

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού

Περιβάλλοντος

Χαρακτηρισμός βακτηριοφάγων που προσβάλλουν το

φυτοπαθογόνο βακτήριο

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*

ΣΑΝΙΔΑΣ ΒΑΪΟΣ

ΒΕΛΛΙΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ (επιβλέπων)

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Βόλος 2016

**Χαρακτηρισμός βακτηριοφάγων που προσβάλλουν το φυτοπαθογόνο βακτήριο
Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi***

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ευάγγελος Βέλλιος, Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (επιβλέπων)

Γεώργιος Νάνος, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ανέστης Καρκάνης, Λέκτορας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 16338/1
Ημερ. Εισ.: 12/06/2017
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΦΠΑΠ
2016
ΣΑΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή της πτυχιακής 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. Νάνο Γεώργιο, Καθηγητή, και τον κ. Καρκάνη Ανέστη, Λέκτορα, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ευχαριστίες επίσης εκφράζω στον κ. Βερίλλη Παναγιώτη, Επίκουρο Καθηγητή, για τη διεξαγωγή της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, τον κ. Νάνο Γεώργιο για την παροχή φυτικού υλικού για περεταίρω δοκιμές, καθώς επίσης και την Parinda Barua, μεταπτυχιακή φοιτήτρια (Erasmus mundus brave) του Assam Agricultural University (Ινδία), για τη συνεργασία της σε ορισμένα τμήματα της διατριβής μου.

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
2 ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	9
2.1 Η ασθένεια “καρκίνωση της ελιάς”	9
2.1.1 Συμπτώματα της ασθένειας	9
2.1.2 Το φυτοπαθογόνο βακτήριο <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	12
2.1.3 Αντιμετώπιση	13
2.2 Βακτηριοφάγοι	14
2.2.1 Δομή των βακτηριοφάγων	14
2.2.2 Βιολογικός κύκλος των βακτηριοφάγων	15
2.2.3 Οικολογία των βακτηριοφάγων	16
2.2.4 Ταξινόμηση των βακτηριοφάγων	17
2.2.5 Αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων βακτηρίων με τη χρήση βακτηριοφάγων	18
2.2.6 Βακτηριοφάγοι που μολύνουν είδη του γένους <i>Pseudomonas</i>	19
2.3 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία	21
2.3.1 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διελεύσεως (T.E.M.)	21
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
3.1 Προσδιορισμός του φάσματος λύσης 4 βακτηριοφάγων, σε 5 απομονώσεις του <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	23
3.2 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διελεύσεως (T.E.M.) στους βακτηριοφάγους	26
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
4.1 Φάσμα λύσης των βακτηριοφάγων G1, G2, A1 και A2 σε 5 απομονώσεις του <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	28
4.1.1 Αποτελέσματα βιοδοκιμών του φάγου G1 στις βακτηριακές απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10	29
4.1.2 Αποτελέσματα βιοδοκιμών του φάγου G2 στις βακτηριακές απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10	31

4.1.3	Αποτελέσματα βιοδοκιμών του φάγου A1 στις βακτηριακές απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10	34
4.1.4	Αποτελέσματα βιοδοκιμών του φάγου A2 στις βακτηριακές απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10	37
4.1.5	Φάσμα λύσης των G1,G2,A1 και A2 σε σχέση με τις βακτηριακές απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10	39
4.2	Ταξινόμηση των βακτηριοφάγων έπειτα από παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τύπου διελεύσεως (T.E.M.)	41
4.2.1	Ταξινόμηση βακτηριοφάγων της απομόνωσης G1	42
4.2.2	Ταξινόμηση βακτηριοφάγων της απομόνωσης A1	43
4.2.3	Ταξινόμηση βακτηριοφάγων της απομόνωσης A2	46
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	47
6	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	49
7	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός βακτηριοφάγων που μολύνουν το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Το συγκεκριμένο βακτήριο αποτελεί το παθογόνο αίτιο της ασθένειας καρκίνωση της ελιάς. Διεξήχθησαν βιοδοκιμές μεταξύ των βακτηριοφάγων G1, G2, A1, A2 και των βακτηριακών απομονώσεων του *P.savastanoi* pv. *savastanoi* Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10. Σκοπός των βιοδοκιμών ήταν ο προσδιορισμός του φάσματος λύσης των τεσσάρων βακτηριοφάγων μεταξύ των πέντε βακτηριακών απομονώσεων. Επίσης έγινε παρατήρηση των φάγων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τύπου διελεύσεως (T.E.M.) με σκοπό το μορφολογικό χαρακτηρισμό και την πιθανή ταξινόμησή τους. Τοξικότερος βακτηριοφάγος βρέθηκε πως είναι ο A2, μετά ο G2, ο G1 και τελευταίος ο A1. Ανθεκτικότερη βακτηριακή απομόνωση αποδείχτηκε πως είναι η Pss6, με τις Pss7, Pss10 και Pss8 να ακολουθούν, ενώ μεγαλύτερη ευαισθησία στην προσβολή των βακτηριοφάγων έδειξε η Pss9. Τέλος όσον αφορά την ταξινόμηση των βακτηριοφάγων, στην απομόνωση G1 βρέθηκαν δύο διαφορετικά είδη που ανήκουν στην οικογένεια *Podoviridae*, στην απομόνωση A1 τέσσερα διαφορετικά είδη που ταξινομήθηκαν στις οικογένειες *Lipothrixviridae*, *Myoviridae*, *Fuselloviridae* και *Cystoviridae*, και στην απομόνωση A2 δύο διαφορετικά είδη που ανήκουν στις οικογένειες *Corticoviridae* και *Microviridae*.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ελιά αποτελεί σημαντική καλλιέργεια για την περιοχή της Μεσογείου και τη χώρα μας καθώς καλλιεργείται από την αρχαιότητα κυρίως για το υψηλής διατροφικής αξίας ελαιόλαδο. Ωστόσο εκτός από τις παραδοσιακές περιοχές καλλιέργειας, η ελιά έχει επεκταθεί σε ολόκληρο τον κόσμο λόγω της φήμης που έχει αποκτήσει το ελαιόλαδο.

Η ασθένεια καρκίνωση της ελιάς προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, προκαλώντας σαν συμπτώματα χαρακτηριστικούς όγκους και υπερπλασίες. Προκαλεί μείωση της παραγωγής και υποβάθμιση της ποιότητας του καρπού και του ελαιολάδου. Η εξάπλωση της ασθένειας ευνοείται από τον υγρό καιρό και νέες μολύνσεις μπορούν να γίνουν εύκολα μέσα από τις τομές του κλαδέματος και τραυματισμένους ιστούς.

Στο παρελθόν η αντιμετώπιση της ασθένειας γινόταν κυρίως με τα αντιβιοτικά, τα οποία σήμερα έχουν καταργηθεί εξαιτίας της ανθεκτικότητας που ανέπτυξαν τα βακτήρια. Στις μέρες μας η αντιμετώπιση γίνεται κυρίως με καλλιεργητικά μέτρα και προληπτικές εφαρμογές με χαλκούχα σκευάσματα κατά τις περιόδους που υπάρχει κίνδυνος νέων μολύνσεων.

Επομένως προκύπτει η ανάγκη αποτελεσματικής αντιμετώπισης της ασθένειας χωρίς την επιπλέον επιβάρυνση του περιβάλλοντος. Αυτό έχουν ως στόχο και οι έρευνες που γίνονται με τους βακτηριοφάγους. Βακτηριοφάγοι είναι οι ιοί που μολύνουν τα βακτήρια και τα καταστρέφουν. Έτσι στόχος είναι στο μέλλον να παρασκευασθούν σκευάσματα με βάση τους βακτηριοφάγους τα οποία θα είναι αποτελεσματικά εναντίον των βακτηριώσεων και φιλικά προς το περιβάλλον καθώς αποτελούν βιολογικούς παράγοντες αντιμετώπισης.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να αξιολογηθεί το φάσμα λύσης τεσσάρων βακτηριοφάγων που μολύνουν το *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, σε πέντε απομονώσεις του, καθώς επίσης και να γίνει προσπάθεια ταξινόμησης αυτών με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τύπου διελεύσεως (T.E.M.). Με λίγα λόγια σκοπός της εργασίας ήταν να γίνει χαρακτηρισμός των βακτηριοφάγων ως προς το φάσμα λύσης και τη μορφολογία τους.

2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

2.1 Η ασθένεια “καρκίνωση της ελιάς”

Η ασθένεια “καρκίνωση της ελιάς” προκαλείται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* και έχει εντοπιστεί στην πλειονότητα των περιοχών όπου καλλιεργείται η ελιά (*Olea europaea* L.) σε ολόκληρο τον κόσμο, και κυρίως στις Μεσογειακές χώρες όπου η ελιά αποτελεί παραδοσιακή καλλιέργεια (Quesada *et al.*, 2008). Πιο συγκεκριμένα η ασθένεια έχει αναφερθεί στις εξής χώρες: Αυστρία, Κύπρος, Γαλλία, Γερμανία, Ελλάδα, Ιταλία, Ολλανδία, Νορβηγία, Πορτογαλία, Ρωσία, Ισπανία, Σουηδία, Ελβετία, Ηνωμένο Βασίλειο, πρώην Γιουγκοσλαβία, Γεωργία, Ιράν, Ιράκ, Ισραήλ, Λίβανος, Τουρκία, Αλγερία, Λιβύη, Μαρόκο, Νότια Αφρική, Τανζανία, Τυνησία, Μεξικό, Η.Π.Α., Αργεντινή, Βραζιλία, Κολομβία, Περού, Ουρουγουάη και Αυστραλία (Young, 2004). Η ασθένεια είναι γνωστή από την αρχαιότητα καθώς είχε περιγραφεί από τον Θεόφραστο (370-286 π.Χ.) στο *De historia et de causis plantarum* (Scortichini *et al.*, 2004).

