



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας
Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος**

**Απομόνωση βακτηριοφάγων του φυτοπαθογόνου
βακτηρίου
Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi***

ΣΑΝΙΔΑΣ ΒΑΪΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Βόλος 2014

**Απομόνωση βακτηριοφάγων του φυτοπαθογόνου βακτηρίου
Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi***

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ευάγγελος Βέλλιος, Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (επιβλέπων)

Ιωάννης Γούναρης, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ιωάννης Μποζιάρης, Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή της μεταπτυχιακής μου διατριβής κ. Βέλλιο Ευάγγελο, Επίκουρο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας για την επιλογή και ανάθεση του θέματος, τις πολύτιμες συμβουλές του, τη συνεχή καθοδήγησή του κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και για τις υποδείξεις και διορθώσεις του στην συγγραφή του κειμένου της διατριβής μου.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Γούναρη Ιωάννη, Καθηγητή, και τον κ. Μποζιάρη Ιωάννη, Επίκουρο Καθηγητή, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ευχαριστίες επίσης εκφράζω στην κ. Αντωνίου Πολύμνια, Επίκουρη Καθηγήτρια του Γ.Π.Α., για τις πολύτιμες συμβουλές της στην απομόνωση του βακτηρίου, τον κ. Μποζιάρη Ιωάννη για την συμβολή του στην PCR, καθώς επίσης και την Ελένη Ανθούλη, προπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, για τη συνεργασία της κατά την απομόνωση του βακτηρίου.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τη συνεχή υλική, αλλά και ηθική συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φυτοπαθογόνο είδος *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* αποτελεί το αίτιο της ασθένειας καρκίνωση της ελιάς, με χαρακτηριστικά συμπτώματα τους υπερπλαστικούς όγκους στους βλαστούς και τους βραχίονες του φυτού, και περιστασιακά στα φύλλα και τους καρπούς. Μέτρα για την αντιμετώπιση του συγκεκριμένου βακτηρίου αποτελούσαν στο παρελθόν τα αντιβιοτικά, στα οποία έχουν εμφανίσει ανθεκτικότητα πληθώρα βακτηρίων. Σήμερα χρησιμοποιούνται κυρίως τα χαλκούχα σκευάσματα, στα οποία επίσης έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα, καθώς επίσης και τοξικότητα προς το περιβάλλον. Η ανησυχία για τις επιπτώσεις στο περιβάλλον λόγω της χρήσης χημικών βακτηριοκτόνων σε συνδυασμό με την ανάγκη για γεωργικές πρακτικές βιώσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον, οδήγησε στην αναζήτηση εναλλακτικής λύσης. Μια τέτοια λύση είναι η χρήση βακτηριοφάγων, οι οποίοι αποτελούν βιολογικούς παράγοντες αντιμετώπισης των βακτηρίων και υπάρχουν σε αφθονία στο περιβάλλον. Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η απομόνωση βακτηριοφάγων του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, και η δοκιμή τους σε διάφορες απομονώσεις του βακτηρίου. Αρχικά συλλέχθηκαν δείγματα φυτικού ιστού για την απομόνωση του βακτηρίου. Ακολούθησε η ταυτοποίησή των απομονώσεων με τη μοριακή τεχνική της PCR. Στη συνέχεια ακολούθησε η συλλογή δειγμάτων εδάφους και φυτικού ιστού για την απομόνωση των βακτηριοφάγων. Τέσσερις βακτηριοφάγοι απομονώθηκαν από δύο διαφορετικά δείγματα, οι G1, G2, A1 και A2. Στην πορεία έγινε η τιτλοδότηση των βακτηριοφάγων και ο χαρακτηρισμός της μορφολογίας και του μεγέθους των πλακών που σχηματίζουν. Τέλος έγινε η διεξαγωγή βιοδοκιμών μεταξύ των τεσσάρων φάγων και πέντε βακτηριακών απομονώσεων, των Pss 1, Pss 2, Pss 3, Pss 4 και Pss 5. Έτσι έγινε και ο προσδιορισμός του εύρους ξενιστών, όσον αφορά απομονώσεις του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Και οι τέσσερις φάγοι γενικά έδειξαν καλά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, ωστόσο οι φάγοι A1 και A2 φαίνεται να είναι περισσότερο τοξικοί απέναντι στο *P. savastanoi* pv. *savastanoi* σε σχέση με τους G1 και G2, καθώς χρειάστηκε να εφαρμοστούν σε μεγαλύτερες δεκαδικές αραιώσεις για να γίνει δυνατή η μέτρηση των πλακών τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

		Σελίδα
1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1	Φυτοπαθογόνα βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i>	8
1.2	Η ασθένεια “καρκίνωση της ελιάς”	9
1.2.1	Γεωγραφική κατανομή και σπουδαιότητα	11
1.2.2	Συμπτώματα της ασθένειας	11
1.2.3	Μετάδοση του παθογόνου αιτίου	12
1.2.4	Ταξινόμηση του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	12
1.2.5	Βιοχημικά χαρακτηριστικά και βιολογία του <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	13
1.2.6	Αντιμετώπιση	13
1.3	Βακτηριοφάγοι	14
1.3.1	Ορισμός και ανακάλυψη των βακτηριοφάγων	14
1.3.2	Βιολογικός κύκλος των βακτηριοφάγων	15
1.3.3	Δομή των βακτηριοφάγων	15
1.3.4	Προέλευση των βακτηριοφάγων	16
1.3.5	Λυσιγονία	17
1.3.6	Ταξινόμηση των βακτηριοφάγων	17
1.3.7	Διαδικασία της μόλυνσης βακτηριακού κυττάρου από φάγο	18
1.3.8	Μόλυνση βακτηρίων από φάγους σε υγρά και στερεά θρεπτικά υποστρώματα	20
1.3.9	Εύρος ξενιστών	21
1.3.10	Βακτηριοφάγοι στη ριζόσφαιρα	22
1.3.11	Βακτηριοφάγοι στη φυλλόσφαιρα	22
1.3.12	Αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων βακτηρίων με τη χρήση βακτηριοφάγων	23
1.4	Βακτηριοφάγοι του γένους <i>Pseudomonas</i>	23
1.4.1	Βακτηριοφάγοι του <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
1.4.2	Βακτηριοφάγοι του <i>Pseudomonas tolaasii</i>	25
1.4.3	Βακτηριοφάγοι του <i>Pseudomonas fluorescens</i>	25

2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
2.1	Απομόνωση του <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	26
2.2	Ταυτοποίηση του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	28
2.2.1	Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο King's B	28
2.2.2	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	29
2.2.3	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	30
2.2.4	Ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων προϊόντων της PCR σε πηκτική αгарόζης	31
2.3	Καμπύλη ανάπτυξης του <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	31
2.4	Αποθήκευση των βακτηριακών απομονώσεων στους -80 °C	32
2.5	Απομόνωση βακτηριοφάγων	32
2.6	Αποθήκευση των βακτηριοφάγων στους -80 °C	35
2.7	Τιτλοδότηση των απομονωμένων βακτηριοφάγων	35
2.8	Προσδιορισμός του φάσματος λύσης των απομονωμένων βακτηριοφάγων	36
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
3.1	Ταυτοποίηση του <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	37
3.2	Καμπύλη ανάπτυξης του <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	38
3.3	Τιτλοδότηση των βακτηριοφάγων G1, G2, A1, και A2	40
3.4	Φάσμα λύσης των G1, G2, A1, και A2 σε 5 απομονώσεις του <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	40
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φυτοπαθογόνα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

Το γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνει μονοκύτταρα βακτήρια τα οποία είναι αρνητικά κατά gram, σχήματος ευθύγραμμης ή καμπυλόμορφης ράβδου, και μεγέθους 0.5-1.0 x 1.5-4.0 μm (Schaad *et al.*, 2001). Επίσης όλα τα είδη αυτού του γένους παράγουν φθορίζουσες χρωστικές. Μοναδικές εξαιρέσεις αποτελούν ορισμένα στελέχη *P. syringae* pv. *persicae*, και *P. corrugata* (Schaad *et al.*, 2001).

Τα φυτοπαθογόνα είδη του γένους *Pseudomonas* προκαλούν μεγάλο αριθμό ασθενειών στα φυτά, με ποικίλα συμπτώματα που περιλαμβάνουν έλκη, μαρασμό, ζημιές σε άνθη και βλαστούς, ξηράνσεις φύλλων, κηλιδώσεις καρπών και φύλλων (*Pseudomonas syringae* pathovars), μαλακές σήψεις (*P. viridiflava*, *P. marginalis*), και όγκους (*P. savastanoi*) (Schaad *et al.*, 2001). Πολλά είδη αυτού του γένους επίσης συναντώνται στα φυτά ως επίφυτα φυλλώματος ή στη ριζόσφαιρά τους. Συγκεκριμένα στο είδος *P. Savastanoi* έχουν αναφερθεί οι παθότυποι: *P. savastanoi* pv. *savastanoi* που προσβάλλει την ελιά, *P. savastanoi* pv. *nerii* που προσβάλλει την πικροδάφνη, *P. savastanoi* pv. *fraxini* που προσβάλλει τον φράξο και *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* που προσβάλλει το φασόλι.

Κυριότερος ξενιστής του παθογόνου είναι η ελιά (*Olea europaea*). Όλα τα μέλη της οικογένειας Oleaceae αναφέρονται ως ξενιστές, καθώς επίσης και η πικροδάφνη (*Nerium oleander*) στην οποία σχηματίζονται παρόμοιοι όγκοι από το *P. savastanoi* pv. *nerii* (Janse, 2005).

Στελέχη του βακτηρίου που μολύνουν την ελιά έχει αναφερθεί ότι μπορούν να μολύνουν και την πικροδάφνη, και αντίθετα στελέχη του *P. savastanoi* pv. *nerii* μπορούν να μολύνουν την ελιά (Ramos *et al.*, 2012). Οι παθότυποι *fraxini* (φράξινος) και *nerii* (πικροδάφνη) διαφοροποιούνται από τον παθότυπο *savastanoi* (ελιά) κυρίως στο φάσμα των ξενιστών τους και αναγνωρίζονται επίσημα από το 1996 και μετά (Ramos *et al.*, 2012).

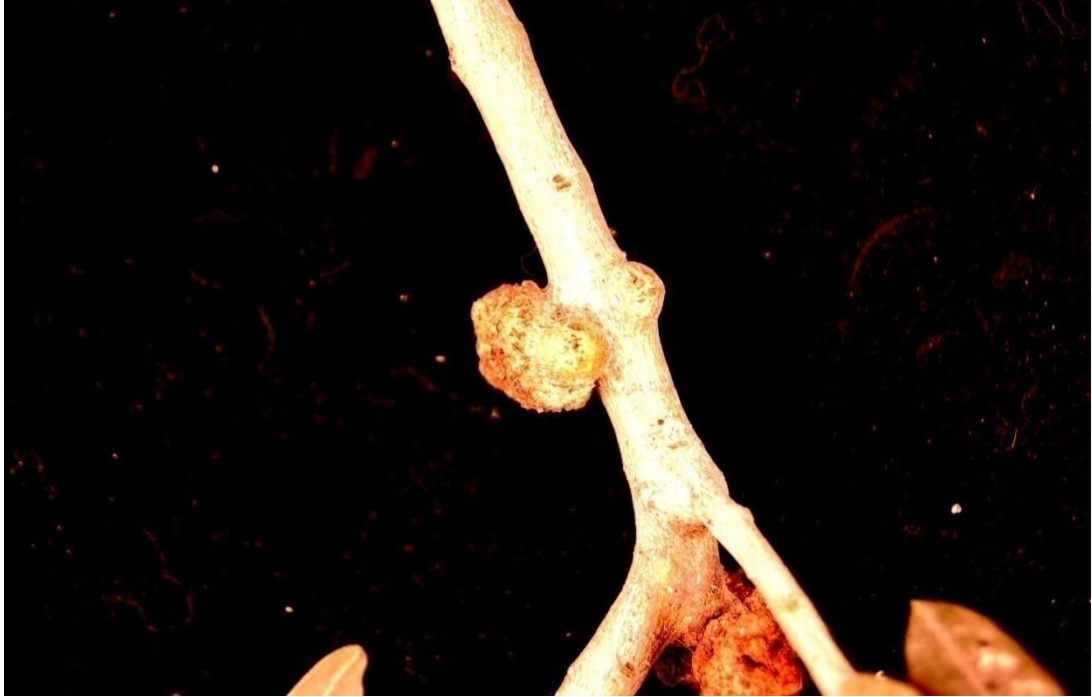
1.2 Η ασθένεια “καρκίνωση της ελιάς”

Το είδος *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* αποτελεί το παθογόνο αίτιο που προκαλεί την ασθένεια καρκίνωση της ελιάς (*Olea europaea*), προκαλώντας εναέριους όγκους και έλκη (Ramos *et al.*, 2012).

Τα βακτήρια του είδους *P. syringae* γενικά αξιοποιούν τον αποπλάστη των φυτών ως παρασιτική θέση και προκαλούν νέκρωση του φυλλώματος σε διάφορους φυτικούς ξενιστές, με μια μειοψηφία παθοτύπων που προκαλούν άλλα είδη συμπτωμάτων, όπως αδροβακτηριώσεις σε ξυλώδη φυτά (Agiros, 2005). Αξιοσημείωτη εξαίρεση αποτελούν ορισμένοι παθότυποι που σχηματίζουν εναέριους όγκους (Εικόνες 1,2,3), σε ξυλώδη φυτά όπως για παράδειγμα το *P. syringae* pv. *savastanoi* (πλέον έχει την ονομασία *P. savastanoi* pv. *savastanoi*) που προκαλεί την ασθένεια καρκίνωση της ελιάς, τα συμπτώματα της οποίας περιλαμβάνουν υπερπλαστικούς όγκους στους βλαστούς και τους βραχίονες του φυτού ξενιστή, και περιστασιακά στα φύλλα και τους καρπούς (Ramos *et al.*, 2012).



Εικόνα 1. Συμπτώματα καρκίνωσης σε βλαστό ελιάς.



Εικόνα 2. Νεαρός όγκος (κλειστός) σε βλαστό ελιάς, σύμπτωμα της καρκίνωσης.



Εικόνα 3. Ανοιχτός όγκος σε βλαστό ελιάς, σύμπτωμα της καρκίνωσης.

1.2.1 Γεωγραφική κατανομή και σπουδαιότητα

Το παθογόνο αίτιο (*P. savastanoi* pv. *savastanoi*) αρχικά περιγράφηκε από τον Ιταλό Savastano το 1889, ο οποίος το ονόμασε *Bacillus oleae tuberculosis* (Janse, 2005). Ο Αμερικανός φυτοβακτηριολόγος Erwin F. Smith ήταν ο πρώτος που περιέγραψε και ταξινόμησε πλήρως το βακτήριο το 1908 και αρχικά το ονόμασε *Bacterium savastanoi* (Παναγόπουλος, 2007; Janse, 2005). Οι χώρες στις οποίες έχει αναφερθεί προσβολή ελαιώνων από το *P. savastanoi* pv. *savastanoi* είναι οι εξής: Αλγερία, Αργεντινή, Αυστραλία, Αυστρία, Βραζιλία, Γαλλία, Ελλάδα, Ελβετία, Ηνωμένο Βασίλειο, Η.Π.Α., Ιράν, Ιράκ, Ισπανία, Ισραήλ, Κολομβία, Κύπρος, Λιβύη, Μαρόκο, Μεξικό, Νέα Ζηλανδία, Νότια Αφρική, Ολλανδία, Ουρουγουάη, Περού, Πολωνία, Σουηδία, Τανζανία, Τουρκία, Τυνησία, οι χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης, οι χώρες της πρώην Γιουγκοσλαβίας (Janse, 2005), αν και γενικότερα θεωρείται ότι η ασθένεια υπάρχει σ' όλες τις ελαιοκομικές περιοχές του κόσμου (Παναγόπουλος, 2007). Σε μεγάλη προσβολή των βλαστών και των βραχιόνων, όταν οι όγκοι δηλαδή φτάσουν σε σημείο να ενωθούν μεταξύ τους, το αποτέλεσμα θα είναι η ξήρανση των βλαστών ή των βραχιόνων. Τέλος υπάρχει μειωμένη ανάπτυξη, και η ασθένεια μπορεί να επιδράσει αρνητικά στην απόδοση των καρπών και την ποιότητα του ελαιολάδου (Janse, 2005).

1.2.2 Συμπτώματα της ασθένειας

Ακανόνιστοι, λείοι που αργότερα γίνονται τραχείς όγκοι σχηματίζονται κυρίως σε βλαστούς και βραχίονες, αλλά μπορούν επίσης να βρεθούν στις ρίζες, στον κορμό, στα φύλλα, στους μίσχους των φύλλων και στους ποδίσκους των καρπών (Janse, 2005). Αρχικά οι όγκοι είναι μαλακοί και κιτρινωποί, αλλά μετά από κάποιο χρονικό διάστημα σκληραίνουν και αποκτούν καστανό μεταχρωματισμό καθώς και νεκρωτικές περιοχές. Στο εσωτερικό των νεαρών όγκων εμφανίζονται, μικρές υδατώδεις περιοχές, που περιέχουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις το παθογόνο βακτήριο (Παναγόπουλος, 2007). Η μεγάλη προσβολή των βλαστών από το βακτήριο έχει ως αποτέλεσμα οι βλαστοί αυτοί να εμφανίζονται καχεκτικοί και στο τέλος να νεκρώνονται. Σε δέντρα μικρής ηλικίας, όταν η προσβολή στον κορμό, στο λαιμό ή τις ρίζες είναι μεγάλη, προκαλείται εξασθένηση του φυτού, η παραγωγή μειώνεται και το δέντρο μπορεί να νεκρωθεί (Παναγόπουλος, 2007). Η προσβολή στους καρπούς της ελιάς ξεκινάει από τα φακίδια,

και εμφανίζεται με τη μορφή κηλίδων οι οποίες περιβάλλονται από χλωρωτική αλώ. Στο τέλος οι όγκοι σχίζονται, και από τη σχισμή όταν επικρατεί υψηλή υγρασία, εξέρχεται παχύρευστο υγρό πλήρες βακτηρίων (βακτηριακό έκκριμα) (Παναγόπουλος, 2007). Τα δέντρα είναι δυνατό μολυνθούν καθ' όλη τη διάρκεια του έτους με την προϋπόθεση να επικρατεί υγρός καιρός (Παναγόπουλος, 2007).

Ανθεκτικές ποικιλίες στην ασθένεια είναι, η Καλαμών, η Μεγαρίτικη και η Θασίτικη, ενώ η Κορωνέικη και η Αμφίσης είναι ιδιαίτερα ευπαθείς (Παναγόπουλος, 2007).

1.2.3 Μετάδοση του παθογόνου αιτίου

Το παθογόνο επιβιώνει στους ιστούς των όγκων και μεταδίδεται όταν εξέρχεται ως βακτηριακό έκκριμα, μέσω της βροχής, των εντόμων, από τα εργαλεία κλαδέματος και από τα μολυσμένα φυτάρια (Janse, 2005). Επίσης τα βακτήρια επιβιώνουν και επιφυτικά. Οι πληθυσμοί του βακτηρίου κατανέμονται ανισομερώς στα φυτά και υφίστανται έντονες διακυμάνσεις στη διάρκεια του έτους, με τη μέγιστη συγκέντρωση των βακτηρίων να παρατηρείται κατά τους βροχερούς και ζεστούς μήνες (Ramos *et al.*, 2012). Το μέγεθος του πληθυσμού του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* είναι εξαιρετικά μεταβλητό, ακόμη και κατά αρκετές τάξεις μεγέθους μεταξύ διαφορετικών φύλλων του ίδιου βλαστού (Quesada *et al.*, 2007).

