



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

Απομόνωση, χαρακτηρισμός και γενετική ποικιλομορφία βακτηρίων που
σχετίζονται με ασθένειες της ελιάς και της καρυδιάς

ΑΠΟΧΑ ΛΕΜΟΝΙΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: Βέλλιος Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής

ΒΟΛΟΣ 2019

“Απομόνωση, χαρακτηρισμός και γενετική ποικιλομορφία βακτηρίων που σχετίζονται με ασθένειες της ελιάς και της καρδιάς”

“Isolation, characterization and genetic diversity of bacteria related to olive and walnut diseases”

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Ευάγγελος Βέλλιος, Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

Χρήστος Αθανασίου, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Φεβρωνία Λιολιοπούλου, μέλος ΕΔΙΠ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βεβαιώνω ότι είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακής Εργασίας του ΤΓΦΠΑΠ.

Απόχα Λεμονιά

A handwritten signature in black ink, appearing to be the name 'Απόχα Λεμονιά' written in a cursive style.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θεωρώ μεγίστη υποχρέωση να εκφράσω ειλικρινώς ευχαριστίες προς τον εντιμότατο καθηγητή μου κ. Βέλλιο Ευάγγελο, Επίκουρο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας, διότι, καθ' όλη τη διάρκεια αυτού του πονήματος, όχι μόνο απέδειξε με καθοριστικές παρεμβάσεις την υψηλή επιστημονική του κατάρτιση, αλλά και επέδειξε με πληθωρικότητα αρετές αληθινού Διδασκάλου.

Ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή του Εργαστηρίου Εντομολογίας, κ. Αθανασίου Χρήστο για την αξιολόγηση της εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες επίσης στην Δρ. Λιολιοπούλου Φεβρωνία, μέλος της ΕΔΙΠ, για την εκπόνηση και αποπεράτωση της εργασίας.

Ευχαριστίες απευθύνω επίσης στον κ. Παπαδόπουλο Νικόλαο Αναπληρωτή Καθηγητή και στον Δρ. Ζάρπα Κωνσταντίνο Διδάκτορα του Εργαστηρίου Εντομολογίας για την παραχώρηση και χρήση των εργαστηριακών μηχανημάτων.

Πολύτιμη υπήρξε επίσης η βοήθεια εκ μέρους του Δρ. Χατζηδημόπουλου Μιχάλη Διδάκτορα του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας καθώς επίσης και της Barua Parinda μεταπτυχιακής φοιτήτριας του προγράμματος Erasmus + . Ομολογώ με ευγνωμοσύνη ότι χωρίς την συνδρομή τους η παρούσα πτυχιακή εργασία δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί.

Τέλος, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τους καλούς μου γονείς, Θεόδωρο και Άννα, την αδερφή μου, Χριστίνα για την αμέριστη συμπαράστασή τους σ' ό,τι δύσκολο αλλά και ωφέλιμο επιχείρησα στη μέχρι τώρα πορεία της ζωής μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	vii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ix
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Κηλίδωση φύλλων και καρπών καρυδιάς προκαλούμενη από το βακτήριο <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	1
1.2 Καρκίνωση της ελιάς.....	2
1.3 Χρώση Gram.....	4
1.4 Αντίδραση υπερευαισθησίας	4
1.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	5
1.5.1 Προσδιορισμός γενετικής ποικιλομορφίας βακτηρίων	5
1.6 Θρεπτικά υποστρώματα.....	6
1.7 Σκοπός	6
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	7
2.1 Θρεπτικά υλικά	7
2.2 Απομονώσεις βακτηρίων από καρπούς, φύλλα και βλαστούς καρυδιάς που έφεραν συμπτώματα της ασθένειας κηλίδωση φύλλων και καρπών καρυδιάς	7
2.2.1 Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων	9
2.2.2 Χρώση Gram.....	10
2.3 Απομονώσεις βακτηρίων PSS από κλάδους ελιάς.	10
2.4 Δοκιμές υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού	11
2.5 Τεχνητή μόλυνση των υγιών φύλλων καπνού με το αιώρημα των βακτηρίων.....	11
2.6 Απομόνωση και καθαρισμός βακτηριακού DNA	13
2.6.1 1 ^ο Πρωτόκολλο απομόνωσης βακτηριακού DNA που εφαρμόστηκε σε όλες τις απομονώσεις βακτηρίων καρυδιάς και στην απομόνωση Pss1	13
2.6.2 2 ^ο Πρωτόκολλο απομόνωσης βακτηριακού DNA των απομονώσεων από καρυδιά (απομονώσεις K,K1,5K1) και της απομόνωσης από ελιάς (Pss1).....	13
2.6.3 3 ^ο Πρωτόκολλο απομόνωσης βακτηριακού DNA των απομονώσεων από καρυδιά (1P, K, 3B1, 5K1, 5B)	14
2.6.4 4 ^ο Πρωτόκολλο απομόνωσης βακτηριακών DNA που προέρχονταν από όλες τις απομονώσεις βακτηρίων ελιάς.....	14
2.6.5 Καθαρισμός βακτηριακού DNA	15
2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	15
2.7.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας των βακτηριακών απομονώσεων ελιάς.	16

2.8 Ηλεκτροφόρηση	16
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	18
3.1 Μέθοδοι απομόνωσης βακτηρίων προσβεβλημένων δέντρων καρυδιάς.....	18
3.2 Χαρακτηριστικά αποικιών	18
3.3 Χρώση κατά Gram	21
3.4 Αντίδραση υπερευαισθησίας	21
3.5 Σύγκριση μεθόδων καθαρισμού DNA βακτηριακών κυττάρων	24
3.6 Διαγνωστική PCR για την ταυτοποίηση του γένους και του είδους των βακτηρίων καρυδιάς	25
3.7 Διαγνωστική PCR για το είδος <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	27
3.8 Αποτελέσματα γενετικής ποικιλομορφίας βακτηρίων με ERIC - BOX- PCR.....	27
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	29
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	32
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	33

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Συμπτώματα της ασθένειας κηλίδωση φύλλων και καρπών καρυδιάς σε καρπούς και φύλλα.....	8
Εικόνα 2. Σημεία τεχνητής μόλυνσης του φύλλου καπνού με αιώρημα βακτηριακών κυττάρων.....	12
Εικόνα 3. Ανάπτυξη κίτρινης αποικίας γύρω από κομμάτι ιστού σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα NA+A.....	18
Εικόνα 4. Ανάπτυξη κίτρινων και λευκών αποικιών σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα NA+A.....	18
Εικόνα 3. Κίτρινες αποικίες των βακτηριακών απομονώσεων από καρυδιά στο θρεπτικό υπόστρωμα NA+A.....	20
Εικόνα 6. Κίτρινες αποικίες των βακτηριακών απομονώσεων από καρυδιά στο θρεπτικό υπόστρωμα YDC.....	20
Εικόνα 7. Λευκές αποικίες των βακτηριακών απομονώσεων από καρυδιά στο θρεπτικό υπόστρωμα NA+A.....	20
Εικόνα 8. Λευκές αποικίες των βακτηριακών απομονώσεων από καρυδιά στο θρεπτικό υπόστρωμα YDC.....	20
Εικόνα 9. Gram αρνητικά κύτταρα των βακτηρίων της καρυδιάς.....	21
Εικόνα 10. Gram θετικά κύτταρα του μάρτυρα Bt.....	21
Εικόνα 11. Αντίδραση υπερευαισθησίας από τεχνητή μόλυνση φύλλου καπνού τύπου Virginia με την απομόνωση Pss1 (<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>), μετά από 24 ώρες.....	22
Εικόνα 12. Αντίδραση υπερευαισθησίας από τεχνητή μόλυνση φύλλου καπνού τύπου Virginia με την απομόνωση Pss1 (<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>), μετά από 96 ώρες.....	22
Εικόνα 13: Αποτελέσματα μετά από τεχνητές μολύνσεις φύλλου καπνού τύπου Virginia με τις απομονώσεις Pss1(απομόνωση ελιάς), 2Φ (απομόνωση βακτηρίου από φύλλο καρυδιάς), Bt.	22
Εικόνα 14: Τεχνητή μόλυνση κάτω πλευράς φύλλου καπνού με νερό.....	23
Εικόνα 15. Διαγνωστική PCR για το γένος <i>Xanthomonas</i> σε πηκτή αγαρόζης 1,5%, με εκκινητές forward primer 5'-AAGGATCGGGTATTAAC-3 και reverse 5'- AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3'.....	26
Εικόνα 16. Διαγνωστική PCR για το είδος <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> σε πηκτή αγαρόζης 1,5%, με εκκινητές Χαί6F 5'-AAGTCAGATGCGAAGCGAAAGG-3' και Χαί6R 5'-GCACAGCGGGAAGTAATAGCAAAC-3'.....	26

Εικόνα 18: Αποτελέσματα BOX-PCR για το είδος *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε πηκτική ακρυλαμίδης28

Εικόνα 19. Αποτελέσματα ERIC-PCR για το είδος *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε πηκτική ακρυλαμίδης27

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας των βακτηρίων που σχετίζονται με ασθένειες της ελιάς και της καρυδιάς, μπορεί να βοηθήσει στην εξειδικευμένη αντιμετώπιση αυτών των βακτηριώσεων, καθώς έχει παρατηρηθεί ανθεκτικότητα στις επεμβάσεις με χαλκούχα σκευάσματα. Το βακτήριο *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* προκαλεί την ασθένεια κηλίδωση φύλλων και καρπών καρυδιάς και το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* . προκαλεί την ασθένεια καρκίνωση της ελιάς. Απομονώθηκαν από καρπούς, φύλλα και βλαστούς καρυδιάς που έφεραν τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας, 12 βακτηριακά στελέχη με αποικίες κίτρινου χρώματος και 6 λευκού χρώματος στο θρεπτικό υπόστρωμα NA+A. Το Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας διέθετε 10 απομονώσεις του Pss από δέντρα ελιάς και μία απομόνωση από δέντρο καρυδιάς που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Για την ταυτοποίηση των βακτηρίων που απομονώθηκαν από καρυδιά πραγματοποιήθηκε χρώση Gram η οποία ταξινόμησε όλα τα βακτήρια ως Gram ⁻. Έπειτα έγινε παρατήρηση των αποικιών τους στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα YDC και δοκιμή αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φύλλα φυτών καπνού. Το βακτήριο Pss προκάλεσε νέκρωση των ιστών των φύλλων καπνού ενώ αντίθετα οι απομονώσεις από καρυδιά εμφάνιζαν έντονη χλώρωση στα σημεία τεχνητής μόλυνσης. Διεξάχθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για όλες τις απομονώσεις με σκοπό την ταυτοποίησή τους. Οι απομονώσεις βακτηρίων από καρυδιά δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν ενώ και οι δέκα απομονώσεις Pss ταυτοποιήθηκαν ως *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* . Με σκοπό την διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας των βακτηρίων που απομονώθηκαν από ελιά, πραγματοποιήθηκαν δύο αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (BOX-PCR και ERIC-PCR), που είχαν ως αποτέλεσμα την ύπαρξη γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των βακτηρίων που προέρχονταν από διαφορετικές αλλά και ίδιες γεωγραφικές περιοχές.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κηλίδωση φύλλων και καρπών καρυδιάς προκαλούμενη από το βακτήριο *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*.

Η κηλίδωση φύλλων και καρπών καρυδιάς είναι μια προκαρυωτική ασθένεια κυρίως της περσικής καρυδιάς (*J. regia*) και της Αμερικάνικης μαύρης καρυδιάς (*J. nigra*) κατά τους ανοιξιάτικους και καλοκαιρινούς μήνες. Οφείλεται στο βακτήριο *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Xaj). Η πρώτη αναφορά για το βακτήριο στην Ευρώπη έγινε το 1901 από τον Pierce (Pierce 1901), ενώ στην Ελλάδα έγινε το 1951 από τους Σαρεγιάννη και Δημητριάδη (Δημητριάδη 1979).

Τα συμπτώματα είναι καφέ-μαύρες κηλίδες χωρίς συγκεκριμένο σχήμα που σιγά σιγά γίνονται νεκρωτικές. Εμφανίζονται στους οφθαλμούς, τους ίουλους, τα φύλλα, τους καρπούς και τους βλαστούς, οι οποίοι προσβάλλονται κοντά στην κορυφή. (Lamichhane 2014). Επίσης παρατηρείται νέκρωση και μεταχρωματισμός των αγγείων του ελάσματος και έλκη στους ξυλοποιημένους βλαστούς. Οι ποικιλίες που βγάζουν πρώιμα φύλλα είναι πιο ευπαθείς (Θέριος 2013). Πολλά καρύδια πέφτουν πρόωρα ενώ άλλα φτάνουν το επιθυμητό μέγεθος αλλά ο πυρήνας τους είναι μαύρος, ξερός, στεγνός και ζαρωμένος (Frutos 2010).

