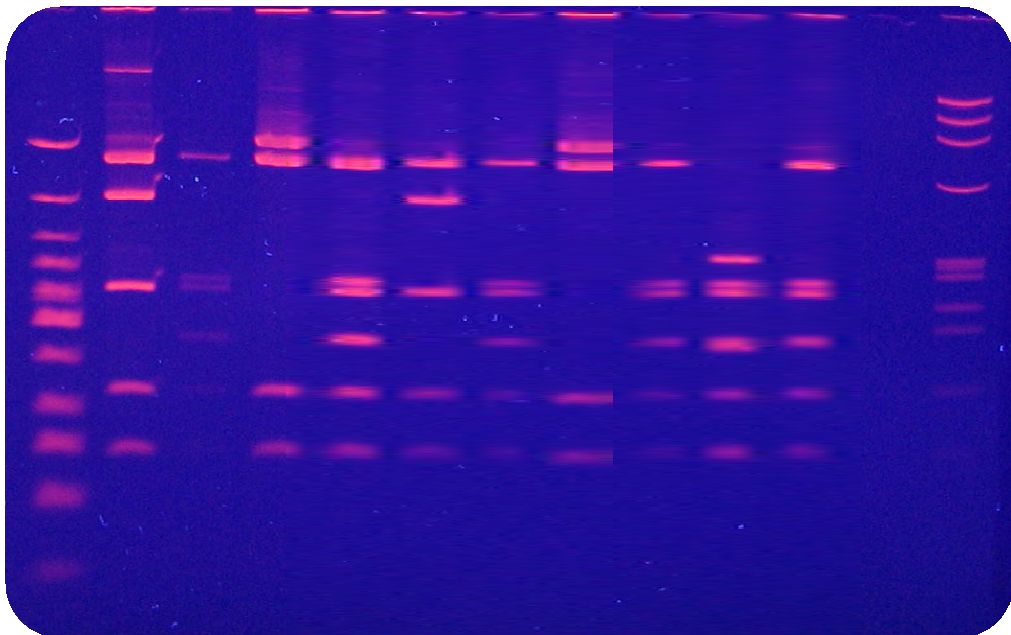


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη παραλλακτικότητας του γονιδίου *vmr1* φυτοπλάσμάτων της ομάδας stolbur που προσβάλλουν φυτά τομάτας στη Ελλάδα»



Πεβερέτος Πέτρος-Γεώργιος

ΒΟΛΟΣ 2013

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ &
ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

Μεταπτυχιακή Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Σπουδών

Κατεύθυνσης 'Σύγχρονη Φυτοπροστασία'

Πεβερέτος Πέτρος Γεώργιος

**«Μελέτη παραλλακτικότητας του γονιδίου *vmr1* φυτοπλάσμάτων της
ομάδας stolbur που προσβάλλουν φυτά τομάτας στη Ελλάδα»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ε. Βέλλιος
Επικ. Καθηγητής
Επιβλέπων

Ι. Γούναρης
Καθηγητής
Μέλος

Σ. Πετρόπουλος
Λέκτορας
Μέλος

Βόλος 2013

Αφιερώνεται στους γονείς μου
και στον αδερφό μου για την
υποστήριξη καθ'όλη την
διάρκεια της μεταπτυχιακής
μου διατριβής

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της παραλλακτικότητας του γονιδίου *vmp1* φυτοπλάσμάτων της ομάδας stolbur που προσβάλλουν φυτά τομάτας. Το *vmp1* γονίδιο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 557 αμινοξέων που πιθανόν να εδράζεται στην μεμβράνη του φυτοπλάσματος. Αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR με το ζεύγος εκκινητών TYRH10 f/r για τον πολλαπλασιασμό μεγάλου μέρους του γονιδίου (1450bp). Στη συνέχεια με RFLP ανάλυση (με την ενδονουκλεάση *Rsa* I) διαχωρίστηκαν 8 διαφορετικά προφίλ πέψης που διαφέρουν ως προς την γεωγραφική εξάπλωση καθώς και ως προς το ποσοστό εμφάνισης αυτών ανα νομό. Συγκεκριμένα το (*vmp1/Rsa* I) PV1 προφίλ βρέθηκε στους νομούς Λάρισας, Φθιώτιδος, Θεσσαλονίκης, Μαγνησίας και Ημαθίας. Το (*vmp1/Rsa* I) PV2 προφίλ βρέθηκε στους νομούς Βοιωτίας, Μαγνησίας, Ηλείας, Λάρισας, Καρδίτσας, Θεσσαλονίκης, Φθιώτιδος και Ημαθίας. Το (*vmp1/Rsa* I) PV3 προφίλ βρέθηκε στους νομούς Λάρισας, Εύβοιας, Μαγνησίας, Θεσσαλονίκης, Βοιωτίας και Ημαθίας. Το (*vmp1/Rsa* I) PV4 προφίλ βρέθηκε στους νομούς Φθιώτιδος, Εύβοιας και Ημαθίας. Το (*vmp1/Rsa* I) PV5 προφίλ βρέθηκε μόνο στο νομό Θεσσαλονίκης. Το (*vmp1/Rsa* I) PV6 προφίλ βρέθηκε μόνο στο νομό Εύβοιας. Το (*vmp1/Rsa* I) PV7 προφίλ βρέθηκε στους νομούς Λάρισας, Μαγνησίας και Φθιώτιδος. Τέλος το (*vmp1/Rsa* I) PV8 προφίλ βρέθηκε μόνο στο νομό Λάρισας. Ως προς το ποσοστό εμφάνισης ανά νομό στο Ν. Λάρισας το PV2 ήταν το επικρατέστερο με ποσοστό 47,08%, στο Ν. Φθιώτιδος υπερίσχυσε το PV1 (53,86%), στο Ν. Θεσσαλονίκης υπερίσχυσε το PV1 (50,02%), στο Ν. Μαγνησίας υπερίσχυσε το PV1 (41,68%) , στο Ν. Ημαθίας υπερίσχυσε το PV1 (40%), στο Ν. Βοιωτίας υπερίσχυσε το PV2 (66,67%) , στο Ν. Ηλείας υπερίσχυσε το PV2 (100%), στο Ν. Καρδίτσας υπερίσχυσε το PV2 (100%) και τέλος στο Ν. Εύβοιας υπερίσχυσε το PV4 (61,55%).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	6
1.1. Γενικά χαρακτηριστικά φυτοπλάσμάτων	6
1.2. Γενικά χαρακτηριστικά ασθενειών προκαλούμενων από φυτοπλάσματα	8
1.3. Διάγνωση ασθενειών προκαλούμενων από φυτοπλάσματα	8
1.4. Συστηματική κατάταξη φυτοπλάσμάτων	10
1.4.1. Γονίδιο <i>tuf</i>	11
1.4.2. Γονίδιο <i>secY</i>	11
1.4.3. Γονίδιο <i>secA</i>	12
1.4.4. Γονίδιο <i>vmp1</i>	12
1.5. Ασθένειες τομάτας προκαλούμενες από φυτοπλάσματα στην Ελλάδα	13
1.5.1. Η καλλιέργεια της τομάτας στην Ελλάδα	13
1.5.2. Ασθένειες προκαλούμενες από φυτοπλάσματα στην Ελλάδα	14
1.2.6. Σκοπός της εργασίας	16
2. Υλικά και μέθοδοι	17
2.1. Προέλευση δειγμάτων ασθενών φυτών τομάτας	17
2.2. Απομόνωση ολικού DNA από τα προσβεβλημένα φυτά	19
2.3. PCR με στόχο το γονίδιο <i>vmp1</i>	20
2.3.1. Επιλογή εκκινητών	20
2.3.2. Συνθήκες PCR	21
2.3.3. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR (TYPH10f/r) σε πηκτή αγαρόζης	22
2.4. Ταυτοποίηση φυτοπλάσμάτων με τη μέθοδο του πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP)	22
2.4.1. Πέψη προϊόντων PCR	22
2.4.2. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης	22
3. Αποτελέσματα	24
3.1. Ανίχνευση του <i>vmp1</i> γονιδίου του φυτοπλάσματος stolbur με PCR(TYPH10f/r)	24
3.2. RFLPs προϊόντος PCR (TYPH10f/r)	26
4. Συζήτηση και συμπεράσματα	44
5. Βιβλιογραφία	47

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή, κ Βέλλιου Ευάγγελου.

Με την ολοκλήρωση της θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς τον κ. Βέλλιο που με εισήγαγε στην Μοριακή Φυτοπαθολογία αναθέτοντας μου ένα τόσο ενδιαφέρον ερευνητικό θέμα. Το συνεχές ενδιαφέρον του, οι σημαντικές υποδείξεις του, η καθοδήγηση του και το επιστημονικό του υπόβαθρο έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εξαιρετική συνεργασία και επικοινωνία το χρονικό διάστημα, καθώς και για τις ουσιαστικές παρεμβάσεις του στη διόρθωση της διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γούναρη Ιωάννη καθώς και τον Λέκτορα κ. Πετρόπουλο Σπυρίδων για το χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση και τη διόρθωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου για την οικονομική και πνευματική υποστήριξη τους σε κάθε μου προσπάθεια.

1. Εισαγωγή

1.1. Γενικά χαρακτηριστικά φυτοπλάσμάτων

Η πρώτη αναφορά για μικροοργανισμούς παρόμοιους με μυκοπλάσματα, που προκαλούν ίκτερο στα φυτά έγινε το 1967 από τους Doi *et al.*, μετά από παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Μέχρι τότε οι ασθένειες με αυτή τη συμπτωματολογική εικόνα είχαν αποδοθεί σε ιολογικές προσβολές (Lee *et al.*, 2000, Bove and Garnier 1998; Musseti and Favali, 2004).

Αρχικά τα φυτοπλάσματα ονομάζονταν MLOs που είναι τα αρχικά του αρχικού όρου Mycoplasma-Like Organisms που σημαίνει οργανισμοί που μοιάζουν με μυκοπλάσματα (που προσβάλλουν τα θηλαστικά). Ο όρος αυτός αντικαταστάθηκε το 1994 στο 10^ο Διεθνές Συνέδριο του Διεθνούς Οργανισμού Μυκοπλασματολογίας με τον όρο φυτοπλάσματα σαν έναν όρο που περιγράφει σωστότερα την ξεχωριστή οντότητα των φυτοπλάσμάτων (Lee *et al.*, 2001).

Έχουν διάμετρο 200-800 μm, διαθέτουν μια κυτοπλασματική μεμβράνη τριών στρωμάτων πάχους 8-10nm (Lee *et al.*, 2000) ενώ στερούνται κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν έντονο πολυμορφισμό καθώς και μεγάλη ελαστικότητα. (Lee *et al.*, 2000; Musseti *et al.*, 2004; Razin *et al.*, 1998). Έχουν ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA (530-2200 kb) με μικρή περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη (Christensen *et al.*, 2005; Kamoun and Hogenhout, 2001, Lee *et al.*, 2000). Η ομοιότητα ως προς την αλληλουχία βάσεων των φυτοπλάσμάτων είναι μεγάλη και φθάνει το 88-90%. Επιπλέον έχουν ανιχνευθεί 2 πλασμίδια σε φυτοπλάσματα των ομάδων I – Aster yellows group, III – X disease group, VI – Clover proliferation group, και XII – Stolbur group (Lee *et al.*, 2000). Μεταξύ των φυτοπλάσμάτων υπάρχει μεγάλη ομοιότητα ως προς την αλληλουχία βάσεων που φτάνει και το 88-90%, σε αντίθεση για τις ομοιότητες μεταξύ των φυτοπλάσμάτων και των ειδών που ανήκουν στο γένος *Acholeplasma* το ποσοστό κυμαίνεται από 87 μέχρι 88,5% (Gundersen *et al.*, 1994; Seemuller *et al.*, 1998).

Μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν υποχρεωτικά παράσιτα που διαβιούν στον ηθμό των φυτών. Η πιθανή εξήγηση για την αδυναμία να τα καλλιεργήσουμε σε τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα θεωρούνταν ότι οφείλεται στο γεγονός κατά την εξελικτική τους πορεία υπέστησαν μείωση του γονιδιώματος τους και απώλεια αρκετών γονιδίων που ρυθμίζουν διάφορες μεταβολικές διεργασίες. Η απώλεια των γονιδίων

αυτών που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση του ATP, καθώς επίσης και για την σύνθεση των αμινοξέων και των νουκλεοτιδίων είναι ένα λόγος που δεν διαθέτουν την ικανότητα ανάπτυξης σε τεχνητά υποστρώματα (Bai *et al.*, 2006). Πιθανόν τα φυτοπλάσματα να προσλαμβάνουν τους παραπάνω μεταβολίτες από το πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά περιβάλλον διαβίωσης τους στο εσωτερικό των ξενιστών, ενώ στα τεχνητά υποστρώματα που έχουν δοκιμαστεί δεν τους παρέρχονταν οι συγκεκριμένες ουσίες (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Hogenhout *et al.*, 2008).

Η ανάπτυξη των φυτοπλάσμάτων σε τεχνητά υποστρώματα κατέστη δυνατή μετά από ενυδάτωση των προσβεβλημένων ιστών σε θρεπτικό διάλυμα PivL (η σύστασή του προστατεύεται από πατέντα), τεμαχισμό αυτών και επώαση στους 25°C, ενώ στη συνέχεια το διάλυμα επώαστηκε σε τρυβλίο με προσθήκη PivS (η σύστασή του προστατεύεται από πατέντα) για 5-7 ημέρες στους 25 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και 95%N₂ (Contaldo *et al.*, 2012).

1.2. Γενικά χαρακτηριστικά ασθενειών προκαλούμενων από φυτοπλάσματα

Στους ξενιστές φυτοπλάσμάτων συμπεριλαμβάνονται πάνω από 300 είδη φυτών που ανήκουν στα γυμνόσπερμα, στα μονοκοτυλήδονα και στα δικοτυλήδονα (Bove *et al.*, 1998; Chistensen *et al.*, 2005). Η μετάδοση της ασθένειας γίνεται με έντομα των οικογενειών *Cicadellidae*, *Fulgoridae*, *Psyllidae*. Οι διατροφικές συνήθειες των εντόμων φορέων είναι ένας παράγοντας που καθορίζει το εύρος ξενιστών για κάθε φυτόπλασμα (Christensen *et al.*, 2005). Ένας άλλος παράγοντας είναι η ευαισθησία ή ανθεκτικότητα των φυτών στα φυτοπλάσματα (Garnier *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1998a; Lee *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2003).