1.2.4 Ταξινόμηση του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Το *P. savastanoi* pv. *savastanoi* ανήκει στο Βασίλειο Bacteria, στη Συνομοταξία Proteobacteria, στην Κλάση Gammaproteobacteria, στην Οικογένεια Pseudomonadaceae, στο Γένος *Pseudomonas* και στο Είδος *Pseudomonas savastanoi*. Όπως ήδη αναφέρθηκε, συνώνυμο επίσης του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* είναι και το *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* και ανήκει στην ομάδα του *P. syringae*, στην οποία συμπεριλαμβάνονται πάνω από 60 παθότυποι. Αναλύσεις αλληλουχίας έχουν δείξει ότι το *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (NCPFB 3335) βρίσκεται εξελικτικά πιο κοντά στα *P. syringae* pv. *aesculi* (NCPFB 3681), *P. syringae* pv. *tabaci* (ATCC 11528) και *P. syringae* pv. *phaseolicola* (1448A) από ότι στο *P. syringae* pv. *tomato* (DC3000) ή το *P. syringae* pv. *syringae* (B728a) (Parkinson *et al.*, 2011; Sarkar and Guttman, 2004).

1.2.5 Βιοχημικά χαρακτηριστικά και βιολογία του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*

Το *P. savastanoi* pv. *savastanoi* έχει σχήμα ραβδοειδές, είναι αρνητικό κατά Gram, είναι αερόβιο, κινείται καθώς φέρει 1-4 πολικά μαστίγια και το μέγεθός του είναι 0.4-0.8 x 1.0-3.0 μm (Ramos *et al.*, 2012). Έχει οξειδωτικό μεταβολισμό της γλυκόζης, παράγει ινδολυλοξικό οξύ (IAA), η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι 25-26 °C, ενώ η μέγιστη 35 °C και η ελάχιστη 1 °C (Παναγόπουλος, 2007). Υπεύθυνο γονίδιο για την παραγωγή ινδολυλοξικού οξέος (IAA) είναι το *iaaL* το οποίο απαντάται στους περισσότερους παθότυπους της ομάδας του *P. syringae*. Επίσης οι περισσότερες απομονώσεις του παράγουν πρασινοκίτρινη φθορίζουσα χρωστική (Παναγόπουλος, 2007).

Το βακτήριο δεν επιβιώνει για μεγάλο διάστημα στο έδαφος, και συναντάται επιφυτικά στα φύλλα και κυρίως ενδοφυτικά μέσα στους όγκους. Τα συμπτώματα συχνά σχετίζονται με πληγές σε βλαστούς, φύλλα και καρπούς (Janse, 2005). Η μόλυνση γίνεται από τις πληγές που προκαλούνται από το κλάδεμα των δέντρων, το ράβδισμα των βλαστών για τη συλλογή του καρπού, το χαλάζι, τον παγετό, καθώς και από τις ουλές που σχηματίζονται με την πτώση των φύλλων. Οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί του βακτηρίου συναντώνται τους βροχερούς μήνες με μέτριες θερμοκρασίες (10-20 °C) (Ramos *et al.*, 2012).

Στενή σύνδεση με τους όγκους, που σχηματίζονται από τον παρασιτισμό του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, έχει μια πληθώρα από μη παθογόνα είδη βακτηρίων, πολλά από τα οποία μπορούν να συνθέσουν μεγάλες ποσότητες ινδολυλοξικού οξέος (IAA), κάτι το οποίο ευνοεί τον πολλαπλασιασμό του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Το είδος *Pantoea agglomerans* είναι αυτό που βρέθηκε πιο συχνά να σχετίζεται με τους πληθυσμούς του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, και η αύξησή του φαίνεται να διεγείρεται από την παρουσία του ενεργού πληθυσμού του παθογόνου (Marchi *et al.*, 2006; Quesada *et al.*, 2007).

1.2.6 Αντιμετώπιση

Η καρκίνωση της ελιάς δεν είναι δυνατό να εξαλειφθεί από τη στιγμή που θα εγκατασταθεί σε ένα οπωρώνα, και επομένως η αντιμετώπιση της βασίζεται σε προληπτικά μέτρα.

Ο Παναγόπουλος (2007) προτείνει για την αντιμετώπιση της ασθένειας τα παρακάτω καλλιεργητικά και προληπτικά μέτρα:

1. Όταν η προσβολή είναι μικρή, οι ασθενείς βλαστοί πρέπει να αφαιρούνται και να καίγονται. Επίσης όταν οι όγκοι εμφανίζονται στους βραχίονες ή στον κορμό, θα πρέπει να αφαιρούνται, και οι πληγές να αλείφονται με βορδιγάλιο πολύ. Οι συγκεκριμένες εργασίες θα πρέπει να γίνονται το καλοκαίρι.

2. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται απολυμαντικά για τα εργαλεία κλαδέματος, όπως για παράδειγμα η φορμόλη.

3. Το κλάδεμα, όπως επίσης και το ράβδισμα για τη συλλογή του ελαιόκαρπου, θα πρέπει να αποφεύγονται όταν επικρατούν συνθήκες υψηλής υγρασίας.

4. Όταν υπάρξει παγετός ή χαλάζι τα δέντρα θα πρέπει να ψεκάζονται με κάποιο χαλκούχο σκεύασμα.

5. Τέλος θα πρέπει να επιλέγεται πάντα υγιές πολλαπλασιαστικό υλικό για την εγκατάσταση ενός νέου δενδρώνα.

1.3 Βακτηριοφάγοι

1.3.1 Ορισμός και ανακάλυψη των βακτηριοφάγων

Οι βακτηριοφάγοι, ή αλλιώς εν συντομία φάγοι, αποτελούν ομάδα ιών που μολύνουν βακτήρια και προκαλούν τη λύση των κυττάρων τους (Ceysens, 2009).

Το όνομα βακτηριοφάγος δόθηκε από τον Καναδό βακτηριολόγο Felix d'Herelle, σε μια ουσία που προκαλούσε λύση των βακτηριακών κυττάρων, και η οποία είχε απομονωθεί από περιττώματα (Adams, 1959). Ο d'Herelle επίσης ήταν αυτός που απέδειξε ότι η κυτταρική λύση συνοδεύεται από παραγωγή περισσότερων φάγων και ότι ο παράγοντας που ευθύνεται για τη λύση μεταδίδεται μεταξύ των καλλιεργειών ευαίσθητων βακτηρίων (Adams, 1959). Η ανακάλυψη των βακτηριοφάγων από τον Felix d'Herelle έγινε το 1917 στο ινστιτούτο Παστέρ στο Παρίσι, και μετά από αυτό ακολούθησε η δημοσίευση μιας σειράς εργασιών όπου παρουσιαζόταν η δράση των βακτηριοφάγων.

1.3.2 Βιολογικός κύκλος των βακτηριοφάγων

Ένας τυπικός βακτηριοφάγος μπορεί να υφίσταται σε τρεις διαφορετικές καταστάσεις, τον προφάγο, τον αναπτυσσόμενο φάγο και τον ώριμο φάγο. Οι βακτηριοφάγοι μακριά από τα κύτταρα των ξενιστών τους υφίστανται ως ώριμοι φάγοι, θυμίζοντας την κατάσταση των σπορίων στα βακτήρια (Adams, 1959). Στη συνέχεια όταν ο φάγος προσροφηθεί σε κάποιο βακτηριακό κύτταρο το τμήμα της ουράς του διεισδύει εντός του κυτταρικού τοιχώματος εισάγοντας το νουκλεϊκό οξύ του φάγου εντός του κυττάρου και έτσι μπορεί να αρχίσει να πολλαπλασιάζεται (Adams, 1959). Κατά τον πολλαπλασιασμό μέσα στο κύτταρο του ξενιστή, ο φάγος βρίσκεται στην κατάσταση του αναπτυσσόμενου φάγου, και χαρακτηρίζεται από μεγάλη αναπαραγωγική ικανότητα. Ωστόσο, ορισμένοι φάγοι αφού προσροφηθούν σε ένα κύτταρο και εισχωρήσουν εντός του, μπορεί να μη μετασηματισθούν στην κατάσταση του αναπτυσσόμενου φάγου, αλλά στην κατάσταση του προφάγου, κατά την οποία ο φάγος συμβιώνει με το κύτταρο του ξενιστή του χωρίς να το καταστρέφει. Η συμβιωτική αυτή κατάσταση μεταξύ φάγου και κυττάρου ξενιστή είναι γνωστή και ως λυσιγονία (Adams, 1959).

Συνοψίζοντας λοιπόν, ο κύκλος ζωής ενός φάγου περιγράφεται από τα εξής: εξωκυττάρια αναζήτηση ευαίσθητου βακτηριακού κυττάρου και προσρόφιση σε αυτό, απελευθέρωση του γονιδιώματός του εντός του κυττάρου, πολλαπλασιασμός και ωρίμανση των νέων φάγων, και στη συνέχεια απελευθέρωση αυτών στο εξωκυττάριο περιβάλλον (λύση του κυττάρου) (Adams, 1959).

1.3.3 Δομή των βακτηριοφάγων

Το σωματίδιο ενός βακτηριοφάγου αποτελείται από ένα μονόκλωνο ή δίκλωνο μόριο DNA ή RNA το οποίο προστατεύεται από ένα πρωτεϊνικό περίβλημα (Ceysens, 2009). Τα βασικά τμήματα ενός κοινού βακτηριοφάγου είναι: η κεφαλή, ο λαιμός, ο άξονας της ουράς, οι ίνες της ουράς και η βάση (Calendar, 1988).

Οι κεφαλές των φάγων έχουν γενικά εξαγωνικό περίγραμμα όπως είναι αναμενόμενο από ένα εικοσάεδρο, και αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικής φύσεως καψίδιο (Calendar, 1988; Gill and Abedon, 2003). Εντός του πρωτεϊνικού καψιδίου της κεφαλής βρίσκεται το γονιδίωμα του φάγου το οποίο τις περισσότερες φορές είναι DNA και λιγότερο συχνά RNA. Το πρωτεϊνικό καψίδιο παίζει τους εξής τρεις

σημαντικούς ρόλους στον κύκλο ζωής των φάγων: προστατεύει το γονιδίωμα του φάγου κατά τη διάρκεια της εξωκυτταρικής αναζήτησης (από ένζυμα αποικοδόμησης DNA), επιδρά στην προσκόλληση του φάγου σε ένα ευαίσθητο βακτηριακό κύτταρο, και συμβάλει στη μετέπειτα μεταφορά του γονιδιώματος του φάγου μέσα στο κυτόπλασμα του μολυσμένου βακτηρίου (Gill and Abedon, 2003).

Το τμήμα της ουράς στους φάγους αποτελείται από τον άξονα, τα ινίδια και τη βάση. Το μήκος της ουράς εξαρτάται από το μήκος του άξονά της και χαρακτηρίζεται από δύο γενικούς τύπους: ευέλικτη μη συσταλτή, και άκαμπτη συσταλτή (Calendar, 1988). Είναι πιθανό ότι ο άξονας της ουράς αποτελεί αγωγό παθητικής μεταφοράς του DNA, καθώς δεν υπάρχει καμία απόδειξη ότι συμμετέχει ενεργά στην προώθηση του από την κεφαλή προς το κύτταρο του ξενιστή κατά την μεταφορά του γονιδιώματος (Calendar, 1988). Εξωτερικά ο άξονας περιβάλλεται από μια κυλινδρική θήκη που αποτελείται από πρωτεΐνες ελικοειδώς διατεταγμένες (Calendar, 1988).

Τα ινίδια της ουράς βρίσκονται στο άκρο της ουράς και είναι τα οργανίδια που συμβάλλουν στην προσρόφηση του φάγου σε κάποιο ευαίσθητο κύτταρο. Τα ινίδια μπορεί να είναι παχιά ή λεπτά, μακριά ή κοντά. Επίσης σε ορισμένους φάγους τα ινίδια μπορεί να υπολείπονται (Calendar, 1988).

Η βάση είναι το τμήμα στο άκρο της ουράς πάνω στο οποίο εδράζονται τα ινίδια. Η βάση αυτή συνδέει το καψίδιο της κεφαλής με την επιφάνεια του κυττάρου, μεταφέροντας το DNA μέσω του σωλήνα του άξονα της ουράς (Calendar, 1988).

1.3.4 Προέλευση των βακτηριοφάγων

Σύμφωνα με την επικρατέστερη θεωρία, μια σειρά μεταλλάξεων σε ένα τμήμα του γενετικού υλικού βακτηρίων, είχαν ως αποτέλεσμα το τμήμα αυτό του γενετικού υλικού να αποκτήσει ορισμένο βαθμό αυτονομίας (Adams, 1959). Το αποτέλεσμα των μεταλλάξεων ήταν να συντεθεί ένα συγκεκριμένο είδος πρωτεΐνης, που σκοπός της είναι να προστατεύει το τμήμα του γενετικού υλικού από το εξωκυττάριο περιβάλλον και να συμβάλλει στη μεταφορά του γενετικού υλικού μεταξύ των κυττάρων. Επίσης δεν είναι απίθανο οι βακτηριοφάγοι να έχουν εξελιχθεί από ένα πρωτόγονο μηχανισμό, που αναπτύχθηκε αρχικά για να μεταφέρει γενετικό υλικό μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων (Adams, 1959). Πλέον είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι βακτηριοφάγοι αποτελούν οχήματα για τη μεταφορά γονιδίων μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων, ασκώντας πίεση επιλογής στους πληθυσμούς των ξενιστών τους και ρυθμίζοντας έτσι

τη μικροβιακή ποικιλότητα (Ceyskens, 2009). Τέλος υπάρχει και η υπόθεση ότι, ορισμένοι φάγοι έχουν την ικανότητα να υποβάλλονται σε γενετικό ανασυνδυασμό με τα κύτταρα των ξενιστών τους, με αποτέλεσμα οι νέοι φάγοι που προκύπτουν να μολύνουν είδη βακτηρίων τα οποία πριν ήταν απρόσβλητα (Ceyskens, 2009).

1.3.5 Λυσιγονία

Οι φάγοι μπορούν να διαφοροποιηθούν σε δύο τύπους, στους ήπιους και σε αυτούς που προκαλούν υποχρεωτικά λύση των κυττάρων. Μόνο οι ήπιοι φάγοι μπορούν να εμφανίσουν λυσιγονία (Gill and Abedon, 2003). Κάθε βακτηριακό κύτταρο, σε μια λυσιγονική καλλιέργεια βακτηρίων, είναι ικανό να μεταδώσει φάγους στους απογόνους του (Adams, 1959). Σύμφωνα με τον Lwoff (1953), τα λυσιγονικά βακτηριακά κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται χωρίς να απελευθερώνουν ώριμους φάγους και χωρίς να χάνουν τη λυσιγόνο ικανότητα ακόμη και μετά από πολλές διαιρέσεις. Επίσης πάλι σύμφωνα με τον Lwoff (1953), κατά τη λύση λυσιγονικών κυττάρων από άλλους φάγους ή από μηχανικά μέσα, δεν απελευθερώνονται ώριμα σωματίδια φάγων, παρά μόνο όταν υπάρξει λύση των κυττάρων αυθόρμητα ή αποσύνθεση αυτών. Τα λυσιγονικά βακτήρια είναι πολύ κοινά στη φύση και ίσως αποτελούν την κύρια δεξαμενή των βακτηριοφάγων (Adams, 1959). Αποτέλεσμα της λυσιγονίας είναι τα βακτήρια να αποκτούν ανθεκτικότητα σε μολύνσεις από παρόμοιους (ομόλογους) φάγους (Gill and Abedon, 2003). Ωστόσο τα συγκεκριμένα βακτήρια (λυσιγονικά) μπορούν να μολυνθούν από φάγους που είναι συγγενικοί με τον ήδη υπάρχοντα αλλά έχουν υποστεί κάποια μετάλλαξη, ή από φάγους που διαφέρουν από τον ήδη υπάρχοντα ήπιο φάγο (Gill and Abedon, 2003).

1.3.6 Ταξινόμηση των βακτηριοφάγων

Οι βακτηριοφάγοι σύμφωνα με τον Adams (1959), μπορούν να διαχωριστούν σε ομάδες ανάλογα με τα είδη των βακτηρίων που μολύνουν, όπως για παράδειγμα σε τυφοειδείς φάγους ή σταφυλοκοκκικούς φάγους. Επίσης ονομάζονται βάσει χαρακτηρισμών συγκεκριμένων απομονώσεων ή συλλογών, για να προσδιορίσουν συγκεκριμένους φάγους όπως είναι ο λ, ο T1 ή ο P8. Οι φάγοι επίσης μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Όσον αφορά τη συνάφεια ή τη συγγένεια των φάγων, αυτή ορίζεται όταν δύο ή περισσότεροι φάγοι

έχουν κοινό ξενιστή, κοινή μορφολογία και συνήθως ορισμένα κοινά αντιγόνα (Adams, 1959).

Η διεθνής επιτροπή για την ταξινόμηση των ιών (ICTV) βασιζόμενη κυρίως στη μορφολογία του ιοσωματίου και στη σύνθεση του νουκλεϊκού οξέος, τους διαχωρίζει σε δύο τάξεις και δεκατρείς οικογένειες. Η τάξη *Caudovirales* είναι αυτή με τα περισσότερα μέλη και περιλαμβάνει φάγους που έχουν ουρά και δίκλωνο μόριο DNA. Οι τρεις κύριες οικογένειες που περιλαμβάνει η τάξη *Caudovirales* διακρίνονται μεταξύ τους από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της ουράς τους: το 60% των φάγων αυτών ανήκουν στην οικογένεια *Siphoviridae* και έχουν μακριές και εύκαμπτες ουρές, το 25% ανήκει στην οικογένεια *Myoviridae* με διπλής στρώσης συσταλτές ουρές, και το 15% ανήκει στην οικογένεια *Podoviridae* με βραχείες ουρές με μεγάλη διάμετρο (Ceysens, 2009). Οι πολυεδρικοί, νηματοειδής και πλειόμορφοι φάγοι αποτελούν μόνο το 3-4% των φάγων που έχουν μελετηθεί και ανήκουν σε δέκα οικογένειες, μερικές από τις οποίες έχουν μικρό αριθμό φάγων (Ackermann, 2006). Οι φάγοι που φέρουν ουρά και έχουν δίκλωνο μόριο DNA συνήθως αποτελούνται από μια αναλογία πρωτεϊνών-DNA 1:1 και το χρωμόσωμα τους βρίσκεται συμπυκνωμένο εντός της κεφαλής τους, αντιπροσωπεύοντας το 20-50% της μάζας του ιού (Ceysens, 2009; Earnshaw and Harrison, 1977). Όλα τα μέλη της τάξης *Caudovirales* έχουν κεφαλές με εικοσαεδρική συμμετρία (20 πλευρές/12 κορυφές). Το μέγεθος των κεφαλών τους σχετίζεται με το μέγεθος του γονιδιώματος που φέρουν, και αυτό ποικίλει σε διάμετρο μεταξύ 45 και 100 nm (Ceysens, 2009). Τέλος όσοι φάγοι χαρακτηρίζονται από σύμβολα χωρίς να γίνεται αναφορά στον ξενιστή τους, συνήθως είναι από τους ευρύτερα μελετημένους και αναγνωρισμένους φάγους (Ceysens, 2009).