Το βακτήριο μεταφέρεται με το νερό της βροχής. Κρίσιμη περίοδος για την μετάδοσή του, αποτελεί το διάστημα από την έναρξη της βλάστησης μέχρι δύο εβδομάδες μετά την πλήρη άνθιση (Lamichhane 2014). Η βροχή κυρίως βοηθάει στην εξάπλωση της ασθένειας, φορείς όμως μπορεί να είναι και έντομα καθώς και ακάρεα. Το βακτήριο μπορεί να βρίσκεται πάνω στη γύρη χωρίς ο ρόλος της στην επιδημιολογία της ασθένειας να έχει αποδειχθεί (Frutos 2010).

Διαχειμάζει στα προσβεβλημένα μέρη του φυτού (Frutos 2010, Lamichhane 2014). Δεν έχει διαπιστωθεί ακόμα η ικανότητα επιβίωσης του βακτηρίου στα πεσμένα προσβεβλημένα φύλλα των δέντρων της καρυδιάς. Μολύνει μέσω των στοματίων ή πληγών (Lamichhane 2014).

Ανήκει στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Τα κύτταρά του έχουν μέγεθος 0,4-1,0 x1,2-3,0 μm. Το σχήμα τους είναι ραβδόμορφο και φέρουν ένα πολικό μαστίγιο. Η

βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων είναι 25-27 °C. Έπειτα από 24 ώρες στους 27 °C στα θρεπτικά υποστρώματα NA και LB, εμφανίζονται μεμονωμένες αποικίες κυττάρων διάμετρο 2-5 mm. Οι αποικίες του στο θρεπτικό υπόστρωμα NA έχουν κίτρινη απόχρωση (Sharma 1999) (Πίνακας 1) και έχουν γυαλιστερή εμφάνιση η οποία οφείλεται σε έναν εξωπολυσακχαρίτη, το κόμμι ξανθάνης (Midha and Patil 2014), ενώ στο LB φέρουν σκούρα κίτρινη απόχρωση (Plessis and Westhizen 1995, Agrios 1997, Schaad et al. 2001).

Το κίτρινο χρώμα αποτελεί διαγνωστικό δείκτη για το γένος και προέρχεται από την ομάδα χρωστικών γνωστών ως ξανθομοναδίνες (Sharma 1999). Μεταλλάξεις των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της χρωστικής ουσίας προκαλούν υπερευαισθησία σε φωτοβιολογικές βλάβες. (Rajagopal et al. 1999). Ωστόσο, υπάρχουν πολλά στελέχη και παθότυποι που δεν παράγουν κίτρινη χρωστική και φαίνονται λευκά (Midha and Patil 2014).

Για την αντιμετώπιση της ασθένειας τα μέτρα που λαμβάνονται είναι κυρίως προληπτικά. Πρωταρχικό μέτρο είναι η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού στο χωράφι. Ο προληπτικός ψεκασμός με χαλκούχα σκευάσματα θα πρέπει να γίνεται έπειτα από παγετό, χαλάζι και πληγές που δημιουργούνται στα δέντρα, συμπεριλαμβανομένης της πτώσης των φύλλων του φθινοπώρου, η οποία παρέχει πύλες εισόδου για τον παθογόνο. Οι εφαρμογές με χαλκούχα μπορούν να προκαλέσουν ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου στο χαλκό και επιπλέον, δεν είναι αποτελεσματικές οι επεμβάσεις με χαλκό όταν το παθογόνο εισέλθει στο φυτό (Lamichhane 2014).

1.2 Καρκίνωση της ελιάς

Το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (PSS) προκαλεί την ασθένεια καρκίνωση της ελιάς. Κύριο σύμπτωμα της ασθένειας είναι η δημιουργία όγκων στα κλαδιά, πιο σπάνια στα φύλλα, στον κορμό, στις ρίζες και στους ποδίσκους των καρπών (Janse 2005). Οι όγκοι στην αρχή είναι μικροί και ξεκινούν εσωτερικά από τους κλαδίσκους. Με την εγκάρσια τομή ανώριμων όγκων, διαπιστώνεται και ο μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου (Young 2004). Στον καρπό, καστανόμαυρες κυκλικές κηλίδες, εμφανίζονται όταν είναι πράσινοι οι καρποί και μπορεί να περιβάλλονται από γλωρωτική άλω (Panagoroulos 1993).

Το παθογόνο εισέρχεται από πληγές της επιδερμίδας που μπορούν να προκύψουν από ακραία καιρικά φαινόμενα όπως παγετό και χαλάζι, αλλά και από το ράβδισμα των κλαδιών κατά τη συλλογή από εργαλεία κλαδέματος, μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό και μέσω των εντόμων (Janse 2005).

Οι πληγές (χαμηλές θερμοκρασίες, χαλάζι) και η βροχή, ευνοούν την ασθένεια. Στους καρπούς η μόλυνση επιτυγχάνεται μέσω φακιδίων. Το βακτήριο επιβιώνει μέσα στους όγκους, αλλά και επιφυτικά στις επιφάνειες του δέντρου (Panagoroulos 1993).

Το βακτήριο ανήκει στα αρνητικά κατά Gram. Τα κύτταρά του έχουν μέγεθος 0,5-1x1,5-4 μm Το σχήμα τους είναι επιμήκης προς ραβδόμορφο και φέρουν ένα ή περισσότερα πολικά μαστίγια. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων είναι 25-26 °C (Agrios 1997, Shaad et al. 2001). Μετά από έξι μέρες επώασης στους 27°C στο θρεπτικό υπόστρωμα SNA οι αποικίες έφεραν κυκλικό σχήμα και είχαν διάμετρο 0,5- 2,9 mm (Moretti et al. 2008). Οι αποικίες του στο θρεπτικό υπόστρωμα King's B έχουν ανοιχτή κίτρινη απόχρωση (Πίνακας 1) (Agrios 1997, Shaad et al. 2001). Όσον αφορά το PSS, οι περισσότερες απομονώσεις, παράγουν πρασινοκίτρινη φθορίζουσα χρωστική (Παναγόπουλος 2007) σε ένα μέτριο σε χαμηλή περιεκτικότητα σε σίδηρο θρεπτικό υπόστρωμα (Agrios 1997).

Για την αντιμετώπιση της ασθένειας τα μέτρα που λαμβάνονται είναι κυρίως προληπτικά. Πρωταρχικό μέτρο είναι η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού στο χωράφι. Συνίσταται η απομάκρυνση των κοντινών θάμνων αγριελιάς που μπορεί να αποτελούν εστίες του μολύσματος. Απαραίτητη είναι η μεγάλη προσοχή για την αποφυγή τυχόν τραυματισμών των δέντρων που προκύπτουν από το ράβδισμα κατά την συγκομιδή καθώς και το κλάδεμα, το οποίο πρέπει να ξεκινά από τα υγιή δέντρα πρώτα. Ο προληπτικός ψεκασμός με χαλκούχα σκευάσματα μειώνει την προσβολή από το Pss (Young 2004, Janse 2005, Ramos et al. 2012). Επιπλέον, οι εφαρμογές με χαλκούχα μπορούν να προκαλέσουν ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου στο χαλκό (Ngugen K. et al. 2018)

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των υπό μελέτη βακτηρίων.

Βακτήρια	Μέγεθος	Θερμοκρασία Ανάπτυξης	Μαστίγια	Gram stain	Σχήμα	Χρώμα αποικίας
PSS	0,5-1x1,5-4 μm	25-26°C.	1 πολικό ή περισσότερα	Αρνητικό κατά Gram	Επιμήκης προς ραβδόμορφο	Ανοιχτό κίτρινο
Χaj	0,4-1,0 x1,2-3,0 μm	25-27 °C.	1 πολικό	Αρνητικό κατά Gram	ραβδόμορφο	κίτρινο

1.3 Χρώση Gram

Το 1884 ο Christian Gram δημοσίευσε την τεχνική της χρώσης Gram. Η μέθοδος τροποποιήθηκε το 1921 από τον Hucker. Στη χρώση Gram εφαρμόζονται χρωστικά διαλύματα με συγκεκριμένη σειρά με σκοπό την ταξινόμηση των βακτηρίων σε gram-θετικά (μπλε χρώματος) και gram-αρνητικά (ροζ χρώματος). Η τεχνική βασίζεται στη διαφορετική χημική σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων. Τα gram-θετικά έχουν παχύτερο στρώμα πεπτιδογλυκάνης, ενώ τα gram-αρνητικά διαθέτουν επιπλέον ένα στρώμα λιποπολυσακχαριτών, με αποτέλεσμα τα gram-θετικά βακτήρια να διατηρούν την κύρια χρωστική- κρυσταλλικό ιώδες- ενώ τα gram-αρνητικά να αποχρωματίζονται και να χρωματίζονται στο τέλος με το διάλυμα της σαφρανίνης ώστε να είναι ορατά με τη χρήση του μικροσκοπίου (Madigan et al. 2015, Tortora 2016).

1.4 Αντίδραση υπερευαισθησίας

Για την ταυτοποίηση ενός βακτηρίου ως φυτοπαθογόνο ή μη, πραγματοποιείται η δοκιμή της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού (Goodman and Navacky 1994). Ως αντίδραση υπερευαισθησίας ορίζεται «η ακραία έκφραση αντοχής των φυτών» (Τζάμος 2007) έπειτα από εμβολιασμό τους με πυκνό αιώρημα φυτοπαθογόνων βακτηρίων στα οποία δεν αποτελεί ξενιστής ο καπνός (Γεωργόπουλος 1984, Goodman 1968). Σε μοριακό επίπεδο όταν οι διεγέρτες των βακτηρίων (χαρπίνες και γόνιμοι αμολυσματικότητας Avr) έρθουν σε επαφή με την κυτταρική μεμβράνη των φυτικών κυττάρων, αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες

ανθεκτικότητας (R) που θα ενεργοποιήσουν την αντίδραση υπερευαισθησίας (Sharma 1999, Τζάμος 2007) έτσι ώστε σε σύντομο χρονικό διάστημα να νεκρωθούν τα προσβαλλόμενα κύτταρα (Goodman and Navacky 1994, Γεωργόπουλος 1984, Goodman 1968).

1.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία απλή μέθοδος που ενισχύει ένα συγκεκριμένο τμήμα αλληλουχιών DNA από ένα σύνθετο μείγμα μορίων DNA. Για την διεξαγωγή της απαιτεί κυρίως εκμαγείο DNA, εκκινητές νουκλεοτίδια και το ενζυμο DNA πολυμεράση. Οι εκκινητές είναι συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA συμπληρωματικές των αλληλουχιών DNA που πρόκειται να ανιχνευθεί και να ενισχυθεί. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης πηκτής αγαρόζης ή ακρυλαμίδης, διαχωρίζει τα τμήματα DNA με βάση το μέγεθος και το φορτίο και χρησιμοποιείται για την απεικόνιση και ανάλυση των προϊόντων της PCR. Τα τμήματα DNA μετανάστευαν εντός της πηκτής με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με το μέγεθός τους εάν εφαρμοστεί διαφορά δυναμικού και τελικά γίνονται ορατά μετά από επώαση σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Garibyan and Avashia 2013).

Με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA, οι μετρήσεις λαμβάνονται στο φασματοφωτόμετρο στα μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Η οπτική πυκνότητα (OD) που ισούται με το 1, αντιστοιχεί σε περίπου 50 $\mu\text{g/mL}$ για δίκλωνη αλυσίδα DNA. Η αναλογία μεταξύ των μετρήσεων στα $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ παρέχει εκτίμηση της καθαρότητας του νουκλειικού οξέος. Ο λόγος $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ ισούται με τις τιμές 1,8 και 2,0 αντίστοιχα. Αν υπάρχει μόλυνση με πρωτεΐνη ή φαινόλη ο λόγος $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ λαμβάνει τιμές μικρότερες από τις παραπάνω (Sambrook et al. 1989).