Εκτός των εντόμων φορέων οι φυτοπλασματικές ασθένειες μπορούν να μεταδοθούν με εμβολιασμό, με φανερόγαμα παράσιτα του γένους *Cuscuta* καθώς και με αγενές πολλαπλασιαστικό υλικό (μοσχεύματα, ριζώματα, κονδύλους, βολβούς). Η αντιμετώπιση των ασθενειών που προκαλούνται από φυτοπλάσματα βασίζονται στη ληψη προληπτικών μέτρων όπως η χρησιμοποίηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, η καταπολέμηση των εντόμων φορέων, η εφαρμογή καλλιεργητικών μέτρων, η κατεργασία του εδάφους για καταστροφή των προνυμφών των εντόμων φορέων, η ζιζανιοκτονία για καταστροφή ζιζανίων δευτερευόντων ξενιστών, η καταστροφή ήδη προσβεβλημένων φυτών καθώς και η παρακολούθηση γειτονικών αγρών για πιθανές μολύνσεις φυτών από φυτοπλάσματα (Bove and Garnier, 1998; EPPO/CABI, 2006; Garnier *et al.*, 1999; McCoy *et al.*, 1982; Batlle *et al.*, 2000; Del Serrone *et al.*, 2001; Boudon-Padieu *et al.*, 1999).

1.3. Διάγνωση ασθενειών προκαλούμενων από φυτοπλάσματα

Οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση-χαρακτηρισμό των φυτοπλάσμάτων είναι οι μοριακές μέθοδοι και συγκεκριμένα η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), η 'nested' PCR, ο συνδυασμός PCR με πολυμορφισμό μήκους κλασμάτων περιορισμού DNA (RFLPs) και η PCR αληθούς χρόνου (qPCR) (Lee *et al.*, 2001; Galetto *et al.*, 2010).

Για τις μεθόδους PCR, nested PCR και qPCR έχει σχεδιαστεί ένας μεγάλος αριθμός εκκινητών οι οποίοι είτε είναι γενικευμένοι (ανιχνεύεται η ύπαρξη φυτοπλάσματος οποιαδήποτε ομάδας) είτε είναι εξειδικευμένοι για φυτοπλάσματα μιας συγκεκριμένης ομάδας (Lee *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Galetto *et al.*, 2010).

Η πιο συνηθισμένη περιοχή γονιδιώματος που έχουν σχεδιαστεί να υβριδίζουν οι εκκινητές είναι το γονίδιο 16S rDNA. Η nested PCR βασίζεται κυρίως στο συνδυασμό μίας πρώτης PCR με γενικευμένους εκκινητές και στη συνέχεια ακολουθεί μια δεύτερη με εξειδικευμένους εκκινητές που υβριδίζουν στο προϊόν της πρώτης PCR (Lee *et al.*, 1999). Ο συνδυασμός PCR και RFLP στην περιοχή του γονιδίου 16S rDNA έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί είναι ο κυριότερος και ο πλέον αποδεκτός τρόπος για κατάταξη των φυτοπλάσμάτων σε συγκεκριμένη ομάδα. Οι Wei *et al.*, το 2004 δημιούργησαν μια ψηφιακή πλατφόρμα (λογισμικό) με τη βοήθεια της οποίας γνωρίζοντας την αλληλουχία του 16S rDNA γίνεται πέψη με συγκεκριμένα ένζυμα *in silico* ή και ταξινόμηση του σε συγκεκριμένη ομάδα (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>).

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην πέψη του προϊόντος της PCR με ενδονουκλεάσες, διαχωρισμός των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη ή συνηθέστερα πολυακρυλαμίδης και σύγκριση του προφίλ της πέψης με αυτό που δίνουν φυτοπλάσματος ‘αναφοράς’ που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες (Lee *et al.*, 1998b; Maniatis *et al.*, 1982).

Άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των φυτοπλάσμάτων σε φυτικούς ιστούς ή σε έντομα φορείς είναι η ηλεκτρονική μικροσκοπία και οι ορολογικές μέθοδοι (ανοσοφθορισμός, ανοσοενζυμική ELISA). Η ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέθοδος (ELISA) είναι μια ορολογική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για διάγνωση ασθενειών προκαλούμενες από προκαρυωτικά φυτοπαθογόνα (Ward *et al.*, 2004). Για την εφαρμογή της απαιτείται υψηλής ποιότητας αντιορός που έχει παρασκευαστεί με τη χρήση καθαρής καλλιέργειας παθογόνου σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα. Αυτό δε μπορεί (ακόμα) να επιτευχθεί για όλα τα φυτοπλάσματα με συνέπεια ο αντιορός που παρασκευάζονταν μέχρι τώρα να αντιδρά και με πρωτεΐνες ή άλλα μακρομόρια του φυτού. Αυτός είναι και ο λόγος που η εφαρμογή της μεθόδου είναι περιορισμένη (Lee *et al.*, 1999).

Τέλος, η ηλεκτρονική μικροσκοπία λόγω του υψηλού κόστους του εργαστηριακού εξοπλισμού, δεν εφαρμόζεται για το χαρακτηρισμό των φυτοπλάσμάτων (απαιτείται αντιορρός) αλλά μόνο για την εξακρίβωση φυτοπλάσμάτων στα αγγεία του ηθμού (Baker *et al.*, 1985; Musetti and Favali 2004).

1.4. Συστηματική κατάταξη φυτοπλάσμάτων

Οι Lim και Seers το 1989 ήταν αυτοί που πρότειναν την κατάταξη των φυτοπαθογόνων MLO's στη τάξη των Mollicutes και πρότειναν τη συγγενική σχέση αυτών περισσότερο με το γένος *Acholeplasma* παρά με το γένος *Spiroplasma* ή τα μυκοπλάσματα των ζωικών οργανισμών. Για την κατάταξη τους εντός της κλάσης Mollicutes έχει προταθεί η δημιουργία του προσωρινού (προκαταρτικού *Candidatus:Ca*) γένους *Phytoplasma* (Razin *et al.*, 1998; IRPM: International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology).

Με τις μοριακές μεθόδους που έχουν αναφερθεί στην παράγραφο 1.3 γίνεται η συστηματική κατάταξη των φυτοπλάσμάτων με βάση την αλληλουχία βάσεων του 16S rDNA γονιδίου και μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 25 είδη του γένους *Candidatus Phytoplasma* (Firrao *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2007). Η περαιτέρω διαφοροποίηση των φυτοπλάσμάτων σε υποομάδες της ομάδας stolbur βασίζεται και σε άλλες γονιδιακές περιοχές, όπως η μεταξύ των γονιδίων της παρεμβολόμενης περιοχής (Internal Transcribe Spacer-ITS) 16/23S rDNA (Lee *et al.*, 1999; Seemuller *et al.*, 1998) καθώς και μία ομάδα γονιδίων που έχουν συντηρημένες περιοχές που μπορούν να σχεδιαστούν εκκινητές, αλλά έχουν επίσης και περιοχές που εμφανίζουν μεγάλη παραλλακτικότητα. Αυτά είναι τα γονίδια *tuf*, *secY*, *secA*, *vmpl* που περιγράφονται στις επόμενες παραγράφους (Cimerman *et al.*, 2009; Murolo *et al.*, 2010).

1.4.1. Γονίδιο *tuf*

Το γονίδιο *tuf*, που κωδικοποιεί τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu, είναι ένα άλλο ιδιαίτερα διατηρημένο γονίδιο που έχει συχνά χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση και την ταξινόμηση των φυτοπλάσμάτων. Το 1997, οι Schneider *et al.*, σχεδίασαν ζεύγη εκκινητών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για απομόνωση της *tuf* γονιδιακής αλληλουχίας από τις περισσότερες ομάδες φυτοπλάσμάτων. Βρέθηκε ότι το γονίδιο *tuf*, όπως και το γονίδιο 16S rRNA, αντιπροσωπεύει ένα ικανό δείκτη για την ταξινόμηση των φυτοπλασματικών ομάδων. Οι ομοιότητες στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων μεταξύ των Aster yellows (AY), της X-ασθένειας της ροδακινιάς και του stolbur (STOL) φυτοπλασματικών ομάδων κυμάνθηκαν σε ποσοστά από 87,8 έως 97,0%. Οι φυτοπλασματικές ομάδες και υποομάδες μπορούν να διαφοροποιηθούν με βάση τις αναλύσεις με την μέθοδο των RFLPς χρησιμοποιώντας διάφορα ένζυμα περιορισμού(π.χ. *Hpa* II). Η αποτελεσματικότητά για το διαχωρισμό μεταξύ φυτοπλάσμάτων είναι ελαφρώς χαμηλότερη από εκείνη του 16S rRNA γονιδίου (Schneider *et al.*, 1997; Marccone *et al.*, 2000). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, το γονίδιο *tuf* βρέθηκε να είναι χρήσιμο στη διαφοροποίηση των διαφόρων οικολογικών στελεχών εντός των 16SrRNA υποομάδων (Langer *et al.*, 2004).

1.4.2. Γονίδιο *secY*

Το γονίδιο *secY*, το οποίο κωδικοποιεί μία υπομονάδα πρωτεΐνης της μεταθετάσης, είναι ένας άλλος μοριακός δείκτης που είναι χρήσιμος για την αξιόπιστη διαφοροποίηση των στελεχών των φυτοπλάσμάτων. Η μεταβλητότητα της αλληλουχίας του *secY* γονιδίου είναι παρόμοια με εκείνη των *rp* γονιδίων. Η ακολουθία του *secY* γονιδίου παρουσιάζει ομοιότητες μεταξύ των δύο 16Sr φυτοπλασματικών υποομάδων με την ομοιότητα να κυμαίνεται από 57,4 έως 76,0% (Lee *et al.*, Αδημοσίευτο). Οι υποομάδες που οριοθετούνται με το γονίδιο *secY* και με την βοήθεια των αναλύσεων RFLP ταξινομούν τα φυτοπλάσματα στις ομάδες 16SrI και 16SrV φυτοπλάσμάτων, γενικά συμφωνούσαν με εκείνες που οριοθετούνται με το *rp* γονίδιο (Lee *et al.*, 2006; Martini *et al.*, 2007). Εντούτοις, λόγω των πιο κατατοπιστικών χαρακτήρων του γονιδίου αυτού, η αξιοπιστία του *secY* γονιδίου είναι ελαφρώς καλύτερη από το *rp* γονίδιο. Το γονίδιο *secY*, όπως το γονίδιο *rp*, θα

μπορούσε να αποτελέσει έναν καλό υποψήφιο δείκτη για την ταξινόμηση των στελεχών των φυτοπλάσμάτων.

1.4.3. Γονίδιο *secA*

Μια ακόμα υπομονάδα πρωτεΐνης της μεταθετάσης που κωδικοποιείται από το *secA* γονίδιο βρέθηκε ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διαφοροποίηση των φυτοπλάσμάτων. Μέρος της γονιδιακής αλληλουχίας, (περίπου 480bp), ενισχύθηκε με PCR από διάφορα στελέχη φυτοπλάσμάτων που αντιπροσωπεύουν 12 ομάδες 16Sr. Οι ομοιότητες της αλληλουχίας κυμάνθηκαν σε ποσοστά από 69,7% έως 84,4% ανάμεσα σε δύο 16Sr ομάδες. Η ικανότητα του *secA* γονιδίου ως παράμετρος για την διαφοροποίηση των φυτοπλάσμάτων είναι παρεμφερής με των *tr* και *secY* γονιδίων (Hodgetts *et. al.*, 2008).

1.4.4. Γονίδιο *vmpl*

Το γονίδιο *vmpl* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 557 αμινοξέων που πιθανόν εδράζεται στην μεμβράνη του φυτοπλάσματος. Το γονίδιο *vmpl* χρησιμοποιείται για την περαιτέρω ομαδοποίηση των φυτοπλάσμάτων της ομάδας stolbur. Μια τέτοια προσπάθεια σε ευρεία κλίμακα, έγινε στο πλαίσιο του Ευρωπαϊκού προγράμματος SEERA.NET με τίτλο: Typing of stolbur phytoplasma isolates (group 16SrXII-A)(Murolo *et. al.*, 2010) με τη δοκιμή ενός μεγάλου αριθμού φυτοπλάσμάτων της ομάδας stolbur. Το αποτέλεσμα ήταν να διαχωριστούν 21 διαφορετικές ομάδες μετά από RFLPs με συγκεκριμένα ένζυμα περιορισμού του προϊόντος PCR του *vmpl*. Αυτή η ποικιλομορφία του γονιδίου *vmpl* θα μπορούσε να επηρεάσει τη σχέση μεταξύ φυτοπλάσματος-ξενιστή ή φυτοπλάσματος-φορέα, διότι μέρος της πρωτεΐνης-προϊόντος του *vmpl* γονιδίου είναι εκτεθειμένη εξωτερικά του κυττάρου του φυτοπλάσματος (Murolo *et. al.*, 2010).

1.5. Ασθένειες τομάτας προκαλούμενες από φυτοπλάσματα στην Ελλάδα

1.5.1. Η καλλιέργεια της τομάτας στην Ελλάδα

Η τομάτα είναι ένα από τα πιο δημοφιλή και ευρέως καλλιεργούμενα φυτά στην Ελλάδα. Οι καλλιεργούμενοι τύποι ανήκουν στο είδος *Lycopersicon esculentum*. Προέρχεται από την Νότια Αμερική. Η τομάτα ανήκει στην οικογένεια *Solanaceae* και στο γένος *Lycopersicon*. Το γένος συμπεριλαμβάνει 12 είδη. Είναι φυτό που καλλιεργείται στην Ελλάδα σαν ετήσιο, έχει θαμνώδη ανάπτυξη καθώς, σχηματίζει πολλούς βλαστούς, ενώ τα φύλλα του είναι σύνθετα περωτά διατεταγμένα κατ'εναλλαγή (Βαρδαβάκης, 1993).