Το *P. savastanoi* pv. *savastanoi* μπορεί να προκαλέσει σημαντικές απώλειες στην παραγωγή άμεσα και έμμεσα. Άμεσα από μολύνσεις που αναστέλλουν την ανθοφορία και επηρεάζουν την ανάπτυξη και την ποιότητα του καρπού, και έμμεσα αποδυναμώνοντας τους βραχίονες (εικόνα 2.1) του δέντρου (Quesada *et al.*, 2008; Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010).

Σε περιπτώσεις έντονης προσβολής οι όγκοι συνενώνονται μεταξύ τους, και εκτός από τη μείωση της ζωτικότητας μπορεί να υπάρξει ξήρανση κλάδων ή και ολόκληρων δέντρων (Παναγόπουλος, 2007).

Οι οικονομικές επιπτώσεις της ασθένειας έχουν αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια, ιδίως σε ελαιώνες πυκνής φύτευσης (Quesada *et al.*, 2010).

2.1.1 Συμπτώματα της ασθένειας

Το *P. savastanoi* pv. *savastanoi* προκαλεί την ανάπτυξη υπερπλασιών στα ελαιόδεντρα, σχηματίζοντας σφαιρικούς όγκους στον κορμό και τους κλάδους (εικόνα 2.2), όπως επίσης σπανιότερα στα φύλλα και τους καρπούς (Quesada *et al.*, 2008).



Εικόνα 2.1 Συμπτώματα καρκίνωσης σε βραχίονα ελιάς.



Εικόνα 2.2 Ανοιχτός όγκος σε βλαστό ελιάς, σύμπτωμα της καρκίνωσης.

Οι μολύνσεις ξεκινούν από πληγές που έχουν γίνει πρόσφατα, σχηματίζοντας αρχικά μια μικρή κοιλότητα, λόγω της άμεσης κατάρρευσης των φυτικών κυττάρων (Quesada *et al.*, 2010). Έπειτα οι όγκοι που σχηματίζονται, αρχικά είναι ακανόνιστα σφαιροειδείς, πρασινωποί, όχι πολύ σκληροί και με λεία επιφάνεια. Με την πάροδο του χρόνου σκληραίνουν, διαρρηγνύονται, σκουραίνουν (εικόνα 2.3), και η διάμετρός τους κυμαίνεται από μερικά χιλιοστά έως αρκετά εκατοστά (Marchi *et al.*, 2009). Με λίγα λόγια μετά την προσβολή από το βακτήριο, οι όγκοι που σχηματίζονται αυξάνουν σε μέγεθος και διαρρηγνύονται, επιτρέποντας έτσι τη διαφυγή των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της βροχής (Scortichini *et al.*, 2004).

Περισσότερο ευαίσθητα εμφανίζονται τα νεαρά δέντρα, όπου όταν προσβληθούν από την ασθένεια γίνονται αδύναμα, παρεμποδίζοντας έτσι τη σωστή διαμόρφωσή τους (Young, 2004).



Εικόνα 2.3 Παλαιοί ξηλοποιημένοι όγκοι σε βραχίονα ελιάς, σύμπτωμα της καρκίνωσης.

2.1.2 Το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Το *P. savastanoi* pv. *savastanoi* απομονώθηκε και περιγράφηκε από τον Luigi Savastano, περίπου 2200 χρόνια αργότερα από την αναφορά του Θεόφραστου, και αρχικά ονομάστηκε *Bacillus oleae tuberculosis* (Scortichini *et al.*, 2004). Είναι αρνητικό κατά gram και ανήκει στην ομάδα του *Pseudomonas syringae* που περιλαμβάνει σημαντικά για τη γεωργία φυτοπαθογόνα βακτήρια, με ευρεία ποικιλία συμπτωμάτων και ευρύ φάσμα ποωδών και ξυλωδών φυτών-ξενιστών (Matas *et al.*, 2012). Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* έχουν σχήμα ραβδοειδές, φέρουν πολικά μαστίγια και ο μεταβολισμός τους είναι αερόβιος (Janse, 2005). Άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* είναι 25-26 °C, και οι απομονώσεις του παράγουν φθορίζουσα χρωστική (Παναγόπουλος, 2007).

Εκτός από την ελιά, το *P. savastanoi* προσβάλλει επίσης την πικροδάφνη (*Nerium oleander* L.), το λιγούστρο (*Ligustrum japonicum*) και τον φράξινο (*Fraxinus excelsior* L.), προκαλώντας παρόμοια συμπτώματα (Marchi *et al.*, 2005; Gori *et al.*, 2012). Πρόσφατα αναφέρθηκε και η ροδιά ως φυσικός ξενιστής του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Bozkurt *et al.*, 2014). Εκτός από τον παθότυπο (pv.) *savastanoi*, διακρίνονται και οι παθότυποι *phaseolicola*, *glycinea*, *fraxini* και *nerii* (Marchi *et al.*, 2005). Τα διάφορα στελέχη του *P. savastanoi*, εκτός από την ειδικευση ως προς τον ξενιστή, διαφέρουν μεταξύ τους και όσον αφορά τα βιοχημικά και γενετικά τους χαρακτηριστικά (Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008).

Ο σχηματισμός των όγκων είναι αποτέλεσμα της παραγωγής των φυτό-ορμονών ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) και κυτοκινών, από το βακτήριο (Smidt and Kosuge, 1978; Comai and Kosuge, 1980; Surico *et al.*, 1985). Η παραγωγή της φυτό-ορμόνης ινδολο-3-οξικό οξύ είναι συνηθισμένη μεταξύ των φυτοπαθογόνων βακτηρίων, επηρεάζοντας την ανάπτυξη των φυτών με τη διατάραξη της ισορροπίας της αυξίνης (Aragon *et al.*, 2014).

Πηγές για νέες μολύνσεις αποτελούν οι πληθυσμοί του βακτηρίου που βρίσκονται εντός των νεαρών όγκων, αλλά και οι πληθυσμοί που βρίσκονται σε υγιή ελαιόδεντρα ως επίφυτα, στην επιφάνεια των φύλλων, των βλαστών αλλά και των καρπών (Tegli *et al.*, 2010). Θα μπορούσαμε λοιπόν να πούμε πως οι επιφυτικοί καθώς και οι πληθυσμοί εντός των όγκων, λειτουργούν ως δεξαμενές του βακτηρίου (Campos *et al.*, 2009). Η εξάπλωση του βακτηρίου σε μικρές αποστάσεις γίνεται μέσω της βροχής, του ανέμου, του παγετού, του χαλαζιού, των εντόμων, και μέσω καλλιεργητικών πρακτικών όπως

είναι το κλάδεμα ή κατά τη συγκομιδή (Quesada *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2012). Επίσης μολύνσεις μπορούν να γίνουν από τις πληγές που δημιουργούνται κατά την πτώση των φύλλων, κυρίως από το μέσο έως το τέλος της άνοιξης, κάνοντας την περίοδο αυτή ιδιαίτερα κρίσιμη για επέμβαση (Teviotdale and Krueger, 2004). Πτώση των φύλλων σε συνδυασμό με βροχή μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή εξάπλωση της ασθένειας (Teviotdale and Krueger, 2004). Οι υψηλότεροι πληθυσμοί του βακτηρίου σημειώνονται τους βροχερούς μήνες με θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 10-20 °C (Ramos *et al.*, 2012).

2.1.3 Αντιμετώπιση

Οι πρακτικές που εφαρμόζονται για την αντιμετώπιση της ασθένειας κυρίως στοχεύουν στη μείωση της εξάπλωσής της, με καλλιεργητικές πρακτικές όπως είναι το κλάδεμα, και η εφαρμογή ενώσεων του χαλκού (Tegli *et al.*, 2010). Στα προληπτικά καλλιεργητικά μέτρα συγκαταλέγονται, η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, η αποφυγή δημιουργίας πληγών, η αφαίρεση και το κάψιμο των προσβεβλημένων κλάδων και η καλή απολύμανση των κλαδευτικών εργαλείων (Janse, 2005). Οι εφαρμογές με σκευάσματα που περιέχουν ενώσεις του χαλκού γίνονται επίσης προληπτικά, μιας και είναι δύσκολο να καταπολεμηθεί το βακτήριο αφού εγκατασταθεί (Quesada *et al.*, 2010). Επιπλέον οι ενώσεις αυτές μπορεί να είναι επικίνδυνες για το περιβάλλον, και ενισχύουν την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας του παθογόνου βακτηρίου (Maldonado-González *et al.*, 2013).

Η μείωση της ευαισθησίας των φυτών στις μολύνσεις, προϋποθέτει τη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών, όπου είναι και η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την ολοκληρωμένη αντιμετώπιση των ασθενειών. Δυστυχώς όμως δεν υπάρχει κάποια γνωστή ποικιλία ελιάς που να είναι απολύτως ανθεκτική στο παθογόνο (Ramos *et al.*, 2012). Αρκετά ανθεκτικές ποικιλίες θεωρούνται η Μεγαρίτικη, η Θασίτικη και η Καλαμών, ενώ ευπαθείς στην εκδήλωση της ασθένειας είναι η Αμφίσης και η Κορωνέϊκη (Παναγόπουλος, 2007).