1.5.1 Προσδιορισμός γενετικής ποικιλομορφίας βακτηρίων

Η γενετική ποικιλομορφία στα βακτήρια μελετάται μέσω μιας εξειδικευμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης η οποία χρησιμοποιεί εκκινητές συμπληρωματικούς προς αλληλουχίες DNA οι οποίες βρίσκονται διασπαρμένες σε όλα τα βακτηριακά γονιδιώματα. Υπάρχουν τρεις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, BOX (154 bp) που προέρχεται από το *Streptococcus pneumoniae*, ERIC (124-127 bp) και REP (35-40 bp) (Osborn and Smith 2005). Στόχος είναι η ενίσχυση των

αλληλουχιών που υπάρχουν μεταξύ αυτών, ώστε να γίνει διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών (Versalovic 1994, Osborn and Smith 2005, Hagedorn et al. 2011).

1.6 Θρεπτικά υποστρώματα

Για την ταυτοποίηση των βακτηρίων Xaj και Pss, υπάρχουν εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα. Για το Pss έχει βρεθεί πως το θρεπτικό υπόστρωμα PVAR-1 άγαρ, είναι εκλεκτικό έναντι των σαπροφυτικών βακτηρίων (Surico and Lavermicocca 1989). Όσον αφορά το Xaj, το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα YDC στοχεύει στην παραγωγή ή μη της ξανθομοναδίνης (Schaad et al. 2001), το BS -brilliant cresyl blue-starch- που στοχεύει στην εμφάνιση ιριδίζον αποικιών που περιβάλλονται από μια αδιαφανή ζώνη λόγω της υδρόλυσης αμύλου (Mulrean and Schroth 1980) και το SQ – succinate quinate – στον μεταβολισμό του κιννοϊκού οξέως (Lee et al. 1992).

Ως κύρια θρεπτικά υποστρώματα για την ανάπτυξη του Xaj και Pss είναι το NA και το King's B αντίστοιχα. Το NA διαθέτει πρωτεΐνη πεπτόνη που αποτελεί πηγή αζώτου, beef extract το οποίο παρέχει οργανικό άνθρακα, άζωτο, βιταμίνες και ανόργανα άλατα, άγαρ που αποτελείται από πολυσακχαρίτες και παρέχει σταθερότητα και χλωριούχο νάτριο ώστε να διατηρείται η συγκέντρωση άλατος στο θρεπτικό υπόστρωμα παρόμοια με το κυτταρόπλασμα των μικροοργανισμών (Carruccino and Sherman 2002).

1.7 Σκοπός

Σκοπός της πτυχιακής εργασίας, υπήρξε η μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας βακτηρίων Pss υπεύθυνα για την καρκίνωση της ελιάς από την ευρύτερη περιοχή του Βόλου και της Λαμίας, καθώς και βακτηρίων που απομονώθηκαν από φύλλα, βλαστούς και καρπούς καρυδιάς με συμπτώματα βακτηριακής κηλίδωσης φύλλων και καρπών καρυδιάς.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Θρεπτικά υλικά

Τα Θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ήταν τα εξής:

- ❖ NA+A, LAB M NA Amersham (potato peptone 5,0 g/L, beef extract 3,0 g/L, sodium chloride 8,0 g/L, agar No2 12,0 g/L), με προσθήκη 3 g/L άγαρ (Agar-Agar, Bioscience carl Roth), ώστε το υλικό να έχει μια πιο συμπαγής και σταθερή υφή. Το NA+A αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 λεπτά (Schaad et al. 2001).
- ❖ YDC, που περιέχει yeast extract 10,0 g/L, dextrose 22,0 g/L, Agar 15 g/L, calcium carbonate (USP light powder) 20,0 g/L (Schaad et al. 2001). Σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη, τοποθετούνταν όλα τα υλικά και τελευταίο το CaCO₃ γιατί καθιζάνει γρήγορα και δεν αναμιγνύεται εύκολα με τα υπόλοιπα υλικά. Το μείγμα θερμαινόταν μέχρι το σημείο ζέσεως όπου αναδεύονταν έντονα και κατόπιν το υλικό μοιραζόταν σε τρυβλία Petri (Atlas 2010).
- ❖ King's B (solid), που περιείχε potato peptone 20,0 g/L, agar No2 15,0 g/L τα οποία ενυδατώνονταν για 5 λεπτά και ύστερα με συνεχή ανάδευση προστίθονταν glycerol 15,0 mL/L, K₂HPO₄ anhydrous 1,5 g/L και MgSO₄ · 7H₂O 1,5 g/L. Το μείγμα θερμαινόταν μέχρι το σημείο ζέσεως και αποστειρώνονταν στους 121 °C για 15 λεπτά (Atlas 2010).
- ❖ King's B Broth (liquid): που περιείχε potato peptone 20,0 g/L η οποία ενυδατώνονταν για 5 λεπτά και ύστερα με συνεχή ανάδευση προστίθονταν glycerol 15,0 mL/L, K₂HPO₄ anhydrous 1,5 g/L και MgSO₄ · 7H₂O 1,5 g/L. Το μείγμα θερμαινόταν μέχρι το σημείο ζέσεως και αποστειρώνονταν στους 121 °C για 15 λεπτά (Atlas 2010).

2.2 Απομονώσεις βακτηρίων από καρπούς, φύλλα και βλαστούς καρυδιάς που έφεραν συμπτώματα της ασθένειας κηλίδωση φύλλων και καρπών καρυδιάς

Οι απομονώσεις των βακτηρίων από καρπούς, φύλλα και βλαστούς καρυδιάς που έφεραν τα τυπικά συμπτώματα της κηλίδωσης φύλλων και καρπών καρυδιάς (Εικόνα 1), πραγματοποιήθηκαν το χρονικό διάστημα 2017-2018 μετά από μια περίοδο έντονων βροχοπτώσεων στις περιοχές Κορόπη του Δήμου Νοτίου Πηλίου, στα

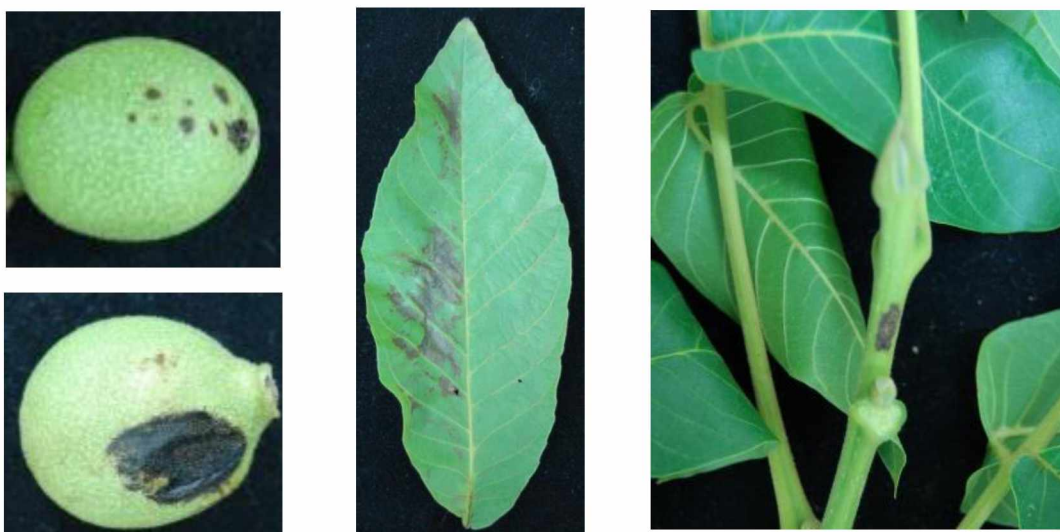
περίχωρα Λάρισας και στην περιοχή Καλαμπάκας του Δήμου Μετεώρων (Πίνακας 2). Τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από την περιοχή Καλαμπάκας, προέρχονταν από το ίδιο δέντρο.

Πραγματοποιήθηκαν δύο μέθοδοι απομόνωσης:

Για την πρώτη μέθοδο, τμήματα (0,5 cm) από το εξωκάρπιο των προσβεβλημένων καρπών κόπηκαν με νυστέρι και εμβαπτίστηκαν πρώτα σε 50 mL υποχλωριώδους νατρίου (5%) για 2 λεπτά και στη συνέχεια σε αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό για 1 λεπτό για απομάκρυνσης της περίσσειας του υποχλωριώδους νατρίου. Αφού αφέθηκαν για λίγο σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υλικό NA+A στους 25 °C για 41 ώρες.

Για την δεύτερη μέθοδο, οι καρποί πρώτα απολυμάνθηκαν εξωτερικά με αιθανόλη. Έπειτα κόπηκαν μικρά τμήματά τους (0,5 cm) με νυστέρι, εμβαπτίστηκαν σε 10 mL αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό και αφέθηκαν για μιάμιση ώρα περίπου σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα λήφθηκαν 50 μ L, απλώθηκαν σε τρυβλίο με NA+A και επωάστηκε στους 25 °C για 41 ώρες (Plessis and Westhizen 1995).

Το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας διέθετε απομόνωση (Ch 1) από φύλλο καρυδιάς που έφερε συμπτώματα βακτηριακής κηλίδωσης φύλλων και καρπών καρυδιάς ποικιλίας Chadler από την περιοχή Παλαμά Δομοκού Φθιώτιδας, χρώματος αποικίας υπόλευκου και διαμέτρου 2 mm, η οποία είχε απομονωθεί σύμφωνα με την πρώτη μέθοδο και συμπεριλήφθηκε στα πειράματα.



Εικόνα 1. Συμπτώματα της ασθένειας κηλίδωση φύλλων και καρπών καρυδιάς σε καρπούς, φύλλα και βλαστούς.

Πίνακας 2. Απομονώσεις βακτηρίων με συμπτώματα βακτηριακής κηλίδωσης

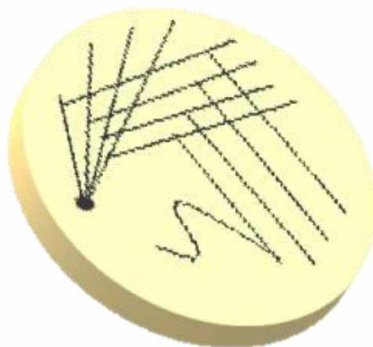
Ημερομηνία Απομόνωσης	Περιοχή Συλλογής	Μέθοδος Απομόνωσης	Τμήμα προσβολής	Βακτηριακά στελέχη	Διάμετρος μεμονωμένης αποικίας (mm)
30/5/17	Κορόπη	2 ^η	Καρπός	1P	1
30/5/17	Κορόπη	2 ^η	Καρπός	2P	1
30/5/17	Κορόπη	2 ^η	Καρπός	3P	1
30/5/17	Κορόπη	2 ^η	Καρπός	4P	1
30/5/17	Κορόπη	1 ^η	Καρπός	M1	2
30/5/17	Κορόπη	1 ^η	Καρπός	M2	2
30/5/17	Κορόπη	1 ^η	Καρπός	M3	2
27/6/17	Καλαμπάκα	1 ^η	Καρπός	K	1
27/6/17	Καλαμπάκα	1 ^η	Καρπός	K1	1
27/6/17	Καλαμπάκα	1 ^η	Φύλλο	2Φ	1
18/5/18	Καλαμπάκα	1 ^η	Βλαστός	3B1	1
18/5/18	Καλαμπάκα	1 ^η	Βλαστός	3B2	1
31/5/18	Λάρισα	2 ^η	Φύλλο	4Φ1	1
31/5/18	Λάρισα	2 ^η	Φύλλο	4Φ2	2
31/5/18	Λάρισα	2 ^η	Φύλλο	4Φ3	2
2/7/18	Καλαμπάκα	2 ^η	Καρπός	5K1	1
2/7/18	Καλαμπάκα	2 ^η	Καρπός	5K2	1
2/7/18	Καλαμπάκα	2 ^η	Βλαστός	5B	1

2.2.1 Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων

Για τη δημιουργία μεμονωμένων αποικιών καθώς και για τη διατήρηση των βακτηρίων, υιοθετήθηκε η μέθοδος της γραμμωτής διασποράς (Σχήμα 1) σε γυάλινα τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα το NA+A. Τα βακτήρια επωάζονταν στους 25° C για 36-48 ώρες και διατηρούνταν στους 4 °C μέχρι και ένα μήνα.