Συστηματική ταξινόμηση

<u>Βασίλειο:</u>	Φυτά (Plantae)
<u>Συνομοταξία:</u>	Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)
<u>Ομοταξία:</u>	Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)
<u>Υφομοταξία:</u>	Αστερίδες (Asteridae)
<u>Τάξη:</u>	Στρυχνώδη (Solanales)
<u>Οικογένεια:</u>	Σολανώδη (Solanaceae)
<u>Γένος:</u>	Λυκοπερσικόν(Lycopersicon)
<u>Είδος:</u>	<i>S. lycopersicum</i>

Πηγή: Βαρδαβάκης, 1993

Παρά τη μείωση της καλλιεργούμενης έκτασης, η καλλιέργεια τομάτας συνεχίζει να έχει μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον για τη χώρα μας και θεωρείται ως μία καλλιέργεια που θα εξακολουθήσει να ενδιαφέρει και στο μέλλον τους Έλληνες παραγωγούς. Συγκεκριμένα το 2009 καλλιεργήθηκαν 323.500 στρέμματα με ποσότητα παραγωγής τους 1.561.311 τόνους, το 2010 καλλιεργήθηκαν 242.000 στρέμματα με ποσότητα παραγωγής τους 1.406.200 τόνους και το 2011 καλλιεργήθηκαν 198.000 στρέμματα με ποσότητα παραγωγής τους 1.169.900 τόνους (<http://faostat.fao.org>).

1.5.2. Ασθένειες προκαλούμενες από φυτοπλάσματα στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα έχουν περιγραφεί δύο ασθένειες της τομάτας με παθογόνο αίτιο φυτόπλασμα, η ασθένεια stolbur και η ασθένεια γνωστή ως γιαντοφθαλμία της τομάτας (big bud) (Alivizatos, 1989; Alivizatos, 1993). Κατόπιν έρευνας όμως στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αποδείχθηκε ότι και αυτή προέρχεται από φυτοπλάσματα της ομάδας stolbur. Άρα αποτελεί διαφορετική η συμπτωματολογική εικόνα της ίδιας ασθένειας που πιθανώς οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες ή σε διαφορετική αντίδραση στο παθογόνο διαφορετικών ποικιλιών τομάτας (Alivizatos, 1993). Η πρώτη αναφορά της ασθένειας stolbur έγινε στην Τσεχοσλοβακία το 1932 και έκτοτε έχει αναφερθεί στην Ουγγαρία, Αυστρία, Γαλλία, Ελβετία, Ιταλία, πρώην Γιουγκοσλαβία, Βουλγαρία, Ρουμανία, Ηνωμένο Βασίλειο, Σαουδική Αραβία και Ιράκ. Τα φυτοπλάσματα που προκαλούν την ασθένεια ανήκουν στην ομάδα XII με εξαίρεση τα φυτά πιπεριάς όπου εμφάνισαν χαρακτηριστικά συμπτώματα της ασθένειας και τα φυτοπλάσματα ανήκαν στην ομάδα VI (Πίνακας 1) (Lee *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1998b; Lavina and Batlle, 2002; Seruga *et al.*, 2000; Batlle *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2003; Castro and Romero, 2002; Bertaccini *et al.*, 1999; Terlizzi *et al.*, 2006). Εκτός από τα φυτά που αναφέρονται στον Πίνακα 1, ξενιστές φυτοπλάσμάτων της ομάδας stolbur είναι ακόμα 18 είδη 6 οικογενειών (*Convolvulus arvensis*), αγριοτομάτα (*Solanum nigrum*), πεντάνευρο (*Plantago lanceolata*), βρωμολάχανο (*Lepidium draba*), τραχύ βλήτο (*Amaranthus retroflexus*), λουβουδιά (*Chenopodium album*), κίρσιο (*Cirsium arvense*), λεβάντα (*Lavandula officinalis*), αμυγδαλιά (*Prunus dulcis*) (Batlle *et al.*, 2000; Maixner *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1997a), αμπέλι (*Vitis vinifera*), σέλινο (*Apium graveolens*), βυσσινιά (*Prunus cerasus*) (Marccone *et al.*, 1999), αχλαδιά (*Pyrus communis*), νεκταρινιά – (*Persica laevis*), μηδική (*Medicago sativa*) (Pilkington *et al.*, 2003), πράσο (*Allium ampeloprasum*) (Bertaccini *et al.*, 1999), αβοκάντο (*Persea americana*) (Lavifia and Batlle, 2002) και φράουλα (*Fragaria ananassa*) (Terlizzi *et al.*, 2006).

Στα χαρακτηριστικά συμπτώματα που εμφανίζουν τα προσβεβλημένα φυτά τομάτας περιλαμβάνονται: η μικροφυλλία, η σκούπα της μάγισσας, τα παραμορφωμένα στείρα άνθη, (συνδεδεμένα ή χωριστά υπερμεγέθη σέπαλα με νευρώσεις ερυθρού χρώματος, επιμήκεις ύπερους, υποτυπώδεις στήμονες,

πεπαχυμένους ποδίσκου), η μικροκαρπία, η πάχυνση του ποδίσκου των καρπών (EPPO/CABI, 2006; Pracros *et al.*, 2006; Alivizatos, 1989). Σε φυτά πιπεριάς έχουν παρατηρηθεί βραχυγονάτωση, γιγαντοφθαλμία, πρασίνισμα ή χλωρανθία, σέπαλα συνδεδεμένα μεταξύ τους, και αποτυχία καρπόδεσης (Castro and Romero, 2002).

Αντίστοιχα σε φυτά τομάτας με υποτιθέμενη προσβολή από φυτόπλασμα της ομάδας big bud έχουν παρατηρηθεί: πάχυνση στελεχών και βλαστών, αναπτυξη μεγάλων ανθοφόρων κωνοειδών οφθαλμών, βλαστομανία βραχέων και παχέων βλαστών, βραχυγονάτωση και φυλλωδία (Alivizatos, 1993).

Πίνακας 1. Κατάταξη των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια stolbur στη τομάτα και σε άλλους ξενιστές

Φυτό - Ξενιστής	Χώρα	Ομάδα φυτοπλάσματος	Βιβλιογραφία
Αβοκάντο	Ιταλία	16S rDNAXII	Lavina and Batlle, 2002
Αμπέλι	Κροατία	16S rDNAXII-A	Seruga <i>et al.</i> , 2000
Αμπέλι	Σερβία	16S rDNAXII-A	Seruga <i>et al.</i> , 2000
Αμπέλι, περικοκλάδα, αγριοσίκαλη, λεβάντα, αγριοτομάτα	Ισπανία	16S rDNAXII-A	Batlle <i>et al.</i> , 2000
Πιπεριά	Ισπανία	16S rDNA VI	Castro and Romero, 2002
Πιπεριά	Σερβία	16S rDNA XII	Lee <i>et al.</i> , 1998b; Schneider <i>et al.</i> , 1997b
Πράσο	Ιταλία, Τσεχία	16S rDNA XII-A	Bertaccini <i>et al.</i> , 1999
Τομάτα	Ιταλία	16S rDNA XII	Del Serrone <i>et al.</i> , 2001
Φράουλα	Ιταλία	16SrDNAXII-A	Terlizzi <i>et al.</i> , 2006

1.2.6. Σκοπός της εργασίας

Το θέμα που πραγματεύεται η παρούσα εργασία είναι η μελέτη της παραλλακτικότητας του γονιδίου *vmr1* των φυτοπλάσμάτων της ομάδας Stolbur που προσβάλουν φυτά τομάτας στην Ελλάδα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική PCR με εκκινητές που υβριδίζουν στην αρχή και στο τέλος του γονιδίου *vmr1* και στη συνέχεια το προϊόν της PCR υποβλήθηκε σε πέψη με περιοριστικά ένζυμα (RFLPs).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Προέλευση δειγμάτων ασθενών φυτών τομάτας

Τα δείγματα από ασθενή φυτά τομάτας συλλέχθηκαν κατά τα έτη 2006, 2007 και 2008 από τους νομούς Λάρισας, Φθιώτιδος, Θεσσαλονίκης, Μαγνησίας, Ημαθίας, Βοιωτίας, Ηλείας, Καρδίτσας και Εύβοιας (Πίνακας 2) από την ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας. Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε βαθιά στην κατάψυξη (-80°C) μέχρι να γίνει η εξαγωγή του ολικού DNA. Σε προηγούμενη εργασία είχε ταυτοποιηθεί η παρουσία φυτοπλάσμάτων σε αυτά τα δείγματα με PCR (Κασσαβέτη, 2007).

Πίνακας 2. Προέλευση και κωδικοποίηση των δειγμάτων

Κωδικός δειγματοληψίας	Περιοχή δειγματοληψίας
VIII	Μικροθήβες Μαγνησίας
IX	Νεράδα Μαγνησίας
X	Άγιος Δημήτριος Βοιωτίας
XI	Ορχομενός Βοιωτίας
XII	Βρυσιά Λάρισας
XIII	Λεβεντοχώρι Ηλείας
XIV	Κορακοχώρι Ηλείας
XV	Εφύρα Ηλείας
XVII	Αγιά Λάρισας
XVIII	Αχίλλειο Λάρισας
XIX	Ριζόμυλος Μαγνησίας
XX	Παλαμάς Φθιώτιδος
XXI	Ξυνιάδα Φθιώτιδος
XXII	Ψαχνά Εύβοιας
XXIII	Ψαχνά Εύβοιας
XXIV	Μαντούδι Εύβοιας
XXV	Μαντούδι Εύβοιας
XVI	Σταγαίικα Αχαΐας
XXVI	Νεοχώρι Εύβοιας
XXVII	Νεοχώρι Εύβοιας

XXVIII	Αρέθουσα Θεσσαλονίκης
XXIX	Βελεστίνο Μαγνησίας
XXXVI	Σκουροχώρι Ηλείας
XLI	Μαντούδι Εύβοιας
XLII	Αύρα Θεσσαλονίκης
XLIV	Παλαμάς Φθιώτιδος
XLV	Παλαμάς Φθιώτιδος
XLVI	Παλαμάς Φθιώτιδος
XLVII	Στεφανοβίκειο Μαγνησίας
XLVIII	Σωτήριο Λάρισας
XLIX	Σωτήριο Λάρισας
L	Λοφίσκος Λάρισας
LII	Εργοστάσιο τομάτας Λάρισας
LIII	Καρυές Φθιώτιδος
LIV	Καρυές Φθιώτιδος
LV	Πλάτανος Ημαθίας
LVI	Χάλκη Λάρισας
LVII	Αγχιάλος Μαγνησίας
LIX	Πέτρα Καστοριάς
LX	Μαντούδι Εύβοιας
LXI	Σαλαμίνα Αττικής
LXIV	Παλαμάς Φθιώτιδος
LXV	Σοφάδες Καρδίτσα
LXVIII	Μελισσοχώρι Καρδίτσα
LXIX	Δασοχώρι Καρδίτσα
LXX	Λάρισα
LVIII	Παλαμάς Φθιώτιδος
LXVII	Φίλια Καρδίτσας
LXXI	Λάρισα
LXXII	Άνω κάμηλα Σερρών

2.2. Απομόνωση ολικού DNA από τα προσβεβλημένα φυτά

Το ολικό DNA φυτών προσβεβλημένων με φυτοπλάσματα, καθαρίστηκε με βάση τις μεθόδους που περιγράφονται από τους Muhammad *et. al.*, (1994), και Doyle and Doyle με μερικές τροποποιήσεις. Κατεψυγμένα φύλλα και βλαστοί (1 g περίπου) κονιορτοποιήθηκαν με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Η σκόνη που προέκυψε αναμίχθηκε με 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος CTAB-1 (2% hexadecyltrimethylammonium bromide, 1.4M NaCl, 0.2% 2-mercaptoethanol, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl, pH=8,0) σε θερμοκρασία 60 °C και 50mg PVPP (polyvinylpyrrolidone) και το μείγμα που προέκυψε επώαστηκε στους 60 °C για 30 min. Ακολούθησε καθαρισμός του δείγματος με προσθήκη μισού όγκου χλωροφορμίου και μισού όγκου φαινόλης, καλή ανάδευση και φυγοκέντρωση σε 17900 xg για 5min. σε θερμοκρασία δωματίου. Από τις 2 φάσεις που προέκυψαν παραλήφθηκε η υδατική φάση και προστέθηκε ποσότητα 5M NaCl ίση με το μισό όγκο του αρχικού διαλύματος και δύο όγκοι 95% αιθυλική αλκοόλη (EtOH) θερμοκρασίας -20 °C. Το δείγμα καταψύχθηκε στη συνέχεια για 1hr και ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 17.900 xg για 10 min. Μετά την απόρριψη της υπερκείμενης φάσης το ίζημα υπέστη πλύση με EtOH 70% και προσθήκη 100μl υπερκάθαρου νερού (milipore). Το RNA καταστράφηκε στη συνέχεια μετά από επώαση του δείγματος με 0,5μg/ml RNase A στους 37 °C για 30 min. Το ένζυμο απομακρύνθηκε με καθαρισμό του δείγματος με φαινόλη και χλωροφόρμιο όπως έχει ήδη περιγραφεί. Το DNA κατακρημνίστηκε με φυγοκέντρωση σε 17.900 xg για 10min αφού προηγουμένως είχαν προστεθεί στην υδατική φάση 3M οξικού νατρίου (όγκου ίσου με το 1/10 του όγκου της υδατικής φάσης) και 100% EtOH (ποσότητας ίση με 2,5 όγκους της υδατικής φάσης) και είχε ακολουθήσει κατάψυξη του δείγματος (-20 °C) για 1 hr. Τέλος το ίζημα πλύθηκε δύο φορές με 70% EtOH και μία φορά με 100% EtOH και μετά την ξήρανση του σε θερμοκρασία δωματίου επαναδιαλύθηκε σε 100μl υπερκάθαρου νερού και αποθηκεύτηκε στους -20 °C.

2.3. PCR με στόχο το γονίδιο *vmp1*

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πρώτο δείγμα που έδωσε θετική αντίδραση, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν α) DNA από υγιές φυτό τομάτας και β) δείγμα χωρίς DNA.