Για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της ασθένειας απαιτείται αρχικά ένα προσεκτικά σχεδιασμένο και εκτελεσμένο κλάδεμα, το οποίο θα πρέπει να ξεκινά με τα υγιή δέντρα, αποφεύγοντας τον υγρό καιρό (Ramos *et al.*, 2012). Για την αποφυγή εξάπλωσης της ασθένειας συστήνεται μια εφαρμογή με χαλκούχο βακτηριοκτόνο, αμέσως μετά τη συγκομιδή του καρπού. Ωστόσο ένας πρόσθετος ψεκασμός την άνοιξη,

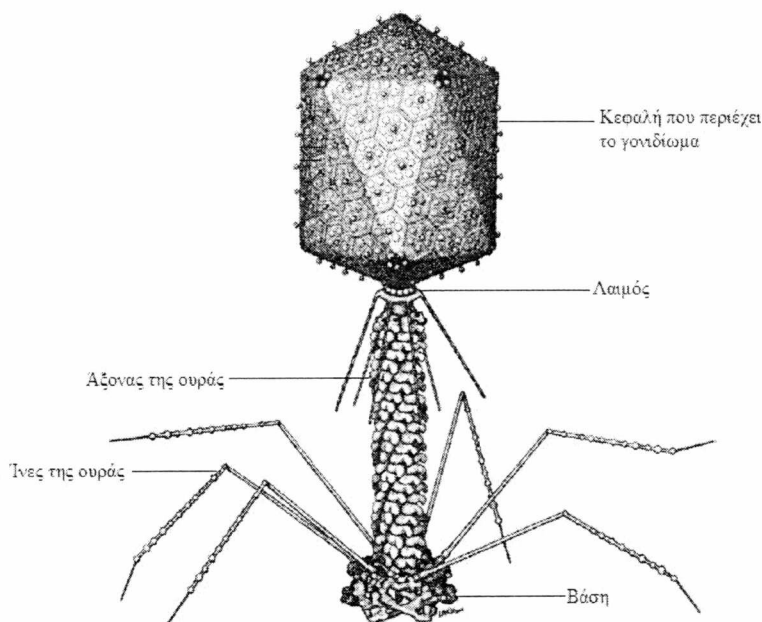
όπου μεγάλο μέρος των φύλλων πέφτουν, κρίνεται απαραίτητος για την αποτροπή των μολύνσεων (Teviotdale and Krueger, 2004). Τέλος, επέμβαση με χαλκούχο σκεύασμα θα πρέπει να γίνεται επίσης μετά από παγετό ή χαλάζι (Παναγόπουλος, 2007).

2.2 Βακτηριοφάγοι

Οι βακτηριοφάγοι ή αλλιώς φάγοι, είναι ιοί που μολύνουν τα ευβακτήρια και τα αρχαία (Ackermann, 2006). Η ανακάλυψή τους έγινε από τον Frederick Twort και τον Felix d'Herelle το 1915 και το 1917 αντίστοιχα, και συναντώνται παντού, από το έδαφος και τη θάλασσα, μέχρι το νερό που πίνουμε και το φαγητό που τρώμε (Kutter and Sulakvelidze, 2005). Οι φάγοι έχουν διαφοροποιηθεί αρκετά σε σχέση με τους υπόλοιπους ιούς, και αποτελούν την αρχαιότερη και πολυπληθέστερη κατηγορία τους (Ackermann, 2006). Το εύρος ξενιστών των φάγων είναι σχετικά στενό, πιο συγκεκριμένα αυτό μπορεί να περιορίζεται σε ένα μόνο βακτηριακό γένος, είδος, ή ακόμη και σε περιορισμένο αριθμό στελεχών ενός είδους (Gill and Abedon, 2003).

2.2.1 Δομή των βακτηριοφάγων

Τα βασικά τμήματα ενός κοινού βακτηριοφάγου είναι: η κεφαλή, ο λαιμός, η ουρά, οι ίνες της ουράς και η βάση της (σχήμα 2.1) (Casjens and Hendrix, 1988).



Σχήμα 2.1 Δομή του βακτηριοφάγου T4 (Leiman *et al.*, 2003).

Η κεφαλή αποτελείται από ένα πρωτεϊνικής βάσης καψίδιο που περικλείει τον πυρήνα, και εντός αυτού εμπεριέχεται το γονιδίωμα, όπου τις περισσότερες φορές είναι DNA και λιγότερο συχνά RNA (Gill and Abedon, 2003). Το γονιδίωμα μπορεί να είναι μονόκλωνο ή δίκλωνο (Novik and Savich, 2015). Το πρωτεϊνικό καψίδιο προστατεύει το γονιδίωμα του φάγου κατά την διάρκεια της εξωκυττάριας αναζήτησης, συμμετέχει στην προσκόλληση του φάγου σε κάποιο βακτηριακό κύτταρο καθώς επίσης και στη διαδικασία της έγχυσης του γονιδιώματος εντός του κυτταροπλάσματος του βακτηρίου (Gill and Abedon, 2003). Η ουρά χρησιμεύει στην πρόσδεση, μέσω των ινιδίων σε κάποιο επιδεκτικό κύτταρο και στη συνέχεια ως αγωγός, μέσω του οποίου μεταφέρεται το γονιδίωμα στο κύτταρο του ξενιστή κατά τη μόλυνση (Casjens and Hendrix, 1988; Novik and Savich, 2015). Ο κεντρικός άξονας της ουράς αποτελείται από ελικοειδώς διατεταγμένες υπομονάδες με μήκη 3 έως 825 nm (Ceyskens, 2009). Επίσης ο άξονας μπορεί να είναι εύκαμπτος και μη συσταλτός, ή άκαμπτος και συσταλτός (Casjens and Hendrix, 1988). Όλοι οι τύποι ουρών περιλαμβάνουν στο άκρο τους κάποιες εξωτερικές αποφύσεις και μια βάση με αρκετές ίνες, οι οποίες συμμετέχουν στην πρόσδεση του φάγου στο βακτηριακό κύτταρο, καθώς επίσης και μια μυτερή άκρη ή ακίδα που είναι εξειδικευμένη προς τους υποδοχείς της μεμβράνης του βακτηρίου (Novik and Savich, 2015).

2.2.2 Βιολογικός κύκλος των βακτηριοφάγων

Οι βακτηριοφάγοι απαντώνται εκτός και εντός των κυττάρων των ξενιστών τους, τους οποίους και έχουν ανάγκη για αναπαραχθούν (Novik and Savich, 2015). Με βάση το βιολογικό τους κύκλο, οι φάγοι χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους λυτικούς και τους ήπιους. Οι λυτικοί φάγοι αφού πολλαπλασιαστούν επιφέρουν τη λύση του κυττάρου του ξενιστή, απελευθερώνοντας τους απογόνους τους. Αντίθετα οι ήπιοι φάγοι μπορούν να ακολουθήσουν λυτικό κύκλο και να καταστρέψουν το βακτηριακό κύτταρο, ή να ακολουθήσουν λυσιγονικό κύκλο, κατά τον οποίο το γονιδίωμα του φάγου δεν αντιγράφεται αλλά παραμένει σε μια αδρανή κατάσταση (προφάγος), ή ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή (Guttman *et al.*, 2005).

Ο βιολογικός κύκλος ενός τυπικού λυτικού φάγου αποτελείται από τα εξής στάδια: 1) εξωκυτταρική αναζήτηση, 2) προσκόλληση σε κάποιο επιδεκτικό βακτηριακό κύτταρο, 3) έγχυση του γονιδιώματος μέσα στο βακτηριακό κύτταρο, 4) σχηματισμός και ωρίμανση των απογόνων του φάγου, και τέλος 5) λύση του κυττάρου και

απελευθέρωση των νεοσχηματισμένων φάγων στο εξωκυττάριο περιβάλλον (Gill and Abedon, 2003). Πιο συγκεκριμένα η μόλυνση ενός βακτηριακού κυττάρου από φάγο, ξεκινά με την πρόσδεση-προσρόφηση εξειδικευμένων δομών της ουράς, όπως είναι οι ίνες και οι ακίδες σε ειδικά μόρια της επιφάνειας των βακτηρίων. Μετά την πρόσδεση το γονιδίωμα του φάγου περνά διαμέσου της ουράς στο κύτταρο του ξενιστή. Αυτό επιτυγχάνεται διαπερνώντας το στρώμα πεπτιδογλυκάνης με τη βοήθεια ενός ενζυματικού μηχανισμού που βρίσκεται στο άκρο της ουράς, και στη συνέχεια διεισδύοντας στην εσωτερική μεμβράνη, απελευθερώνεται το γονιδίωμα. Τέλος μετά τη μορφογένεση των ισωματίων, απελευθερώνεται η πρωτεΐνη χολίνη η οποία τροποποιεί την εσωτερική μεμβράνη του κυττάρου, επιτρέποντας στο ένζυμο λυσίνη να φτάσει στην πεπτιδογλυκάνη και να τη διασπάσει, επιφέροντας έτσι τη λύση του κυττάρου και την απελευθέρωση των ισωματίων (Guttman *et al.*, 2005).

Λυσιγονία είναι η λανθάνουσα κατάσταση στην οποία το γονιδίωμα ενός ήπιου φάγου παραμένει επ' αόριστον, χωρίς να προωθεί την παραγωγή ισωματίων φάγου, και χωρίς να επιφέρει τον κυτταρικό θάνατο (Miller and Day, 2008). Ο ήπιος λοιπόν φάγος εισέρχεται στην κατάσταση του προφάγου και συμβιώνει με το κύτταρο του ξενιστή του, το οποίο όταν πολλαπλασιαστεί μεταδίδει προφάγους και στους απογόνους του (Adams, 1959).

2.2.3 Οικολογία των βακτηριοφάγων

Όσον αφορά το έδαφος και τη ριζόσφαιρα, η υγρασία παίζει μεγάλο ρόλο καθώς έλλειψη αυτής έχει ως αποτέλεσμα την προσκόλληση των φάγων στα εδαφικά τεμαχίδια, καθιστώντας τους ανενεργούς. Το όξινο pH του εδάφους επίσης μπορεί να επιφέρει την αδρανοποίηση τους (Gill and Abedon, 2003).