Για τον χαρακτηρισμό των αποικιών, από μεμονωμένη αποικία βακτηρίου (σε υλικό NA+A), μάζα βακτηριακών κυττάρων μεταφέρθηκε σε τρυβλία Petri με υλικό YDC

και έγινε γραμμωτή διασπορά τους με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου. Σε τρυβλία με υλικό YDC, τα βακτήρια επωάστηκαν στον επωαστικό θάλαμο στους 25 °C για 48 ώρες. Οι απομονώσεις 1P, Ch1, M1, M2, K1, 2Φ μελετήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα και έγινε επανάληψη του πειράματος δύο φορές.



Σχήμα 1. Μέθοδος παραλλήλων γραμμών

2.2.2 Χρώση Gram

Για την ταυτοποίησή τους κατά Gram χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες τα είδη *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kustaki strain PB-54* (Bt) και *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (PSS1), απομόνωση Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας. Η χρώση Gram έγινε με χρήση των αντιδραστηρίων του προϊόντος Gram-color stain set (Merck; Catalog No.: 1.11885) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Τα προσηλωμένα δείγματα μετά τη χρώση εξετάστηκαν με τη βοήθεια ελαιοκαταδυτικού φακού σε μεγέθυνση 2000x (σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο Nikon Laborhot-2) και φωτογραφήθηκαν με τη χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής Moticam 10.0 MP.

2.3 Απομονώσεις βακτηρίων PSS από κλάδους ελιάς.

Το εργαστήριο διέθετε δέκα απομονώσεις βακτηρίων *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Πίνακας 3) σε διάλυμα υγρής καλλιέργειας με γλυκερίνης. Για την παρασκευή του, λήφθηκαν 500 μl από την καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα King's B και 500 μl αποστειρωμένης γλυκερόλης τα οποία αναμίχθηκαν σε Eppendorf tube, ακολούθησε ταχεία ψίξη σε υγρό άζωτο και αποθήκευση στους -80°C. Για τη δημιουργία μεμονωμένων αποικιών καθώς και για τη διατήρηση των βακτηρίων, υιοθετήθηκε η μέθοδος γραμμωτής διασποράς (Σχήμα 1) σε γυάλινα τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα King's B (Atlas 2001). Τα βακτήρια

επωάζονταν στους 25° C για 48-72 ώρες και διατηρούνταν στους 4 °C μέχρι και δύο μήνες.

Πίνακας 3. Απομονώσεις Pss Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας και περιοχή προέλευσης

Απομονώσεις βακτηρίου	Περιοχή Συλλογής
Pss1	οικιστικό συγκρότημα Βόλου
Pss2	οικιστικό συγκρότημα Βόλου
Pss3	οικιστικό συγκρότημα Λαμίας
Pss4	οικιστικό συγκρότημα Λαμίας
Pss5	ορεινή περιοχή Βόλου
Pss6	περίχωρα Λαμίας
Pss7	περίχωρα Λαμίας
Pss8	περίχωρα Λαμίας
Pss9	περίχωρα Λαμίας
Pss10	οικιστικό συγκρότημα Βόλου

2.4 Δοκιμές υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού

Κάθε αποικία βακτηρίου τοποθετήθηκε ξεχωριστά σε ένα αποστειρωμένο universal με 10 mL King's B liquid και επώαστηκε για 24 ώρες στον επωαστικό θάλαμο στους 25 °C στα 150 rpm.

Από την υγρή καλλιέργεια λήφθηκε 1 mL αιωρήματος κυττάρων και φυγοκεντρήθηκε στα 5000 x g (rcf) στους 4 °C για 10 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση απορρίφθηκε το υπερκείμενο και στο ίζημα, το οποίο δεν ήταν αρκετά συμπαγές, προστέθηκε 1 mL αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό. Μετά από ελαφριά ανακίνηση, λήφθηκαν 400 μl από κάθε δείγμα και μετρήθηκε η απορρόφηση φωτός στα 660 nm και στα 600 nm.

2.5 Τεχνητή μόλυνση των υγιών φύλλων καπνού με το αιώρημα των βακτηρίων

Για κάθε πείραμα υπερευαισθησίας επιλέγονταν φύλλα μεγάλα, ζωηρά πράσινα, που εκφύονται από τη μέση του στελέχους του φυτού (Tsuchiya and Wakimoto 1983). Με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης σύριγγας του 1 mL (τύπου ινσουλίνης), στην κάτω πλευρά του φύλλου (Εικόνα 2) εγχύθηκαν με 150 μl αιωρήματος βακτηριακών κυττάρων (απομονώσεις Πίνακα 2) (Essakhi et al. 2015). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kustaki strain PB-54* (Bt) και *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss1). Η

τεχνητή μόλυνση έγινε κοντά στα νεύρα του φύλλου και κυρίως στα σημεία που υπήρχαν αρκετές διακλαδώσεις μεταξύ τους. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις από όλες τις απομονώσεις βακτηρίων από καρπούς, φύλλα και βλαστούς καρυδιάς. Στο κάθε φύλλο καπνού που γινόταν τεχνητή μόλυνση, πάντα στη μια πλευρά του φύλλου εγχέονταν μόνο το αιώρημα βακτηριακών κυττάρων και οι αρνητικοί μάρτυρες Pss1 και Bt, ενώ στα σημεία του φύλλου που βρίσκονταν απέναντι από αυτά, εγχέονταν νερό.



Εικόνα 2. Σημεία τεχνητής μόλυνσης του φύλλου καπνού με αιώρημα βακτηριακών κυττάρων.

Παράλληλα με την τεχνητή μόλυνση σε φύλλα καπνού, λήφθηκαν 50 μl από το αιώρημα των βακτηριακών κυττάρων και μετά από διαδοχικές αραιώσεις έγινε διασπορά τους σε τρυβλία Petri, με τη βοήθεια διανομέα, που περιείχαν θρεπτικό υλικό NA+A για αξιολόγηση της βιωσιμότητάς τους αλλά και για τη ακριβή μέτρηση της συγκέντρωσης των κυττάρων η οποία κυμάνθηκε σε όλες τις περιπτώσεις από 10^8 έως 10^{10} κύτταρα/mL (Tsuchiya and Wakimoto 1983, Klement 1964). Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές για την καθεμιά απομόνωση.

Τα φυτά καπνού του πειράματος, γαλλικής ποικιλίας W50 (τύπου Virginia), μεσαίου ύψους, με μεγάλα πράσινα φύλλα, δέχονταν επιπλέον φως με λάμπες Osram L 18W/77 Fluora, για 14 ώρες καθημερινά (Goodman and Plurad 1971).

2.6 Απομόνωση και καθαρισμός βακτηριακού DNA

Για τις απομονώσεις και τον καθαρισμό βακτηριακού DNA από κύτταρα *P. savastanoi* pv. *savastanoi* και από βακτηριακά κύτταρα απομονώσεων που προέρχονταν από καρυδιά, αξιολογήθηκαν τέσσερις μέθοδοι καθαρισμού DNA, οι δύο από αυτές υπήρξαν κοινές για κάποιες απομονώσεις.

2.6.1 1^ο Πρωτόκολλο απομόνωσης βακτηριακού DNA που εφαρμόστηκε σε όλες τις απομονώσεις βακτηρίων καρυδιάς και στην απομόνωση Pss1

Αρχικά σε 10 mL King's B liquid, τοποθετήθηκε μια μεμονωμένη αποικία βακτηρίου και επώαστηκε για 24 ώρες στους 25 °C στα 150 rpm. Έπειτα λήφθηκαν 1,5 mL από το αιώρημα και φυγοκεντρήθηκαν στα 13000 x g στους 4 °C για 5 λεπτά. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου υγρού, στο ίζημα προστέθηκαν 400 μL ρυθμιστικού διαλύματος Λύσης 1 (0,4 NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,2 mM EDTA pH8.0). Στη συνέχεια, το αιώρημα αναδεύτηκε για 10-15 sec και προστέθηκαν 80 μL 20% SDS και 9,6 μL 20 mg/mL πρωτεϊνάσης K (400 μg/mL στο τελικό). Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν στους 60 °C για 1 ώρα. Ακολούθησε προσθήκη 300 μL 5M NaCl, ανάδευση για 30 sec και φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στα 10000 x g στους 4 °C, ενώ από το υπερκείμενο διάλυμα λήφθηκαν 730 μL και σε αυτά προστέθηκαν 730 μL ισοπροπανόλης και τα δείγματα ψύχθηκαν στους -20 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρωση των δειγμάτων στα 10000 x g στους 4 °C για 20 λεπτά, απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και προσθήκη 500 μL αιθυλικής αλκοόλης (70%) και ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρωση στα 13000 x g στους 4 °C για 5 λεπτά. Τέλος το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μL νερού -DEPC treated water Sigma Aldrich- (όσον αφορά τις απομονώσεις από καρυδιά) ή σε 20 μL νερού (DEPC) όσον αφορά την απομόνωση Pss. Η ποσότητα και η καθαρότητα του DNA εκτιμήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω (παράγραφος 2.6.5). Τα δείγματα μέχρι περαιτέρω χρήσης αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20 °C (Aljanabi and Martinez 1997).

2.6.2 2^ο Πρωτόκολλο απομόνωσης βακτηριακού DNA των απομονώσεων από καρυδιά (απομονώσεις K,K1,5K1) και της απομόνωσης από ελιάς (Pss1)

Σε 10 mL King's B liquid, τοποθετήθηκε μια μεμονωμένη αποικία βακτηρίου και επώαστηκε για 48 ώρες στους 25 °C στα 150 rpm. Έπειτα λήφθηκαν 1,5 mL από το αιώρημα και φυγοκεντρήθηκαν στα 13000 x g στους 4 °C για 5 λεπτά. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου υγρού, στο ίζημα προστέθηκαν 60 μL διαλύματος

πρωτεϊνάσης K (50 µg/mL 10 mM Tris. HCl pH 7.5, 1 mM EDTA). Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάστηκαν στους 56 °C για 15 λεπτά και στους 95 °C για άλλα 15 λεπτά. Τα δείγματα μέχρι περαιτέρω χρήσης αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20 °C (Maes 1993).

2.6.3 3^ο Πρωτόκολλο απομόνωσης βακτηριακού DNA των απομονώσεων από καρδιά (1P, K, 3B1, 5K1, 5B)

Σε 5 mL King's B liquid, τοποθετήθηκε μια μεμονωμένη αποικία βακτηρίου και επωάστηκε για 48 ώρες στους 25 °C στα 150 rpm. Λήφθηκαν 1,5 mL από το αιώρημα και φυγοκεντρήθηκαν στα 13000 x g για 5 λεπτά. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου υγρού, στο ίζημα προστέθηκαν 200 µL Tris 0,1 M και 200 µL (NaOH 0,2 N + 1% SDS), ακολουθήθηκε ήπια ανάδευση και προσθήκη 350 µL φαινόλης και 350 µL χλωροφορμίου και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 13000 x g για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, στο υπερκείμενο προστέθηκαν 700 µL αιθυλικής αλκοόλης (95%) και φυγοκεντρήθηκαν στα 13000 rpm για 10 λεπτά. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου υγρού, στο ίζημα προστέθηκαν 1-1,5 mL αιθυλικής αλκοόλης (70%) και φυγοκεντρήθηκαν στα 13000 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα και έπειτα επαναιωρήθηκε σε 100 µL νερού (DEPC treated) (Gomes et al. 2000). Η ποσότητα και η καθαρότητα του DNA εκτιμήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω (παράγραφος 2.6.5). Τα δείγματα μέχρι περαιτέρω χρήσης αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20 °C.

2.6.4 4^ο Πρωτόκολλο απομόνωσης βακτηριακών DNA που προέρχονταν από όλες τις απομονώσεις βακτηρίων ελιάς

Αρχικά σε 10 mL King's B liquid, τοποθετήθηκε μια μεμονωμένη αποικία βακτηρίου και επωάστηκε για 24 ώρες στους 25 °C στα 150 rpm. Έπειτα λήφθηκαν 1,5 mL από το αιώρημα και φυγοκεντρήθηκαν στα 17000 x g στους 4 °C για 5 λεπτά. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου υγρού, στο ίζημα προστέθηκαν 500 µL ρυθμιστικού διαλύματος (200 mM Tris HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, και 2% PVP). Στη συνέχεια, το αιώρημα αναδεύτηκε για 1 ώρα στους 25 °C στα 150 rpm και φυγοκεντρήθηκε στα 5000 x g για 5 λεπτά. Στο υπερκείμενο διάλυμα (730 µL) προστέθηκαν 730 µL ισοπροπανόλης και τα δείγματα παρέμειναν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 13000 x g στους 4 °C για 10 λεπτά. Τέλος το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 µL νερού

(DEPC). Η ποσότητα και η καθαρότητα του DNA εκτιμήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω (παράγραφος 2.6.5). Τα δείγματα μέχρι περαιτέρω χρήσης αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20 °C (Llop et al. 1999).