1.3.7 Διαδικασία της μόλυνσης βακτηριακού κυττάρου από φάγο

Τα βασικά στάδια της μόλυνσης ενός βακτηρίου από βακτηριοφάγο είναι τα εξής: α) προσρόφηση του φάγου στο βακτηριακό κύτταρο, β) διείσδυση του φάγου στο βακτηριακό κύτταρο και μεταφορά του γονιδιώματός του εντός του κυττοπλάσματος, πολλαπλασιασμός του φάγου μέσα στο βακτηριακό κύτταρο και τέλος γ) λύση του βακτηριακού κυττάρου και απελευθέρωση των απογόνων του φάγου (Adams, 1959). Ως προσρόφηση μπορεί να οριστεί η προσκόλληση ενός σωμαστιδίου φάγου πάνω σε βακτηριακό κύτταρο (Adams, 1959).

Πριν τη μόλυνση των βακτηριακών κυττάρων, οι φάγοι συνυπάρχουν με βακτήρια σε υδατικό περιβάλλον μέχρι την τυχαία επαφή ενός φάγου με ευαίσθητο βακτηριακό κύτταρο (Gill and Abedon, 2003). Η πιθανότητα για ένα άτομο φάγου να έρθει σε επαφή με βακτηριακό κύτταρο και να το μολύνει, εξαρτάται από το ρυθμό διάχυσής του αλλά και την πυκνότητα των φάγων και των ευαίσθητων βακτηρίων με αποτέλεσμα η μεγάλη πυκνότητα βακτηριακών κυττάρων να σημαίνει και ταχεία μόλυνσή τους (Kasman *et al.*, 2002).

Η προσρόφηση των βακτηριακών κυττάρων από τους φάγους είναι μια χημική και φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ τους (Gill and Abedon, 2003). Κρίσιμος παράγοντας για την προσρόφηση των φάγων στα βακτηριακά κύτταρα είναι το ιοντικό περιβάλλον στο οποίο λαμβάνει χώρα η διαδικασία, καθώς μη ευνοϊκή συγκέντρωση άλατος μπορεί να αποτρέψει την προσρόφηση των κυττάρων (Adams, 1959). Αδυναμία προσρόφησης μπορεί επίσης να συμβεί και παρουσία αντισωμάτων κοντά στα βακτήρια τα οποία επικαλύπτουν τις θέσεις υποδοχείς των βακτηριακών κυττάρων. Κατά την προσρόφηση, πρωτεΐνες των φάγων αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μόρια στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, η μόλυνση ενός βακτηριακού κυττάρου από βακτηριοφάγο ξεκινάει με μια εξαιρετικά ειδική και μη αναστρέψιμη αλληλεπίδραση πρωτεϊνών του σωματιδίου του φάγου, με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας όπως είναι οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης ή οι δομές των λιποπολυσακχαριτών στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Klumpp *et al.*, 2013). Οι πρωτεΐνες επίσης που βρίσκονται στη βάση των φάγων έχει αποδειχτεί ότι είναι απαραίτητες για τη δέσμευση του κυττάρου ξενιστή (Klumpp *et al.*, 2013).

Μετά την προσρόφηση του φάγου στο βακτηριακό κύτταρο, ακολουθεί η διείσδυση εντός του κυτταρικού τοιχώματος και η έγχυση του γονιδιώματός του. Εξειδικευμένες πρωτεΐνες που υπάρχουν στην ουρά, μεσολαβούν για την τοπική αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος, επιτρέποντας έτσι τη μεταφορά του γονιδιώματος (Klumpp *et al.*, 2013). Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέουν την κεφαλή με την ουρά του φάγου, και αποτελούν ολιγομερείς δομές που βρίσκονται σε συγκεκριμένο σημείο στην κορυφή της ουράς. Εκτός από τη μεταφορά του γονιδιώματος ελέγχουν και τη συναρμολόγηση της ουράς στους ανώριμους φάγους, κατά τη μορφογένεση των νέων σωματιδίων εντός του βακτηριακού κυττάρου (Ceysens, 2009). Η ουρά συνδέει τον φάγο με το κύτταρο του ξενιστή και χρησιμεύει ως αγωγός για την έγχυση του γονιδιώματος (Ceysens, 2009). Πιο συγκεκριμένα, το πρωτεϊνικό περίβλημα της ουράς συστέλλεται και ο αγωγός της διαπερνά την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη και το

κυτταρικό τοίχωμα (Leiman *et al.*, 2004). Η μολυσματική διαδικασία που περιλαμβάνει τη χρήση της ουράς πλεονεκτεί εξελικτικά έναντι άλλων στρατηγικών ιικής μόλυνσης, και αυτό μπορεί να ευθύνεται για το ότι οι φάγοι με ουρά είναι οι πιο πολυάριθμες βιολογικές οντότητες στον πλανήτη (Hendrix, 2002).

Μετά τη μόλυνση τους από τους φάγους τα βακτηριακά κύτταρα σταματούν να διαιρούνται. Η σύνθεση του DNA και του RNA του βακτηρίου σχεδόν σταματά, μετά όμως από ένα μικρό διάστημα αρχίζει η σύνθεση του DNA του φάγου (Adams, 1959). Η πρωτεϊνοσύνθεση του βακτηρίου επίσης συνεχίζεται. Ο πολλαπλασιασμός των φάγων ξεκινάει καθώς αρχίζει η σύνθεση του DNA και των πρωτεϊνών. Μετά από ένα μικρό διάστημα το DNA του φάγου ρυθμίζει τις κυτταρικές λειτουργίες και επαναπρογραμματίζει το βακτηριακό κύτταρο για την παραγωγή νέων φάγων (Klumpp *et al.*, 2013). Αφού παραχθούν οι πρωτεΐνες και αντίγραφα DNA του φάγου, οι απόγονοί του συναρμολογούνται. Τέλος ακολουθεί η κυτταρική λύση του βακτηριακού κυττάρου και η απελευθέρωση των απογόνων του φάγου. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την προσρόφηση μέχρι τη λύση του κυττάρου και την απελευθέρωση των απογόνων του φάγου, ονομάζεται λανθάνουσα περίοδος. Στην περίπτωση μόλυνσης από κάποιο ήπιο φάγο δεν επέρχεται η λύση του κυττάρου, αλλά η ενσωμάτωση του γονιδιώματος του φάγου στο χρωμόσωμα του ξενιστή, έχοντας ως αποτέλεσμα την αλλαγή στην έκφραση των γονιδίων του (Klumpp *et al.*, 2013).

1.3.8 Μόλυνση βακτηρίων από φάγους σε υγρά και στερεά θρεπτικά υποστρώματα

Όταν κάποιοι φάγοι προστεθούν σε υγρή αναπτυσσόμενη καλλιέργεια ενός ευαίσθητου βακτηρίου, η σειρά των γεγονότων που θα ακολουθήσουν σύμφωνα με τον Adams (1959) θα είναι η εξής: Αρχικά τα σωματίδια των φάγων θα προσροφηθούν στα βακτηριακά κύτταρα και μέσα σ' ένα μικρό διάστημα θα επέλθει η λύση των μολυσμένων κυττάρων και η απελευθέρωση των απογόνων των φάγων. Οι απόγονοι στη συνέχεια θα προσροφηθούν και αυτοί με τη σειρά τους σε όσα κύτταρα δεν είχαν μολυνθεί και θα ακολουθήσει η έναρξη ενός δευτέρου κύκλου μόλυνσης. Οι μολυσματικοί κύκλοι ακολουθούν ο ένας τον άλλο και ο πληθυσμός των φάγων αυξάνεται σε κάθε κύκλο, έως ότου όλα τα ευαίσθητα βακτηριακά κύτταρα υποστούν λύση. Στο τέλος της διαδικασίας η υγρή καλλιέργεια εμφανίζεται διαυγής και παραμένει έτσι επ' αόριστον. Ο χρόνος που απαιτείται για την λύση των κυττάρων εξαρτάται κυρίως από τη λανθάνουσα περίοδο και τον αριθμό των φάγων που

προστέθηκαν στην καλλιέργεια. Η συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων καθώς και ο ρυθμός προσρόφησής των φάγων παίζουν δευτερεύοντα ρόλο.

Σε καλλιέργεια βακτηρίων η οποία αναπτύσσεται σε στερεό μέσο και μολύνεται με κάποιο βακτηριοφάγο, η ακολουθία των γεγονότων πάλι σύμφωνα με τον Adams (1959) θα είναι η εξής: Μόλις το σωματίδιο του φάγου τοποθετηθεί πάνω στο βακτηριακό υπόστρωμα, θα προσροφηθεί σε ένα βακτηριακό κύτταρο και θα αρχίσει ένας μολυσματικός κύκλος. Οι απόγονοι του φάγου παραμένουν αρχικά στην περιοχή της λύσης και σταδιακά αρχίζουν να μετακινούνται με αργή διάχυση μέσω του υποστρώματος. Στη συνέχεια τα γειτονικά βακτηριακά κύτταρα μολύνονται και λύνονται και αυτά με τη σειρά τους, αυξάνοντας έτσι περεταίρω τον πληθυσμό των φάγων. Τελικά η περιοχή των βακτηρίων που έχουν υποστεί λύση γίνεται ορατή με γυμνό μάτι και εμφανίζεται ως μια κυκλική ζώνη άνευ βακτηρίων. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται πλάκες και το μέγεθός και η μορφολογία τους εξαρτώνται από τον συνδυασμό μεταξύ των φάγων και των βακτηρίων. Το μέγεθος των πλακών συνήθως φθάνει στο μέγιστο μετά από 8 με 12 ώρες και στη συνέχεια σταματάει να αναπτύσσεται καθώς εξαρτάται από την ενεργή ανάπτυξη των βακτηρίων. Η διαύγεια των πλακών εξαρτάται από την ολοκληρωτική λύση των βακτηρίων που κατά συνέπεια θα είναι ευαίσθητα. Όσο περισσότερα ανθεκτικά βακτήρια υπάρχουν τόσο πιο θολές εμφανίζονται οι πλάκες. Κάθε πλάκα σχηματίζεται από τη μολυσματική διαδικασία και τον πολλαπλασιασμό ενός συγκεκριμένου φάγου.

1.3.9 Εύρος ξενιστών

Το εύρος των ξενιστών των περισσότερων φάγων, δηλαδή τα είδη που είναι ικανά να μολύνουν και να παράγουν απογόνους, είναι σχετικά περιορισμένο, και συνήθως αφορά ένα μόνο βακτηριακό γένος, είδος ή ακόμη και ορισμένο μόνο αριθμό στελεχών ενός συγκεκριμένου είδους (Gill and Abedon, 2003). Έτσι ενώ η συνολική πυκνότητα των φάγων μπορεί να είναι τεράστια, έως 100 εκατομμύρια ή και περισσότερο ανά γραμμάριο εδάφους ή ml νερού, η πραγματική πυκνότητα των φάγων που είναι ικανοί να μολύνουν ένα συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος είναι συνήθως πολύ μικρότερη (Gill and Abedon, 2003; Ashelford *et al.*, 2002; Wommack and Colwell, 2000).

Τα βακτηριακά στελέχη που έχει βρεθεί ότι αποτελούν ξενιστές βακτηριοφάγων, ανήκουν στα ακόλουθα γένη: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Chromobacterium*, *Micrococcus*, *Gaffkya*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*,

Corynebacterium, *Pasteurella*, *Brucella*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Nocardia* και όλα τα γένη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Adams, 1959).

1.3.10 Βακτηριοφάγοι στη ριζόσφαιρα

Οι βακτηριοφάγοι στην περιοχή της ριζόσφαιρας, που ορίζεται ως το έδαφος που περιβάλλει τις ρίζες καθώς και η επιφάνεια των ριζών των φυτών, εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη δομή και το pH του εδάφους. Σε συνθήκες έλλειψης εδαφικής υγρασίας οι βακτηριοφάγοι συμπεριφέρονται όπως τα κολλοειδή του εδάφους και προσκολλώνται στα εδαφικά τεμαχίδια. Επομένως μόνο όταν υπάρχει επαρκής εδαφική υγρασία οι βακτηριοφάγοι διαχέονται με ευκολία και έχουν περισσότερες πιθανότητες να συναντήσουν κάποιο βακτηριακό κύτταρο. Σε εδάφη με όξινο pH από την άλλη, οι βακτηριοφάγοι μπορεί να αδρανοποιηθούν (Gill and Abedon, 2003).

Ένα έδαφος με δεσμευμένους φάγους στα τεμαχίδια του θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως μια ζωντανή δεξαμενή μολύσματος που αξιοποιείται μόνο όταν τα βακτήρια μεγαλώνουν, διαχέονται ή κολυμπούν στην περιοχή των φάγων, ή αν τα ίδια τα τεμαχίδια του εδάφους μεταφέρονται σ' ένα περιβάλλον όπου υπάρχουνε βακτήρια (Gill and Abedon, 2003). Επομένως οι βακτηριοφάγοι στο έδαφος μπορούν να συναντήσουν και να προσροφηθούν σε κάποιο βακτηριακό κύτταρο, μέσω της διάχυσής τους στο εδαφικό διάλυμα (Gill and Abedon, 2003).

1.3.11 Βακτηριοφάγοι στη φυλλόσφαιρα

Η φυλλόσφαιρα, η επιφάνεια των φύλλων, οι βλαστοί και τα εναέρια τμήματα των φυτών δηλαδή αποτελούν αφιλόξενο περιβάλλον για τους βακτηριοφάγους, καθώς είναι εκτεθειμένοι σε αντίξοες συνθήκες όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία και η έλλειψη υγρασίας. Επειδή δεξαμενή των βακτηριοφάγων θεωρείται το έδαφος, προκύπτει το ερώτημα για το πώς οι βακτηριοφάγοι από το έδαφος μετακινούνται στα εναέρια τμήματα των φυτών. Σύμφωνα με τους Gill και Abedon (2003), υπάρχουν δύο πιθανές εξηγήσεις, η μια είναι ότι οι φάγοι μεταβαίνουν στη φυλλόσφαιρα κατά τη βλάστηση των σπόρων και στη συνέχεια παραμένουν ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του φυτού. Η δεύτερη είναι ότι οι φάγοι θα μπορούσαν να μετακινηθούν από φυτό σε φυτό μέσω της φυλλόσφαιρας, με το έδαφος να παραμένει ο συλλέκτης των φάγων από τη

φυλλόσφαιρα και όχι η δεξαμενή αυτών. Τα έντομα επίσης αποτελούν πιθανούς φορείς των βακτηριοφάγων από το έδαφος στα φυτά.

1.3.12 Αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων βακτηρίων με τη χρήση βακτηριοφάγων

Η προοπτική που υπάρχει είναι ότι οι βακτηριοφάγοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Αυτό προϋποθέτει την εφαρμογή σκευασμάτων που περιέχουν βακτηριοφάγους σε ορισμένα οικοσυστήματα, προκειμένου να μειωθεί το μέγεθος του πληθυσμού συγκεκριμένων βακτηρίων (Gill and Abedon, 2003). Η χρήση των βακτηριοφάγων για την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων βακτηρίων αποτελεί μια μορφή βιολογικής αντιμετώπισης, καθώς χρησιμοποιείται ένας οργανισμός για την αντιμετώπιση ενός άλλου. Όπως και στις άλλες μεθόδους βιολογικής καταπολέμησης έτσι και σε αυτή την περίπτωση, προκύπτει το πλεονέκτημα της μειωμένης χρήσης χημικών φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων, όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση σημαίνει μείωση της χρήσης των χημικών αντιβιοτικών (όπου αυτά χρησιμοποιούνται) (Gill and Abedon, 2003).

Περιπτώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν φάγοι για την αντιμετώπιση προσβολών από φυτοπαθογόνα βακτήρια σε φυτά ή φυτικά τεμάχια είναι οι εξής: για την απολύμανση μολυσμένων κονδύλων πατάτας εναντίον του *Streptomyces scabies*, για την αντιμετώπιση της βακτηριακής κηλίδωσης στα ροδάκινα εναντίον του *Xanthomonas pruni*, για την αντιμετώπιση του *Xanthomonas campestris* στη ροδακινιά, το λάχανο και την πιπεριά, για την αντιμετώπιση του *Ralstonia solanacearum*, για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος που προκαλείται από το *Erwinia amylovora*, καθώς επίσης και εναντίον του *Pseudomonas tolaasii* που προκαλεί τη βακτηριακή κηλίδωση στα μανιτάρια (Gill and Abedon, 2003).

1.4 Βακτηριοφάγοι του γένους *Pseudomonas*

Οι βακτηριοφάγοι που προσβάλλουν το γένος *Pseudomonas* έχουν μελετηθεί εκτενώς, και έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατηγοριοποίηση άλλων βακτηριοφάγων αλλά και για θεραπεία ανθρωπονόσων προκαλούμενες από βακτήρια (Zanetti *et al.*, 2013; Ceysens, 2009). Εμφανίζονται πλειόμορφοι και με ουρά στο ηλεκτρονικό

μικροσκόπιο και οι περισσότεροι ανήκουν στην τάξη *Caudovirales* που περιλαμβάνει τις οικογένειες *Myoviridae*, *Siphoviridae* και *Podoviridae* (Zanetti *et al.*, 2013).

1.4.1 Βακτηριοφάγοι του *Pseudomonas aeruginosa*

Το *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο εδάφους που ευδοκιμεί σε ποικίλα υγρά περιβάλλοντα και έχει την ικανότητα να προκαλεί ασθένειες σε ένα ευρύ φάσμα ξενιστών συμπεριλαμβανομένων φυτών, νηματωδών, εντόμων και ζώων (Ceyskens, 2009). Επίσης αποτελεί βακτήριο υγειονομικού ενδιαφέροντος καθώς είναι ευκαιριακό παθογόνο του ανθρώπου που προκαλεί λοιμώξεις απειλητικές για τη ζωή σε ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση, εγκαύματα, AIDS και άλλους ασθενείς με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα (Kerr και Snelling, 2009). Η αντιμετώπιση του *Pseudomonas aeruginosa* είναι πλέον προβληματική λόγω της ανθεκτικότητας που έχει αναπτύξει το βακτήριο σε πολλά κοινά αντιβιοτικά (Li *et al.*, 2010).

Αρκετοί είναι οι φάγοι του *Pseudomonas aeruginosa* με δίκλωνο μόριο DNA, που έχουν αλληλουχηθεί την τελευταία δεκαετία (Ceyskens, 2009). Από την οικογένεια *Myoviridae* ο φάγος ΦΚΖ αντιπροσωπεύει μια ομάδα φάγων με ευρεία μολυσματικότητα στα είδη του γένους *Pseudomonas*, που φέρουν ασυνήθιστα μεγάλες κεφαλές και ουρές με εμφανή κολάρο, που περιβάλλονται από χαλαρό δίκτυο ινιδίων (Ackermann *et al.*, 1988). Το γονιδίωμα μεγέθους 280 kb του ΦΚΖ είναι από τα μεγαλύτερα γονιδιώματα φάγων που έχουν αλληλουχηθεί, και έχει βρεθεί ότι είναι ταυτόσημο κατά 99% με το γονιδίωμα του SD1-M, και επίσης έχει παρόμοιο πυρήνα γονιδιώματος με τον 201Φ2-1 (Mesyanzhinov *et al.*, 2002; Kwan *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2008). Ο μόνος άλλος φάγος της οικογένειας *Myoviridae* που προσβάλλει τα είδη του γένους *Pseudomonas* και έχει αλληλουχηθεί πλήρως είναι ο ήπιος φάγος ΦCΤΧ, ο οποίος σχετίζεται γενετικά και μορφολογικά με τον Ρ2 (Nakayama *et al.*, 1999). Όλοι οι φάγοι που μολύνουν το γένος *Pseudomonas* και ανήκουν στην οικογένεια *Siphoviridae*, χαρακτηρίζονται από ήπια μολυσματικότητα που σημαίνει ότι μπορεί να έχουν λυτική η λυσιγονική αλληλεπίδραση με τον ξενιστή τους (Ceyskens, 2009).