2.3.1. Επιλογή εκκινητών

Η επιλογή των εκκινητών έγινε βάση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών TYRH10 forward / TYRH10 reverse του οποίου οι αλληλουχίες φαίνονται στον Πίνακα 3 (Fialova *et. al.*, 2009). Το τμήμα του DNA που πολλαπλασιάζεται με τη χρήση του συγκεκριμένου ζεύγους εκκινητών είναι 1450 bp και περιλαμβάνει σχεδόν όλο το *vmp1* γονίδιο (Murolo *et. al.*, 2010).

Πίνακας 3. Αλληλουχία του ζεύγους TYRH10 εκκινητών

<u>Όνομα εκκινητή</u>	<u>Αλληλουχία εκκινητή</u>
TYRH10 forward	AACGTTTCATCAACAATCAGTC
TYRH10 reverse	CACTTCTTTCAGGCAACTTC

2.3.2. Συνθήκες PCR

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνίσκους PCR 0.2 ml (Greiner bio-one) και ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50 μl. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 5 μl 10x PCR buffer (Standard *Taq* Reaction Buffer, New Englands Biolabs, NEB), 5 μl 2mM dNTPs (Invitrogen), 1 μl (20pmol/μl) από κάθε εκκινητή, 0,5 μl *Taq* πολυμεράση (5units/μl), 36.5 μl υπερκάθαρου (milipore) νερού και 1μl DNA (περίπου 50ng/μl). Στη συνέχεια, οι μικροσωληνίσκοι τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή (Mastercycle gradient, Eppendorf, Ελλάδα) (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 Θερμοκυκλοποιητής Mastercycle Eppendorf

Το θερμοκρασιακό προφίλ της αντίδρασης PCR (Murolo *et. al.*, 2010) ήταν ως εξής: 94 °C για 4 min για τον πρώτο κύκλο και στη συνέχεια στους 94 °C για 30 sec, στους 55 °C για 30 sec και 72 °C για 2 min για 35 κύκλους. Η αντίδραση ολοκληρωνόταν με ένα τελευταίο κύκλο στους 72 °C για 7 min.

2.3.3. Ηλεκτοφόρηση των προϊόντων της PCR (TYPH10f/r) σε πηκτή αγαρόζης

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 1,05% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE (10,8 g Tris base, 5,5 g βορικού οξέος, 4 ml 0,5 M EDTA pH=8,0) σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (horizontal electrophoresis mini and big unit, Sigma- Aldrich). Πέντε μικρόλιτρα (5μl) του προϊόντος της PCR αναμείχθηκαν με 3 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης δείγματος (Loading buffer: 0,25% bromophenol blue, 0,25% xylene cyanol, 15% Ficoll Type 400, Pharmacia) και τοποθετήθηκαν στα βοθρία της πηκτής. Ως δείκτης μοριακού βάρους τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε 1 kb DNA ladder (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 kb, NEB, New England Biolabs) σε ποσότητα 7 μl. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 100 V και διήρκησε 40 min. Κατόπιν, η πηκτή εμβαπτίστηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθυδίου (1,6 μg/ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE για 40 min και μετά πραγματοποιήθηκε πλύσιμο με τρεχούμενο νερό βρύσης. Τέλος, για να γίνει ορατή η ζώνη των προϊόντων της PCR, ακολούθησε έκθεση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (μήκος κύματος 312 nm) και φωτογράφιση της πηκτής.

2.4. Ταυτοποίηση φυτοπλάσμάτων με την μέθοδο του πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP)

2.4.1. Πέψη προϊόντων PCR

Το προϊόν της PCR (με εκκινητές TYPH10 f/r) υπέστη πέψη με την ενδονουκλεάση *Rsa* I (Murolo *et. al.*, 2010).

Η αντίδραση της πέψης πραγματοποιήθηκε σε σωλήνες Eppendorf 1,5 ml και σε συνολικό όγκο 20 μl. Τα αντιδρώντα ήταν: 2 μl ρυθμιστικό διάλυμα εξειδικευμένο για το *Rsa* I ένζυμο (NEBuffer, NEB1), 0,5 μl ένζυμο *Rsa* I, 7,5 μl, milipore H₂O και 10 μl προϊόν PCR (TYPH10f/r). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37°C για 18-20 ώρες.

2.4.2. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

Η ανάλυση των κλασμάτων των RFLPs έγινε με κάθετη ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης 5%, πάχους 1mm (PAGE) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE. Για την παρασκευή 5% πολυακρυλαμίδης αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα ακρυλαμίδη 30% αναμειγνύοντας 29% w/v ακρυλαμίδη και 1% w/v N,N-methylenebisacrylamide. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε η πηκτή αναμειγνύοντας 16,6% v/v διάλυμα ακρυλαμίδης 30% με 62,7% v/v diH₂O, 20% v/v 5xTBE(54 g Tris base, 27,5 g Boric acid και 20ml 0,5 M EDTA, pH=8), 0.035% TEMED και 0,070% AMPS. Σε κάθε δείγμα (20,0 μl από τον προϊόν της πέψης) προστέθηκαν 3 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης δείγματος και ως δείκτες μοριακού βάρους των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκαν 20 μl ΦΧ174 DNA-*Hae* III Ladder (72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1.078, 1.353 bp NEB) και 20 μl Low Molecular Weight DNA Ladder (25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 500, 766 bp NEB). Η ηλεκτροφόρηση διήρκεσε 2 hr σε τάση 60V (Εικόνα 2.2). Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή πολυακρυλαμίδης εμβαπτίστηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθυδίου (1,6 μg/ml) σε TBE για 1 hr και ακολούθησε έκπλυση αυτής σε di-H₂O για 30 min. Τέλος, όπως και στην οριζόντια ηλεκτροφόρηση, οι θέσεις του DNA έγιναν ορατές με τοποθέτηση της πηκτής σε τράπεζα φθορισμού και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 312 nm.

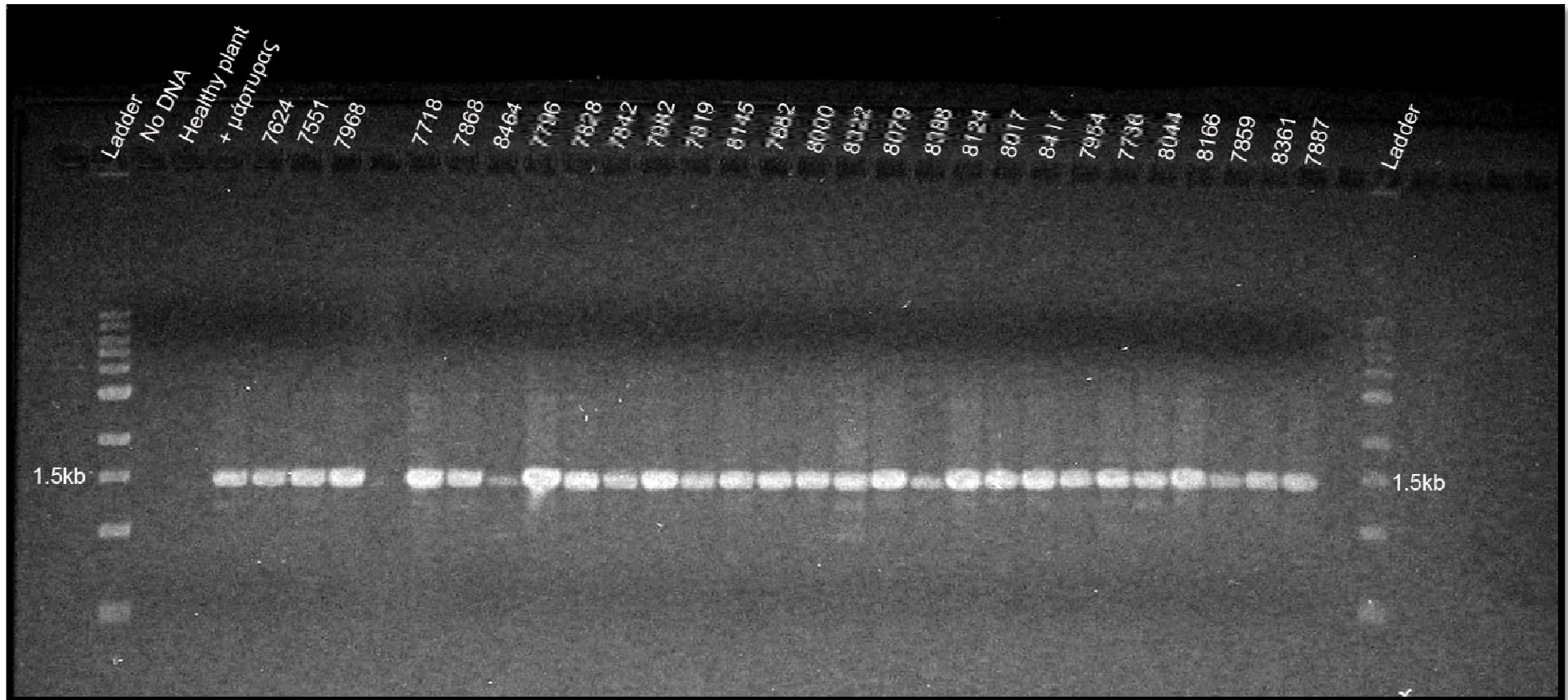


Εικόνα 2.2 Ηλεκτροφόρησης της πηκτής πολυακρυλαμίδης

3.Αποτελέσματα

3.1. Ανίχνευση του *vmr1* γονιδίου του φυτοπλάσματος stolbur με PCR (TYRH10f/r)

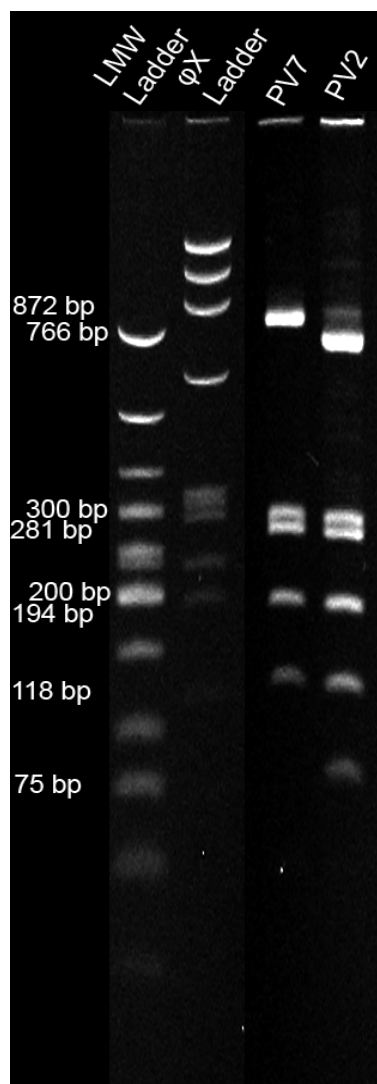
Από τα 77 δείγματα που εξετάστηκαν όλα έδωσαν προϊόν στην PCR με το ζεύγος των εκκινητών TYRH10f/r. Τα προϊόντα της PCR είχαν το αναμενόμενο μέγεθος των 1450bp (Εικόνα 3.1). Ο θετικός μάρτυρας έδινε σταθερά το ίδιο προϊόν επιβεβαιώνοντας την ομαλή εξέλιξη της αντίδρασης ενώ κανένας από τους αρνητικούς μάρτυρες (υγιές φυτό, αντίδραση χωρίς προσθήκη DNA-No DNA) δεν έδωσε προϊόν (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Προϊόντα PCR με χρήση εκκινητών TYRH10 *f/r* σε πηκτή αγαρόζης (1,05% σε TBE). Ladder 1kb (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 kb). Υγιές φυτό, No DNA: αρνητικοί μάρτυρες (PCR με DNA από υγιές φυτό τομάτας και χωρίς προσθήκη DNA αντίστοιχα). +μάρτυρας : PCR με DNA από το πρώτο φυτό που έδωσε το αναμενόμενο προϊόν (1450bp). 7624...7887 DNA από φυτά τομάτας που φέρουν συμπτώματα.

3.2. RFLPs προϊόντος PCR (TYRH10 f/r)

Για τη μελέτη παραλλακτικότητας του γονιδίου *vmr1*, του φυτοπλάσματος της ομάδας Stolbur που προσβάλλει φυτά τομάτας στην Ελλάδα, έγινε πέψη του προϊόντος της PCR (TYRH10 f/r) των υπό εξέταση δειγμάτων (77) με την ενδονουκλεάση *Rsa* I. Διαχωρίστηκαν οκτώ διαφορετικά προφίλ (PV1, PV2, PV3, PV4, PV5, PV6, PV7, PV8). Το προφίλ PV1 αντιπροσωπεύει το 23,37% των δειγμάτων (18 από τα 77), το προφίλ PV2 αντιπροσωπεύει το 35,06% των δειγμάτων (27 από τα 77), το προφίλ PV3 αντιπροσωπεύει το 16,88% των δειγμάτων (13 από τα 77), το προφίλ PV4 αντιπροσωπεύει το 12,98% των δειγμάτων (10 από τα 77), το προφίλ PV5 αντιπροσωπεύει το 1,29% των δειγμάτων (1 από τα 77), το προφίλ PV6 αντιπροσωπεύει το 1,29% των δειγμάτων (1 από τα 77), το προφίλ PV7 αντιπροσωπεύει το 7,79% των δειγμάτων (6 από τα 77) και το προφίλ PV8 αντιπροσωπεύει το 1,29% των δειγμάτων (1 από τα 77). Τα αποτελέσματα φαίνονται στις εικόνες 3.2-3.4.