2.6.5 Καθαρισμός βακτηριακού DNA

Με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA, οι μετρήσεις λαμβάνονταν στο φασματοφωτόμετρο στα μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Η αναλογία απορρόφησης στα 260 nm και 280 nm (OD₂₆₀ / OD₂₈₀) χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η καθαρότητα των νουκλεϊνικών οξέων.

2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την ταυτοποίηση του γένους ως *Xanthomonas* των βακτηριακών απομονώσεων που εμφάνιζαν συμπτώματα κηλίδωσης φύλλων και καρπών καρυδιάς, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές XajM-F 5'-AAGGATCGGGTATTAAC-3'(forward primer) και XajM-R 5'-AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3'(reverse) με αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 2 min, ακολοθούμενη από 29 κύκλους 95 °C για 45 sec, 37 °C για 1 min ,72 °C για 2 min και 72 °C για 10 min (Maes 1993) ενώ για την ταυτοποίηση του είδους ως Xaj χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Xaj6F 5'-AAGTCAGATGCGAAGCGAAAGG-3' και Xaj6R 5'-GCACAGCGGGAAGTAATAGCAAAC-3' με αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 5 min, ακολοθούμενη από 35 κύκλους 95 °C για 30 sec, 61 °C για 30 sec ,72 °C για 30 sec και 72 °C για 10 min (Fernades 2017). Για τον προσδιορισμό των απομονώσεων από τα δέντρα της ελιάς ως παθογόνου βακτηρίου Pss που προκαλεί την ασθένεια καρκίνωση της ελιάς, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές IAALF 5'-GGCACCAGCGGCAACATCAA-3', IAALR 5'-CGCCCTCGGAACTGCCATAC-3' με αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 5 min, ακολοθούμενη από 25 κύκλους 94 °C για 30 sec, 62 °C για 30 sec και 72 °C για 30 sec. (Bertolini et al. 2003). Κάθε μία PCR επαναλαμβάνονταν από δύο φορές για όλες τις απομονώσεις.

Για την PCR χρησιμοποιούνταν 12,5 μL Top Taq της Qiagen, 1 μL από κάθε εκκινητή, 9,5 μL υπερκάθαρο νερό και 1 μL από το DNA που απομονώθηκε από το καθένα βακτήριο. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιούνταν το νερό. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους - 20 °C.

2.7.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας των βακτηριακών απομονώσεων ελιάς.

Για την διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας των διαφορετικών απομονώσεων του βακτηρίου PSS, λαμβάνονταν 12,5 μL Top Taq της Qiagen, 0,5 μL από κάθε εκκινητή (ERIC1R - ERIC2 και BOX1R) και 1 μL από το dna που απομονώθηκε από το καθένα βακτήριο. Για την PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής Mastercycler personal της Eppendorf, με αρχική αποδιάταξη στους 95 $^{\circ}\text{C}$ για 2 min, ακολοθούμενη από 30 κύκλους στους 94 $^{\circ}\text{C}$ για 3 min, στους 92 $^{\circ}\text{C}$ για 30 sec, στους 52 $^{\circ}\text{C}$ για 1 min και στους 72 για 8 min. Το τελευταίο στάδιο είναι στους 72 $^{\circ}\text{C}$ για 8 min και στους 10 $^{\circ}\text{C}$ για 10 sec (Vicente et al. 2007). Τα δείγματα αποθηκεύονταν στους - 20 $^{\circ}\text{C}$.

2.8 Ηλεκτροφόρηση

Μετά από τον καθαρισμό του βακτηριακού DNA, η ποιότητα του νουκλεϊκού οξέος αξιολογούνταν μετά από οριζόντια ηλεκτροφόρηση όπως και τα προϊόντα των αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης διαχωρίζονταν με οριζόντια ηλεκτροφόρηση (mini horizontal electrophoresis unit, Sigma- Aldrich), [5 μL από το από το DNA ή τα προϊόντα της PCR και 3 μL ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (loading buffer 40% γλυκερίνη σε 1x TE, pH 8.0 bromophenol blue και xylene cyanol)]. Σε κάθε ηλεκτροφόρηση έτρεχε και ένα δείγμα-πρότυπο με γνωστά μεγέθη ζωνών. Στη συνέχεια γινόταν διαχωρισμός των τμημάτων DNA μετά από εφαρμογή διαφοράς δυναμικού 120 V στα άκρα της πηκτής για 30 λεπτά. Ύστερα, γινόταν επώαση της πηκτής σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (12 μL) και TBE 1x (100 mL) για μισή ώρα. Τέλος τα τμήματα DNA ήταν ορατά μετά από τοποθέτηση της πηκτής σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

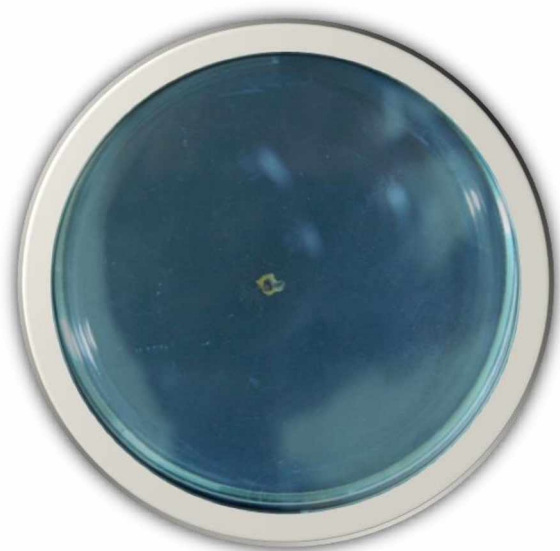
Για το διαχωρισμό των προϊόντων των αντιδράσεων της PCR με εκκινητές BOX-ERIC, εφαρμόστηκε κάθετη ηλεκτροφόρηση (Vertical electrophoresis unit, Sigma- Aldrich) σε πηκτή ακρυλαμίδης 30% (ακρυλαμίδα: bis ακρυλαμίδα 29:1) (10 μL από το προϊόν της PCR αναμιγνύονταν με 3 μL ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης. Στη συνέχεια γινόταν διαχωρισμός των τμημάτων DNA μετά από εφαρμογή διαφοράς δυναμικού 30 V στα άκρα της πηκτής για 15 λεπτά και 60V για 3 ώρες. Ύστερα, γινόταν επώαση της πηκτής σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (60 μL) και TBE 1x

(500 mL) για μία ώρα. Τέλος τα τμήματα DNA ήταν ορατά μετά από τοποθέτηση της πηκτής σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας .

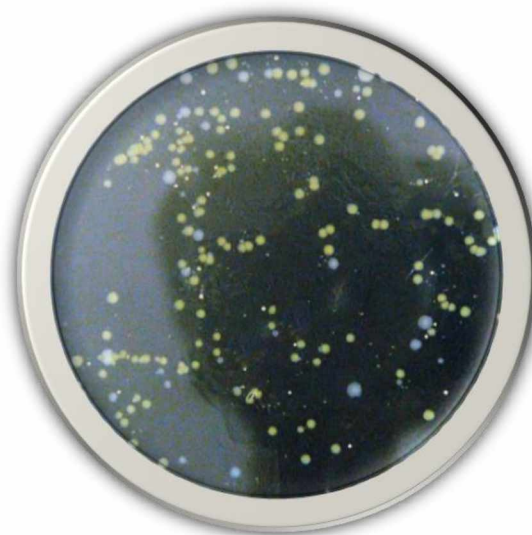
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μέθοδοι απομόνωσης βακτηρίων προσβεβλημένων δέντρων καρυδιάς

Και οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τις απομονώσεις των βακτηρίων έδιναν εξίσου καλά αποτελέσματα. Ύστερα από την επώαση των απομονώσεων σε τρυβλία με NA+A στους 25 °C για 41 ώρες, αναπτύσσονταν αποικίες βακτηρίων κίτρινου ή λευκού χρώματος γύρω από τους ιστούς των φυτών ή διάσπαρτα στο τρυβλίο, ανάλογα με τη μέθοδο απομόνωσης (Εικόνες 3 και 4).



Εικόνα 3. Ανάπτυξη κίτρινης αποικίας γύρω από κομμάτι ιστού σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα NA+A, σύμφωνα με την πρώτη μέθοδο απομόνωσης, που εμφάνιζε τα τυπικά συμπτώματα της κηλίδωσης καρπών και φύλλων καρυδιάς.



Εικόνα 4. Ανάπτυξη κίτρινων και λευκών αποικιών σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα NA+A, σύμφωνα με την δεύτερη μέθοδο απομόνωσης, που εμφάνιζε τα τυπικά συμπτώματα της κηλίδωσης καρπών και φύλλων καρυδιάς.

3.2 Χαρακτηριστικά αποικιών

Οι αποικίες των βακτηρίων της καρυδιάς που έφεραν κίτρινο χρώμα στο θρεπτικό υπόστρωμα NA, διατήρησαν το χρώμα τους και στο YDC (Εικόνες 5 και 6) (Πίνακας 4). Η όψη τους ήταν έντονο κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα με βλενώδη ανάπτυξη. Οι αποικίες των βακτηρίων που έφεραν λευκό χρώμα, αναγνωρίζονταν με δυσκολία στο συγκεκριμένο υπόστρωμα, λόγω του χρώματός τους (Εικόνες 7 και 8).

Πίνακας 4. Χρώμα αποικιών στα θρεπτικά υποστρώματα NA+A και YDC. Για τις απομονώσεις 2P,3P,4PM3,K,3B1,3B2,4Φ1,4Φ2,4Φ3,5K1,5K2,5B δεν πραγματοποιήθηκε γραμμωτή διασπορά τους σε τρυβλία με YDC.

Βακτήρια	NA+A Χρώμα αποικίας	YDC Χρώμα αποικίας
Ch1	Λευκό	Λευκό
1P	Κίτρινο	Κίτρινο
2P	Κίτρινο	-
3P	Κίτρινο	-
4P	Κίτρινο	-
M1	Λευκό	Λευκό
M2	Λευκό	Λευκό
M3	Λευκό	-
K	Κίτρινο	-
K1	Κίτρινο	Κίτρινο
2Φ	Κίτρινο	Κίτρινο
3B1	Κίτρινο	-
3B2	Κίτρινο	-
4Φ1	Κίτρινο	-
4Φ2	Λευκό	-
4Φ3	Λευκό	-
5K1	Κίτρινο	-
5K2	Κίτρινο	-
5B	Κίτρινο	-



Εικόνα 4. Κίτρινες αποικίες των βακτηριακών απομονώσεων από καρδιά στο θρεπτικό υπόστρωμα NA+A.



Εικόνα 5. Κίτρινες αποικίες των βακτηριακών απομονώσεων από καρδιά στο θρεπτικό υπόστρωμα YDC



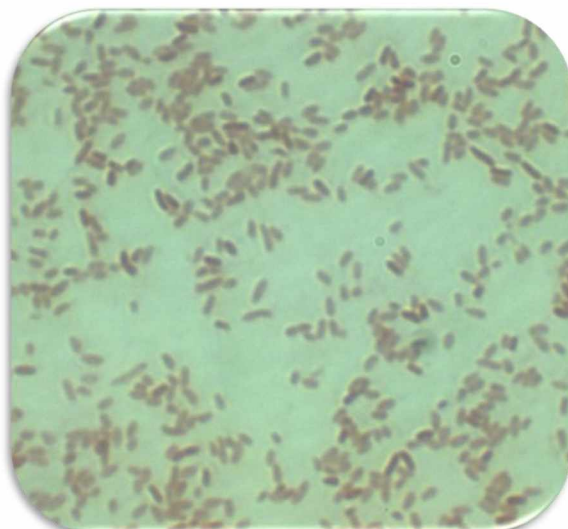
Εικόνα 7 Λευκές αποικίες των βακτηριακών απομονώσεων από καρδιά στο θρεπτικό υπόστρωμα NA+A



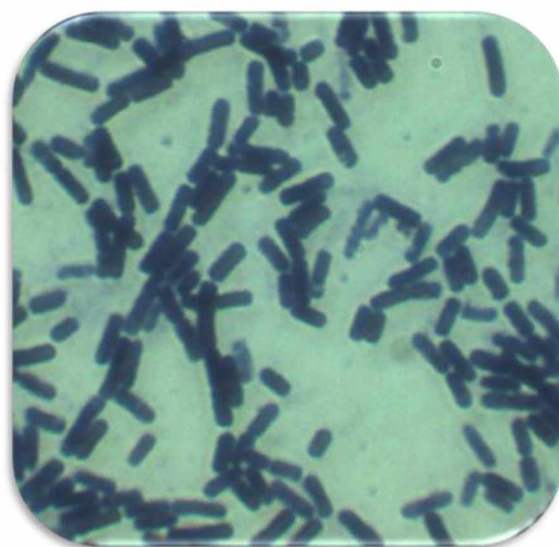
Εικόνα 6. Λευκές αποικίες των βακτηριακών απομονώσεων από καρδιά στο θρεπτικό υπόστρωμα YDC

3.3 Χρώση κατά Gram

Όλες οι απομονώσεις των βακτηρίων από τα δέντρα της καρυδιάς και της ελιάς, ταυτοποιήθηκαν ως Gram⁻ (Εικόνα 9) ενώ ο Bt ως Gram⁺ (Εικόνα 10).