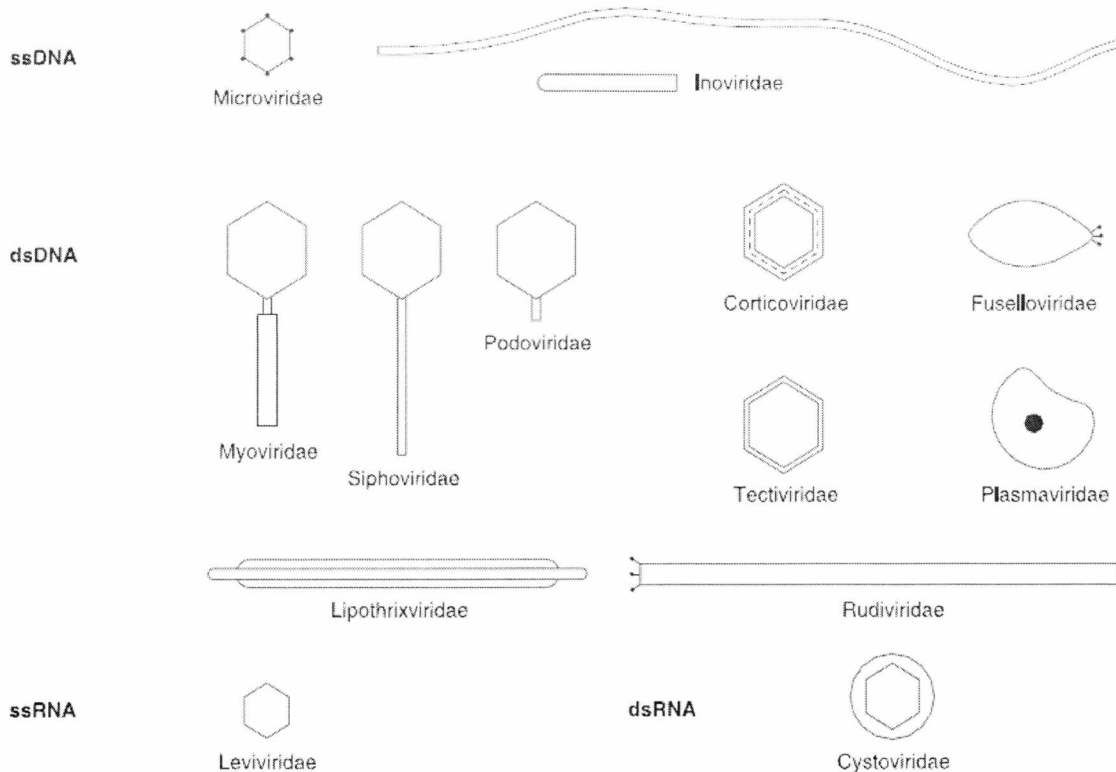
Από τη στιγμή που το έδαφος αποτελεί τη δεξαμενή των βακτηριοφάγων, το ερώτημα που τέθηκε από τους Gill και Abedon το 2003, είναι το πώς αυτοί φτάνουν τη φυλλόσφαιρα ενός δέντρου και μολύνουν επίφυτα. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι φάγοι μεταβαίνουν στη φυλλόσφαιρα κατά τη βλάστηση των σπόρων και στη συνέχεια παραμένουν ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του φυτού, ενώ άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι μεταβαίνουν από φυτό σε φυτό διαμέσου της φυλλόσφαιρας.

Τέλος σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των φάγων, είναι η υπεριώδης ακτινοβολία (260 nm), το pH του περιβάλλοντος στο οποίο

βρίσκονται, το ασκορβικό οξύ, η ουρία, η ουρεθάνη, τα απορρυπαντικά, το αέριο της μουστάρδας, οι αλκοόλες, οι χηλικές ενώσεις και η θερμότητα (Guttman *et al.*, 2005).

2.2.4 Ταξινόμηση των βακτηριοφάγων

Οι βακτηριοφάγοι ταξινομούνται σε μια τάξη, 13 οικογένειες (σχήμα 2.2) και 31 γένη (Ackermann, 2006). Σύμφωνα με τη διεθνή επιτροπή για την ταξινόμηση των ιών (ICTV), για την ταξινόμηση των βακτηριοφάγων είναι απαραίτητος ο μορφολογικός χαρακτηρισμός του ισωματίου (τύπος ουράς, αριθμός εδρών, νηματοειδές, πλειομορφικό), και ο προσδιορισμός της σύνθεσης του νουκλεϊκού οξέος του (Novik and Savich, 2015).



Σχήμα 2.2 Βασικοί μορφότυποι των βακτηριοφάγων (Ackermann, 2006).

Από τους 6196 γνωστούς βακτηριοφάγους, οι 546 μολύνουν είδη του γένους *Pseudomonas*, με τους περισσότερους να ανήκουν στην τάξη *Caudovirales* (Novik and Savich, 2015). Η τάξη *Caudovirales* περιλαμβάνει φάγους με δίκλωνο DNA, ουρά, εικοσαεδρικές κεφαλές ή επιμήκη καψίδια (Novik and Savich, 2015). Το μέγεθος των κεφαλών είναι ανάλογο με το μέγεθος του γονιδιώματος που περικλείουν και

κυμαίνεται σε διάμετρο μεταξύ 45 και 100 nm (Ceysens, 2009). Ανάλογα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της ουράς οι φάγοι κατανέμονται σε τρεις οικογένειες, τη *Myoviridae* (156 φάγοι) όπου περιλαμβάνει φάγους με μακριές συσταλτές ουρές, τη *Siphoviridae* (249 φάγοι) με μακριές μη συσταλτές ουρές, και την *Podoviridae* (129 φάγοι) με φάγους που έχουν μικρή μη συσταλτή ουρά (Novik and Savich, 2015). Οι φάγοι χωρίς ουρά, οι νηματοειδείς και οι πλειομορφικοί δηλαδή, περιλαμβάνουν λιγότερους από 190 ιούς (3,6% των φάγων) και ταξινομούνται σε 10 μικρές οικογένειες (Ackermann, 2006). Φάγους με πολυεδρικές κεφαλές και γονιδίωμα DNA περιέχουν οι οικογένειες *Microviridae*, *Corticoviridae* και *Tectiviridae*, ενώ με γονιδίωμα RNA και πολυεδρικές κεφαλές οι *Leviviridae* και *Cystoviridae*. Νηματοειδείς φάγους περιέχουν οι οικογένειες *Inoviridae*, *Lipothrixviridae* και *Rudiviridae*, ενώ τέλος πλειομορφικούς οι οικογένειες *Plasmaviridae* και *Fuselloviridae* (Ackermann, 2005).

2.2.5 Αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων βακτηρίων με τη χρήση βακτηριοφάγων

Η διαδικασία κατά την οποία χρησιμοποιούνται βακτηριοφάγοι για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων βακτηρίων, είναι γνωστή ως θεραπεία με τη χρήση φάγων. Κατ' αυτή γίνεται εφαρμογή συγκεκριμένων βακτηριοφάγων στο πεδίο, προκειμένου να μειωθεί ο πληθυσμός συγκεκριμένων-επιδεκτικών βακτηρίων (Gill and Abedon, 2003). Η θεραπεία με τη χρήση φάγων αποτελεί μέσο βιολογικής αντιμετώπισης των βακτηρίων, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση της χρήσης χημικών βακτηριοκτόνων και αντιβιοτικών (Gill and Abedon, 2003). Για την επιτυχία της αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων βακτηρίων στη φυλλόσφαιρα, απαιτούνται υψηλοί πληθυσμοί φάγων κατά τις κρίσιμες περιόδους, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η αλληλεπίδραση τους με τα βακτήρια στόχους (Jones *et al.*, 2012). Επίσης αναγκαίο είναι, οι φάγοι να συνδυαστούν με προστατευτικές ενώσεις οι οποίες θα τους προστατεύσουν από τη UV ακτινοβολία, έτσι ώστε να παραμείνουν ενεργοί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Jones *et al.*, 2012).

Περιπτώσεις στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί βακτηριοφάγοι για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων βακτηρίων περιλαμβάνουν την απολύμανση μολυσμένου πατατόσπορου από το *Streptomyces scabies* (McKenna *et al.*, 2001), την αντιμετώπιση του *Xanthomonas campestris* στη ροδακινιά (Randhawa and Civerolo, 1986), του *Ralstonia solanacearum* στα κηπευτικά (Fujiwara *et al.*, 2011), του *Erwinia amylovora* στα μηλοειδή (Erskine, 1973), και του *Pseudomonas tolaasii* στα μανιτάρια (Kim *et al.*,

2011). Στην πράξη, εμπορική εφαρμογή των φάγων γίνεται με το προϊόν AgriPhage το οποίο έχει πάρει έγκριση από την Αμερικανική υπηρεσία προστασίας του περιβάλλοντος, και κυκλοφορεί από το 2005 από την εταιρία OmniLytics, για την αντιμετώπιση του παθογόνου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και του *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* στην τομάτα και την πιπεριά (Balogh *et al.*, 2003; Obradovic *et al.*, 2005).

2.2.6 Βακτηριοφάγοι που μολύνουν είδη του γένους *Pseudomonas*

Pseudomonas fluorescens

Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι επιζήμιο για τις βιομηχανίες γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς παράγει πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία αλλοιώνουν και υποβαθμίζουν το γάλα (Sillankorva *et al.*, 2004).

Ο λυτικός βακτηριοφάγος □IBB-PF7A μολύνει το *Pseudomonas fluorescens* επιφέροντας τη λύση των κυττάρων του. Ο □IBB-PF7A ανήκει στην υποοικογένεια *Autographivirinae*, της οικογένειας *Podoviridae*, έχει διάμετρο κεφαλής 63 nm και το μέγεθος της μη συσταλτής ουράς του είναι 13 × 8 nm (Sillankorva *et al.*, 2011).

Pseudomonas tolaasii

Οι καλλιέργειες μανιταριών συχνά εμφανίζουν μια ασθένεια που προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas tolaasii*. Το *P. tolaasii* παράγει μια τοξίνη η οποία είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό κηλίδων και τη διάσπαση του ιστού των μανιταριών (Kim *et al.*, 2011).