1.4.2 Βακτηριοφάγοι του *Pseudomonas tolaasii*

Το *Pseudomonas tolaasii* είναι το αίτιο της ασθένειας της καφέ κηλίδωσης των καλλιεργούμενων μανιταριών και χαρακτηρίζεται από την παραγωγή της τολασίνης, μιας πεπτιδικής τοξίνης η οποία σχηματίζει πόρους στην επιδερμίδα των μανιταριών διασπώντας τα κύτταρα, και καστρέφοντας τις καρποφορίες τους (Kim *et al.*, 2010). Η μόλυνση από το *Pseudomonas tolaasii* συχνά κάνει την καλλιέργεια των μανιταριών πολύ δύσκολη, επειδή τα παθογόνα βακτήρια εξαπλώνονται πολύ εύκολα ιδιαίτερα κατά τη φάση της ανάπτυξης του μύκητα (Kim *et al.*, 2010).

Ισχυρή δράση εναντίον του *Pseudomonas tolaasii* έχει δείξει ο φάγος φPto-br6g, ο οποίος αποτελείται από εικοσαεδρική κεφαλή και μακριά ουρά, και ταξινομείται στην οικογένεια *Siphoviridae* (Nguyen *et al.*, 2012). Το γονιδίωμα του φPto-br6g έχει αλληλουχηθεί πλήρως και έχει μήκος 26,499 bp και το μόριό του είναι δίκλωνο DNA (Nguyen *et al.*, 2012). Ένας άλλος φάγος του *Pseudomonas tolaasii* είναι ο Bf7, ο οποίος αποτελείται από κοντή μη συσταλτή ουρά, εικοσαεδρική κεφαλή με διάμετρο 60 nm, γεγονός που υποδηλώνει ότι ανήκει στην οικογένεια *Podoviridae* (Nagy *et al.*, 2012). Το μόριό του είναι DNA και το γονιδίωμά του έχει μέγεθος 40,058 bp (Nagy *et al.*, 2012).

1.4.3 Βακτηριοφάγοι του *Pseudomonas fluorescens*

Το *Pseudomonas fluorescens* βρίσκεται συνήθως στο νερό και στο έδαφος, αλλά απαντάται επίσης και προκαλεί σημαντικά προβλήματα στη βιομηχανία τροφίμων (Sillankorva *et al.*, 2004). Προκαλεί ιδιαίτερα προβλήματα σε βιομηχανίες γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς προκαλεί αλλοίωση στο γάλα λόγω της παραγωγής πρωτεολυτικών ενζύμων (Sillankorva *et al.*, 2004).

Το *Pseudomonas fluorescens* μπορεί να μολυνθεί από τον λυτικό φάγο ΦS1, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια *Podoviridae* και χαρακτηρίζεται από κεφαλή, βραχεία και μη συσταλτή ουρά και δίκλωνο μόριο DNA (Sillankorva *et al.*, 2004).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απομόνωση του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Οι απομονώσεις του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* έγιναν από όγκους που υπήρχαν σε βλαστούς ελιάς, οι οποίοι συλλέχτηκαν από ορεινούς ελαιώνες αλλά και από οικιστικά συγκροτήματα που βρίσκονται στην ευρύτερη περιοχή του Βόλου και της Λαμίας.

Οι μολυσμένοι με το βακτήριο βλαστοί της ελιάς (που έφεραν εμφανείς όγκους), τεμαχίστηκαν σε τμήματα των 15 cm περίπου για τη διευκόλυνση της επεξεργασίας τους. Για την απομόνωση των βακτηρίων, προτιμούνται οι νεαροί και κλειστοί όγκοι. Αρχικά έγιναν επιμήκεις τομές στους όγκους των βλαστών έτσι ώστε να αποκαλυφθεί ο μολυσμένος ιστός (Εικόνα 4). Στη συνέχεια αποσπάστηκε όσο το δυνατό μεγαλύτερο τμήμα ιστού από τον όγκο (μεγαλύτερο μόλυσμα), το οποίο δεν έφερε καστανό μεταχρωματισμό.



Εικόνα 4. Επιμήκεις τομές σε προσβεβλημένο βλαστό ελιάς, ώστε να αποκαλυφθεί το τμήμα του όγκου (Προσφορά Ελένης Ανθούλη).

Τα τμήματα του όγκου τοποθετήθηκαν στο κέντρο τριβλίων petri που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα King's B (για 1 λίτρο: Proteose peptone 20.0 g, K₂HPO₄ 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 1.5 g, Glycerol 15.0 ml, Agar 15.0 g, αποστείρωση στους 120 °C) (Schaad *et al.*, 2001), και επώστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης στους 25 °C για 72 ώρες. Οι αποικίες του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, που εμφανίστηκαν γύρω από το τμήμα του ιστού (Εικόνα 5), ήταν επίπεδες, με ακανόνιστα περιθώρια και γκριζωπό-λευκό χρώμα όπως περιγράφεται και από τους Çerpi και Gürel, 2012. Στη συνέχεια από τις αρχικές αυτές αποικίες έγινε απομόνωση του βακτηρίου με τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα King's B (Εικόνα 6), και ακολούθησε επώαση στους 25 °C για 72 ώρες. Από τις νέες αποικίες (διαμέτρου 2-3 mm) που προέκυψαν έγινε εκ νέου απομόνωση του βακτηρίου με την ίδια μέθοδο σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B, για τον καθαρισμό των απομονώσεων. Οι καλλιέργειες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με θερμοκρασία 4 °C για τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των βακτηρίων, έως ότου έγινε η ταυτοποίησή τους.



Εικόνα 5. Αποικίες *P. savastanoi* pv. *savastanoi* επαπτόμενες στο τμήμα όγκου βλαστού ελιάς, σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα King's B, σε τρυβλίο Petri.



Εικόνα 6. Μέθοδος των παράλληλων γραμμών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα King's B, απομόνωσης *P. savastanoi* pv. *savastanoi*.

2.2 Ταυτοποίηση του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Η ταυτοποίηση του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* που απομονώθηκε από φυτικούς ιστούς έγινε με τη βοήθεια της PCR και εξειδικευμένους εκκινητές.

2.2.1 Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο King's B

Η παρασκευή του υγρού θρεπτικού μέσου King's B, έγινε με όλα τα συστατικά που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 2.1 εκτός από το Agar.

Αφού αποστειρώθηκε το θρεπτικό υλικό σε αυτόκαυστο στους 120 °C, μοιράστηκε σε φιαλίδια τύπου McCartney σε ίσες ποσότητες 5 ml (Εικόνα 7). Οι μεμονωμένες αποικίες του βακτηρίου στο τρυβλίο, μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένα ρύγχη μηχανικής πιπέτας μέσα στα φιαλίδια McCartney με το θρεπτικό μέσο (κάθε μια σε διαφορετικό φιαλίδιο). Στη συνέχεια τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν για επώαση σε επωαστικό θάλαμο με περιστρεφόμενη βάση για 40 ώρες στους 25 °C και στις 150 rpm.



Εικόνα 7. Υγρή καλλιέργεια *P. savastanoi* pv. *savastanoi* σε φιαλίδιο τύπου McCartney.

2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Λήφθηκαν 1,5 ml από κάθε υγρή καλλιέργεια και τοποθετήθηκαν σε σωληνίσκους τύπου Eppendorf. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των σωληνίσκων για 5 λεπτά, και μετά το θρεπτικό μέσο απορρίφθηκε. Στη συνέχεια το ίζημα επαναιωρήθηκε με την προσθήκη των ρυθμιστικών διαλυμάτων : 1x GTE (50 mM Glucose, Tris pH: 8.0 25 mM, EDTA pH: 8.0 10 mM) 100 μl, 0.2 M υδροξείδιο του νατρίου (NaOH)/1% SDS 200 μl, 3M οξικού καλίου/2M οξικού οξέως (3M KOAC/2M Acetic acid) 150 μl (το συγκεκριμένο διάλυμα χρειάζεται αποστείρωση). Σε κάθε στάδιο το διάλυμα που προέκυπτε αναμιγνυόταν. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 17000 x g. Από το υπερκείμενο που προέκυψε λήφθηκαν 400 μl και μεταφέρθηκαν σε νέους σωληνίσκους. Προστέθηκαν 800 μl ισοπροπανόλης (ISO-propanol), το μίγμα ανακινήθηκε (vortex) και στη συνέχεια έμεινε για 15 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 17000 x g. Κατόπιν απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε με την προσθήκη 100 μl απιονισμένου-αποστειρωμένου νερού (dsH₂O) και 100 μl 4M χλωριούχου λιθίου (LiCl). Το μίγμα τοποθετήθηκε στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 17000 x g. Παραλήφθηκαν

200 μl από το υπερκείμενο και σ' αυτά προστέθηκαν 20 μl 3M οξικού νατρίου (NaAc) και 500 μl αιθυλικής αλκοόλης (EtOH) 100%. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 17000 x g και στη συνέχεια απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια στο ίζημα προστέθηκε αιθυλική αλκοόλη 70% και μετά φυγοκέντρηση για 5 λεπτά. Κατόπιν αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και έμεινε το ίζημα. Έπειτα οι σωληνίσκοι έμειναν ανοιχτοί για 5-10 λεπτά μέχρι να εξατμιστεί η αιθυλική αλκοόλη. Το ίζημα επαναιωρήθηκε με 50 μl απιονισμένο-αποστειρωμένο νερό (dsH₂O).

Τέλος εκτιμήθηκε η ποσότητα του DNA με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD₂₆₀) του υδατικού διαλύματος σε φάσμα 260 nm στο φασματοφωτόμετρο καθώς επίσης και η καθαρότητα του DNA σύμφωνα με την σχέση: $1.8 < OD_{260}/OD_{280} < 2.0$ για καθαρό DNA (Sambrook and Russell, 2001).

2.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Για την ταυτοποίηση του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* επιλέχθηκε η μοριακή τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *iaaL* ήταν οι εξής:

Εκκινητής IAALF, 5'- GGCACCAGCGGCAACATCAA-3' ; εκκινητής IAALR, 5'- CGCCCTCGGAAGTCCATAC-3' (Penyalver *et al.*, 2000). Οι εκκινητές αυτοί πολλαπλασιάζουν ένα τμήμα του γονιδίου *iaaL* μεγέθους 454 βάσεων (bp). Οι αντιδράσεις της PCR διεξήχθησαν σε τελικό όγκο 50 μl συνδυάζοντας τα ακόλουθα αντιδραστήρια: 5 μl 10x PCR buffer, 5 μl 2Mm dNTPs, 1 μl από τον κάθε εκκινητή IAALF/IAALR (20 pmol/ μl), 36.5 μl DEPC H₂O (νερό στο οποίο έχει προστεθεί DEPC), 0.5 μl *Taq* πολυμεράση (5u/microlitres), και 1 μl από το πλασμιδιακό DNA του βακτηρίου. Οι συνθήκες ενίσχυσης περιελάμβαναν τα εξής στάδια: 94 °C για 5 λεπτά, 34 °C για 5 λεπτά και 68 °C για 30 δευτερόλεπτα. Όλα τα στάδια επαναλήφθηκαν 40 φορές (40 κύκλοι). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* και απιονισμένο-αποστειρωμένο νερό. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA από *P. savastanoi* pv. *savastanoi* που ταυτοποιήθηκε σε αρχική PCR. Το DNA του αρνητικού μάρτυρα *Pseudomonas fluorescens* ήταν προσφορά του κυρίου Ιωάννη Μποζιάρη, Επίκουρου Καθηγητού του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

2.2.4 Ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων προϊόντων της PCR σε πηκτική αγαρόζη

Τα ενισχυμένα προϊόντα της PCR διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη 1.5 % w/v σε διάλυμα TBE. Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια: TBE 1x (Tris base 10.8 gr, βορικό οξύ 5.5 gr, 0.5 M EDTA 4 ml στο 1 λίτρο) και Αγαρόζη.

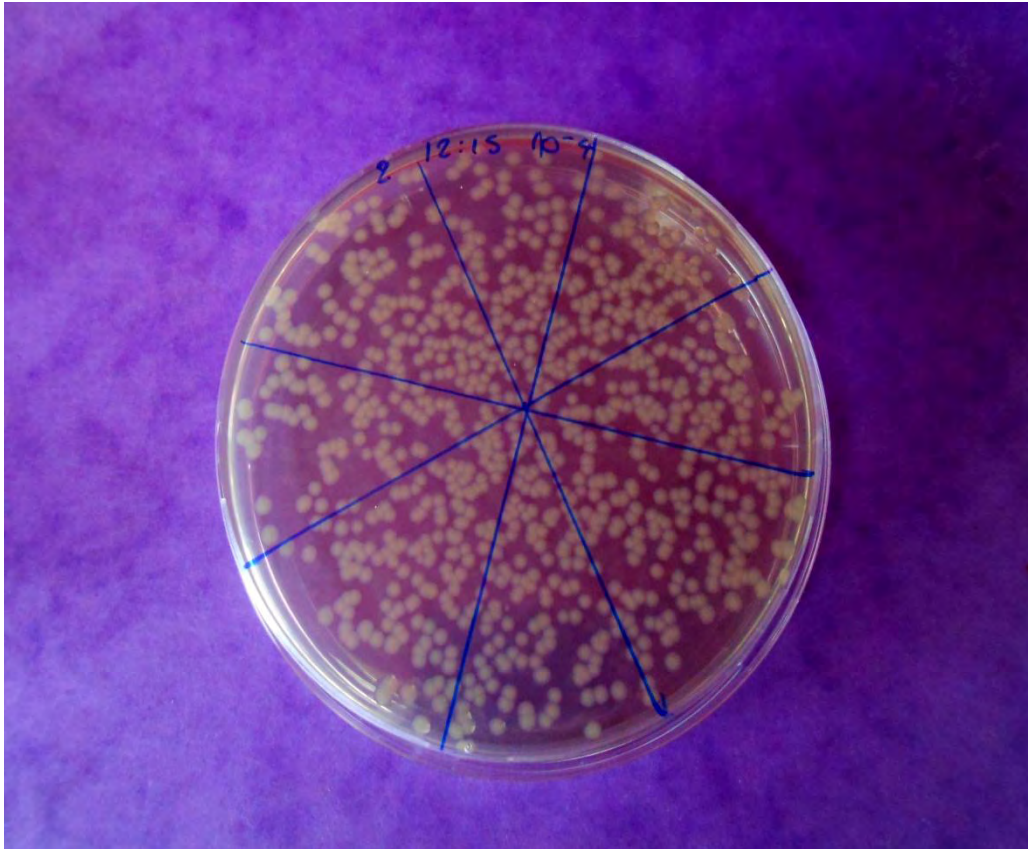
Ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση στα 120 V.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης έγινε η χρώση της πηκτής αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), για 60 λεπτά. Τέλος η πηκτική φωτογραφήθηκε πάνω σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (360 nm).

2.3 Καμπύλη ανάπτυξης του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Τα στάδια της καμπύλης ανάπτυξης ενός βακτηρίου είναι τα εξής: Φάση υστέρησης, Εκθετική φάση, Στάσιμη φάση και Νεκρά φάση. Στη συγκεκριμένη μελέτη ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε η εύρεση της εκθετικής φάσης του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, της φάσης δηλαδή κατά την οποία τα βακτηριακά κύτταρα χαρακτηρίζονται από ευρωστία και πολλαπλασιάζονται με γρήγορους ρυθμούς.

Αρχικά εμβολιάστηκαν 2 ml υγρής καλλιέργειας *P. savastanoi* pv. *savastanoi* σε 150 ml υγρού θρεπτικού μέσου King's B και η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε επωαστικό θάλαμο με περιστρεφόμενη βάση στους 25 °C και στις 150 rpm. Ανά διαστήματα μετρούνταν η οπτική πυκνότητα της υγρής καλλιέργειας στα 600 nm (OD₆₀₀) και στη συνέχεια γινόταν διαδοχικές αραιώσεις 1:10 (έως και επτά) καθώς και επίστρωση των αραιώσεων στις επιφάνειες τρυβλίων με θρεπτικό μέσο King's B, εις τριπλούν για κάθε αραιώση. Ο συνολικός χρόνος που διατηρήθηκε η υγρή καλλιέργεια ήταν 2145 λεπτά. Στο τέλος μετρήθηκαν οι βακτηριακές αποικίες που προκύψαν από την επίστρωση της κάθε αραιώσης (Εικόνα 8) και έτσι έγινε γνωστός και αριθμός των βακτηριακών κυττάρων τη δεδομένη χρονική στιγμή. Οι βακτηριακές αποικίες εκφράστηκαν σε μονάδες cfu/ml (colony forming units/ml), και τέλος σχεδιάστηκε η καμπύλη ανάπτυξης του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, όπου και διακρίνεται η εκθετική φάση του βακτηρίου.



Εικόνα 8. Μέτρηση των βακτηριακών αποικιών που προκύψαν μετά την επίστρωση των αραιώσεων του βακτηρίου στις επιφάνειες τρυβλίων, με θρεπτικό μέσο King's B (Προσφορά Ελένης Ανθούλη).

2.4 Αποθήκευση των βακτηριακών απομονώσεων στους -80°C

Οι βακτηριακές απομονώσεις διατηρήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80°C ως μίγμα υγρής καλλιέργειας με γλυκερόλη.

Συγκεκριμένα τοποθετήθηκαν 500 μl αποστειρωμένης γλυκερόλης και 500 μl υγρής καλλιέργειας *P. savastanoi* pv. *savastanoi* σε μικροσωληνίσκους τύπου Eppendorf. Στη συνέχεια έγινε ανάμιξη των συστατικών και ακολούθησε η αποθήκευση σε βαθιά κατάψυξη (θερμοκρασία -80°C).

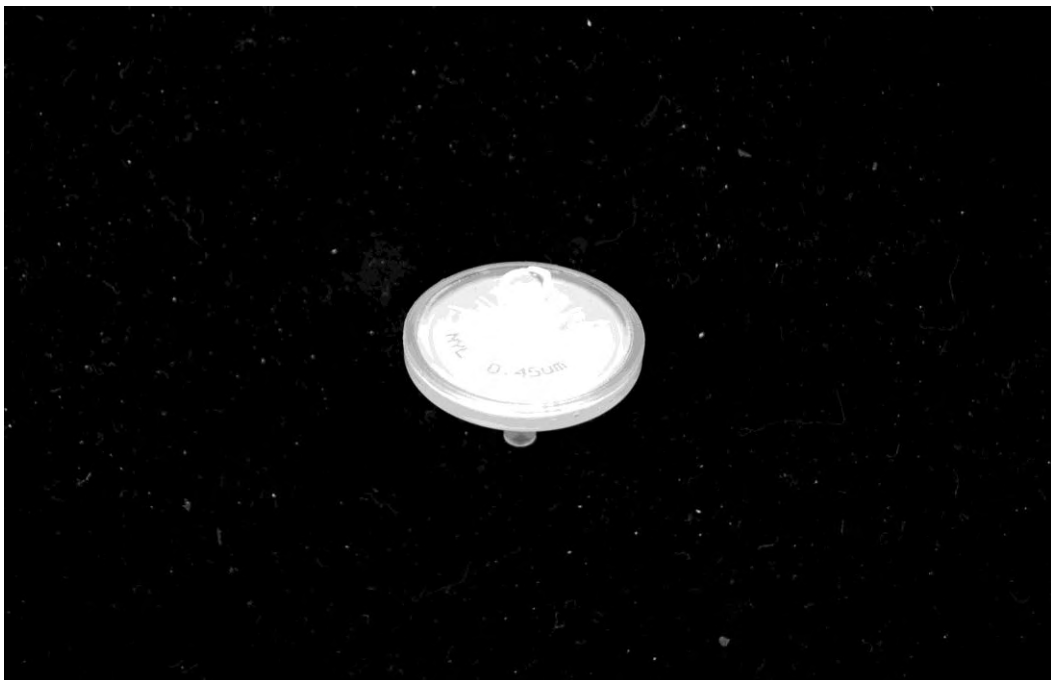
2.5 Απομόνωση βακτηριοφάγων

Αρχικά συλλέχθηκαν δείγματα φυτικού ιστού (φύλλα και βλαστοί ελιάς), και δείγματα εδάφους από βάθος 10 και 20 εκατοστών αντίστοιχα, σε ακτίνα ενός μέτρου από τη βάση των δέντρων (Gill *et al.*, 2003). Τα δείγματα συλλέχθηκαν από δύο

διαφορετικές περιοχές του Βόλου, μια ορεινή όπου ο ελαιώνας είχε μεγάλη προσβολή από το *P. savastanoi* pv. *savastanoi* και μια παραθαλάσσια με μικρή προσβολή. Τα δείγματα του φυτικού ιστού τεμαχίσθηκαν για τη διευκόλυνση του χειρισμού τους. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη 10 γραμμάρια φυτικού ιστού, 40 γραμμάρια εδάφους, 60 ml υγρού θρεπτικού μέσου King's B και 10 ml υγρής καλλιέργειας *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Έπειτα οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με περιστρεφόμενη βάση στους 25 °C και στις 150 rpm, για 18 έως 20 ώρες στο σκοτάδι. Μετά την επώαση το μίγμα μοιράστηκε σε μικροσωληνίσκους τύπου Eppendorf των 2 ml και αυτοί με τη σειρά τους τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο για φυγοκέντρηση στους 4 °C και 8000 g για 20 λεπτά (Gill *et al.*, 2003).