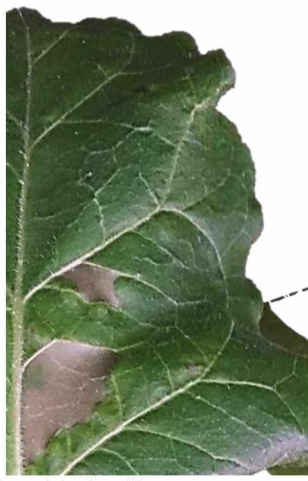
Εικόνα 9. Gram αρνητικά κύτταρα των βακτηρίων της καρυδιάς



Εικόνα 10. Gram θετικά κύτταρα του μάρτυρα Bt

3.4 Αντίδραση υπερευαισθησίας

Η τεχνητή μόλυνση των φύλλων καπνού με 10^8 κύτταρα/mL της απομόνωσης βακτηρίου Pss1, είχε σαν αποτέλεσμα σε κάθε επανάληψη, τη νέκρωση των ιστών των φύλλων στα σημεία εισόδου του παθογόνου στο φυτό ύστερα από 24 ώρες η οποία γινόταν πιο έντονη μετά από 72 ώρες (Εικόνες 11 και 12).

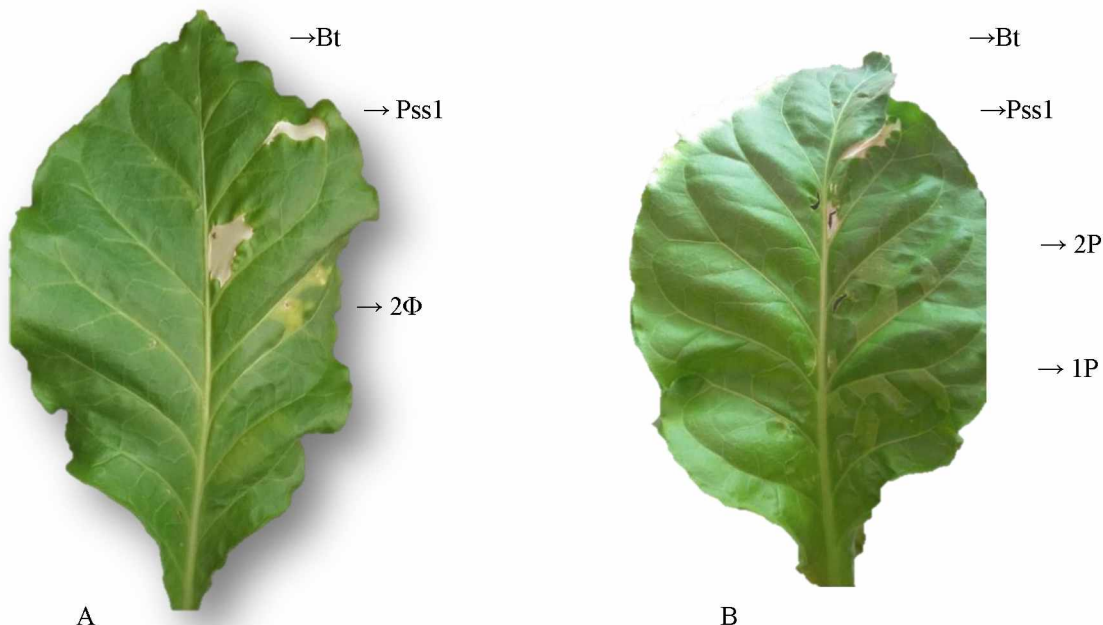


Εικόνα 11. Αντίδραση υπερευαισθησίας από τεχνητή μόλυνση φύλλου καπνού τύπου Virginia με την απομόνωση Pss1 (*P. savastanoi* pv.*savastanoi*), μετά από 24 ώρες.



Εικόνα 12. Αντίδραση υπερευαισθησίας από τεχνητή μόλυνση φύλλου καπνού τύπου Virginia με την απομόνωση Pss1 (*P. savastanoi* pv.*savastanoi*), μετά από 72 ώρες.

Η τεχνητή μόλυνση των φύλλων καπνού με κύτταρα από απομονώσεις βακτηρίων από δένδρα καρυδιάς είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση χλώρωσης στα σημεία εισόδου των βακτηρίων στα φύλλα ύστερα από πέντε μέρες (Εικόνα 13 και Πίνακας 5). Η χλώρωση αυτή ήταν σταθερή και δεν εξαφανίζονταν ποτέ από τα φύλλα, σύμφωνα με παρατηρήσεις που λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα. Αντίθετα παρατηρήθηκε ότι και μετά το πέρας 20 ημερών, η χλώρωση γινόταν πιο έντονη. Αμέσως μετά την τεχνητή μόλυνσή με νερό και Bt, υπήρξε μια μικρή διαφοροποίηση των σημείων εμβολιασμού από το υπόλοιπο φύλλο, η οποία δεν ήταν ορατή μετά από μισή ώρα (Εικόνα 14).



Εικόνα 13: Αποτελέσματα μετά από τεχνητές μολύνσεις φύλλου καπνού τύπου Virginia με τις απομονώσεις Pss1 (απομόνωση ελιάς), 2Φ (απομόνωση βακτηρίου από φύλλο καρυδιάς), Bt. Παρατηρείται νέκρωση στο σημείο όπου έγινε έγχυση κυττάρων Pss1, εμφάνιση έντονης χλώρωσης στα 1P και 2P, καμία αντίδραση στο Bt .



Εικόνα 14: Τεχνητή μόλυνση κάτω πλευράς φύλλου καπνού με νερό.

Πίνακας 5. Αντίδραση των φύλλων καπνού στις τεχνητές μολύνσεις με τις απομονώσεις βακτηρίων από φύλλα καρδιάς και τους μάρτυρες Pss1 και Bt.

Βακτηριακά στελέχη	Χλώρωση των ιστών του φύλλου ύστερα από τεχνητές μολύνσεις
1P	Έντονη χλώρωση
2P	Έντονη χλώρωση
3P	Χλώρωση
4P	Χλώρωση
M1	Έντονη χλώρωση
M2	Ασθενής χλώρωση
M3	Ασθενής χλώρωση
K	Έντονη χλώρωση
K1	Έντονη χλώρωση
2Φ	Έντονη χλώρωση
3B1	Έντονη χλώρωση
3B2	Έντονη χλώρωση
4Φ1	Ασθενής χλώρωση
4Φ2	Έντονη χλώρωση
4Φ3	Ασθενής χλώρωση
5K1	Έντονη χλώρωση
5K2	Έντονη χλώρωση
5B	Έντονη χλώρωση
Ch1	Ασθενής χλώρωση
Pss1	Αντίδραση υπερευαισθησίας
Bt	Καμία αλλοίωση στους ιστούς των φύλλων

3.5 Σύγκριση μεθόδων καθαρισμού DNA βακτηριακών κυττάρων

Τρεις μέθοδοι καθαρισμού βακτηριακού DNA μελετήθηκαν για τα βακτήρια που απομονώθηκαν από καρυδιά (Εικόνες 13 και 14). Και στις δύο μεθόδους καθαρισμού DNA (1ο Πρωτόκολλο καθαρισμού DNA και 3^ο Πρωτόκολλο), οι τιμές του φασματοφωτόμετρου στα μήκη κύματος 260 nm και 280 nm (Πίνακας 6) ήταν κατά μέσο όρο 1,78 και 1,89 και βρίσκονται εντός των επιτρεπόμενων ορίων, συνεπώς το DNA που απομονώθηκε είναι καθαρό.

Πίνακας 6. Σύγκριση τιμών οπτικής πυκνότητας των δύο μεθόδων καθαρισμού DNA

OD Απομονώσεις	1 ^ο Πρωτόκολλο καθαρισμού DNA			3 ^ο Πρωτόκολλο καθαρισμού DNA		
	OD260 nm	OD280 nm	OD260/OD280	OD260 nm	OD280 nm	OD260/OD280
1P	0,8546	0,4568	1,87	0,7695	0,3593	2,14
2P	0,7525	0,3933	1,91	-	-	-
3P	0,3664	0,1924	1,90	-	-	-
4P	1,7143	0,9993	1,72	-	-	-
M1	0,7535	0,4030	1,87	-	-	-
M2	0,1148	0,0634	1,81	-	-	-
M3	0,0986	0,0535	1,84	-	-	-
K	0,1914	0,0955	2,00	0,1831	0,0879	2,08
K1	0,3273	0,1677	1,95	-	-	-
2Φ	3,4590	1,7714	1,95	-	-	-
3B1	1,4774	0,9048	1,63	0,6032	0,3475	1,74
3B2	0,4250	0,2087	2,04	-	-	-
4Φ1	0,0422	0,0247	1,71	-	-	-
4Φ2	0,0003	0,0008	0,38	-	-	-
4Φ3	0,0202	0,0159	1,27	-	-	-
5K1	0,3328	0,1667	2,00	1,5547	0,9430	1,65
5K2	1,1264	0,5996	1,88	-	-	-
5B	1,8365	1,1378	1,61	0,3411	0,1846	1,85
Ch1	0,4314	0,2184	1,98	-	-	-
Pss1	0,4260	0,2098	2,3	-	-	-

Τα ίδια αποτελέσματα καθαρότητας DNA δίνουν και οι βακτηριακές απομονώσεις που προκαλούν την ασθένεια καρκίνωση της ελιάς με μέση τιμή καθαρότητας DNA 1,41 (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Τιμές οπτικής πυκνότητας μετά από καθαρισμό DNA βακτηριακών απομονώσεων ελιάς

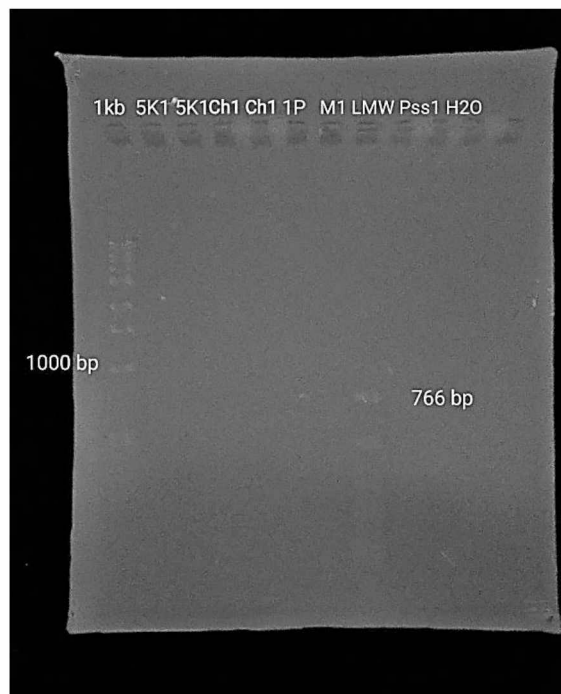
4^ο Πρωτόκολλο καθαρισμού DNA			
OD Απομονώσεις	OD₂₆₀ nm	OD₂₈₀ nm	OD₂₆₀ / OD₂₈₀
Pss1	0,9605	0,6532	1,47
Pss2	0,3873	0,2986	1,30
Pss3	0,4147	0,3263	1,27
Pss4	0,4825	0,3739	1,29
Pss5	1,6473	1,0384	1,58
Pss6	0,3824	0,2942	1,30
Pss7	2,8065	1,7168	1,63
Pss8	0,5554	0,3939	1,41
Pss9	0,5393	0,3823	1,41
Pss10	0,4924	0,3380	1,46

3.6 Διαγνωστική PCR για την ταυτοποίηση του γένους και του είδους των βακτηρίων καρυδιάς

Τα αναμενόμενα αποτελέσματα ήταν η ύπαρξη ζώνης στο πήκτωμα αγαρόζης στα 480 bp (Maes 1993) (Εικόνα 15) για να ανήκουν τα βακτήρια στο γένος *Xanthomonas*. Αντίθετα οι απομονώσεις ξεπερνούσαν κατά πολύ το προσδοκώμενο αποτέλεσμα, εμφανίζοντας ζώνες από 500bp μέχρι 2000bp. (Εικόνα 16). Η PCR με χρήση των εκκινήτων που περιγράφονται στους Fernandes et al. (2017) δεν έδωσε κανένα αποτέλεσμα, ανεξαρτήτως της μεθόδου απομόνωσης DNA (αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος 436 bp). Και στις δύο επαναλήψεις των πειραμάτων τα αποτελέσματα ήταν σταθερά.