Ο φάγος □Pto-br6g είναι φάγος του *P.tolaasii*, ανήκει στην οικογένεια *Siphoviridae* και αποτελείται από εικοσαεδρική κεφαλή διαμέτρου 60 nm και μια μακριά μη συσταλτή ουρά μήκους 140 nm (Nguyen *et al.*, 2012). Στην οικογένεια *Podoviridae* ανήκει ο Bf7 ο οποίος διαθέτει εικοσαεδρική κεφαλή διαμέτρου επίσης 60 nm, και κοντή ουρά (Sajben-Nagy *et al.*, 2012).

Pseudomonas solanacearum

Το *P.solanacearum* προκαλεί την ασθένεια της βακτηριακής μάρανσης σε αρκετές καλλιέργειες κηπευτικών, όπως η τομάτα και η πατάτα.

Στους φάγους που μολύνουν το συγκεκριμένο βακτήριο συμπεριλαμβάνονται οι □RSA1, □RSL1 και □RSB1. Ο □RSA1 είναι ένας P2 φάγος με κεφαλή και ουρά της οικογένειας *Myoviridae*, όπως επίσης και ο □RSL1. Ο □RSB1 ανήκει στην οικογένεια *Podoviridae* και μορφολογικά μοιάζει στον T7 φάγο (Fujiwara *et al.*, 2011). Ένας άλλος φάγος που μολύνει το *P.solanacearum* είναι ο νηματοειδής PE226, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια *Inoviridae* και έχει μήκος 1050 ± 200 nm, και πλάτος 6–9 nm (Murugaiyan *et al.*, 2010).

Pseudomonas aeruginosa

Το *P.aeruginosa* αποτελεί παθογόνο του ανθρώπου και προκαλεί δευτερογενείς λοιμώξεις σε ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση, τραυματίες με εγκαύματα, ασθενείς του AIDS και γενικότερα ασθενείς με αδύναμο ανοσοποιητικό (Kerr and Snelling, 2009).

Κάποιοι από τους βακτηριοφάγους του *P.aeruginosa* είναι: ο LUZ24, όπου ανήκει στην οικογένεια *Podoviridae*, διαθέτει εικοσαεδρική κεφαλή με διάμετρο 63 nm και μια κοντή ουρά με διαστάσεις 12 x 8 nm. Άλλοι φάγοι επίσης της οικογένειας *Podoviridae* είναι οι LUZ7 και LIT1, με διάμετρο καψιδίου 70-nm και κοντή ουρά. Στην οικογένεια *Siphoviridae* ανήκει ο YuA, ο οποίος διαθέτει επιμήκη κεφαλή με διαστάσεις 72 x 51 nm και μακριά ουρά μήκους 145 nm (Ceysens, 2009).

Pseudomonas putida

Το *P.putida* είναι ένα κοινό βακτήριο της ριζόσφαιρας. Ο φάγος Lu11 (*Myoviridae*) που έχει ως ξενιστή το συγκεκριμένο είδος, θεωρείται ότι είναι αρκετά μεγάλος σε μέγεθος, καθώς η διάμετρος της εικοσαεδρικής κεφαλής του είναι 124 nm και η συσταλή ουρά του έχει μήκος 200 nm και πλάτος 20 nm (Adriaenssens *et al.*, 2012).

2.3 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία

Στις αρχές του 20ου αιώνα, οι φυσικοί ανακάλυψαν ότι υλικά σωματίδια όπως τα ηλεκτρόνια, εμφανίζουν κυματοειδή χαρακτήρα (Egerton, 2005). Την ιδιότητα των ηλεκτρονίων να οπισθοσκεδάζονται ή να διέρχονται μέσα από κάποιο σώμα, εκμεταλλεύεται η ηλεκτρονική μικροσκοπία (Βερίλλης, 2015).

Σύμφωνα με τον Βερίλλη (2015) τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: Σαρωτικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (SEM), Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τύπου διελεύσεως (TEM), Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διερχόμενης δέσμης υψηλής ανάλυσης (HRTEM) και Σαρωτικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διερχόμενης δέσμης (STEM).

2.3.1 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διελεύσεως (T.E.M.)

Σε ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διελεύσεως, τα ηλεκτρόνια διαπερνούν ένα λεπτό δείγμα και στη συνέχεια απεικονίζονται με τους κατάλληλους φακούς σε ευρεία αναλογία (Egerton, 2005). Αυτού του τύπου τα μικροσκόπια αποτελούνται από τα εξής τμήματα: το σύστημα φωτισμού, το οποίο περιλαμβάνει το «πολυβόλο» ηλεκτρονίων, μαζί με δύο ή περισσότερους συγκεντρωτικούς φακούς που εστιάζουν τα ηλεκτρόνια στο παρασκεύασμα, και το σύστημα απεικόνισης που περιέχει τουλάχιστον τρεις φακούς που παράγουν μια μεγεθυμένη εικόνα του δείγματος σε μια φθορίζουσα οθόνη, ή στην οθόνη ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή μέσω μιας κάμερας (Egerton, 2005).

Σημαντικό κομμάτι της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας είναι η προετοιμασία των δειγμάτων. Η κύρια τεχνική που χρησιμοποιείται σήμερα για την εξέταση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των βακτηριοφάγων, είναι η εξέταση των αρνητικά χρωματισμένων σωματιδίων τους σε ηλεκτρονικά μικροσκόπια διελεύσεως (Ackermann and Heldal, 2010). Η τεχνική της αρνητικής χρώσης βασίζεται στην ανάμιξη των προς εξέταση σωματιδίων με ένα πυκνό ηλεκτρονιακό διάλυμα, ενός μεταλλικού άλατος υψηλού μοριακού βάρους και μικρού μοριακού μεγέθους. Κατά τη διαδικασία αυτή μια σταγόνα εναιωρήματος φάγου εναποτίθεται με πιπέτα σε ένα πλέγμα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, το οποίο είναι εφοδιασμένο με επικάλυψη άνθρακα και formvar. Στη συνέχεια μια σταγόνα του υλικού χρώσης προστίθεται και αναμιγνύεται απαλά με το δείγμα. Μετά από 1 λεπτό, το υλικό χρώσης αποσύρεται με διηθητικό χαρτί και το πλέγμα αφού στεγνώσει είναι έτοιμο για εξέταση (Ackermann,

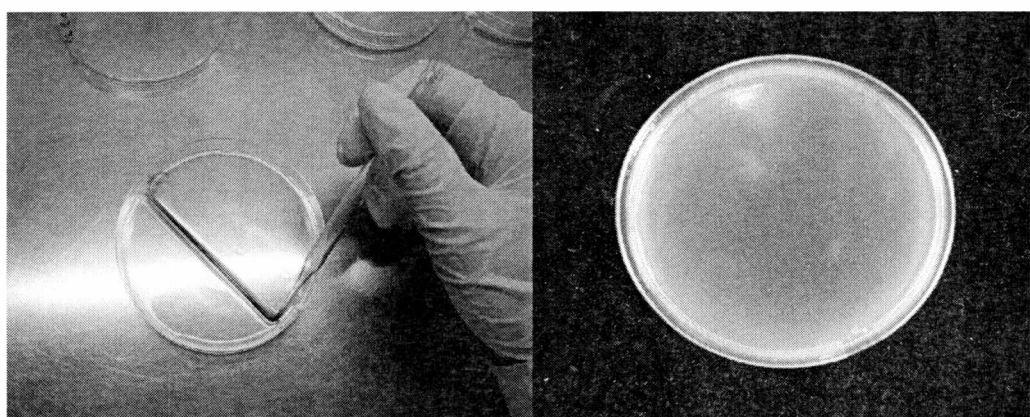
2005). Κατά την εξέταση, τα ισομέγμια στο πλέγμα εμφανίζονται λευκά ή γκρι σε σκούρο φόντο (Ackermann and Heldal, 2010).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Προσδιορισμός του φάσματος λύσης 4 βακτηριοφάγων, σε 5 απομονώσεις του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*

Οι φάγοι και οι βακτηριακές απομονώσεις του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία ανήκουν στη συλλογή του εργαστηρίου φυτοπαθολογίας, και συντηρούνται σε βαθιά κατάψυξη στους -80°C σε μίγματα γλυκερόλης (glycerol stocks). Πιο συγκεκριμένα 500 μl αποστειρωμένης γλυκερόλης και 500 μl υγρής καλλιέργειας *P. savastanoi* pv. *savastanoi* ή 500 μl υγρής καλλιέργειας *P. savastanoi* pv. *savastanoi* πλήρης φάγων, αναμιγνύονται και αφού τοποθετηθούν σε μικροσωληνίσκους τύπου Eppendorf, αποθηκεύονται σε βαθιά κατάψυξη.

Στους φάγους G1, G2, A1 και A2 διενεργήθηκαν βιοδοκιμές σε συνδυασμό με τις βακτηριακές απομονώσεις του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss6, Pss7, Pss8, Pss9, Pss10) έτσι ώστε να προσδιοριστεί το φάσμα λύσης του κάθε φάγου στην κάθε απομόνωση. Οι δοκιμές έγιναν με δεκαδικές αραιώσεις του κάθε φάγου και επίστρωση (εικόνα 3.1) σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B εις τριπλούν, με την κάθε βακτηριακή απομόνωση ξεχωριστά.