Το υπερκείμενο υγρό που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση συλλέχθηκε και διηθήθηκε μέσα από φίλτρα με διάμετρο οπών 0.45 μm (Εικόνα 9). Ακολούθησε η προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος SM, όπου σε 1 ml υπερκειμένου προστέθηκαν 9 ml SM, και διατήρηση του διαλύματος στους 4 °C μέχρι να γίνει η απομόνωση των φάγων. Σύμφωνα με τους Sambrook και Russell (2001) για την παρασκευή 1L SM ρυθμιστικού διαλύματος απαιτούνται τα εξής αντιδραστήρια:

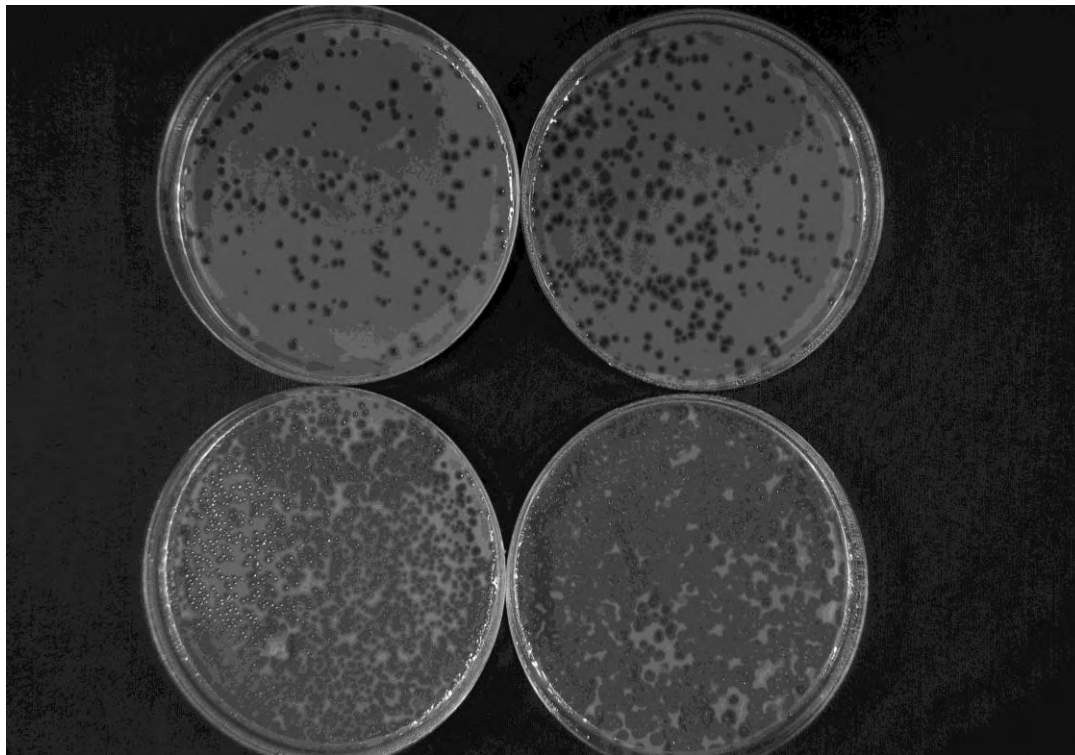
NaCl: 5.8 g, MgSO₄·7H₂O: 2 g, 1 M Tris-Cl (pH 7.5): 50 ml και 2% (w/v) διάλυμα ζελατίνης (2 g ζελατίνης προστίθενται σε τελικό όγκο 100 ml, και ακολουθεί αποστείρωση). Το διάλυμα αποστειρώνεται και αφού κρυώσει χωρίζεται σε κλάσματα των 50 ml.



Εικόνα 9. Φίλτρο με διάμετρο οπών 0.45 μm, για την απομόνωση φάγων.

Για την απομόνωση των φάγων έγιναν δεκαδικές διαδοχικές αραιώσεις (τουλάχιστον τρεις) του αποθηκευμένου υπερκειμένου υγρού με ρυθμιστικό διάλυμα SM. Στη συνέχεια 250 μl από κάθε αραιώση αναμιγνύονται με 250 μl υγρής καλλιέργειας *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* και έγινε επίστρωση του μίγματος σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα King's B. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης στους 25 °C για επώαση από 24 έως 48 ώρες. Μετά την επώαση εμφανίστηκαν οι πλάκες (Εικόνα 10) που σχηματίζονται από τη λύση των κυττάρων που προκαλούν οι φάγοι.

Δύο πλάκες από κάθε δείγμα, τέσσερις φάγοι δηλαδή (G1, G2, A1, A2), μεταφέρθηκαν για εμπλουτισμό και επώαση σε ήδη ανεπτυγμένες υγρές καλλιέργειες (10 ml) *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Εικόνα 11), και στη συνέχεια ακολούθησε φιλτράρισμα, αραιώση, και επίστρωση της αραιώσης (250 μl) με υγρή καλλιέργεια *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (250 μl) σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα King's B. Η συγκεκριμένη διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές για τον καθαρισμό των φάγων.



Εικόνα 10. Πλάκες διαφόρων τύπων που προκύψαν από διασπορά κυττάρων *P. savastanoi* pv. *savastanoi* μετά από ανάμιξη με αιώρημα εδάφους.



Εικόνα 11. Λύση βακτηριακών κυττάρων σε υγρή καλλιέργεια *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, λόγω δράσης βακτηριοφάγων. Αριστερά καλλιέργεια με βακτηριοφάγους όπως φαίνονται τα υπολείμματα της καλλιέργειας του βακτηρίου. Δεξιά καλλιέργεια βακτηρίου χωρίς βακτηριοφάγους.

2.6 Αποθήκευση των βακτηριοφάγων στους -80°C

Μετά τον καθαρισμό των φάγων, μεμονωμένες πλάκες από κάθε φάγο μεταφέρθηκαν για εμπλουτισμό και επώαση σε υγρές καλλιέργειες *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε θρεπτικό μέσο King's B. Μετά την λύση των βακτηριακών κυττάρων 500 μl από την καλλιέργεια (πλήρης φάγων) αναμίχθηκαν με 500 μl γλυκερόλης. Το μίγμα φάγου-γλυκερόλης (glycerol stock) τοποθετήθηκε σε μικροσωληνίσκους τύπου Eppendorf, οι οποίοι αποθηκεύτηκαν σε βαθιά κατάψυξη στους -80°C .

2.7 Τιτλοδότηση των απομονωμένων βακτηριοφάγων

Οι βακτηριοφάγοι που χρησιμοποιήθηκαν για την τιτλοδότηση όπως και οι βακτηριακές απομονώσεις, είχαν διατηρηθεί στους -80°C (glycerol stock).

Απομονώσεις του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* όσο και φάγοι που διατηρήθηκαν με αυτό τον τρόπο στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, χρησιμοποιήθηκαν ως και πέντε μήνες μετά παραμονή τους σε αυτή τη θερμοκρασία και δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη μολυσματικότητά τους. Αρχικά το 1 ml των φάγων που περιέχεται στο glycerol stock διηθείται μέσα από φίλτρο με διάμετρο οπών 0.45 μm , και αραιώνεται με 9 ml SM buffer. Στη συνέχεια ακολουθούν δεκαδικές διαδοχικές αραιώσεις ως εξής: 100 μl από το προαναφερθέν διάλυμα των φάγων με το SM buffer αραιώνονται με 900 μl SM buffer, δηλαδή 10^{-1} αραιώση. Μετά γίνεται επίστρωση σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα King's B εις τριπλούν για κάθε αραιώση, με 250 μl από την αραιώση των φάγων συν 250 μl υγρή καλλιέργειας *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, η οποία βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης του βακτηρίου. Στην εκθετική φάση η ανάπτυξη του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* βρίσκεται όταν η οπτική πυκνότητα (OD_{600}) είναι 0.758, δηλαδή 8.32×10^7 cfu. Η τιτλοδότηση και των τεσσάρων φάγων έγινε με τη βακτηριακή απομόνωση Pss1. Τέλος οι πλάκες που σχηματίστηκαν από την επίστρωση ης κάθε αραιώσης μετρήθηκαν και εκφράστηκαν ως pfu/ml (plaque forming units/ml).

2.8 Προσδιορισμός του φάσματος λύσης των απομονωμένων βακτηριοφάγων

Στους απομονωμένους βακτηριοφάγους G1, G2, A1 και A2 διενεργήθηκαν βιοδοκιμές σε βακτηριακές απομονώσεις για να προσδιοριστεί το φάσμα λύσης του κάθε φάγου σε διαφορετικές απομονώσεις του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

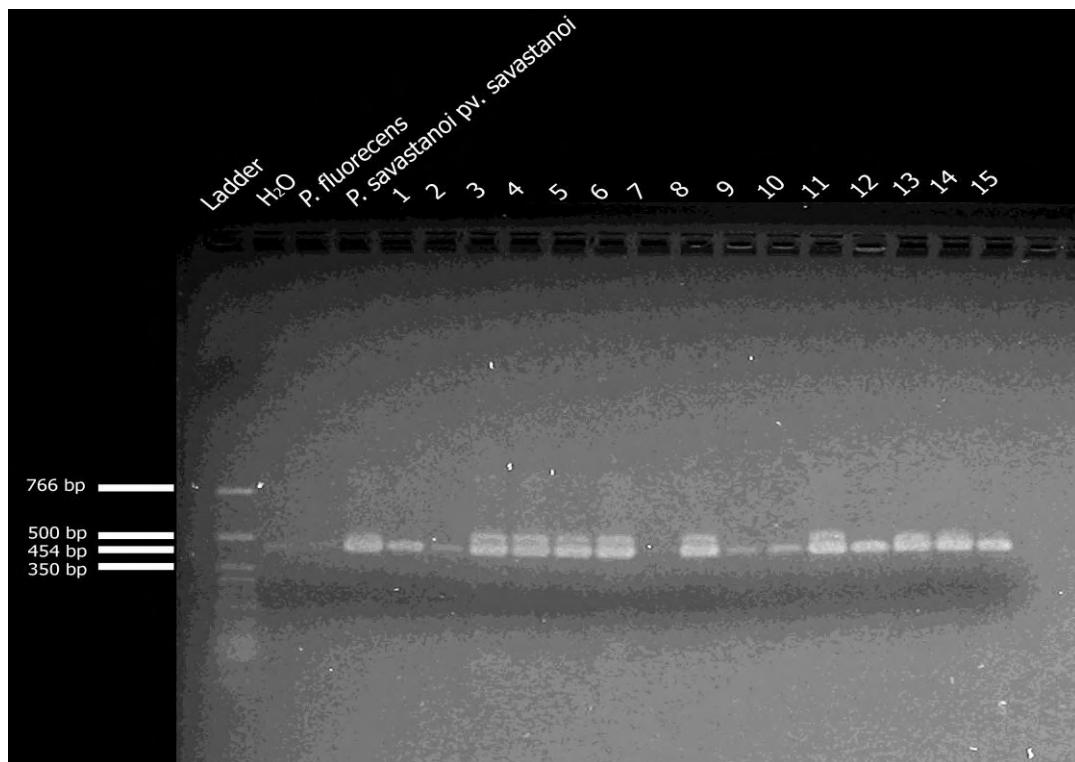
Οι δοκιμές έγιναν με δεκαδικές αραιώσεις του κάθε φάγου και επίστρωση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B εις τριπλούν, με την κάθε βακτηριακή απομόνωση ξεχωριστά. Οι δεκαδικές αραιώσεις και η επίστρωση έγιναν όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο. Επίσης η κάθε βακτηριακή απομόνωση κατά την επίστρωση βρισκόταν στην εκθετική της φάση.

Τέλος μετρήθηκαν οι πλάκες που προκύψαν από την επίστρωση της κάθε αραιώσης του κάθε φάγου, στην εκάστοτε βακτηριακή απομόνωση.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ταυτοποίηση του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Από τους όγκους σε βλαστούς ελιάς απομονώθηκαν 15 βακτηριακές αποικίες, οι οποίες εξετάστηκαν αν είναι απομονώσεις του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, με τη μέθοδο της PCR. Από τις 15 απομονώσεις, οι 11 έδωσαν θετικό αποτέλεσμα, ζώνη μεγέθους 454-bp δηλαδή (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Πηκτή αγαρόζης 1% σε TBE ύστερα από ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR 15 βακτηριακών απομονώσεων.

Θέση 1 Ladder φx, θέση 2 Μάρτυρας (H₂O αντί DNA), θέση 3 Μάρτυρας *Pseudomonas fluorescens*, θέση 4 Μάρτυρας *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, θέσεις 5-19 απομονώσεις βακτηρίων από όγκους ελιάς. Η ζώνη μεγέθους ήταν 454-bp. Στον Πίνακα 1 φαίνεται η προέλευση και η κωδική ονομασία αυτών των απομονώσεων.

Πίνακας 1. Κωδική ονομασία και προέλευση απομονώσεων που ταυτοποιήθηκαν ως απομονώσεις *P. savastanoi* pv. *savastanoi*.

#	Κωδικός	Προέλευση
1	Pss 10	οικιστικό συγκρότημα Βόλου
3	Pss 1	οικιστικό συγκρότημα Βόλου
4	Pss 2	οικιστικό συγκρότημα Βόλου
5	Pss 11	περίχωρα Λαμίας
6	Pss 8	περίχωρα Λαμίας
8	Pss 9	περίχωρα Λαμίας
11	Pss 7	περίχωρα Λαμίας
12	Pss 6	περίχωρα Λαμίας
13	Pss 5	ορεινή περιοχή Βόλου
14	Pss 4	οικιστικό συγκρότημα Λαμίας
15	Pss 3	οικιστικό συγκρότημα Λαμίας

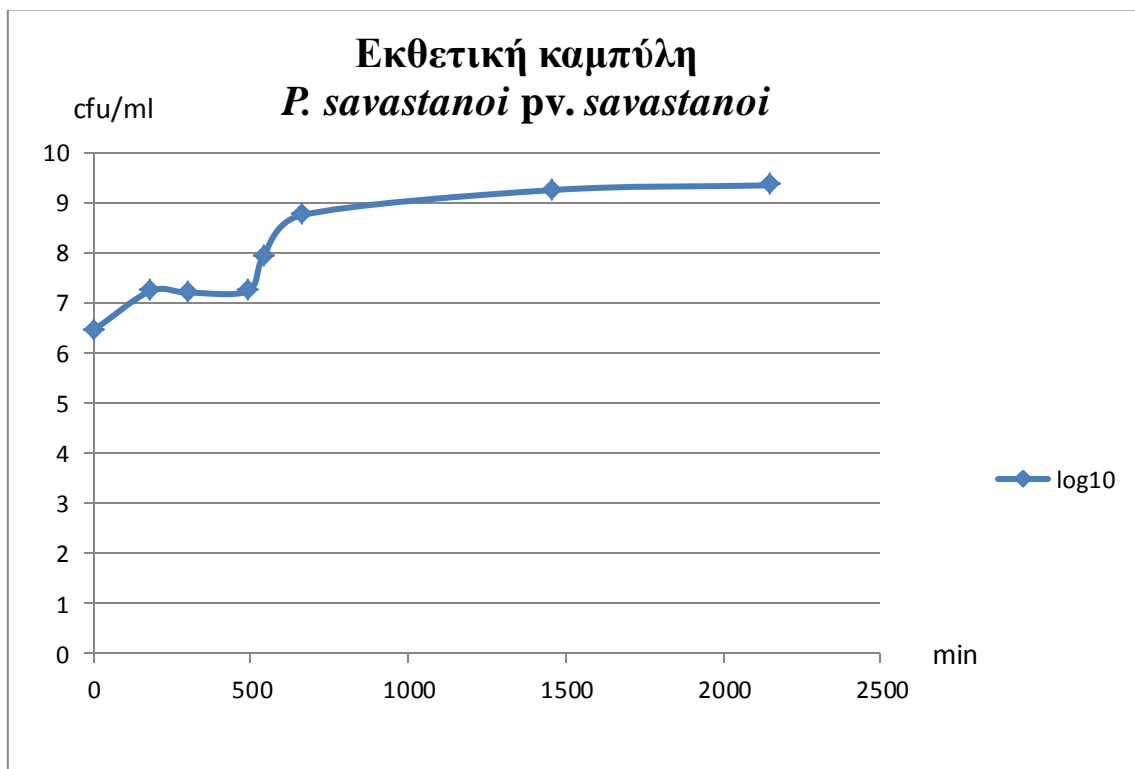
3.2 Καμπύλη ανάπτυξης του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2) δίδεται ο αριθμός των αποικιών που προκύψαν από την επίστρωση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B των αραιώσεων σε δεδομένη χρονική στιγμή, εκφρασμένες σε cfus/ml. Όπως προκύπτει και από την καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου (Γράφημα 1), η εκθετική φάση της ανάπτυξης του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* ξεκινάει στα 540 λεπτά, όταν η απορρόφηση (O.D.₆₀₀) είναι από 0,7584 έως 0,8417 και ο αριθμός των cfu (colony forming units) είναι $8,32 \times 10^7$ ανά ml.

Πίνακας 2. Βακτηριακές αποικίες που προκύψαν σε δεδομένη χρονική στιγμή εκφρασμένες σε δεκαδικό λογάριθμο cfu/ml, κατά την καμπύλη ανάπτυξης του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

min	CFU/ml	log ₁₀ (cfu/ml)
1	2810600	6,448799042
180	16800000	7,225309282

300	15840000	7,199755177
490	16960000	7,229425848
540	83200000	7,920123326
660	549200000	8,739730529
1455	1746600000	9,242193456
2145	2173200000	9,337099696



Γράφημα 1. Καμπύλη ανάπτυξης *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Στον άξονα του x διακρίνεται ο χρόνος (min), και στον άξονα του y οι cfu εκφρασμένες σε δεκαδικό λογάριθμο cfu/ml.