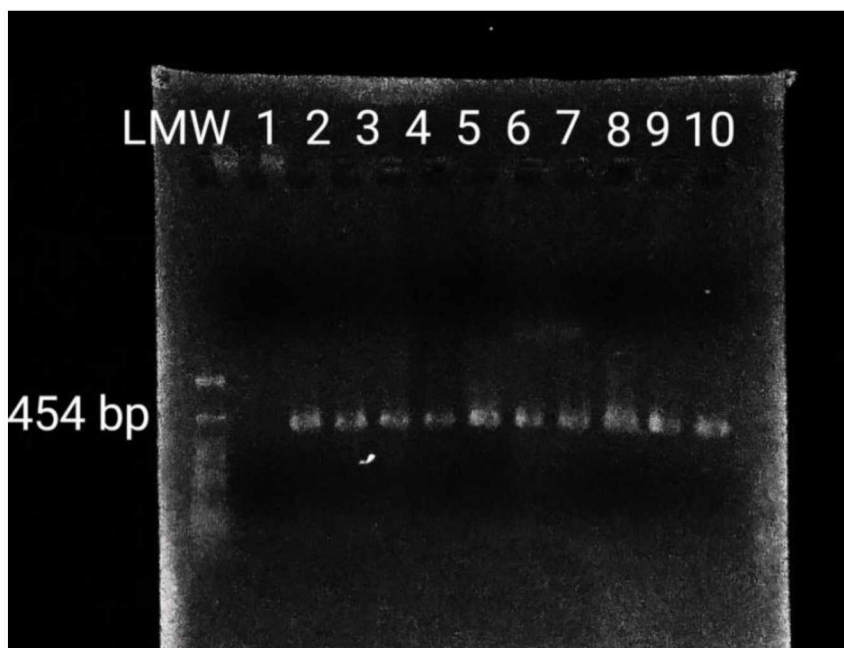
Εικόνα 15. Διαγνωστική PCR για το γένος *Xanthomonas* σε πηκτή αραρόζης 1,5%, με εκκινητές XajM-F και XajM-R. Όπου 1kb: 1kb ladder, 1P, 2P,4P, Ch1,M1,M2,M3 2Φ,3B1:απομονώσεις από τμήματα καρδιάς, LMV: LMV ladder.



Εικόνα 16. Διαγνωστική PCR για το είδος *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* σε πηκτή αραρόζης 1,5%, με εκκινητές Xaj6F και Xaj6R. Όπου 1kb: 1kb ladder, 5K1, Ch1,1P M1:απομονώσεις από τμήματα καρδιάς, Pss1: απομόνωση από ελιά, LMV: LMV ladder.

3.7 Διαγνωστική PCR για το είδος *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Όλα τα βακτήρια ταυτοποιήθηκαν ως PSS εμφανίζοντας στην πηκτική αγαρόζης ζώνη στα 454 bp. (Εικόνα 17).



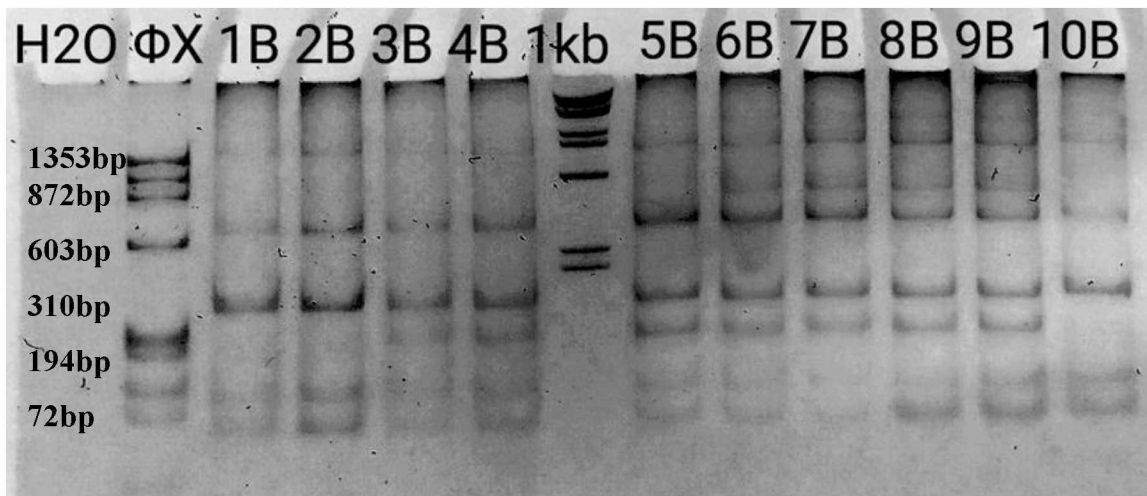
Εικόνα 17: Διαγνωστική PCR για το είδος *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε πηκτική αγαρόζης 1,5%, με εκκινητές IAALF, IAALR. Όπου LMV: LMV ladder, 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10: οι απομονώσεις Pss1, Pss2, Pss3, Pss4, Pss5, Pss6, Pss7, Pss8, Pss9, Pss10.

3.8 Αποτελέσματα γενετικής ποικιλομορφίας βακτηριών με ERIC- BOX- PCR

Τα αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική ακρυλαμίδης με τον εκκινητή BOX1R ταξινομούν τις απομονώσεις από ελιά σε τέσσερις ομάδες (Εικόνα 18). Μία ομάδα αποτελούν τα Pss1, Pss2 και Pss10 που απομονώθηκαν από οικιστικό συγκρότημα του Βόλου και φέρουν ζώνες στα 1353 bp, 650 bp, 194 bp και 72 bp. Δεύτερη ομάδα, τα Pss3, Pss4 που προέρχονται από οικιστικό συγκρότημα της Λαμίας και εμφανίζουν ζώνες στα 650 bp, 406 bp, 194 bp και 72 bp. Το Pss5 που απομονώθηκε από ορεινή περιοχή του Βόλου φέρει ζώνες στα 1353 bp, 650 bp, 406 bp, 194 bp και 72 bp και τέταρτη ομάδα τα Pss6, Pss7, Pss8 και Pss9 που απομονώθηκαν από τα περίχωρα της Λαμίας με ζώνες στα 1353 bp, 872 bp, 650 bp, 406 bp, 194 bp και 72 bp.

Τα αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική ακρυλαμίδης με τους εκκινητές ERIC1R - ERIC2, ταξινομούν τις απομονώσεις από ελιά σε έξι ομάδες (Εικόνα 19). Το Pss1

ομαδοποιείται ξεχωριστά από τα Pss2 και Pss10 (1400 bp, 872-600 bp, 350 bp) που απομονώθηκαν από οικιστικό συγκρότημα του Βόλου καθώς φέρει μία επιπλέον διπλή ζώνη στα 1078 bp. Τα Pss3, Pss4 που προέρχονται από οικιστικό συγκρότημα της Λαμίας αποτελούν την τρίτη ομάδα με ζώνες στα 1400 bp, και 872-600 bp. Το Pss5 που απομονώθηκε από ορεινή περιοχή του Βόλου ταξινομείται ξεχωριστά από τα υπόλοιπα εμφανίζοντας ζώνες στα 1400 bp, 1078 bp, 872-600 bp, 350 bp. Τέλος τα Pss8, Pss9 (1400 bp και 872-600 bp) που απομονώθηκαν από τα περίχωρα της Λαμίας διαφέρουν από τα Pss6 και Pss7 τα οποία εμφανίζουν μία επιπλέον ζώνη στα 1078 bp, παρόλο που προέρχονται από την ίδια γεωγραφική περιοχή.



Εικόνα 18: Αποτελέσματα BOX-PCR για το είδος *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε πηκτή ακρυλαμίδης. Όπου ΦΧ: ΦΧ ladder, 1B,2B,3B,4B,5B,6B,7B,8B,9B,10B: οι απομονώσεις Pss1, Pss2, Pss3, Pss4, Pss5, Pss6, Pss7, Pss8, Pss9, Pss10, αρνητικός μάρτυρας : H₂O



Εικόνα 19. Αποτελέσματα ERIC-PCR για το είδος *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε πηκτή ακρυλαμίδης. Όπου ΦΧ: ΦΧ ladder, 1E,2E,3E,4E,5E,6E,7E,8E,9E,10E: οι απομονώσεις Pss1, Pss2, Pss3, Pss4, Pss5, Pss6, Pss7, Pss8, Pss9, Pss10, αρνητικός μάρτυρας : H₂O

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Απομονώθηκαν τα βακτήρια 1P, 2P, 3P, 4P, M1, M2, M3, K, K1, 2Φ, 3B1, 3B2, 4Φ1, 4Φ2, 4Φ3, 5K1, 5K2, 5B από καρπούς, φύλλα και βλαστούς καρυδιάς που έφεραν συμπτώματα της ασθένειας κηλίδωσης φύλλων και καρπών καρυδιάς και ήταν αρνητικά κατά Gram. Από αυτά, οι αποικίες 1P, 2P, 3P, 4P, K, K1, 2Φ, 3B1, 3B2, 4Φ1, 5K1, 5K2, 5B μοιάζουν με τις αποικίες του βακτηρίου Xaj (Plessis and Westhizen 1994, Agrios 1997, Sharma 1999, Schaad et al. 2001, Atlas 2010), καθώς έφεραν κίτρινη απόχρωση και γυαλιστερή εμφάνιση στο θρεπτικό υπόστρωμα NA+A και στο εκλεκτικό μέσο YDC, αναπτύσσονταν σε θερμοκρασία 25°C και είχαν διάμετρο 1 mm. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά στελέχη και παθότυποι που δεν παράγουν κίτρινη χρωστική και φαίνονται λευκά (Midha and Patil 2014) όπως θα μπορούσαν να είναι οι αποικίες των βακτηρίων M1, M2, M3, 4Φ2, 4Φ3, Ch1 που απομονώθηκαν από καρπούς και φύλλα καρυδιάς που έφεραν συμπτώματα της ασθένειας κηλίδωσης φύλλων και καρπών καρυδιάς.

Ακόμα, κατά την διάρκεια παρασκευής του θρεπτικού υποστρώματος YDC, υπήρξαν προβλήματα με CaCO₃ γιατί στερεοποιείται γρήγορα και δεν αναμιγνύεται εύκολα με τα υπόλοιπα υλικά, με αποτέλεσμα να απαιτεί συνεχή ανάδευση του υλικού με ταυτόχρονη τοποθέτηση στα τρυβλία Petri. Αυτή η πρακτική δεν εγγυάται πάντα την ομοιόμορφη ανάμιξη των υλικών της γλυκόζης και του CaCO₃. Όσο περισσότερη η συγκέντρωση της γλυκόζης τόσο μεγαλύτερη η παραγωγή κόμμι ξανθάνης από τα βακτήρια του γένους *Xanthomonas* και τόσο καλύτερη απεικόνιση του χρώματός τους λόγω του CaCO₃.

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν από καρυδιά, σε αντίθεση με την απομόνωση βακτηρίου Pss1 από ελιά, δεν προκάλεσαν νέκρωση των ιστών των φύλλων καπνού στα σημεία όπου έγιναν οι τεχνητές μολύνσεις. Μη φυτοπαθογόνα βακτήρια που είχαν απομονωθεί από δέντρα καρυδιάς και χαρακτηρίστηκαν ως *Xanthomonas arboricola*, έδωσαν αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού, ενώ φυτοπαθογόνα βακτήρια που είχαν απομονωθεί από δέντρα καρυδιάς και χαρακτηρίστηκαν επίσης ως *Xanthomonas arboricola* δεν έδωσαν αντίδραση υπερευαισθησίας παρά μόνο μια ασθενή χλώρωση. Η διαφορά αυτή οφείλεται στο γονιδίο T3E το οποίο φαίνεται να

είναι υπεύθυνο για την δημιουργία παθογένειας στο *X.arboricola* (Essakhi et al. 2015).