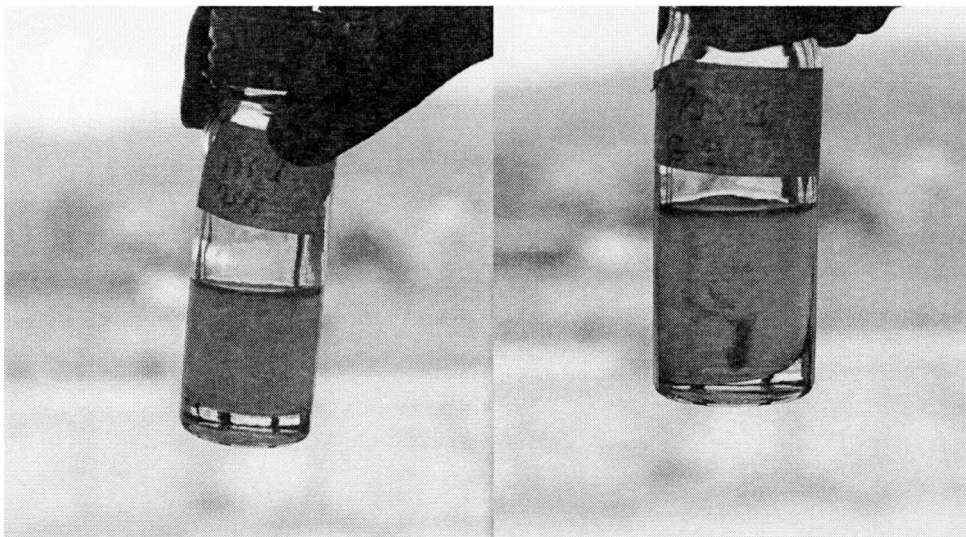


Εικόνα 3.1 Επίστρωση υγρής καλλιέργειας *P. savastanoi* pv. *savastanoi* σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα King's B (αριστερά), καλλιέργεια *P. savastanoi* pv. *savastanoi* σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα King's B, μετά από επίστρωση και επώαση (δεξιά).

Για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος King's B απαιτούνται για ένα λίτρο: Proteose peptone 20.0 g, K_2HPO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, Glycerol 15.0 ml, Agar

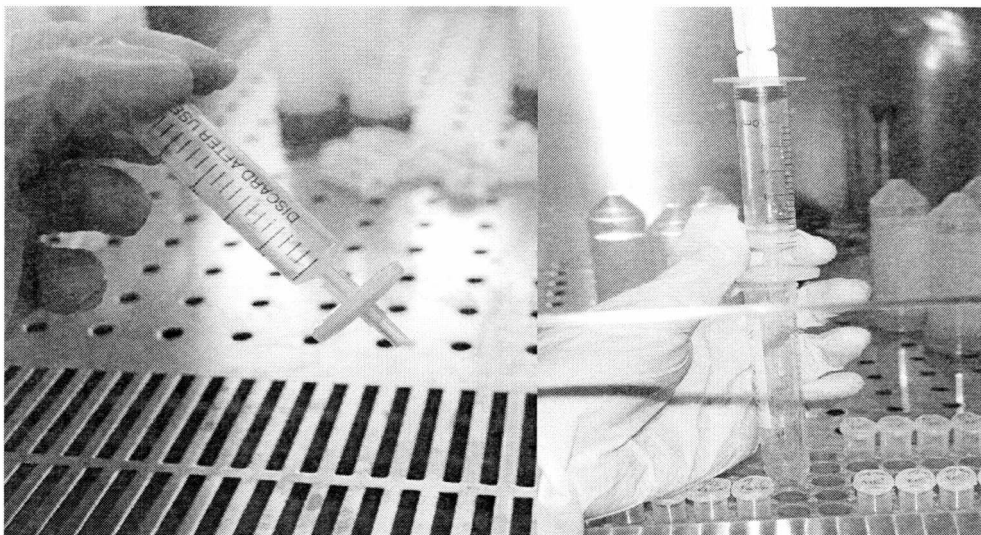
15.0 g και αποστείρωση στους 120 °C (Schaad *et al.*, 2001). Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος SM, για ένα λίτρο απαιτούνται τα εξής: NaCl: 5.8 g, MgSO₄·7H₂O: 2 g, 1 M Tris-Cl (pH 7.5): 50 ml και 2% (w/v) διάλυμα ζελατίνης (2 g ζελατίνης προστίθενται σε τελικό όγκο 100 ml, και ακολουθεί αποστείρωση). Το διάλυμα αποστειρώνεται και αφού κρυώσει χωρίζεται σε κλάσματα των 50 ml (Sambrook and Russell, 2001).

Για την ανανέωση των glycerol stocks των βακτηριακών απομονώσεων μεταφέρθηκαν και εμβολιάστηκαν 100 μl από τα ήδη υπάρχοντα glycerol stocks σε φιαλίδια τύπου McCartney, τα οποία περιείχαν αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο King's B (περιέχει όλα τα συστατικά που αναφέρθηκαν προηγουμένως εκτός από το Agar). Στη συνέχεια τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν για επώαση σε επωαστικό θάλαμο με περιστρεφόμενη βάση για 24 ώρες στους 25 °C και στις 150 rpm. Μετά τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων (υγρή καλλιέργεια) (εικόνα 5) ακολουθήθηκε η διαδικασία για την παρασκευή των μιγμάτων γλυκερόλης. Όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό των βακτηριοφάγων για την ανανέωση των glycerol stocks, έγινε μεταφορά και εμβολιασμός 100 μl από τα ήδη υπάρχοντα glycerol stocks σε υγρή καλλιέργεια *P. savastanoi* pv. *savastanoi* και στη συνέχεια ακολούθησε η επώαση σε επωαστικό θάλαμο με περιστρεφόμενη βάση για 24 ώρες στους 25 °C και στις 150 rpm. Μετά τον πολλαπλασιασμό των φάγων (εικόνα 3.2) ακολούθησε η παρασκευή των μιγμάτων γλυκερόλης.



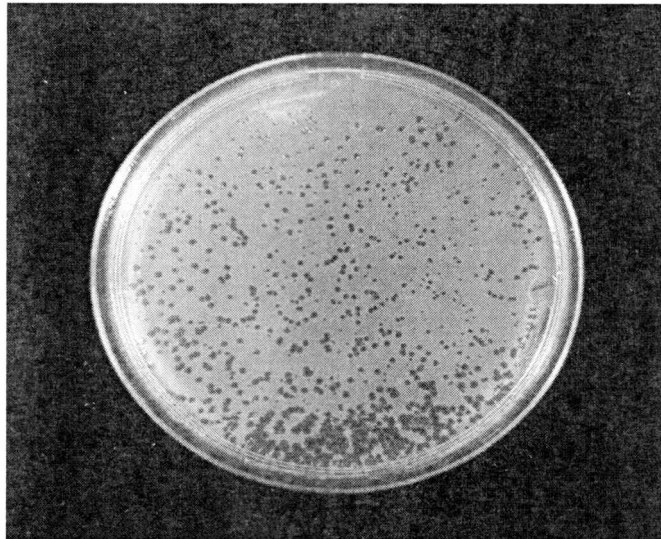
Εικόνα 3.2 Υγρή καλλιέργεια *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (αριστερά), συσσωμάτωμα νεκρών βακτηριακών κυττάρων μετά τη λύση τους από πολλαπλασιασμό φάγων, (δεξιά).

Όσον αφορά τις βιοδοκιμές, αρχικά το 1 ml των φάγων που περιέχεται στο glycerol stock διηθείται μέσα από φίλτρο με διάμετρο οπών 0.45 μm (εικόνα 3.3), 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 υγρής καλλιέργειας *P.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 της υγρής καλλιέργειας στα 600 nm (OD_{600}) είναι 0.758, δηλαδή 8.32×10^7 cfu (Σανίδας, 2014). Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης στους 25 °C για επώαση από 24 έως 48 ώρες. Τέλος οι πλάκες που σχηματίστηκαν από την επίστρωση της κάθε αραιώσης μετρήθηκαν και εκφράστηκαν ως pfu/ml (plaque forming units/ml).



Εικόνα 3.3 Φίλτρο με διάμετρο οπών 0.45 μm προσαρμοσμένο σε σύριγγα (αριστερά), διήθηση υγρής καλλιέργειας *P.savastanoi* pv. *savastanoi* πλήρης φάγων, μέσα από φίλτρο για την απομόνωση των βακτηριοφάγων, (δεξιά).

Ως πλάκα (εικόνα 3.4) ορίζεται η περιοχή των βακτηρίων που έχουν υποστεί λύση, είναι ορατή με γυμνό μάτι και εμφανίζεται ως μια κυκλική ζώνη άνευ βακτηρίων (Adams, 1959). Η κάθε πλάκα σχηματίζεται από τη δράση ενός μεμονωμένου φάγου (Gill and Abedon, 2003).

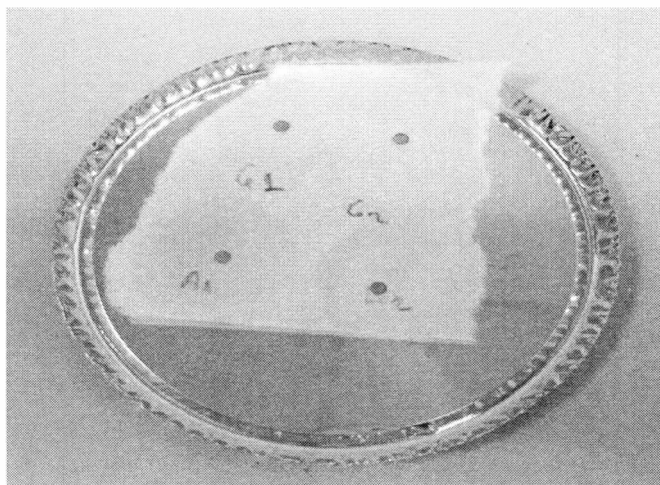


Εικόνα 3.4 Πλάκες που προκύψαν μετά από επίστρωση και επώαση υγρής καλλιέργειας *P.savastanoi* pv. *savastanoi* με βακτηριοφάγο.