Pair Bases

PV7

872

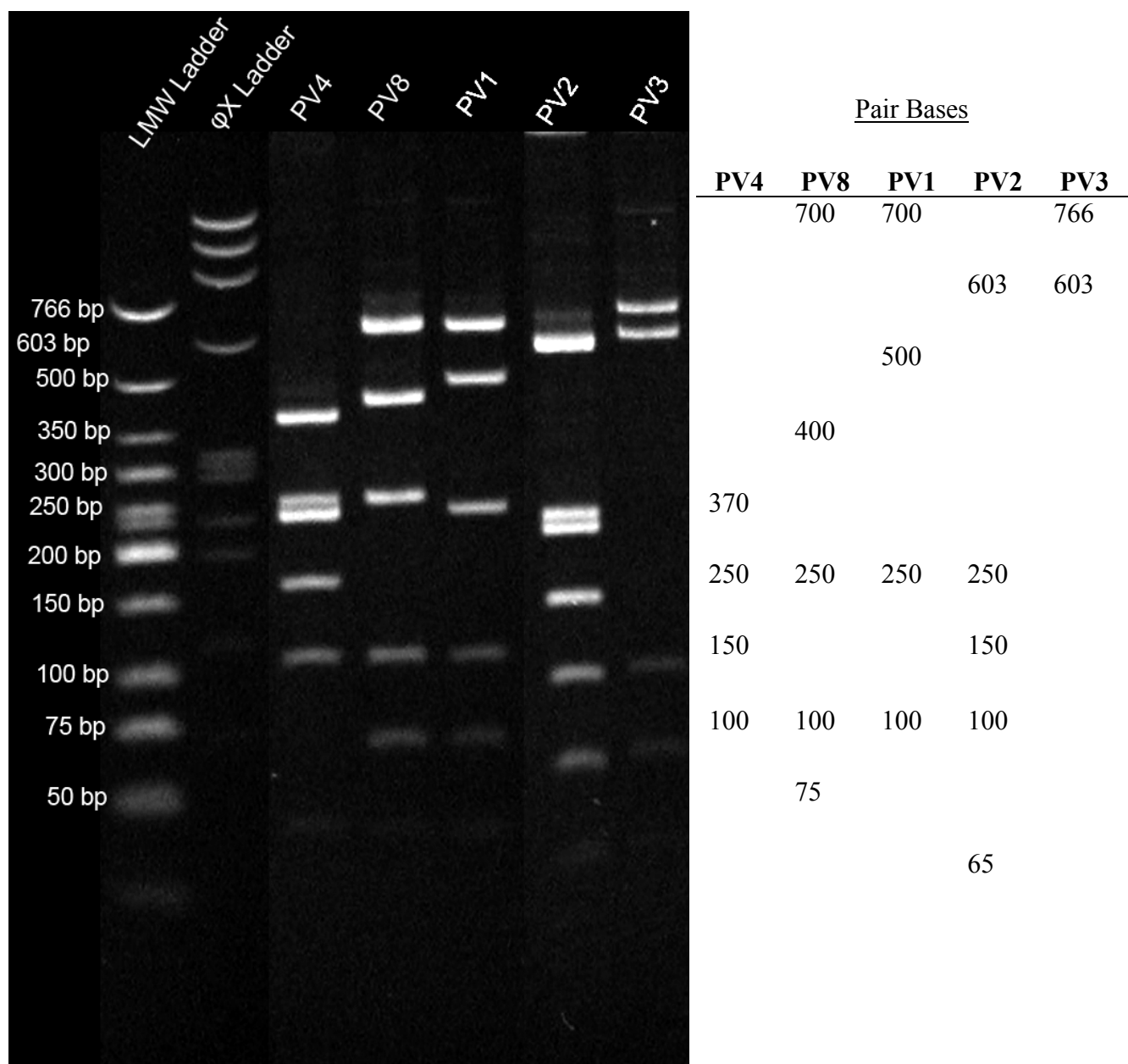
300

281

200

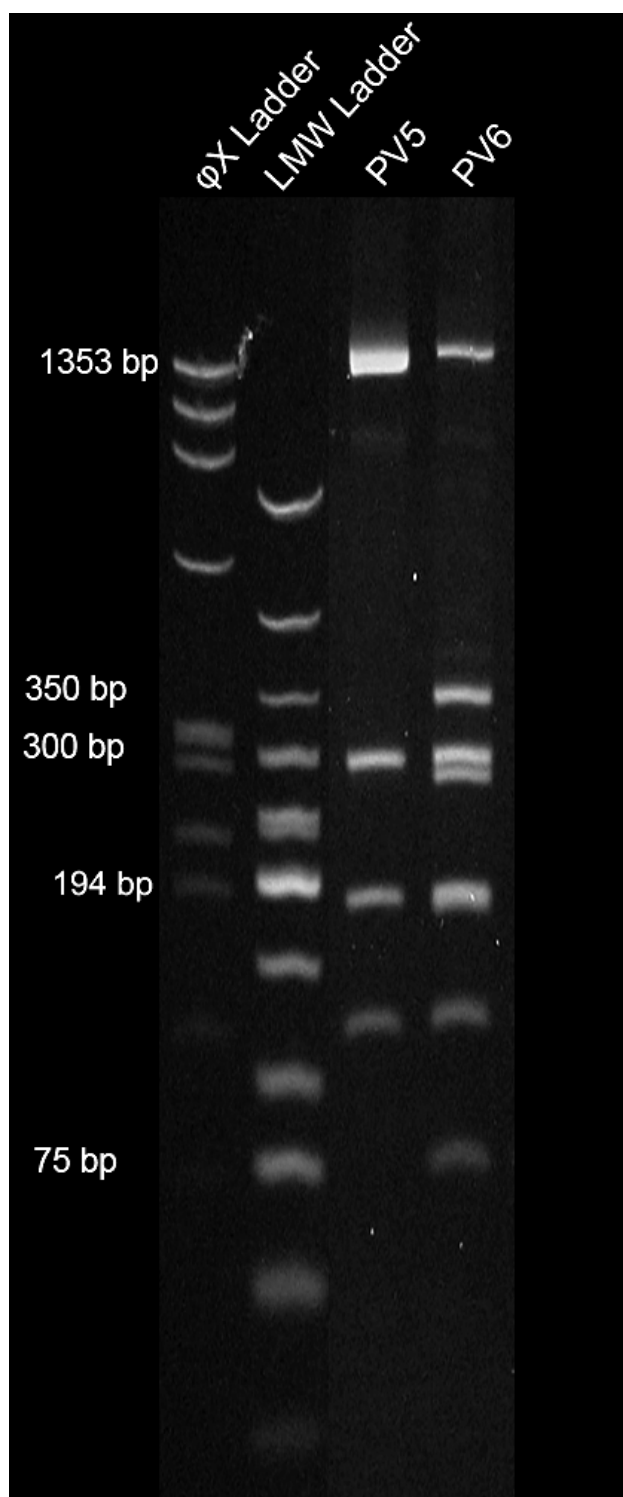
118

Εικόνα 3.2 RFLP ανάλυση των προϊόντων της PCR TYPH10 f/r στα οποία έγινε πέψη με το ένζυμο *Rsa* I. Low Molecular Weight Ladder (25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 500, 766 bp) και φX174 DNA – *Hae* III Digest Ladder (72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353 bp). PV7 :872, 300, 281, 200, 118 bp. PV2: 766, 300, 281, 194, 118, 75 bp



Εικόνα 3.3 RFLP ανάλυση των προϊόντων της PCR TYPH10 f/r στα οποία έγινε πέψη με το ένζυμο *Rsa* I. Low Molecular Weight Ladder (25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 500, 766 bp) και φX174 DNA – *Hae* III Digest Ladder (72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353 bp). PV4: 370, 250, 150, 100 bp. PV8: 700, 400, 250, 100, 75 bp. PV1: 700, 500, 250, 100 bp. PV2: 603, 250, 150, 100, 65 bp. PV3: 766, 603 bp.

<u>Pair Bases</u>	
<u>PV5</u>	<u>PV6</u>
1353	1353
	350
300	300
	281
194	194
	75

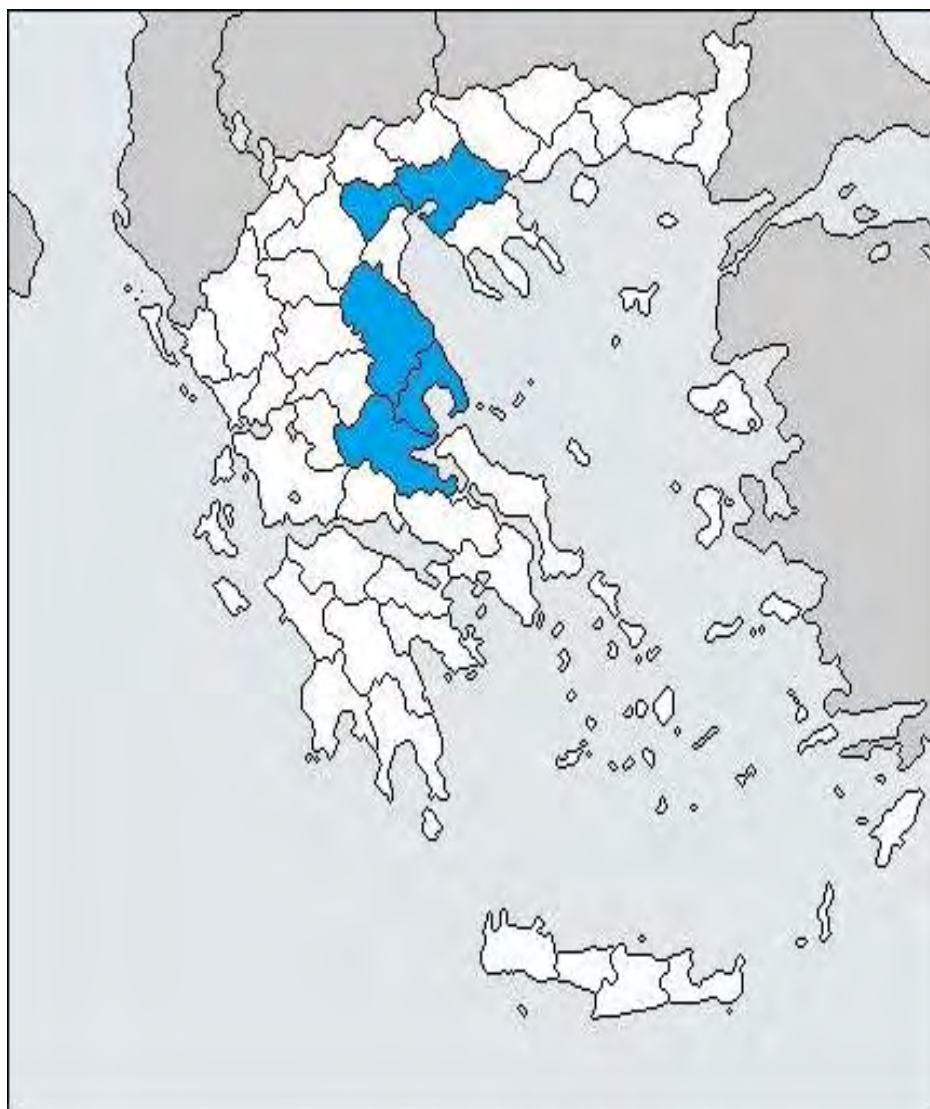


Εικόνα 3.4 RFLP ανάλυση των προϊόντων της PCR TYPH10 f/r στα οποία έγινε πέψη με το ένζυμο *Rsa* I. Low Molecular Weight Ladder (25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 500, 766 bp) και φX174 DNA – *Hae* III Digest Ladder (72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353 bp). PV5: 1353, 300, 194, 175 bp. PV6: 1353, 350, 350, 281, 194, 175, 75 bp

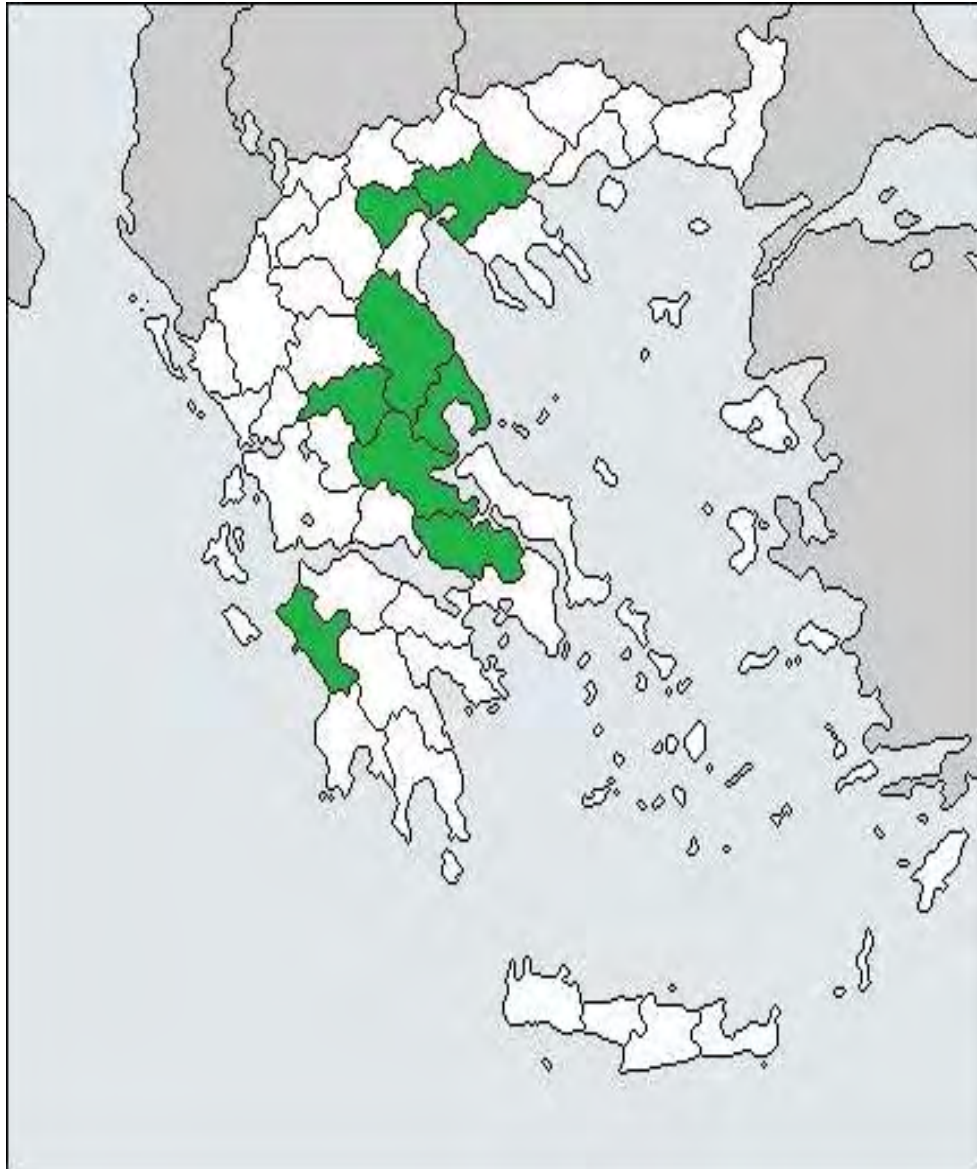
Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1 τα διαφορετικά προφίλ του γονιδίου *vmr1*, μετά από πέψη με την ενδονουκλεάση *RsaI* (προφίλ *vmr1/Rsa I*), δεν εμφανίζονται με την ίδια συχνότητα σε όλες τις περιοχές της Ελλάδας (Πίνακας 3.1 και Εικόνες 3.5-3.12).