Η αντίδραση υπερευαισθησίας επηρεάζεται από τον αριθμό των βακτηριακών κυττάρων που εγχέονται. Δοκιμές με σαπρόφυτα του γένους *Pseudomonas*, όπου ο αριθμός των εμβολιαζόμενων βακτηριακών κυττάρων ήταν μικρότερος από 10⁶ κύτταρα/mL, δεν παρατηρούνταν καμία αλλοίωση στο φύλλο του καπνού. Όταν όμως ξεπερνούσαν τα 10⁹ κύτταρα/mL, τότε εμφανίζονταν χλώρωση μετά από 3-4 μέρες (Klement et al. 1964).

Επίσης δεν είναι σαφές από τους επιστήμονες -Klement et al. 1964, Τζάμος 2007, Essakhi et al. 2015- το τι ακριβώς θεωρείται ως αντίδραση υπερευαισθησίας (χλώρωση ή ολική νέκρωση των ιστών του καπνού) καθώς οι φωτογραφίες που παραθέτουν ως αποδεικτικά στοιχεία δείχνουν χλώρωση σε κάποιες περιπτώσεις και όχι νέκρωση του ιστού.

Θα μπορούσε ίσως να γίνει εμβολιασμός μικρών άγουρων καρυδιών με τα συγκεκριμένα στελέχη των βακτηρίων της καρυδιάς για την εξακρίβωση ή μη της δημιουργίας συμπτωμάτων παρόμοιων με τα συμπτώματα που προκύπτουν ύστερα από μόλυνση του δέντρου με το βακτήριο *Xaj* (Plessis and Westhuizen 1995, Vagelas et al. 2012). Έχει βρεθεί πως από δέντρο καρυδιάς μπορεί να απομονωθεί το βακτήριο *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* το οποίο όμως δεν προκαλεί συμπτώματα στην καρυδιά (Plessis and Westhuizen 1995).

Τα διαφορετικά πρωτόκολλα που δοκιμάστηκαν για την απομόνωση DNA από τα βακτήρια της καρυδιάς, έγιναν με σκοπό την διερεύνηση πιθανής διαφοροποίησης των αποτελεσμάτων η οποία και δεν υπήρξε.

Για να ταυτοποιηθούν οι απομονώσεις βακτηρίων της καρυδιάς ως *Xaj*, θα έπρεπε να εμφανίζεται ζώνη στο πήκτωμα αγαρόζης στα 436 bp (Fernades 2017). Κάτι τέτοιο δεν συνέβη, καθώς οι εκκινητές δεν βρήκαν τις αντίστοιχες θέσεις πρόσδεσης και έναρξης με σκοπό την αντιγραφή του γονιδιώματος. Το αποτέλεσμα ήταν η μη εμφάνιση ζωνών στο πήκτωμα αγαρόζης.

Στα διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss1-10) υπήρξε γενετική ποικιλομορφία των βακτηρίων που απομονώθηκαν από διαφορετικές και ίδιες περιοχές . Τα βακτηριακά στελέχη του βακτηρίου Pss δεν

εμφανίζουν μεγάλη γενετική ποικιλομορφία ακόμα και σε σύγκριση απομονώσεων από διαφορετικές χώρες της Μεσογείου (Moretti et al. 2016). Αν είχε μελετηθεί η γενετική ποικιλομορφία μόνο με την χρήση του BOX εκκινητή δεν θα ήτανε τόσο σαφή η διάκριση της γενετικής ποικιλομορφίας των βακτηρίων. Η χρήση και των ERIC εκκινητών, βοήθησε στην περαιτέρω ανάλυση της ποικιλομορφίας των διαφορετικών στελεχών.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα και των δύο εκκινητών, διαπιστώνεται πως στα βακτήρια που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές υπάρχει γενετική ποικιλομορφία που τα διακρίνει από τα υπόλοιπα. Οι βακτηριακές απομονώσεις που προέρχονται από τις ίδιες γεωγραφικές περιοχές, δεν διαφέρουν παρά ελάχιστα μεταξύ τους.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Οι αποικίες των βακτηρίων 1P, 2P, 3P, 4P, K, K1, 2Φ, 3B1, 3B2, 4Φ1, 5K1, 5K2, 5B που απομονώθηκαν από καρπούς, φύλλα και βλαστούς καρυδιάς και έφεραν συμπτώματα της ασθένειας κηλίδωσης φύλλων και καρπών καρυδιάς μοιάζουν με τις αποικίες του βακτηρίου *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*.
- Δεν υπάρχουν ασφαλή αποτελέσματα για την φυτοπαθογόνο ή μη δράση των βακτηρίων που απομονώθηκαν στην καρυδιά σε αντίθεση με τα φυτοπαθογόνα βακτήρια Pss και συγκεκριμένα της απομόνωσης Pss1 η οποία προκάλεσε αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλο καπνού τύπου Virginia.
- Τα διαφορετικά πρωτόκολλα που δοκιμάστηκαν για την απομόνωση DNA από τα βακτήρια της καρυδιάς και ελιάς έδωσαν καθαρότητα DNA εντός των επιτρεπόμενων ορίων.
- Υπήρξε γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss1-10) που απομονώθηκαν από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agrios G.N., 1997. Plant Pathology. Fourth Edition. Academic Press. London.
- Atlas R.N., 2010. Handbook of Microbiological Media Fourth Edition. CRC Press.
- Bertolini E., Penyalver R., Garcí'a A., Olmos A., Quesada J.M., Cambra M., and Lopez 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.
- Cappuccino J.G., and Sherman N., 2002. *Microbiology: A Laboratory Manual*. 7th Edition, Pearson Education Inc., San Francisco.
- Essakhi S., Cesbron S., Ficher- Le Saux M., Bonneau S., Jacques M., Manceau C., 2015. Phylogenetic and Variable-Number Tandem-Repeat Analyses Identify Nonpathogenic *Xanthomonas arboricola* Lineages Lacking the Canonical Type III Secretion System, *American society for microbiology*.
- Fernades C., Albuquerque P., Sousa R., Cruz., Tavares F., 2017. Multiple DNA Markers for Identification of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* Isolates and its Direct Detection in Plant Samples. *Plant Disease*, 101,858-865.
- Frutos D., 2010. Bacterial diseases of walnut and hazelnut and genetic resources, *Journal of Plant Pathology*, 92: S1.79-S1.85.
- Garibyan L. and Avashia N. 2013. Research techniques made simple: Polymerase reaction (PCR). *J Invest Dermatol*, 133, 3.
- Gomes L. H., Duarte K., Andrino F., Tavares F., 2000. A simple method for dna isolation from *Xanthomonas* spp. *Scientia Agricola*, 5: 3, 553-555.
- Goodman R. N. and Plurad S. B., 1971. Ultrastructural changes in tobacco undergoing the hypersensitive reaction caused by plant pathogenic bacteria. *Physiological Plant Pathology*, 1:1,11-15.

Goodman R. N., and Navacky A. J., 1994. The Hypersensitive reaction in Plants to Pathogens A Resistance Phenomenon. APS Press. USA

Goodman R.N., 1968. The hypersensitive reaction in tobacco: a reflection of changes in host cell permeability, *Phytopathology* 58: 872-873.

Hagedorn C., Blanch A.R. and Harwood V.J., 2011. *Microbial Source Tracking: Methods, Applications and Case Studies*. Springer. New York

Janse J.D., 2005. *Phytopathology principles and practice*. CABI Publishing. The Netherlands.

Klement Z., Farkas G. L. and Lovrekovich L., 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf, *Phytopathology*, 54: 474-477

Lamichhane J. R., 2014. *Xanthomonas arboricola* Diseases of Stone Fruit, Almond, and Walnut Trees: Progress Toward Understanding and Management. *Plant Disease* 98:1.

Llop P., Caruso, P., Cubero J., Morente C., 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods* 37, 23-31

Madigan M. T., Martinko J. M., Bender K. S., Buckley D. H., Stahl D. A., Brock T., 2015. *Brock Biology of Microorganisms* 14th Edition. Pearson

Maes M., 1993. Fast classification of plant-associated bacteria in the *Xanthomonas* Genus. *FEMS Microbiology Letters* 133, 161-166

Midha S. and Patil P. B., 2014. Plasticity in plant Growth promoting and Phytopathogenic Bacteria, Chapter 7: Xenomic Flux in *Xanthomonas* Group of plant pathogenic bacteria. Springer. New York.

Moretti C., Vinatzer B A., Onofri A., Valentini F., Buonauro R., 2017. Genetic and phenotypic diversity of Mediterranean populations of the olive knot pathogen , *Pseudomonas savastanoi* pv . *savastanoi*, *Plant Pathology* 66: 595-605.

Ngugen K. A., Forster H., Adaskaveg J. E., 2018. Efficacy of Copper and New Bactericides for Managing Olive Knot in California. *Plant Disease* 102: 892-898

Osborn A.N. and Smith C.J., 2005. *Molecular Microbial Ecology .Advanced Methods*.UK.

Panagopoulos C. G., 1993. Olive knot disease in Greece. Laboratory of Phytopathology, Agricultural University of Athens, Votanikos.

Pierce N.B., 1901. Walnut bacteriosis. *Botanical Gazette*, 31: 272-273.

Plessis H. and Westhuizen T. J., 1995. Identification of *Xanthomonas campestris* pv. *Juglandis* from (Persian) English Walnut Nursery Trees in South Africa J. *Journal of Phytopathology* 143: 449-454

Rajagopal L., Sundari C.S., Balasubramanian D., Sonti R. V., 1999. The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage *FEBS Letters* 415, 125-128.

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: 9 ,998–1009.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schaad N.W., Jones J.B., and Chun W., 2001. *Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria*. APS Press, Minnesota

Scortichini M., Marchesi U., Prospero P., 2001. Genetic Diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (synonyms: *X. campestris* pv. *juglandis*; *X. juglandis* pv. *juglandis*) Strains from Different Geographical Areas shown by Repetitive Polymerase Chain Reaction Genomic Fingerprinting, *Phytopathology* 149: 325-332

Sharma A, 1999. *Xanthomonas*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. London: Academic Press. pp.2323-2329

Surico G. and Lavermicocca P., 1989. A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi*. *Phytopathology* 79: 185-190.

Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L., 2016. Microbiology: An Introduction, 12th Edition

Tsuchiya K. and Wakimoto S., 1983. Reaction of Tobacco Leaf Tissue Infiltrated with Wild Types and Induced Mutant Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae* Ann. Phytopathology. Japan 49: 47-55

Vagelas I. K., Rumbos, C. I., Tsianto, J., 2012. Variation in disease development among persian walnut cultivars , selections and crosses when inoculated with *Xanthomonas arboricola* pv . *juglandis* in Greece. Journal of Plant Pathology, 94: S1.57-S1.61.

Versalovic J., Schneider M., Bruijn F. J. and Lupski J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in Molecular and Cellular Biology, 5, 25-40.

Vicente J.G., and Roberts S.J., 2007. Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR. European Journal Plant Pathology 117: 383-392.

Young J.M., 2004. Olive Knot and its pathogens. Australasian Plant Pathology, 33: 33-39.

Aljanabi S. M. and Martinez I., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. Press Nucleic Acids Research, 25, 22.

Γεωργόπουλος Σ. Γ., 1984. Βασικές Γνώσεις Φυτοπαθολογίας. Εκδόσεις Σταμούλη. Αθήνα.

Δημητριάδης Σ., Παναγόπουλος Χ., Στάθης Π. 1979. Παρατηρηθείσαι εις την Ελλάδα ασθένειαι των καλλιεργούμενων φυτών. Έκδοση Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, Αθήνα. Κηφισιά.

Θέριος Ι. Ν., 2013. Ειδική Δενδροκομία Φυλλοβόλα Οπωροφόρα Δέντρα. Εκδόσεις Γαρταγάνης. Θεσσαλονίκη.

Παναγοπουλος Χ.Γ., 2007. Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων & Αμπέλου. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα.

Τζάμος Ε.Κ., 2007. Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλης. Αθήνα.