3.2 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διελεύσεως (T.E.M.) στους βακτηριοφάγους

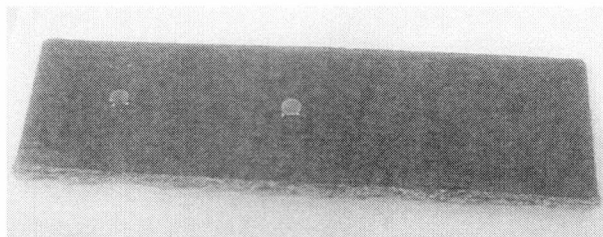
Οι βακτηριοφάγοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτρονική μικροσκοπία ήταν υψηλού τίτλου. Δηλαδή αφού πολλαπλασιάστηκαν σε υγρή καλλιέργεια *P.savastanoi* pv. *savastanoi*, έπειτα διηθήθηκαν μέσα από φίλτρο με διάμετρο οπών 0.45 μm , έτσι ώστε να διαχωριστούν από τα βακτηριακά κύτταρα. Στη συνέχεια έγινε αραιώση 1 ml φάγου με 9 ml ρυθμιστικού διαλύματος SM.

Μια σταγόνα από το κάθε διάλυμα φάγου (50 μl) τοποθετήθηκε σε χάλκινο πλέγμα (grid) με επικάλυψη από formvar, και αφέθηκε να στεγνώσει για περίπου 3-4 λεπτά (εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5 Εναπόθεση των δειγμάτων φάγου σε πλέγματα χαλκού, τα οποία είναι τοποθετημένα πάνω σε διηθητικό χαρτί.

Στη συνέχεια ακολούθησε η αρνητική χρώση με φωσφοβολφραμικό οξύ (PTA) 2% σε απιονισμένο νερό, των χάλκινων πλεγμάτων με τους βακτηριοφάγους (εικόνα 3.6). Η τοποθέτηση των χάλκινων πλεγμάτων στη χρώση, έγινε από τη μεριά της επικάλυψης formvar και διήρκησε 5 λεπτά (Βερίλλης, 2015).

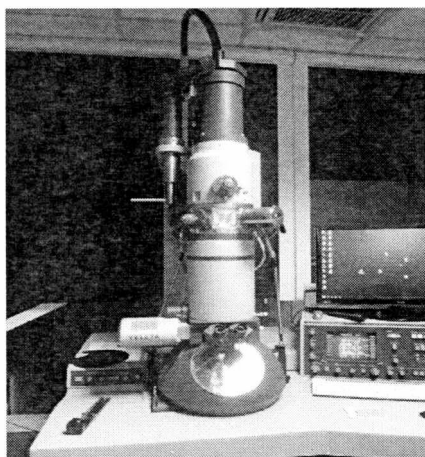


Εικόνα 3.6 Χρώση των πλεγμάτων χαλκού με φωσφοβολφραμικό οξύ (PTA), πάνω σε οδοντιατρικό κερί.

Οι βακτηριοφάγοι που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές αλλά και στην ηλεκτρονική μικροσκοπία είχαν καθαριστεί με τη μέθοδο μεταφοράς μεμονωμένης πλάκας για τουλάχιστον τρεις φορές, πριν αποθηκευτούν ως μίγματα γλυκερόλης στους -80°C .

Τα δείγματα παρατηρήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τύπου διελεύσεως (Philips CM10, κάμερα Veleta Olympus) (εικόνα 3.7) με απαιτούμενη τάση για την παραγωγή των δεσμών ηλεκτρονίων στα 80 kV.

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία των βακτηριοφάγων έγινε σε συνεργασία με τον κύριο Παναγιώτη Βερίλλη, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

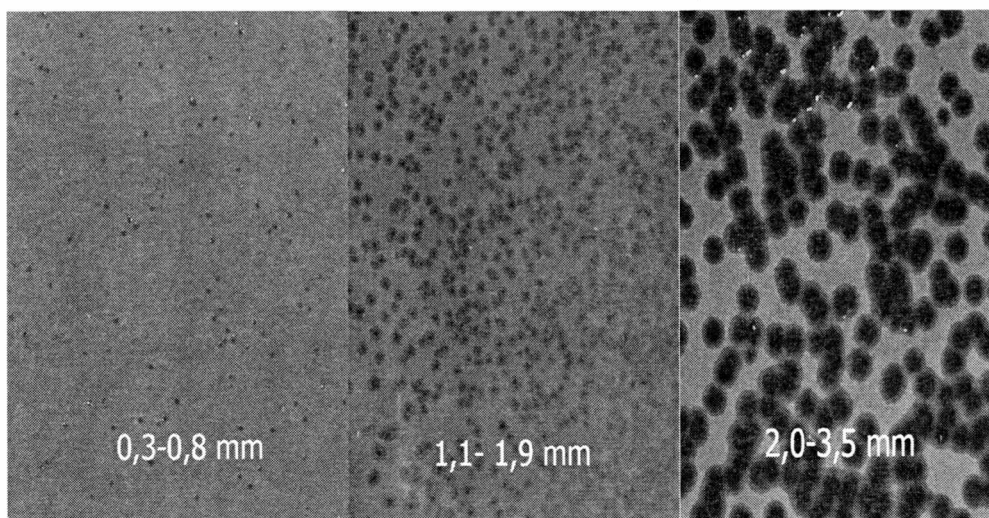


Εικόνα 3.7 Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τύπου διελεύσεως που χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση των δειγμάτων φάγου.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

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

Οι φάγοι G1, G2, A1 και A2 δοκιμάσθηκαν στις απομονώσεις του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10, έτσι ώστε να προσδιορισθεί το φάσμα λύσης τους. Διεξήχθησαν δεκαδικές διαδοχικές αραιώσεις του κάθε φάγου και επίστρωση αυτών σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B με τις εκάστοτε βακτηριακές απομονώσεις. Έπειτα μετρήθηκαν οι πλάκες που προκύψαν από κάθε επίστρωση. Ο αριθμός των πλακών που έδωσαν ορισμένες αραιώσεις ήταν πολύ μεγάλος και τότε χαρακτηρίστηκαν ως 'αμέτρητες πλάκες'. Τέλος 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 (Kim *et al.*, 2011). Με βάση 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 4.1). Όσον αφορά τη διαύγεια, οι πλάκες χαρακτηρίστηκαν σαν καθαρές ή θολές.



Εικόνα 4.1 Πλάκες μικρού, μετρίου και μεγάλου μεγέθους αντίστοιχα, με βάση τη διάμετρό τους.

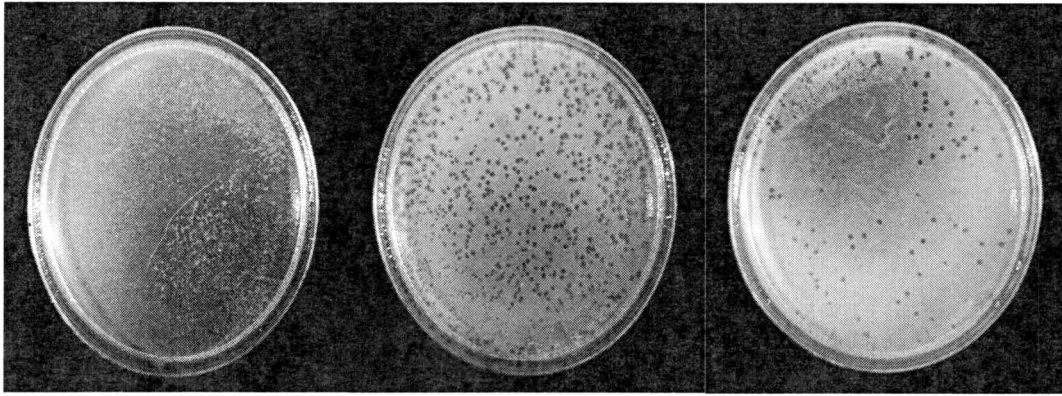
4.1.1 Αποτελέσματα βιοδοκιμών του φάγου G1 στις βακτηριακές απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του φάσματος λύσης του φάγου G1 (αριθμός πλακών ανά αραιώση, μέγεθος και μορφολογικός χαρακτηρισμός πλακών) στις 5 βακτηριακές απομονώσεις.

Πίνακας 4.1 Βιοδοκιμές φάγου G1 στις απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10. Δίδονται ο αριθμός και ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των πλακών ανά δεκαδική αραιώση.

Φάγος G1			
Βακτηριακή απομόνωση	Αραιώση	Αριθμός πλακών (μέσος όρος)	Χαρακτηρισμός πλάκας (διάμετρος, διαύγεια)
Pss6	10^{-5}	αμέτρητες πλάκες	2 mm (μεγάλο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	898,66	
	10^{-7}	237,33	
Pss7	10^{-5}	514,66	1,6 mm (μέτριο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	208	
	10^{-7}	7	
Pss8	10^{-5}	944	1 mm (μέτριο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	584	
	10^{-7}	9,66	
Pss9	10^{-5}	701,33	1 mm (μέτριο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	304	
	10^{-7}	9	
Pss10	10^{-5}	αμέτρητες πλάκες	3 mm (μεγάλο μέγεθος) θολές πλάκες
	10^{-6}	αμέτρητες πλάκες	
	10^{-7}	232	

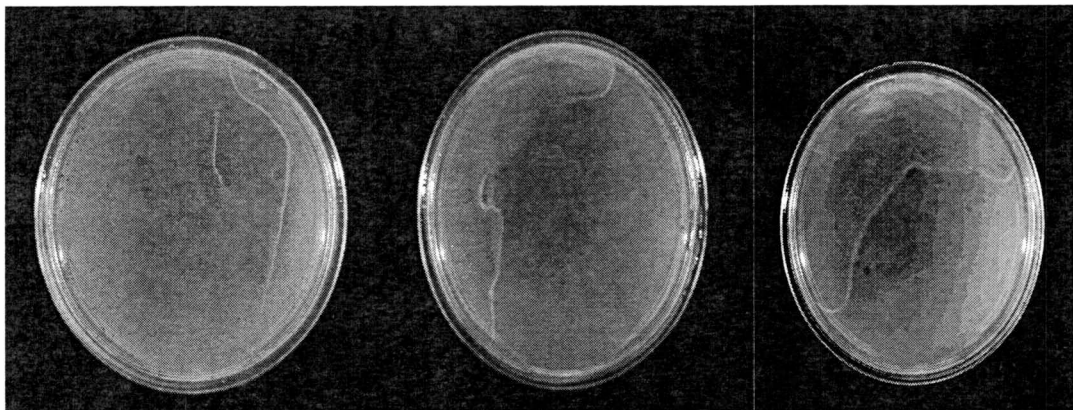
Σύμφωνα με τον πίνακα 4.1, οι πλάκες του G1 σε όλες τις απομονώσεις πλιν της Pss10, ήταν καθαρές που θα πει καλή τοξικότητα. Μεγάλο μέγεθος πλακών έδωσαν οι απομονώσεις Pss6 και Pss10 (θολές όμως). Με βάση τη δεκαδική αραιώση 10^{-7} περισσότερες πλάκες μετρήθηκαν στην απομόνωση Pss6, που σημαίνει μεγαλύτερη ευαισθησία στον φάγο G1, ενώ οι λιγότερες πλάκες μετρήθηκαν στην απομόνωση Pss7, κάτι που σημαίνει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στον G1.