Πίνακας 3.1: Ποσοστό (%) των δειγμάτων τα οποία έδωσαν προφίλ *vmr1/Rsa I* PV1-PV8.

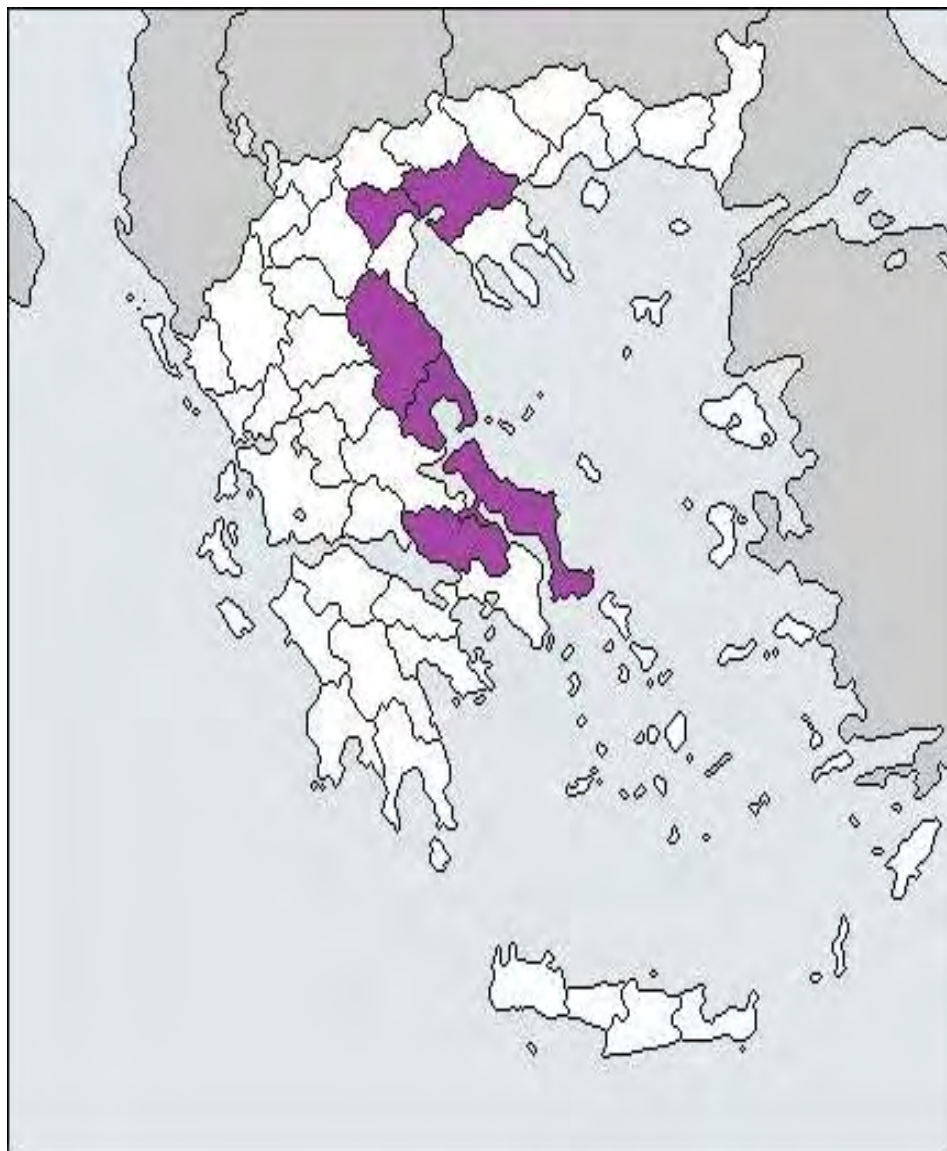
Γενετικό Προφίλ	Ποσοστό επι των δειγμάτων(%)	Νομοί της Ελλάδος που εμφανίζεται
PV1	23,37	Λάρισας, Φθιώτιδος, Θεσσαλονίκης, Μαγνησίας, Ημαθίας
PV2	35,06	Βοιωτίας, Μαγνησίας, Ηλείας, Λάρισας, Καρδίτσας, Θεσσαλονίκης, Φθιώτιδος, Ημαθίας
PV3	16,88	Λάρισας, Εύβοιας, Μαγνησίας, Θεσσαλονίκης, Βοιωτίας, Ημαθίας
PV4	12,98	Φθιώτιδος, Εύβοιας, Ημαθίας
PV5	1,29	Θεσσαλονίκης
PV6	1,29	Εύβοιας
PV7	7,79	Λάρισας, Μαγνησίας, Φθιώτιδος
PV8	1,29	Λάρισας



Εικόνα 3.5 Γεωγραφική εξάπλωση του φυτοπλάσματος Stolbur με RFLP προφίλ *vmr1/Rsa* I PV1.



Εικόνα 3.6 Γεωγραφική εξάπλωση του φυτοπλάσματος Stolbur με RFLP προφίλ *vmr1/Rsa* I PV2.



Εικόνα 3.7 Γεωγραφική εξάπλωση του φυτοπλάσματος Stolbur με RFLP προφίλ *vmr1/Rsa* I PV3.



Εικόνα 3.8 Γεωγραφική εξάπλωση του φυτοπλάσματος Stolbur με RFLP προφίλ *vmr1/Rsa I PV4*.



Εικόνα 3.9 Γεωγραφική εξάπλωση του φυτοπλάσματος Stolbur με RFLP προφίλ *vmr1/Rsa I PV5*.



Εικόνα 3.10 Γεωγραφική εξάπλωση του φυτοπλάσματος Stolbur με RFLP προφίλ *vmr1/Rsa I PV6*.



Εικόνα 3.11 Γεωγραφική εξάπλωση του φυτοπλάσματος Stolbur με RFLP προφίλ *vmp1/Rsa I PV7*.

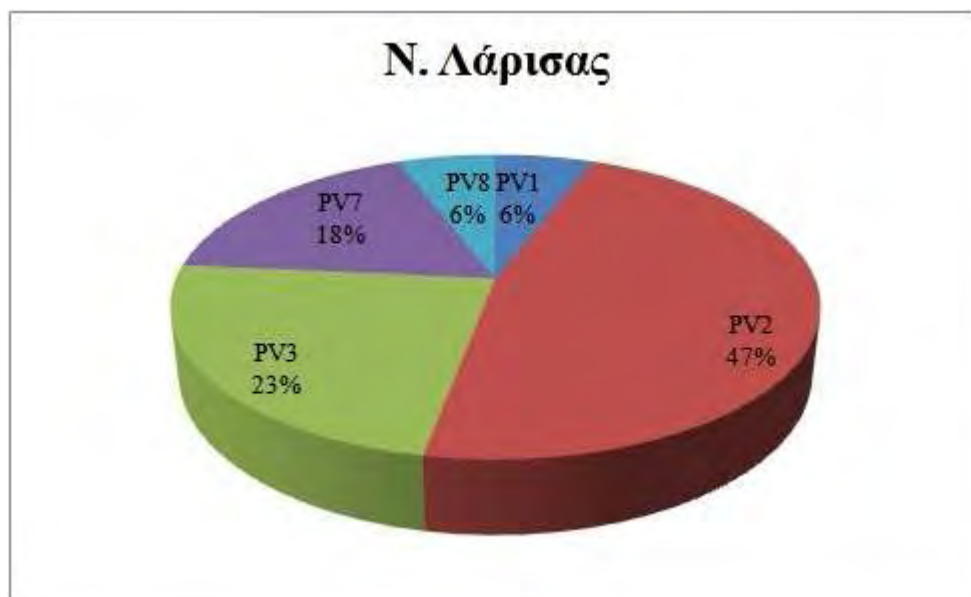


Εικόνα 3.12 Γεωγραφική εξάπλωση του φυτοπλάσματος Stolbur με RFLP προφίλ *vmp1/Rsa I PV8*.

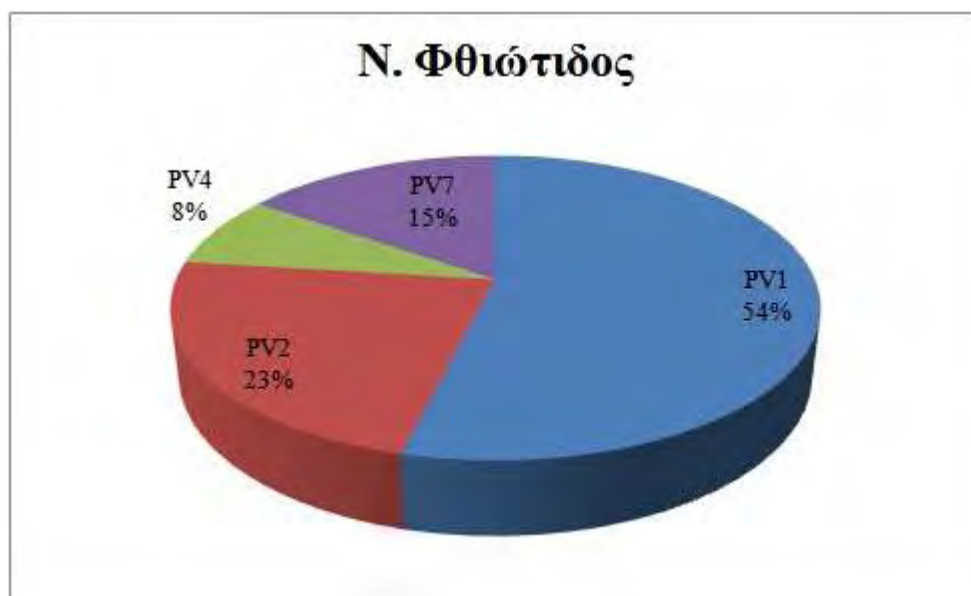
Η συχνότητα εμφάνισης καθώς και τα προφίλ πέψης των προϊόντων της PCR διαφέρουν ανάλογα τον νόμο (Εικόνες 3.13-3.19). Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Συχνότητα (%) εμφάνισης προφίλ πέψης *mp1/Rsa* I ανά νομό.

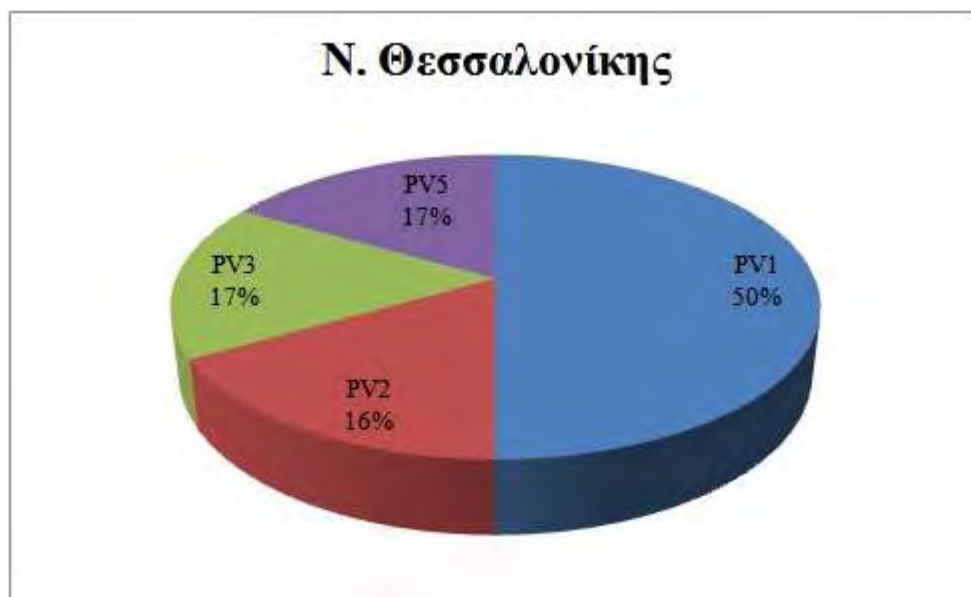
Νομός	PV1	PV2	PV3	PV4	PV5	PV6	PV7	PV8
Λάρισα	5,88	47,08	23,52	-	-	-	17,64	5,88
Φθιώτιδος	53,86	23,07	-	7,69	-	-	15,38	-
Θεσσαλονίκης	50,02	16,66	16,66	-	16,66	-	-	-
Μαγνησίας	41,68	33,33	16,66	-	-	-	8,33	-
Ημαθίας	40,00	20,00	20,00	20,00	-	-	-	-
Βοιωτίας	-	66,67	33,33	-	-	-	-	-
Ηλείας	-	100	-	-	-	-	-	-
Καρδίτσας	-	100	-	-	-	-	-	-
Εύβοιας	-	-	30,76	61,55	-	7,69	-	-



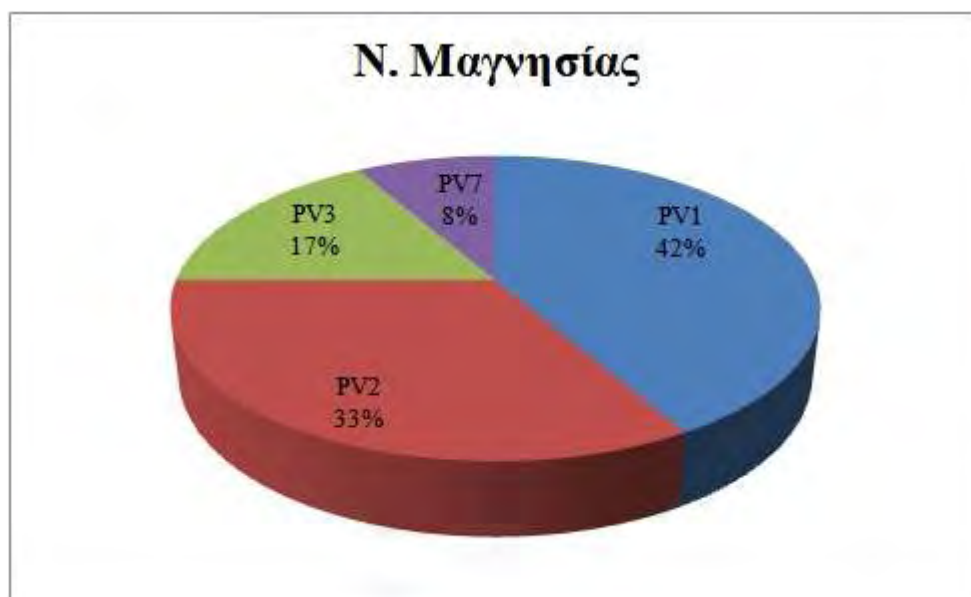
Εικόνα 3.13: Συχνότητα εμφάνισης προφίλ πένης (*vmp1/Rsa I*) στον Ν. Λάρισας.