3.3 Τιτλοδότηση των βακτηριοφάγων G1, G2, A1, και A2

Η τιτλοδότηση και των τεσσάρων φάγων έγινε με την βακτηριακή απομόνωση Pss 1. Οι πλάκες που προκύψαν από την επίστρωση της κάθε αραιώσης φάγων μαζί με απομόνωση του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B εκφράστηκαν ως μονάδες αριθμού πλακών/ml, pfu/ml (plaque forming units/ml) (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Μονάδες αριθμού πλακών/ml όπως προέκυψε κατόπιν τιτλοδότησης των φάγων G1, G2, A1 και A2 με την απομόνωση Pss1 του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

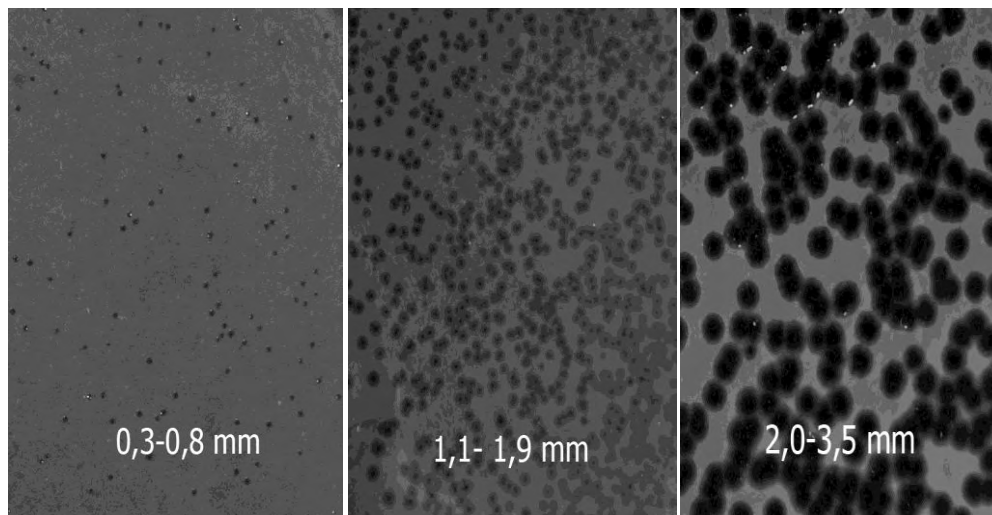
Τιτλοδότηση	
Φάγοι	PFU/ml
G1	10.56×10^6
G2	75.73×10^6
A1	1.77×10^9
A2	2.901×10^9

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της τιτλοδότησης στον πίνακα 3, ο φάγος G2 δίνει πολύ περισσότερες πλάκες σε σχέση με τους υπόλοιπους φάγους. Προφανώς αυτό σημαίνει πως στο αρχικό διάλυμα υπήρχαν περισσότεροι φάγοι. Άρα πιθανώς ο φάγος G2 έχει την ικανότητα να λύει τα κύτταρα της βακτηριακής απομόνωσης Pss 1 και να πολλαπλασιάζεται πιο γρήγορα σε σχέση με τους υπόλοιπους φάγους.

3.4 Φάσμα λύσης των G1, G2, A1, και A2 σε 5 απομονώσεις του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*

Οι τέσσερις φάγοι δοκιμάστηκαν σε πέντε απομονώσεις του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss 1, Pss 2, Pss 3, Pss 4, Pss 5) για τον προσδιορισμό του φάσματος λύσης

τους. Διενεργήθηκαν δεκαδικές διαδοχικές αραιώσεις του κάθε φάγου και επίστρωση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B με τις εκάστοτε βακτηριακές απομονώσεις. Τέλος μετρήθηκαν οι πλάκες που προκύψαν από κάθε επίστρωση. Σε ορισμένες αραιώσεις ο αριθμός των πλακών ήταν μεγάλος και τότε χαρακτηρίζονται ως 'αμέτρητες πλάκες'. Επίσης έγινε χαρακτηρισμός των πλακών ως προς το μέγεθος και τη μορφολογία τους. Μεγάλες και καθαρές πλάκες σχηματίζονται από υψηλής τοξικότητας φάγους, καθαρές αλλά μικρές πλάκες σχηματίζονται από τοξικούς φάγους και μεγάλες αλλά θολές πλάκες σχηματίζονται από μέτριας τοξικότητας φάγους (Hee Kim *et al.*, 2011). Ως προς το μέγεθός τους οι πλάκες χαρακτηρίστηκαν ως μικρές με διάμετρο 0.3-0.8 mm, μετρίου μεγέθους με διάμετρο 1.1-1.9 mm και μεγάλες με διάμετρο 2.0-3.5 mm.

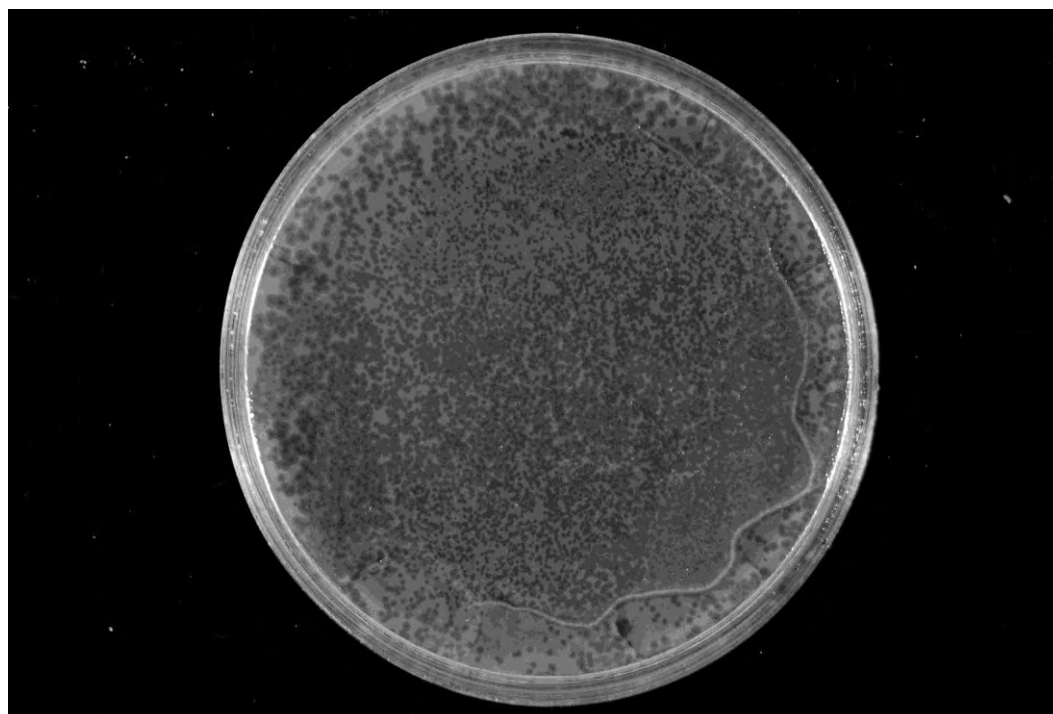


Εικόνα 13. Πλάκες μικρού, μετρίου και μεγάλου μεγέθους, όπως προέκυψαν έπειτα από επώαση απομονώσεων *P. savastanoi* pv. *savastanoi* με τους φάγους G1, G2, A1 και A2 σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.

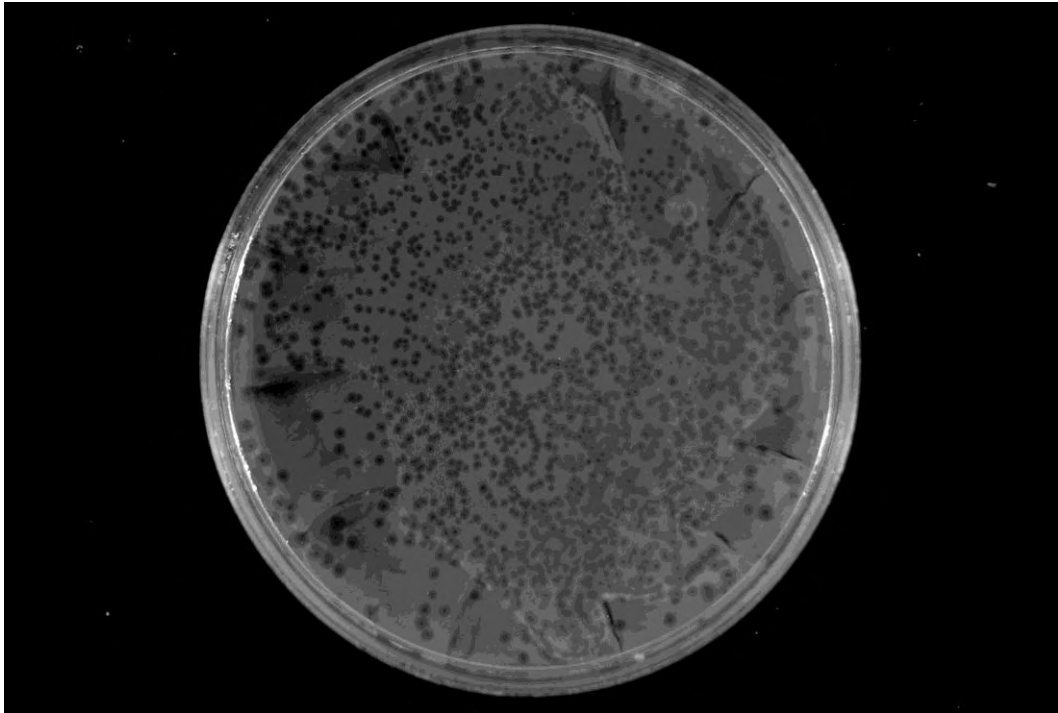
Στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακας 4, 5, 6 και 7) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών (πλάκες ανά αραιώση) και ο τύπος των πλακών.

Πίνακας 4. Βιοδοκιμές φάγου G1 στις απομονώσεις Pss 1, Pss 2, Pss 3, Pss 4 και Pss 5. Δίδονται ο αριθμός των πλακών και το μέγεθος τους ανά δεκαδική αραιώση.

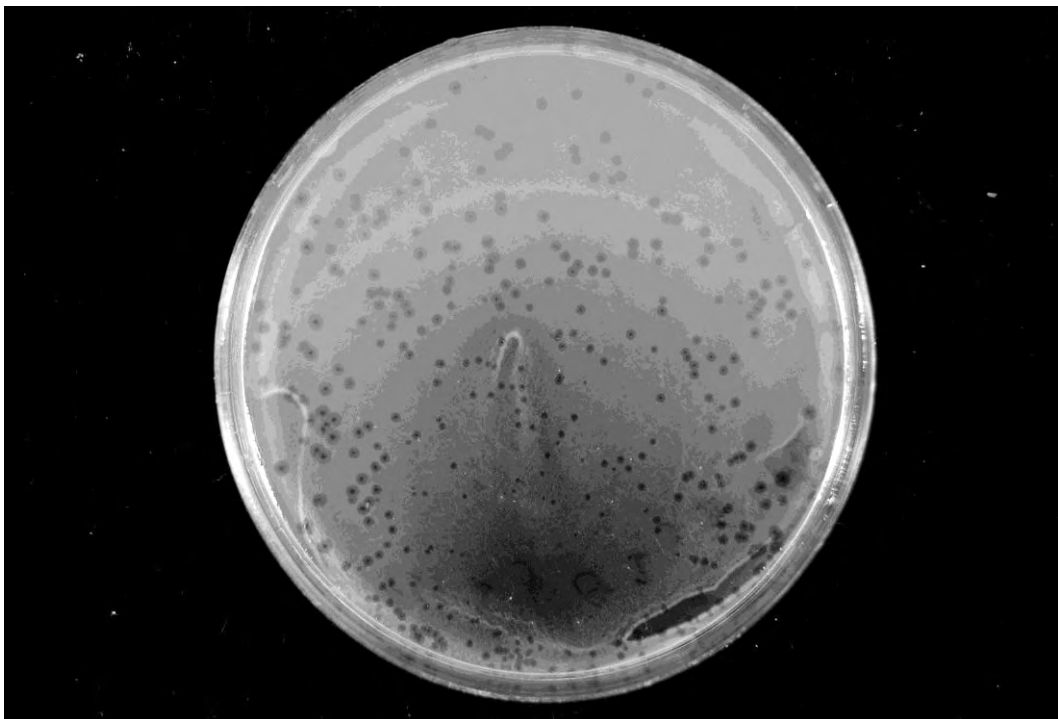
Φάγος G1			
Βακτηριακή απομόνωση	Αραιώση	Αριθμός πλακών	Τύπος πλάκας (διάμετρος, mm)
Pss 1	10^{-2}	αμέτρητες πλάκες	1.1-1.9 mm
	10^{-3}	2180	
	10^{-4}	266,66	
Pss 2	10^{-2}	2181,33	2.0-3.5 mm
	10^{-3}	1266,66	
	10^{-4}	490,66	
Pss 3	10^{-2}	αμέτρητες πλάκες	1.1-1.9 mm
	10^{-3}	1173,33	
	10^{-4}	485,33	
Pss 4	10^{-2}	αμέτρητες πλάκες	2.0-3.5 mm
	10^{-3}	776	
	10^{-4}	581,33	
Pss 5	10^{-2}	αμέτρητες πλάκες	1.1-1.9 mm
	10^{-3}	448	
	10^{-4}	114,66	



Εικόνα 14. Συνδυασμός απομόνωσης Pss 1 με φάγο G1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στην δεκαδική αραιώση 10^{-2} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



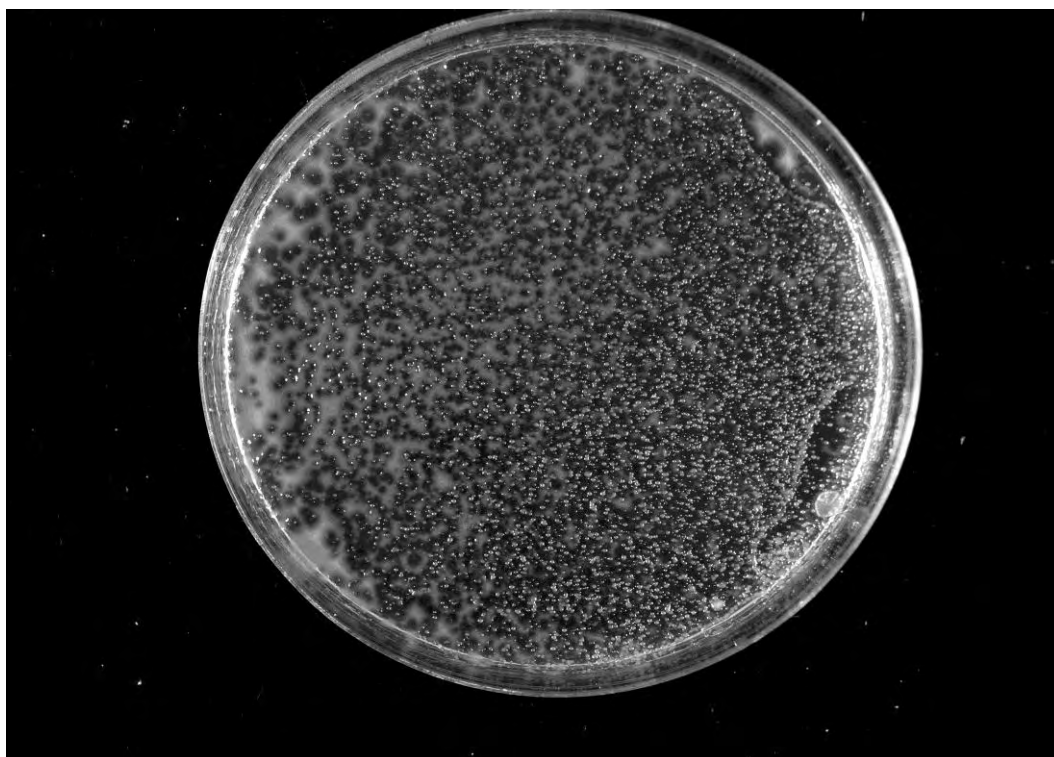
Εικόνα 15. Συνδυασμός απομόνωσης Pss 1 με φάγο G1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στην δεκαδική αραιώση 10^{-3} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



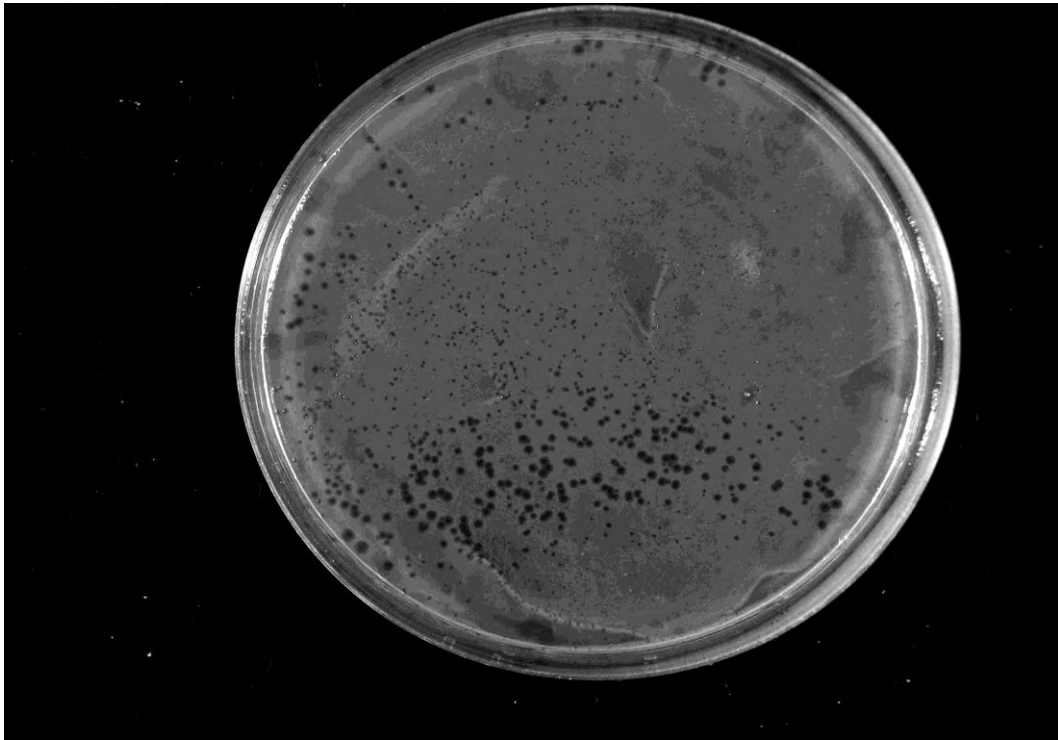
Εικόνα 16. Συνδυασμός απομόνωσης Pss 1 με φάγο G1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στην δεκαδική αραιώση 10^{-4} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.

Πίνακας 5. Βιοδοκιμές φάγου G2 στις απομονώσεις Pss 1, Pss 2, Pss 3, Pss 4 και Pss 5. Δίδονται ο αριθμός των πλακών και το μέγεθος τους ανά δεκαδική αραιώση.