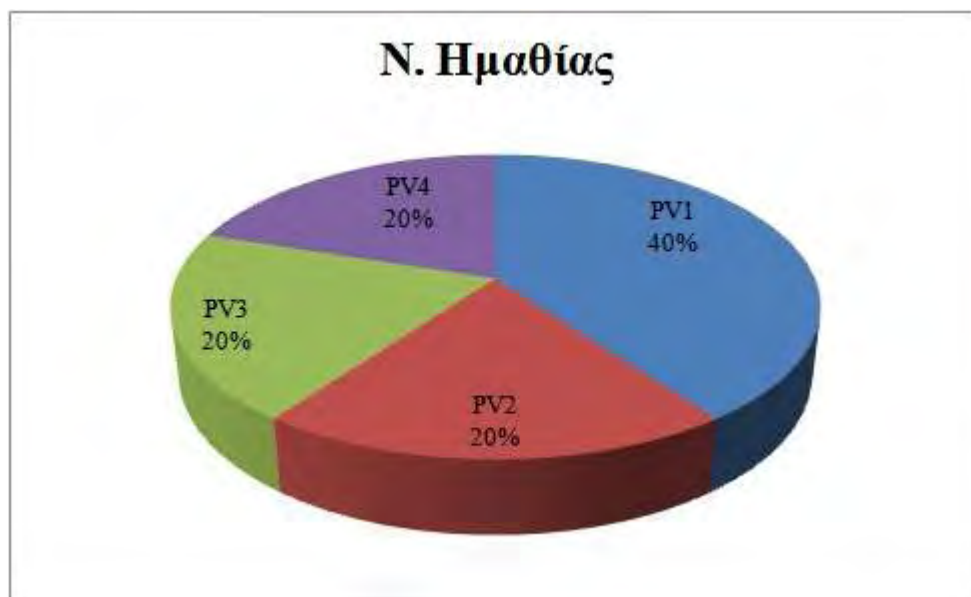
Εικόνα 3.14: Συχνότητα εμφάνισης προφίλ πένης (*vmp1/Rsa I*) στον Ν. Φθιώτιδος.



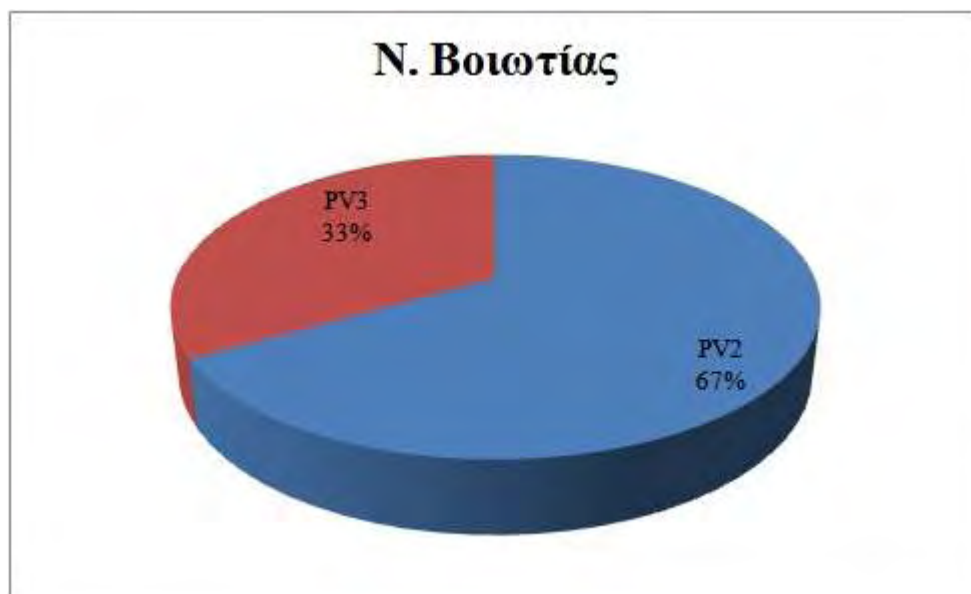
Εικόνα 3.15: Συχνότητα εμφάνισης προφίλ πέψης (*vmp1/Rsa I*) στον Ν. Θεσσαλονίκης.



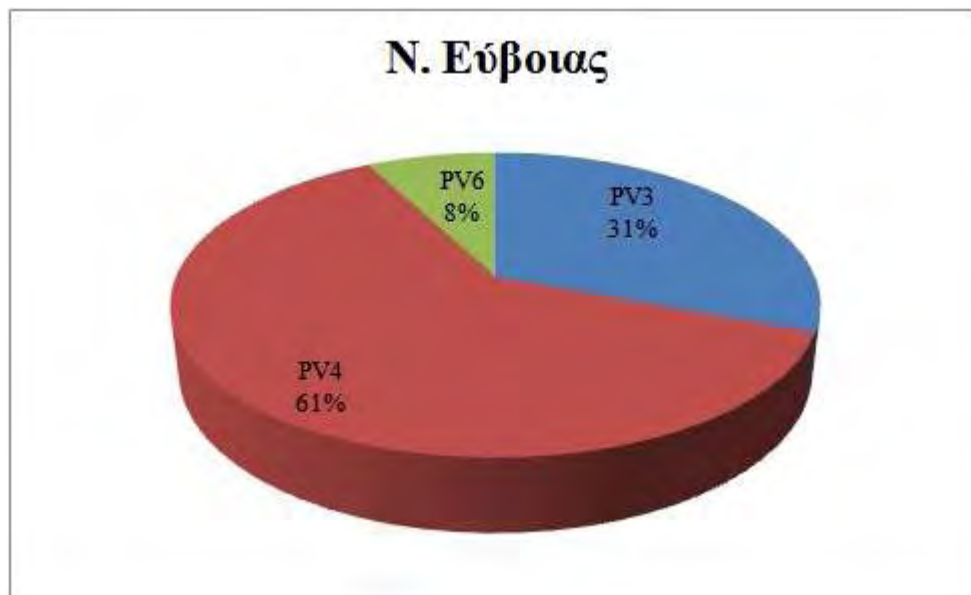
Εικόνα 3.16: Συχνότητα εμφάνισης προφίλ πέψης (*vmp1/Rsa I*) στον Ν. Μαγνησίας.



Εικόνα 3.17: Συχνότητα εμφάνισης προφίλ πέγης (*vmp1/Rsa I*) στον Ν. Ημαθίας.



Εικόνα 3.18: Συχνότητα εμφάνισης προφίλ πέγης (*vmp1/Rsa I*) στον Ν. Βοιωτίας.



Εικόνα 3.19: Συχνότητα εμφάνισης προφίλ πέψης (*vmp1/Rsa I*) στον Ν. Εύβοιας.

4. Συζήτηση και συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία πρωταρχικός στόχος ήταν η απομόνωση του *vmr1* γονιδίου από φυτά προσβεβλημένα με φυτόπλασμα stolbur καθώς επίσης και η μελέτη της παραλλακτικότητας του γονιδίου που είναι ικανή να επιτρέψει τη δημιουργία προφίλ πένης με ενδονουκλεάσες.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας με συμπτώματα προσβολής από φυτοπλάσματα και ελέγχθηκαν με PCR. Τα προσβεβλημένα φυτά είχαν τυπικά συμπτώματα της ασθένειας stolbur και της ασθένειας big bud, όπου και στις δυο περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν φυτοπλάσματα της ομάδας stolbur (16Sr XII). Αρχικά στα φυτά τομάτας πραγματοποιήθηκε PCR με το ζεύγος εκκινητών TYRH10f/r που υβριδίζουν εσωτερικά του γονιδίου *vmr1*. Από την PCR προέκυψαν προϊόντα με το αναμενόμενο μέγεθος (1450bp). Όλα τα δείγματα έδωσαν θετική αντίδραση PCR TYRH10f/r. Το προαναφερθέν ζεύγος εκκινητών ήταν ικανό να πολλαπλασιάσει το *vmr1* γονίδιο.

Στη συνέχεια τα δείγματα υπέστησαν RFLP ανάλυση. Τα προϊόντα της PCR υπέστησαν πένη με το περιοριστικό ένζυμο *Rsa I* ώστε να μελετηθεί η παραλλακτικότητα του γονιδίου *vmr1* του φυτοπλάσματος Stolbur. Μετά την RFLP ανάλυση προέκυψαν 8 διαφορετικά προφίλ πένης με διαφορετική γεωγραφική εξάπλωση. Το PV1 γενετικό προφίλ εμφανίστηκε στο 23,37% των δειγμάτων και βρέθηκε στους νομούς Λάρισας, Φθιώτιδος, Θεσσαλονίκης, Μαγνησίας και Ημαθίας. Το PV2 γενετικό προφίλ βρέθηκε στο 35,06% των δειγμάτων και βρέθηκε στους νομούς Βοιωτίας, Μαγνησίας, Ηλείας, Λάρισας, Καρδίτσας, Θεσσαλονίκης, Φθιώτιδος και Ημαθίας. Το PV3 γενετικό προφίλ βρέθηκε στο 16,88% των δειγμάτων και βρέθηκε στους νομούς Λάρισας, Εύβοιας, Μαγνησίας, Θεσσαλονίκης, Βοιωτίας και Ημαθίας. Το PV4 γενετικό προφίλ βρέθηκε στο 12,98% των δειγμάτων και βρέθηκε στους νομούς Φθιώτιδος, Εύβοιας και Ημαθίας. Το PV5 γενετικό προφίλ βρέθηκε στο 1,26% των δειγμάτων και βρέθηκε μόνο στο νομό Θεσσαλονίκης. Το PV6 γενετικό προφίλ βρέθηκε στο 1,29% των δειγμάτων και βρέθηκε μόνο στο νομό Εύβοιας. Το PV7 γενετικό προφίλ βρέθηκε στο 7,79% των δειγμάτων και βρέθηκε στους νομούς Λάρισας, Μαγνησίας και Φθιώτιδος. Τέλος το PV8 γενετικό προφίλ βρέθηκε στο 1,29% των δειγμάτων και βρέθηκε μόνο στο νομό Λάρισας. Τα προφίλ παρουσίασαν μεγάλη διαφοροποίηση ακόμα και σε επίπεδο νομών. Στο Ν. Λάρισας

υπερίσχυσε το PV2 (47,08%), στο Ν. Φθιώτιδος υπερίσχυσε το PV1 (53,86%), στο Ν. Θεσσαλονίκης υπερίσχυσε το PV1 (50,02%), στο Ν. Μαγνησίας υπερίσχυσε το PV1 (41,68%), στο Ν. Ημαθίας υπερίσχυσε το PV1 (40%), στο Ν. Βοιωτίας υπερίσχυσε το PV2 (66,67%), στο Ν. Ηλείας υπερίσχυσε το PV2 (100%), στο Ν. Καρδίτσας υπερίσχυσε το PV2 (100%) και τέλος στο Ν. Εύβοιας υπερίσχυσε το PV4 (61,55%). Από την παραλλακτικότητα του γονιδίου *vmr1* συμπεραίνουμε ότι πιθανόν συνυπάρχουν 'πληθυσμοί' φυτοπλάσμάτων της ομάδας stolbur (16Sr XII). Αυτοί εμφανίζονται με διαφορετική συχνότητα σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας και επίσης είναι 3 περιπτώσεις όπου τα φυτοπλάσματα με συγκεκριμένο προφίλ πένης *vmr1/Rsa I* (PV5, PV6, PV8) βρέθηκαν μόνο σε ένα νομό. Γενικά η ανομοιόμορφη κατανομή των φυτοπλάσμάτων stolbur (16Sr XII) στον ελλαδικό χώρο μπορεί να εξηγηθεί είτε με την εισαγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού από το εξωτερικό είτε με τα έντομα φορείς που δεν μεταναστεύουν και άρα δε διασπείρουν τα φυτοπλασματικά κύτταρα σε μεγάλες αποστάσεις που φέρουν συγκεκριμένες σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *vmr1*.

Τα προαναφερθέντα προφίλ πένης των προϊόντων της PCR αποτελούν νέα δεδομένα ως προς την ταξινόμηση των φυτοπλάσμάτων με τη βοήθεια της παραλλακτικότητας του *vmr1* γονιδίου. Αυτή η σημαντική ποικιλομορφία του *vmr1* γονιδίου πιστεύεται ότι συμβαίνει λόγω της ισχυρής θετικής επιλογής που ασκείται σε αυτό το γονίδιο, που ενδεχομένως προκύπτει από τις αναγκαίες προσαρμογές του φυτοπλάσματος stolbur στις πολύπλοκες αλλαγές του περιβάλλοντος. Επίσης η ποικιλομορφία του γονιδίου αυτού να οφείλεται σε διαφορετικούς αλληλόμορφους του *vmr1* γονιδίου, οι οποίοι δίνουν διαφορετικό προφίλ μετά από πένη του προϊόντος της PCR TYPH10 f/r με το περιοριστικό ένζυμο *Rsa I*. Η πρωτεΐνη που εκφράζει το συγκεκριμένο γονίδιο μπορεί πιθανότατα να επηρεάζει το εύρος των ξενιστών (αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή) ή το εύρος των φορέων (αλληλεπίδραση φυτοπλάσματος-εντόμου) μιας και εδράζεται στη μεμβράνη των φυτοπλασματικών κυττάρων και ένα μέρος της είναι εκτεθειμένο στο εξωτερικό περιβάλλον. Το γονίδιο *vmr1* χρησιμοποιήθηκε και για την ταξινόμηση του φυτοπλάσματος stolbur σε αμπέλι και διάφορα λαχανικά καταφέροντας να διαχωρίσει οχτώ διαφορετικά προφίλ πένης του προϊόντος της PCR στην Ιταλία (Murolo *et. al.*, 2010).

Στο μέλλον θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί περαιτέρω εάν το γονίδιο *nmr1* συνδέεται με το εύρος των ξενιστών και των φορέων του φυτοπλάσματος που προκαλεί την ασθένεια stolbur.

5. Βιβλιογραφία

Agrios G.N., 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press.

Alivizatos, A.S. (1989). Occurrence and distribution of tomato stolbur in Greece. *Proceedings of 7th conference on Plant Pathogenic Bacteria, Budapest, Hungary*, pp. 945-950.

Alivizatos, A.S. (1993). Association of mycoplasma – like organisms with tomato big bud disease in Greece. *Plant Pathology*, **42**, 158-162.

Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S., Radek, A. J., Shevchenko, D., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J., Hogenhout, S. (2006). Living with genome instability: the adaption of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, **188**, 3682-3696.

Baker, K.K., Ramsdell, D.C., Gillert, J.M. (1985). Electron microscopy: current applications to plant virology. *Plant Disease*, **69**, 85-90.

Battle, A., Martinez, M.A., Lavina, A. (2000). Occurrence, distribution and epidemiology of grapevine yellows in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, **106**, 811-816.

Bertaccini, A., Franova, J., Paltrinieri, S., Martini, M., Navrati, M., Lugaresi, C., Nebesarova, J., Simkova, M. (1999). Leek proliferation: A new phytoplasma disease in the Czech Republic and Italy. *European Journal of Plant Pathology*, **105**, 487-493.

Boudon-Padieu, E. (1999). Grapevine phytoplasmas. In the Proceedings of *First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes*, May, 24th-29th, 1999. [Online]. Available at <http://web.uniud.it/phytoplasma/conf.html> [Access date: 31/08/2013].

Bove, J.M., Garnier, M. (1998). Walled and wall-less eubacteria from plants: sieve-tube-restricted plant pathogens. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **52**, 7-16.

Carraro, L.Loi, N., Ermacora, P. (2001). Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 695-700.

Castro, S., Romero, J. (2002). The association of clover proliferation phytoplasma with stolbur disease of pepper in Spain. *Journal of Phytopathology*, **150**, 25-29.

Christensen, N.M., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M., Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, **10**, 526-535.

Cimerman A., Pacifico D., Salar P., Marzachi C., Foissac X. (2009). Striking Diversity of vmp1, a Variable Gene Encoding a Putative Membrane Protein of the Stolbur Phytoplasma. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 2951-2957.

Contaldo, N., Bertaccini, A., Paltrinieri, S., Windsor, H., Windsor, D. (2012). Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, **51**, 607-617.

Del Serrone, P., Marzachi, C., Bragaloni, M., Gale, P. (2001). Phytoplasma infection of tomato in central Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, **40**, 137-142.

Doi, Y.M., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H. (1967). Mycoplasma or PTL-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witch's broom, aster yellows, or paulownia witch's-broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, **33**, 259-266.

Doyle, J.J., Doyle, J.L. (n.d.). DNA isolation from small amounts of plant tissue. [Online]. Available at <http://orc.igd.cornell.edu/Protocols/DoyleProtocol.pdg> [Access date: 31/08/2013].

EPPO/CABI (2006). Data sheets on quarantine pests: potato stolbur phytoplasma. [Online]. Available at http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Stolbur/PHYYP10_ds.pdf [Access date: 31/08/2013].

Firrao, G., Gibb, K., Streten, C.(2005). Short taxonomy guide to the genus 'Candidatus phytoplasma'. *Journal of Plant Pathology*. **87**, 249-263.

Galetto, L., Marzachi, C. (2010). Real-time PCR and Quantification of Phytoplasmas. *Phytoplasma: Genomes, Plant Hosts and Vectors*, pp 16-19. MPG Books Group, UK.

Garnier, M. (1999). Epidemiology and control of phytoplasma diseases. In the Proceedings of *First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes*, May 24th-29th, 1999. [Online]. Available at <http://web.uniud.it/phytoplasma/conf.html> [Access date: 31/08/2013].

Garnier, M., Foissac, X., Gaurivaud, P., Laigret, F., Renaudin, J., Saillard, C., Bove, J.M. (2001). Mycoplasmas, plants, insect vectors: a matrimonial triangle. *Life Sciences*, **324**, 923-928.

Gundersen, D.E., Lee, I.-M., Rehner, S.A., Davis, R.E., Kingsbury, D.T. (1994). Phylogeny of mycoplasma-like organism (phytoplasmas): A basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, **174**, 5244-5254.

Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Harrison, N., Dickinson, M. (2008) Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of ‘*Candidatus Phytoplasma*’. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 1826-1837.

Hogenhout, S., Oshima, K., Ammar, E.D., Kakizawa, S., Kindom, H., Namba, S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, **9**, 403-423.

<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>

[Access date: 31/08/2013]

<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>

[Access date: 31/08/2013]

IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group (2004). ‘*Candidatus Phytoplasma*’, a taxon for wall-less, non helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1243-1255.

Kamoun, S., Hogenhout, S.A. (2001). Agricultural microbes genome 2: First glimpses into the genome of plant associated microbes. *The Plant Cell*, **13**, 451-458.

Langer, M., Maixner, M. (2004). Molecular characterization of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis*, **43**, 191-199.

Lavina, A., Batlle, A. (2002). First report of stolbur phytoplasma in avocado in Spain. *Plant Disease*, **86**, 692.

Lee, I.M. (1999) Molecular-based methods for detection and identification of phytoplasmas. In the Proceedings of *First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes*, May, 24th-29th, 1999. [Online]. Available at <http://web.uniud.it/phytoplasma/conf.html> [Access date: 31/08/2013].

Lee, I.M., Davis, R.E., Fletcher, J. (2001). In *Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3th ed. (Schaad, N.M., Jones, J.B., Chum, W. eds), APS Press, Minnesota, USA, pp. 283-320.

Lee, I.M., Davis, R.E., Gundersen-Rindal, D.E. (2000). Phytoplasma: phytopathogenic *Mollicutes*. *Annual Review of Microbiology*, **54**, 221-255.

Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Bertaccini, A. (1998a). Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, **88**, 1359-1366.

Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Bartoszyk, I.M. (1998b). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequence. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**, 1153-1169.

Lee, I.M., Zhao, Y., Bottner, K. (2006). SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellow phytoplasma group. *Molecular Cell Probes*, **20**, 87-91.

Lim, P., Sears, B. (1989). 16SrRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology*, **171**, 5901-5906.

Ludwig, W., Glöckner, F.O., Yilmaz, P., 2011. The use of rRNA gene sequence data in the classification and identification of prokaryotes. *Methods in Microbiology*, **38**, 349-384.

Maixner, M., Ahrens, U., Seemuller, E. (1995). Detection of the German grapevine yellows (*Vergilbungskrankheit*) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology*, **101**, 241-250.

Maniloff, J. (1996). The minimal cell genome. In: On being the right size. *Proceeding of National Academy of Science, USA*, **93**, 1004-1006.

Marcone, C., Neimark, A., Ragozzino, A., Lauer, U., Seemuller, E. (1999). Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, **89**, 805-810.

Martin, M., Daniels, P.P., Torres, E., Telleria, M.T. (2003). Detection and identification of phytoplasma DNA in symptomatic mushrooms of the genus *Ramaria* (*O. gomphales*). *Anales Jardin Botanico De Madrid*, **60**, 11-18.

Martini, M., Lee, I.M., Bottner, K., Zhao, Y., Botti, S., Bartacini, A., Harrison, N., Carrao, L., Marcone, C., Khan, A., Osler, R. (2007). Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, **57**, 2037-2051.

McCoy, R.E. (1982). Use of tetracycline antibiotics to control yellow disease. *Plant Disease*, **66**, 539-542.

Muhammad, A., Guang-Ning, Ye., Weeden, F., Reisch, B. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, **12**, 6-13.

Murolo, S., Marcone, C., Prota, V., Garau, R., Foissac, X., Romanazzi, G. (2010). Genetic variability of the stolbur phytoplasma *vmp1* gene in grapevines, bindweeds and vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, **109**, 2049-2059.

Musetti, R. Favali, M.A. (2004). Microscopy techniques applied to the study of phytoplasma diseases: Traditional and innovative methods. In *Current Issues on Multidisciplinary Microscopy Research and Education*, (Mendez-Vilas, A. and Labajos-Biancano, L.eds.) FORMATEX. [Online] Available at <http://www.formatex.org/microscopy2/papers/72-80.pdf> [Access date: 31/08/2013].

Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, **36**, 27-29.

Pilkington, L.J., Gibb, K.S., Gurr, G.M., Fletcher, M.J., Nikandrow, A., Elliot, E., van de Ven, R., Read, D.M.Y. (2003). Detection and identification of phytoplasma from Lucerne with Australian Lucerne yellows disease. *Plant Pathology*, **52**, 754-762.

Pracros, P., Renaudin, J., Eveillard, S., Mouras, A., Hernould, M. (2006). Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 62-68.

Razin, S., Yogev, D., Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathology of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 1056-1094.

Schneider, B., Gribb, K.S., Seemuller, E. (1997b). Sequence and RFLP analysis of elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, **143**, 3381-3389.

Schneider, B., Marcone, C., Kampmann, M., Ragozzino, A., Lederer, W., Cousin, M.-T., Seemuller, E. (1997a). Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, **103**, 675-686.

Scottish Crop Research Institute (2002). Immunogold labeling (IGL). [Online]. Available: <http://www.scri.sari.ac.uk/assoc/NEWSTRUC/BioMech/CellBiol/Microsc/IGL.htm> [Access date: 31/08/2013].

Seemuller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Goschl, M. (1998). Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, **80**, 3-26.

Seruga, M., Curkovic Perica, M., Skoric, D., Kozina, B., Mirosevic, N., Saric, A., Bertaccini, A., Krajacic, M. (2000). Geographical distribution of Bois Noir

phytoplasmas infecting grapevines in Croatia. *Journal of Phytopathology*, **148**, 239-242.

Terlizzi, F., Babini, A.R., Credi, R. (2006). First report of stolbur phytoplasma (16SrXII-A) on strawberry in northern Italy. *Plant Disease*, **90**, 831.

Vellios, E., Lioliopoulou, F. (2007). Detection and characterization of phytoplasmas infecting tomato plants in Greece. *Bulletin of Insectology*, **60**, 157-158.

Ward, E., Foster, S., Fraaije, B., McCartney, A. (2004). Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Annual Applied Biology*. **145**, 1-16.

Wei, W., Davis, R.E., Lee, I.M., Zhao, Y. (2007). Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 1855-1867.

Zhao, Y., Wei, W., Lee, I., Shao, J., Suo, X., Davis, R. (2009). Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **59**, 2582-2593.

Βαρδαβάκης Ε., 1993. Συστηματική Βοτανική. Δ έκδοση. Εκδόσεις Σαλονικίδης. Θεσσαλονίκη.

Κασσαβέτη Α., 2007. Γενετικός χαρακτηρισμός των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την ασθένεια 'stolbur' της τομάτας στην Ελλάδα. M.Sc. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Βόλος.

Παναγόπουλος Χ. Γ., 1995. Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Β έκδοση. Εκδόσεις, Σταμούλης, Αθήνα.

Abstract

The aim of this study was to detect the variability of the *vmp1* gene of the phytoplasma stolbur group that infect tomato plants in Greece. The *vmp1* gene encodes a protein of 557 aa which is probably located at the phytoplasma membrane. At first a PCR took place with TYPH10 f/r pairs of primers for the reproduction of a large portion of the gene (1450bp). Then followed RFLP analysis (with *RsaI* endonuclease) and 8 different patterns were detected. The geographical distribution of each pattern as well as the percentage of each at the total number of the diseased plants in each prefecture, differed greatly. The (*vmp1/Rsa I*) PV1 pattern was detected at Larissa, Fthiotida, Thessaloniki, Magnesia and Imathia prefectures. PV2 was detected in diseased plants from Voiotia, Magnesia, Ileia, Larissa, Karditsa, Thessaloniki, Fthiotida and Imathia prefectures. The (*vmp1/Rsa I*) PV3 was detected at Larissa, Evoia, Magnesia Thessaloniki, Viotia, and Imathia prefectures. The (*vmp1/Rsa I*) PV4 located at Fthiotida, Imathia and, Evoia prefectures. The (*vmp1/Rsa I*) PV5 was detected at Thessaloniki prefecture. The (*vmp1/Rsa I*) PV6 was detected at Evoia prefecture. The (*vmp1/Rsa I*) PV7 was detected at Larissa, Magnesia and Fthiotida prefectures. The (*vmp1/Rsa I*) PV8 was detected at Larissa prefecture. Regarding the percentage of each pattern in various prefectures, PV2 was the dominant restriction profile at Larissa (47.08%), PV1 was the dominant restriction profile at Fthiotida (53.86%), at Thessaloniki (50.02%), Magnesia (41,68%), Imathia (40%), PV2 was the dominant restriction profile at Voiotia (66,67%), Ilia and Karditsa (100%) and PV4 was the dominant restriction profile at Evoia (61.55%).