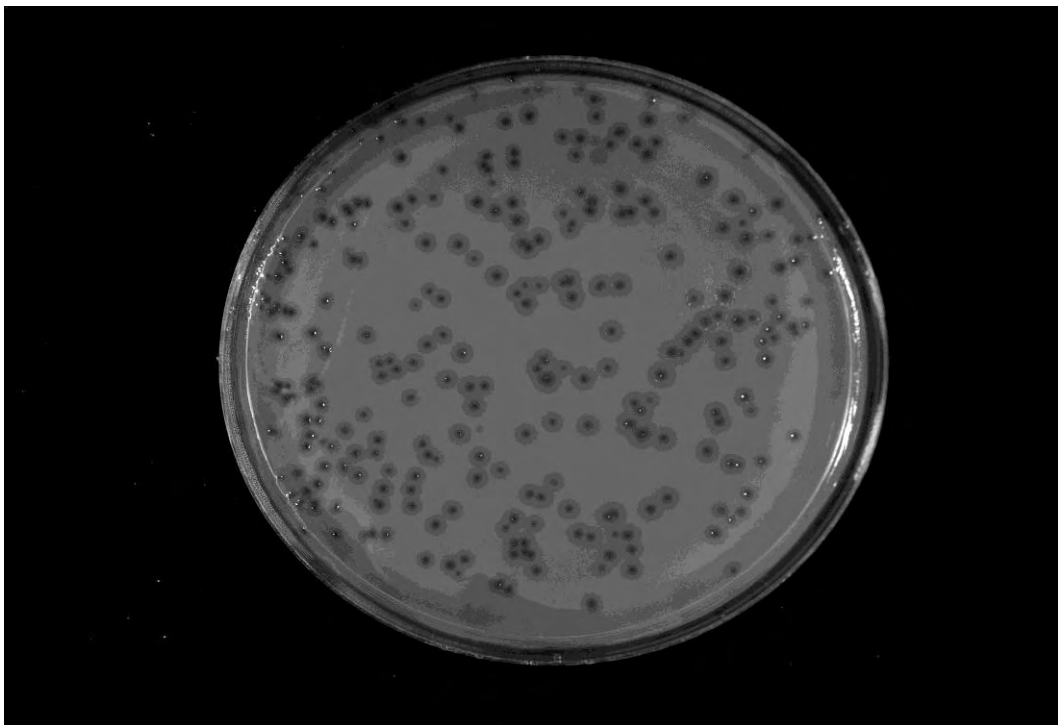
Φάγος G2			
Βακτηριακή απομόνωση	Αραιώση	Αριθμός πλακών	Τύπος πλάκας (διάμετρος, mm)
Pss 1	10^{-3}	αμέτρητες πλάκες	1.1-1.9 mm
	10^{-4}	744	
	10^{-5}	202,66	
Pss 2	10^{-3}	αμέτρητες πλάκες	1.1-1.9 mm
	10^{-4}	αμέτρητες πλάκες	
	10^{-5}	632	
Pss 3	10^{-3}	720	0.3-0.8 mm
	10^{-4}	338,66	
	10^{-5}	109,33	
Pss 4	10^{-3}	αμέτρητες πλάκες	0.3-0.8 mm
	10^{-4}	610,66	
	10^{-5}	170,66	
Pss 5	10^{-3}	αμέτρητες πλάκες	2.0-3.5 mm
	10^{-4}	744	
	10^{-5}	242,66	



Εικόνα 17. Συνδυασμός απομόνωσης Pss 1 με φάγο G2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στην δεκαδική αραιώση 10^{-3} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



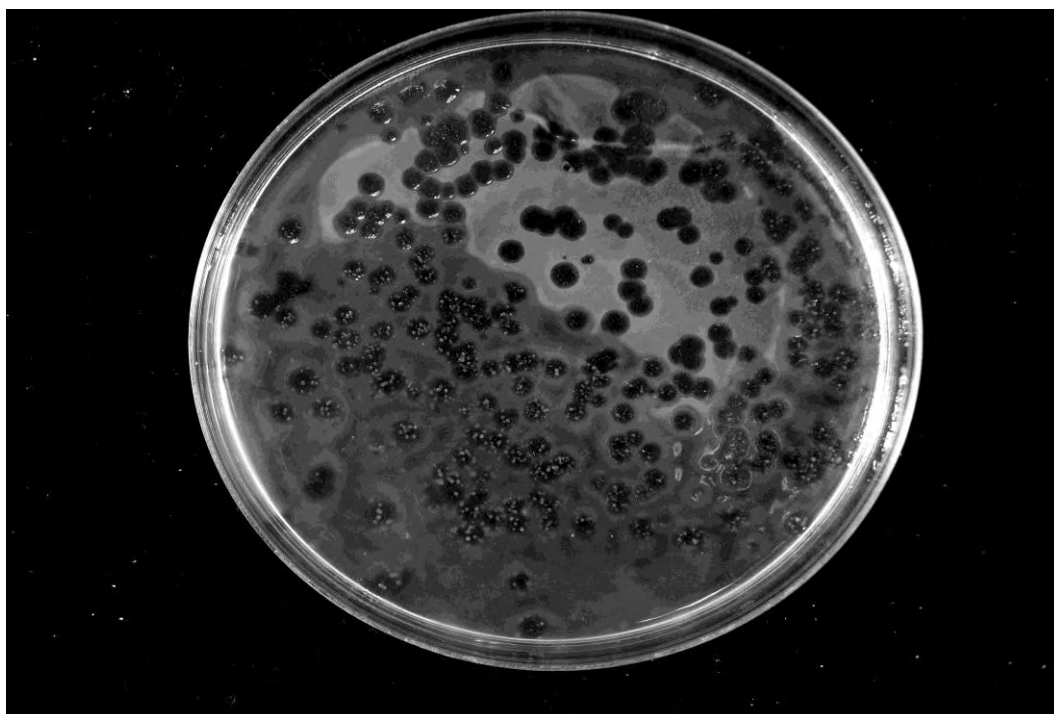
Εικόνα 18. Συνδυασμός απομόνωσης Pss 1 με φάγο G2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στην δεκαδική αραιώση 10^{-4} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



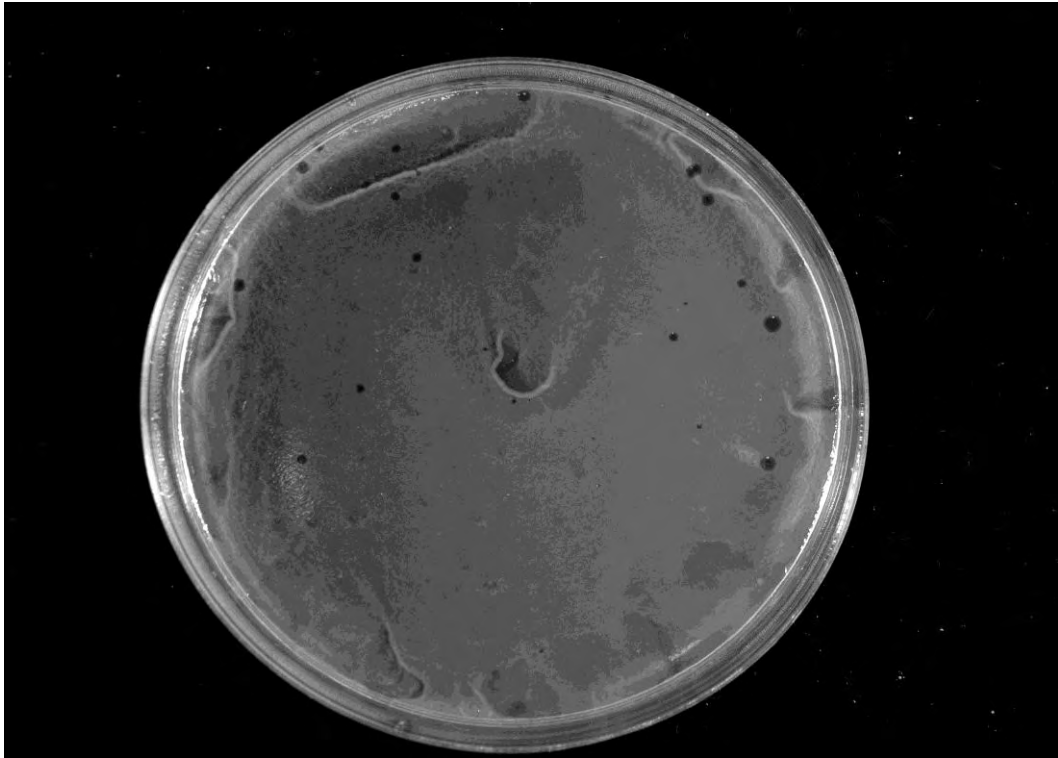
Εικόνα 19. Συνδυασμός απομόνωσης Pss 1 με φάγο G2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στην δεκαδική αραιώση 10^{-5} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.

Πίνακας 6. Βιοδοκιμές φάγου A1 στις απομονώσεις Pss 1, Pss 2, Pss 3, Pss 4 και Pss 5. Δίδονται ο αριθμός των πλακών και το μέγεθος τους ανά δεκαδική αραιώση φάγου.

Φάγος A1			
Βακτηριακή απομόνωση	Αραίωση φάγων	Αριθμός πλακών	Τύπος πλάκας (διάμετρος, mm)
Pss 1	10^{-6}	346,66	2.0-3.5 mm
	10^{-7}	28,66	
	10^{-8}	5,33	
Pss 2	10^{-6}	373,33	1.1-1.9 mm
	10^{-7}	80	
	10^{-8}	7	
Pss 3	10^{-6}	261,33	1.1-1.9 mm
	10^{-7}	7,33	
	10^{-8}	3,33	
Pss 4	10^{-6}	186,66	1.1-1.9 mm
	10^{-7}	11,66	
	10^{-8}	2,33	
Pss 5	10^{-6}	152	2.0-3.5 mm
	10^{-7}	15,66	
	10^{-8}	3,33	



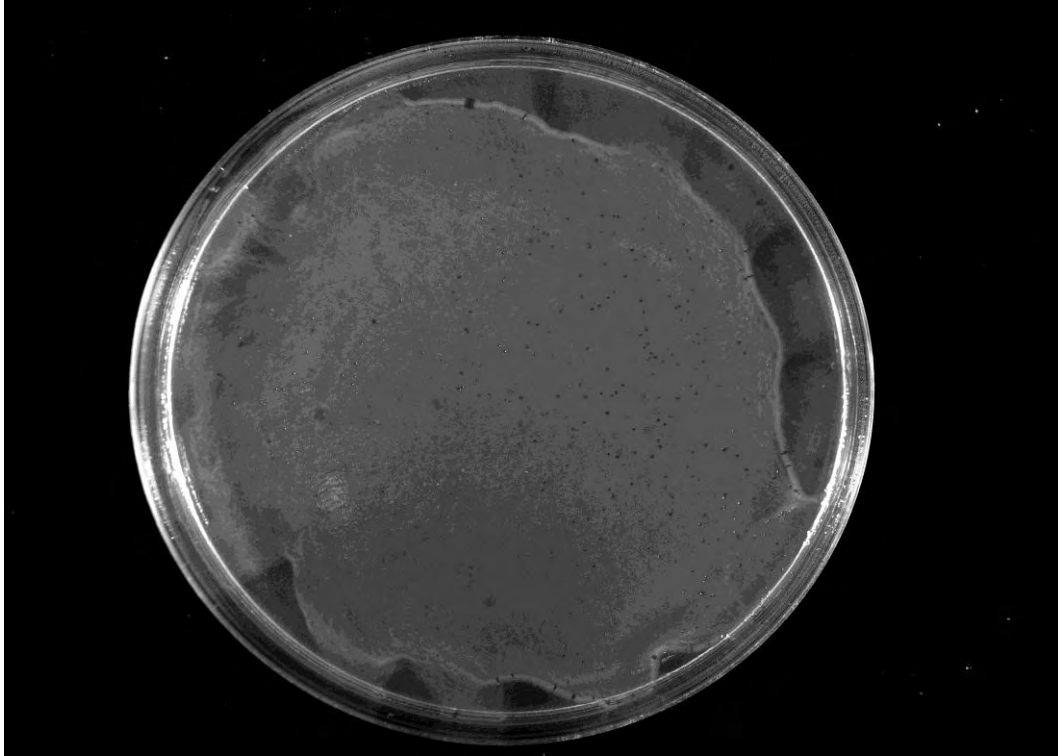
Εικόνα 20. Συνδυασμός απομόνωσης Pss 1 με φάγο A1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στην δεκαδική αραιώση 10^{-6} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



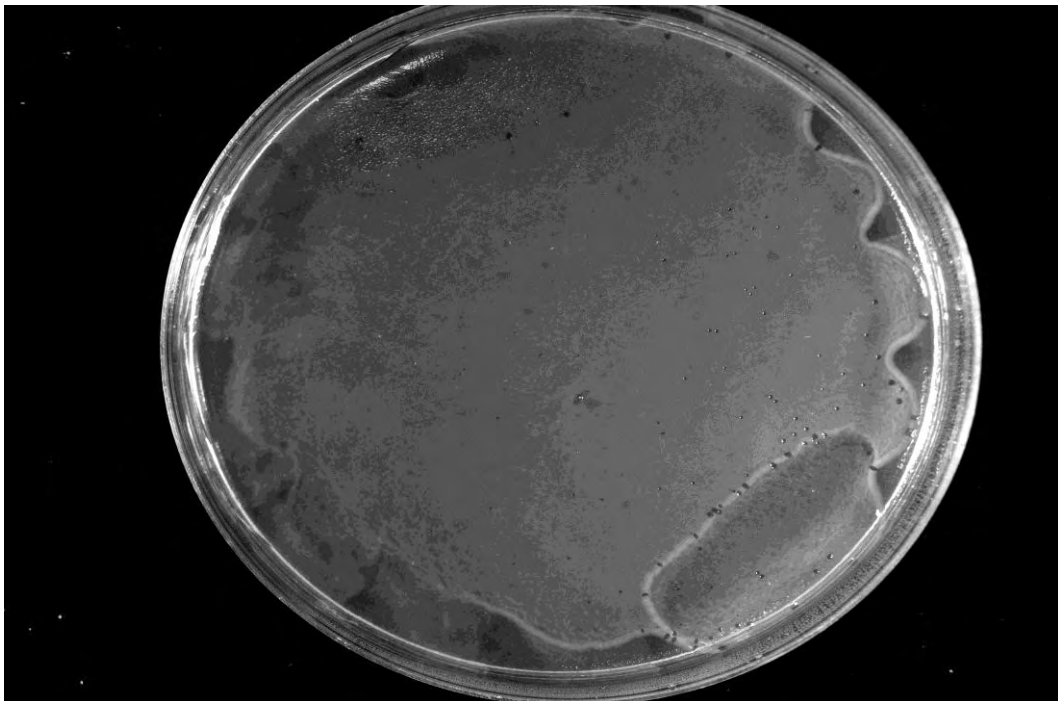
Εικόνα 21. Συνδυασμός απομόνωσης Pss 1 με φάγο A1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στην δεκαδική αραιώση 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.

Πίνακας 7. Βιοδοκιμές φάγου A2 στις απομονώσεις Pss 1, Pss 2, Pss 3, Pss 4 και Pss 5. Δίδονται ο αριθμός των πλακών και το μέγεθος τους ανά δεκαδική αραιώση.

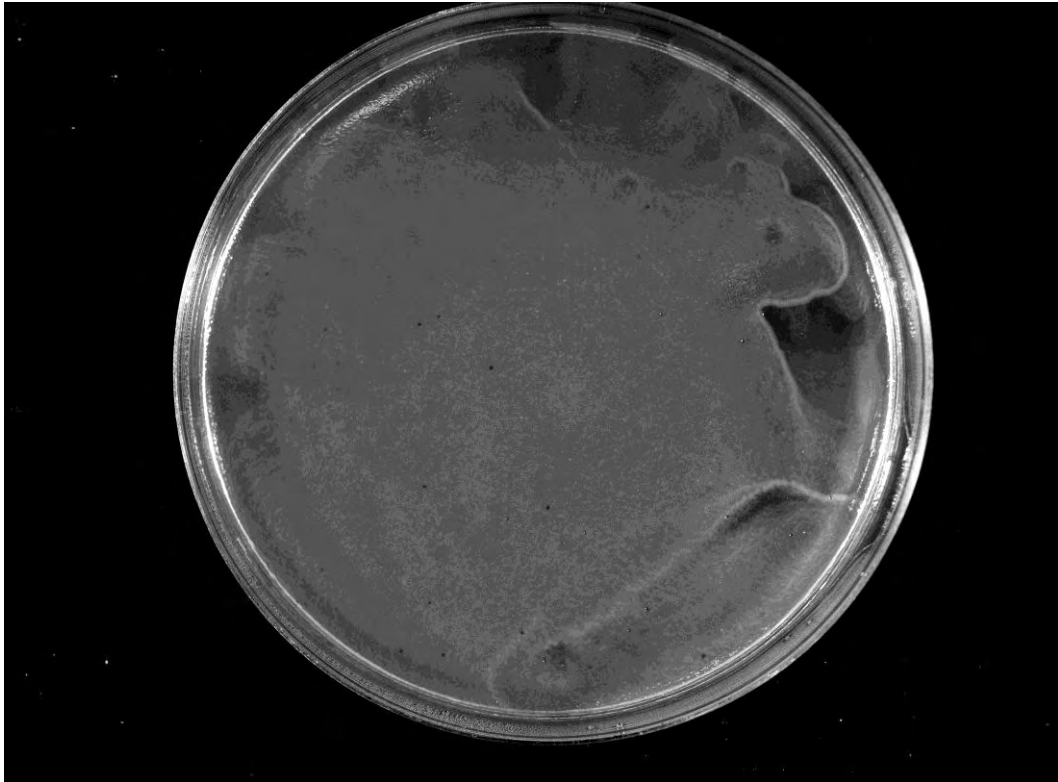
Φάγος A2			
Βακτηριακή απομόνωση	Αραίωση	Αριθμός πλακών	Τύπος πλάκας (διάμετρος, mm)
Pss 1	10^{-6}	640	0.3-0.8 mm
	10^{-7}	320	
	10^{-8}	23	
Pss 2	10^{-6}	749,33	0.3-0.8 mm
	10^{-7}	477,33	
	10^{-8}	41,33	
Pss 3	10^{-6}	325,33	1.1-1.9 mm
	10^{-7}	184	
	10^{-8}	28,33	
Pss 4	10^{-6}	162,66	1.1-1.9 mm
	10^{-7}	94,33	
	10^{-8}	26,66	
Pss 5	10^{-6}	405,33	2.0-3.5 mm
	10^{-7}	416	
	10^{-8}	18,33	



Εικόνα 22. Συνδυασμός απομόνωσης Pss 1 με φάγο A2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στην δεκαδική αραιώση 10^{-6} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



Εικόνα 23. Συνδυασμός απομόνωσης Pss 1 με φάγο A2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στην δεκαδική αραιώση 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



Εικόνα 24. Συνδυασμός απομόνωσης Pss 1 με φάγο A2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στην δεκαδική αραιώση 10^{-8} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.

Παρατηρούμε ότι ο φάγος G1 δίνει πλάκες μετρίου μεγέθους στις απομονώσεις Pss 1, Pss 3 και Pss 5, ενώ στις απομονώσεις Pss 2 και Pss 4 έδωσε μεγάλες πλάκες. Περισσότερες πλάκες έδωσε η απομόνωση Pss 1 και λιγότερες η Pss 5, κάτι που δείχνει πως η απομόνωση Pss 5 είναι περισσότερο ανθεκτική σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Ο φάγος G2 έδωσε πλάκες μικρού μεγέθους στις απομονώσεις Pss 3 και Pss 4, πλάκες μετρίου μεγέθους στις Pss 1 και Pss 2, και πλάκες μεγάλου μεγέθους στην απομόνωση Pss 5. Περισσότερες πλάκες έδωσε η απομόνωση Pss 2 ενώ λιγότερες η Pss 3.

Ο φάγος A1 έδωσε πλάκες μετρίου μεγέθους στις απομονώσεις Pss 2, Pss 3 και Pss 4, και πλάκες μεγάλου μεγέθους στις απομονώσεις Pss 1 και Pss 5. Περισσότερες πλάκες έδωσε η απομόνωση Pss 2 και λιγότερες η Pss 5.

Στον φάγο A2 παρατηρούμε ότι πλάκες μικρού μεγέθους σχηματίστηκαν στις απομονώσεις Pss 1 και Pss 2, πλάκες μετρίου μεγέθους στις απομονώσεις Pss 3 και Pss 4, και πλάκες μεγάλου μεγέθους στην απομόνωση Pss 5. Τις περισσότερες πλάκες είχε η απομόνωση Pss 2 και τις λιγότερες η Pss 4.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δύο δείγματα εδάφους και φυτικού ιστού συλλέχθηκαν από ελαιώνες που βρίσκονται στην ευρύτερη περιοχή του Βόλου, το ένα από ορεινή και το άλλο από παραθαλάσσια περιοχή. Από τα δείγματα αυτά απομονώθηκαν τέσσερις φάγοι (G1, G2, A1, A2), δύο από κάθε δείγμα. Τρία ήταν τα γενικά μεγέθη των πλακών που σχηματίστηκαν από τους παραπάνω φάγους, 0.3-0.8 mm, 1.1-1.9 mm και 2.0-3.5 mm. Οι πλάκες σε όλες τις βακτηριακές απομονώσεις εμφανιζόταν καθαρές, κάτι που υποδεικνύει ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση. Και οι τέσσερις φάγοι γενικά έδειξαν καλά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση *in vitro* του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, καθώς όταν εφαρμόζονταν σε μικρές συγκεντρώσεις η ανάπτυξη του βακτηρίου αναστελλόταν πλήρως. Ωστόσο οι φάγοι A1 και A2 φαίνεται να είναι περισσότερο τοξικοί απέναντι στο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε σχέση με τους G1 και G2, καθώς χρειάστηκε να εφαρμοστούν σε μεγαλύτερες δεκαδικές αραιώσεις για να γίνει δυνατή η μέτρηση των πλακών τους. Περισσότερο ευαίσθητη βακτηριακή απομόνωση φαίνεται να είναι η Pss 2 καθώς στους περισσότερους φάγους είχε τις περισσότερες πλάκες. Ανθεκτικότερη βακτηριακή απομόνωση σε σχέση με τις υπόλοιπες φαίνεται να είναι η Pss 5, καθώς σε δύο από τους φάγους (G1,A1) έδωσε τις λιγότερες πλάκες.

Η καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου είναι αναγκαία για την εύρεση της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Η χρήση του βακτηρίου όπως για παράδειγμα, ο εμβολιασμός των φάγων σε υγρή καλλιέργεια *P. savastanoi* pv. *savastanoi* ή η επίστρωση των φάγων μαζί με το βακτήριο σε θρεπτικό υπόστρωμα, πρέπει να γίνεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης του βακτηρίου. Αυτό γιατί οι φάγοι για τη δράση τους και τον πολλαπλασιασμό τους έχουν ανάγκη την ενεργή ανάπτυξη του βακτηρίου.

Εντούτοις χαρακτηριστικά των τεσσάρων απομονωμένων φάγων θα πρέπει να μελετηθούν και να προσδιοριστούν στο μέλλον. Το μέγεθος, η δομή και η μορφολογία είναι τέτοια χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία να προσδιοριστούν. Αλληλούχιση του γονιδιώματός τους επίσης θα πρέπει να γίνει, και έτσι σύμφωνα με τα παραπάνω να γίνει και η ταξινόμησή τους ως προς την τάξη και την οικογένεια, εκτός και αν πρόκειται για ήδη γνωστούς φάγους. Επίσης θα πρέπει να γίνουν δοκιμές σε περισσότερες απομονώσεις του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ή ακόμα και σε διαφορετικά είδη βακτηρίων, έτσι ώστε να διερευνηθεί το

εύρος των ξενιστών. Ο συνδυασμός των φάγων πιθανό να έχει καλύτερα αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της ασθένειας ως βιολογικό μέσο καταπολέμησης, καθώς μεγαλώνει το φάσμα της λύσης τους. Έχει αποδειχθεί πως όταν εφαρμόζονται συνδυασμοί φάγων (κοκτέιλ φάγων), η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων καθυστερεί ή αναστέλλεται τελείως (Tanji *et al.*, 2004).

Η προοπτική για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων βακτηρίων με τη χρήση φάγων εξακολουθεί να υπάρχει και ενισχύεται, λόγω της εξαιρετικής εξειδίκευσής τους απέναντι στους ξενιστές, και λόγω του ότι αποτελούν βιολογικά μέσα αντιμετώπισης (Adachi και Tsukamoto, 2012). Ωστόσο πριν την εφαρμογή των φάγων στο φυσικό περιβάλλον των βακτηρίων, αναγκαίο θα ήταν να προηγηθούν δοκιμές υπό την επίδραση διαφόρων συνθηκών. Τόσο η θερμοκρασία όσο και η ακτινοβολία UV παίζουν σημαντικό ρόλο για την επιβίωση του φάγου. Με την απουσία ξενιστή, οι πληθυσμοί των φάγων μειώνονται γρήγορα υπό την επίδραση της ακτινοβολίας UV και της αποξήρανσης (Schnabel και Jones, 2000). Ο κατάλληλος χρόνος εφαρμογής των φάγων παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην επιτυχημένη αντιμετώπιση, καθώς πρέπει να υπάρχει ενεργή ανάπτυξη των βακτηρίων.

Στο παρελθόν η αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων βακτηρίων γινόταν αποτελεσματικά, με τη χρήση αντιβιοτικών και κυρίως τη στρεπτομυκίνη. Ωστόσο η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών και ο φόβος μετάδοσης της ανθεκτικότητας σε παθογόνα βακτήρια ανθρώπων, οδήγησε στην απαγόρευση της χρήσης αντιβιοτικών στη φυτική παραγωγή. Τα χαλκούχα σκευάσματα έχουν χρησιμοποιηθεί για περισσότερο από ένα αιώνα και ακόμη χρησιμοποιούνται ευρέως, παρά το γεγονός ότι έχουν εμφανισθεί ανθεκτικά στο χαλκό στελέχη, καθιστώντας έτσι την αντιμετώπισή τους προβληματική (Balogh *et al.*, 2010). Επίσης η συνεχής χρήση του χαλκού έχει αρνητικές συνέπειες λόγω της τοξικότητας στο περιβάλλον και τους μικροοργανισμούς. Η ανησυχία για τις επιπτώσεις στο περιβάλλον λόγω της χρήσης χημικών βακτηριοκτόνων σε συνδυασμό με τη ζήτηση του κοινού για γεωργικές πρακτικές βιώσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον, οδήγησε στην αναζήτηση εναλλακτικής λύσης (Balogh *et al.*, 2010).

Το πρώτο βακτηριοκτόνο που περιέχει φάγους εγκρίθηκε από την Αμερικανική υπηρεσία προστασίας του περιβάλλοντος το 2005, και παράγεται από την εταιρία OmniLytics Inc (Balogh *et al.*, 2010). Το βιολογικό βακτηριοκτόνο AgriPhage™ (<http://www.omnilytics.com/products/agriphage>) περιέχει φάγους που χρησιμοποιούνται ειδικά για την αντιμετώπιση του *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* στην πιπεριά

και του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* στην τομάτα (Nagy *et al.*, 2012). Το συγκεκριμένο βακτηριοκτόνο περιέχει μίγμα φάγων αγρίου τύπου και μεταλλαγμένους φάγους με εύρος ξενιστών τα στελέχη του *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* και του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Nagy *et al.*, 2012). Για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας, η εταιρία OmniLytics δέχεται από τους πελάτες της μολυσμένα δείγματα ιστού κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, από τα οποία απομονώνονται φυτοπαθογόνα βακτήρια και γίνονται δοκιμές για την αντιμετώπισή τους με τους φάγους που χρησιμοποιούνται εκείνη την περίοδο. Αν εντοπιστεί ανθεκτικότητα σε οποιονδήποτε από τους φάγους, το μίγμα των φάγων θα αλλάξει ανάλογα (Balogh *et al.*, 2010). Οι βακτηριοφάγοι δεν επηρεάζονται από την βροχή, σε αντίθεση με τα χημικά βακτηριοκτόνα τα οποία ξεπλένονται και χάνουν την αποτελεσματικότητά τους (Balogh *et al.*, 2010). Τέλος οι βακτηριοφάγοι για καλύτερα αποτελέσματα και τον έλεγχο της ανθεκτικότητας, θα μπορούσαν να ενσωματωθούν σε προγράμματα ολοκληρωμένης καταπολέμησης, σε συνδυασμό με χαλκούχα σκευάσματα για παράδειγμα, εφόσον δεν επηρεάζονται από την παρουσία των ιόντων χαλκού.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ackermann, H.W., Cartier, C., Slopek, S., and Vieu, J.F. (1988). Morphology of *Pseudomonas aeruginosa* typing phages of the lindbeg set. *Ann. Inst. Pasteur/Virol.* 139, 389-404.
- Ackermann, H.W. (2006). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol.*
- Adachi, N., and Tsukamoto, S. (2012). Control of Bacterial Seedling Rot and Seedling Blight of Rice by Bacteriophage. *Plant Disease* 96, 1033-1036.
- Adams, M.H. (1959). *Bacteriophages*. Interscience publishers, New York
- Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, San Diego
- Ashelford, K.E., Day, M.J., and Fry, J.C. (2002). Elevated Abundance of Bacteriophage Infecting Bacteria in Soil. *Applied and environmental microbiology* 69, 285–289.
- Balogh, B., Jones, J.B., Iriarte, F.B., and Momol, M.T. (2010). Phage Therapy for Plant Disease Control. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11, 48-57.
- Bertolini, E., Penyalver, R., García, A., Olmos, A., Quesada, J.M., Cambra, M., and López, M.M. (2003). Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested-PCR in a single closed tube. *Journal of Microbiological Methods* 52, 261– 266.
- Calendar, R. (1988). *THE BACTERIOPHAGES-Volume 1*. Plenum Press, New York
- Çepni, E., and Gürel, F. (2012). Variation in extragenic repetitive DNA sequences in *Pseudomonas syringae* and potential use of modified REP primers in the identification of closely related isolates. *Genetics and Molecular Biology* 35, 650-656.
- Ceyssens, P.J. (2009). *Isolation and characterization of lytic bacteriophages infecting Pseudomonas aeruginosa*. Unpublished BSc (Hons) dissertation, University of Leuven, Leuven
- Earnshaw, W.C., and Harrison, S.C. (1977). DNA arrangement in isometric phage heads. *Nature* 268.
- Gill, J., and Abedon, S.t. (2003). Bacteriophage Ecology and Plants. *APSnet Feature*.
- Gill, J.J., Svircev, A.M., Smith, R., and Castle, A.J. (2003). Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Applied and environmental microbiology* 69, 2133–2138.

- Gori, A., Cerboneschi, M., and Tegli, S. (2012). High-Resolution Melting Analysis as a Powerful Tool to Discriminate and Genotype *Pseudomonas savastanoi* Pathovars and Strains. *PLoS ONE* 7
- Hamid, R.A., and Cooksey, D.A. (1995). A Semiselective Medium for Detecting Epiphytic and Systemic Populations of *Pseudomonas savastanoi* from Oleander. *Phytopathology* 85, 740-745.
- Hee Kim, M., Wan Park, S., and Kee Kim, Y. (2011). Bacteriophages of *Pseudomonas tolaasii* for the Biological Control of Brown Blotch Disease. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54, 99-104.
- Hendrix, R.W. (2002). Bacteriophages: Evolution of the Majority. *Theoretical Population Biology* 61, 471–480.
- Janse, J.D. (2005). *Phytobacteriology principles and practice*. CABI Publishing, Wallingford
- Kasman, L.M., Kasman, A., Westwater, C., Dolan, J., Schmidt, M.G., and Norris, J.S. (2002). Overcoming the Phage Replication Threshold: a Mathematical Model with Implications for Phage Therapy. *Journal of virology* 76, 5557–5564.
- Kerr, K.G., and Snelling, A.M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection* 73, 338-344.
- Klumpp, J., Fouts, D.E., and Sozhamannan, S. (2013). Bacteriophage functional genomics and its role in bacterial pathogen detection. *Briefings in functional genomics* 12, 354-365.
- Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P., and Pelletier, J. (2006). Comparative Genomic Analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages. *Journal of bacteriology* 188, 1184–1187.
- Leiman, P.G., Chipman, P.R., Kostyuchenko, V.A., Mesyanzhinov, V.V., and Rossmann, M.G. (2004). Three-Dimensional Rearrangement of Proteins in the Tail of Bacteriophage T4 on Infection of Its Host. *Cell* 118, 419–429.
- Li, L., Yang, H., Lin, S., and Jia, S. (2010). Classification of 17 newly isolated virulent bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 56, 925–933.
- Lwoff, A. (1953). Lysogeny. *Bacteriol Rev.* 17, 269–337.
- Marchi, G., Sisto, A., Cimmino, A., Andolfi, A., Cipriani, M.G., Evidente, A., and Surico, G. (2006). Interaction between *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* and *Pantoea agglomerans* in olive knots. *Plant Pathology* 55, 614–624.

- Matas, I.M., Lambertsen, L., Rodríguez-Moreno, L., and Ramos, C. (2012). Identification of novel virulence genes and metabolic pathways required for full fitness of *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* in olive (*Olea europaea*) knots. *New Phytologist* 196, 1182–1196.
- Mesyanzhinov, V.V., Robben, J., Grymonprez, B., Kostyuchenko, V.A., Bourkaltseva, M.V., Sykilinda, N.N., Krylov, V.N., and Volckaert, G. (2002). The Genome of Bacteriophage fKZ of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 317, 1-19.
- Nagy, E.S., Maroti, G., Kredics, L., Horvath, B., Parducz, A., Vagvolgyi, C., and Manczinger, L. (2012). Isolation of new *Pseudomonas tolaasii* bacteriophages and genomic investigation of the lytic phage BF7. *FEMS Microbiol Lett* 332, 162–169.
- Nagy, J.K., Király, L., and Schwarczinger, I. (2012). Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Cent. Eur. J. Biol.* 7, 1-12.
- Nakayama, K., Kanaya, S., Ohnishi, M., Terawaki, Y., and Hayashi, T. (1999). The complete nucleotide sequence of fCTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. *Molecular Microbiology* 31, 399–419.
- Nguyen, H.T.D., Yoon, S., Hee Kim, M., Kee Kim, Y., Young Yoon, M., Hee Cho, Y., Lim, Y., Shin, S.H., and Eun Kim, D. (2012). Characterization of bacteriophage ϕ Pto-bp6g, a novel phage that lyses *Pseudomonas tolaasii* causing brown blotch disease in mushrooms. *Journal of Microbiological Methods* 91, 514–519.
- Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J., and Elphinstone, J. (2011). Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the rpoD Locus. *Plant Pathology* 60, 338–344.
- Penyalver, R., Garcia, A., Ferrer, A., Bertolini, E., and Lopez, M.M. (2000). Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Olive Plants by Enrichment and PCR. *Applied and environmental microbiology* 66, 2673–2677.
- Quesada, J.M., García, A., Bertolini, E., López, M.M., and Penyalver, R. (2007). Recovery of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from symptomless shoots of naturally infected olive trees. *International microbiology* 10, 77-84.
- Ramos, C., Matas, I.M., Bardaji, L., Aragon, I.M., and Murillo, J. (2012). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. *Molecular plant pathology* 13, 998-1009.

- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning A laboratory manual-volume 1*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sarkar, S.F., and Guttman, D.S. (1999). Evolution of the Core Genome of *Pseudomonas syringae*, a Highly Clonal, Endemic Plant Pathogen. *Applied and environmental microbiology* 70, 1999-2012.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria*. APS PRESS, Minnesota
- Schnabell, E.L., and Jones, A.L. (2000). Isolation and Characterization of Five *Erwinia amylovora* Bacteriophages and Assessment of Phage Resistance in Strains of *Erwinia amylovora*. *Applied and environmental microbiology* 67, 59-64.
- Sillankorva, S., Oliveira, R., Vieira, M.J., Sutherland, I., and Azeredo, J. (2004). Bacteriophage Φ S1 Infection of *Pseudomonas fluorescens* Planktonic Cells versus Biofilms. *Biofouling* 20, 133 – 138.
- Sillankorva, S., Oliveira, R., Vieira, M.J., Sutherland, I., and Azeredo, J. (2004). *Pseudomonas fluorescens* infection by bacteriophage Φ S1: the influence of temperature, host growth phase and media. *FEMS Microbiology Letters* 241, 13–20.
- Surico, G., and Lavermicocca, P. (1988). A Semiselective Medium for the Isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi*. *Phytopathology* 79, 185-190.
- Tanji, Y., Shimada, T., Yoichi, M., Miyanaga, K., Hori, K., and Unno, H. (2004). Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Applied Microbiology Biotechnology* 64, 270–274.
- Tegli, S., Carboneschi, M., Libelli, I.M., and Santilli, E. (2010). Development of a versatile tool for the simultaneous differential detection of *Pseudomonas savastanoi* pathovars by End Point and Real-Time PCR. *BMC Microbiology* 10, 156.
- Thomas, J.A., Rolando, M.R., Carroll, C.A., Shen, P.S., Belnap, D.M., Weintraub, S.T., Serwer, P., and Hardies, S.C. (2008). Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* myovirus 201 ϕ 2-1 via genomic sequencing, mass spectrometry, and electron microscopy. *Virology* 376, 330–338.
- Valpuesta, J.M., Sousa, N., Barthelemy, I., Fernandez, J.J., Fujisawa, H., Ibarra, B., and Carrascosa, J.L. (2000). Structural Analysis of the Bacteriophage T3 Head-to-Tail Connector. *Journal of Structural Biology* 131, 146–155.

- Wommack, K.E., and Colwell, R.R. (2000). Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiology and molecularbiology reviews* 64, 69–114.
- Yu, Y.P., Gong, T., Jost, G., Liu, W.H., Ye, D.Z., and Luo, Z.H. (2013). Isolation and characterization of five lytic bacteriophages infecting a *Vibrio* strain closely related to *Vibrio owensii*. *FEMS Microbiol Lett* 348, 112–119.
- Zanetti, C.C.S., Mingrone, R.C.C., Kisielius, J.J., Ueda-Ito, M., and Pignatari, A.C.C. (2013). Characterization of bacteriophages infecting clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* stored in a culture collection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 46, 689-695.
- Παναγοπουλος, Χ.Γ. (2007). *Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων & Αμπέλου*. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα

ABSTRACT

The plant pathogen species *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* is the cause of the disease olive knot, with characteristic symptoms hyperplastic tumors stems and arms of the plant, and occasionally on leaves and fruit. Measures to control this bacterium were formerly antibiotics, which have shown resistance plethora of bacteria. Currently used mainly copper compounds, which are also reported resistance, and toxicity to the environment. Concern about the impact on the environment due to the use of chemical bactericides in combination with the need for sustainable agricultural practices and environmentally friendly, has led to the search an alternative. One such solution is the use of bacteriophages, which are biological factors for treatment of bacteria and exist in abundance in the environment. The purpose of this study was to isolate bacteriophages of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, and tested in different isolates of the bacterium. Initially plant tissue samples were collected for isolation of the bacterium. Followed by identification of isolates with the molecular technique of PCR. Then followed by the collection of soil and plant tissue for the isolation of bacteriophages. Four bacteriophages isolated from two different samples G1, G2, A1 and A2. In the course became the titration of bacteriophages and characterization of the morphology and size of plaques forming. Finally was conducting bioassays between four phages and five bacterial isolates Pss 1, Pss 2, Pss 3, Pss 4 and Pss 5. This was the determination of host range, regarding isolates of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.