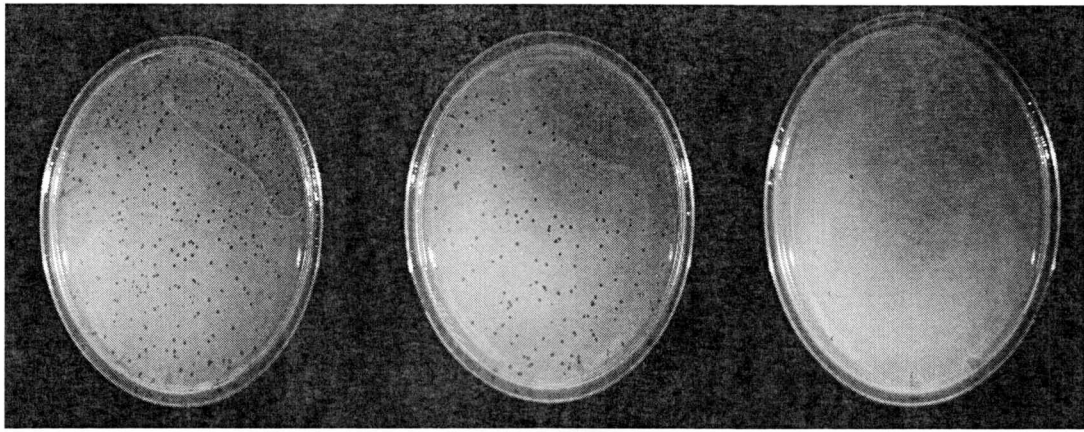
Εικόνα 4.2 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 6 με φάγο G1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



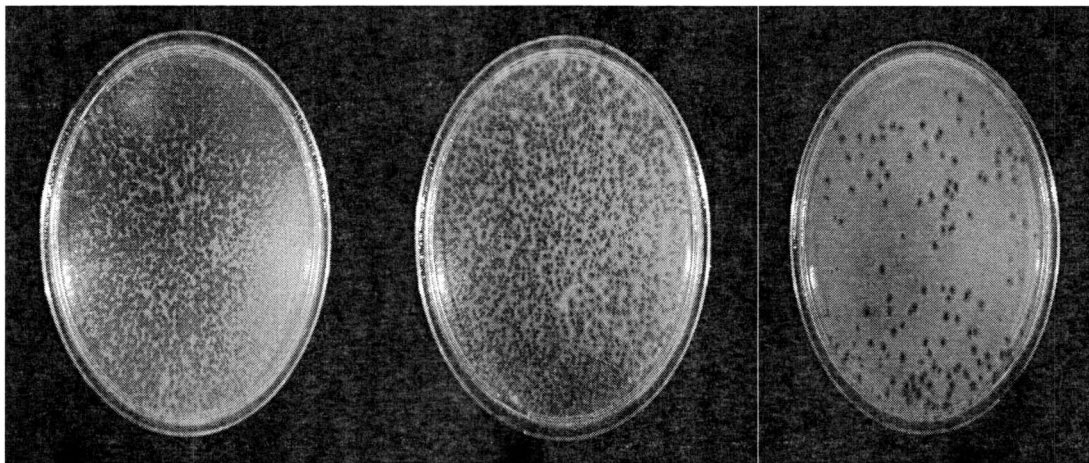
Εικόνα 4.3 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 7 με φάγο G1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



Εικόνα 4.4 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 8 με φάγο G1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



Εικόνα 4.5 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 9 με φάγο G1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



Εικόνα 4.6 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 10 με φάγο G1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.

4.1.2 Αποτελέσματα βιοδοκιμών του φάγου G2 στις βακτηριακές απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του φάσματος λύσης του φάγου G2 (αριθμός πλακών ανά αραιώση, μέγεθος και μορφολογικός χαρακτηρισμός πλακών) στις 5 βακτηριακές απομονώσεις.

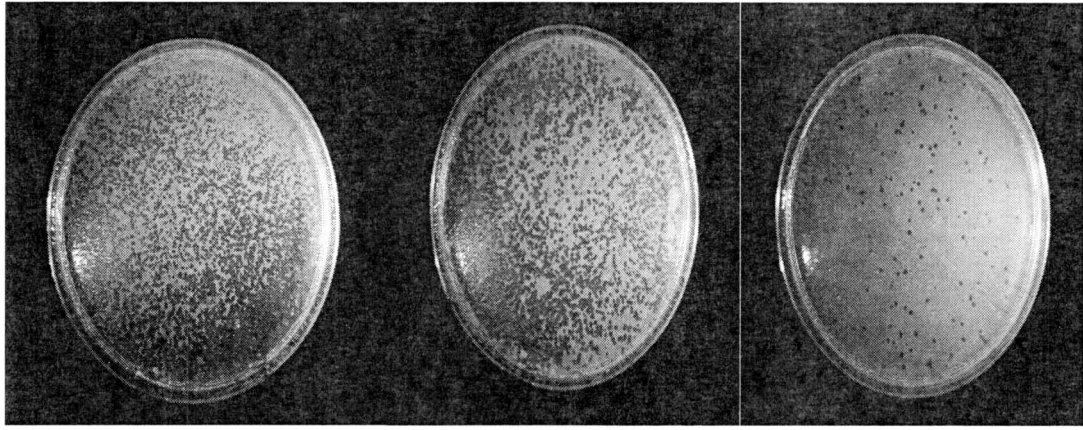
Πίνακας 4.2 Βιοδοκιμές φάγου G2 στις απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10. Δίδονται ο αριθμός και ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των πλακών ανά δεκαδική αραιώση.

Φάγος G2			
Βακτηριακή απομόνωση	Αραιώση	Αριθμός πλακών (μέσος όρος)	Χαρακτηρισμός πλάκας (διάμετρος, διαύγεια)
Pss6	10^{-5}	αμέτρητες πλάκες	1,9 mm (μέτριο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	1600	
	10^{-7}	122,66	
Pss7	10^{-5}	αμέτρητες πλάκες	1,8 mm (μέτριο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	αμέτρητες πλάκες	
	10^{-7}	364	
Pss8	10^{-5}	αμέτρητες πλάκες	1 mm (μέτριο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	αμέτρητες πλάκες	
	10^{-7}	1197,33	
Pss9	10^{-5}	2032	1,1 mm (μέτριο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	1050,66	
	10^{-7}	35,33	
Pss10	10^{-5}	αμέτρητες πλάκες	3,1 mm (μεγάλο μέγεθος) θολές πλάκες
	10^{-6}	880	
	10^{-7}	162,66	

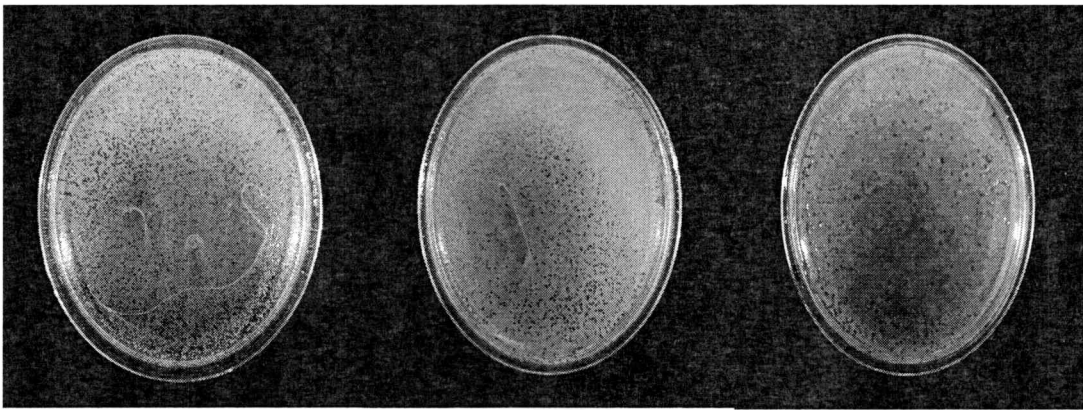
Από τον πίνακα 4.2 προκύπτει ότι περισσότερο ευαίσθητη στον φάγο G2 είναι η απομόνωση Pss8, διότι έδωσε τις περισσότερες πλάκες στη δεκαδική αραιώση 10^{-7} , αντίθετα με την απομόνωση Pss9 που έδωσε τις λιγότερες πλάκες. Σχεδόν όλες οι απομονώσεις έδωσαν πλάκες μετρίου μεγέθους και καθαρές που σημαίνει πως ο φάγος G2 είναι μέτρια τοξικός απέναντί τους. Η απομόνωση Pss10 έδωσε πλάκες μεγάλου μεγέθους, που ήταν όμως θολές, που σημαίνει επίσης μέτρια τοξικότητα από τον φάγο G2.



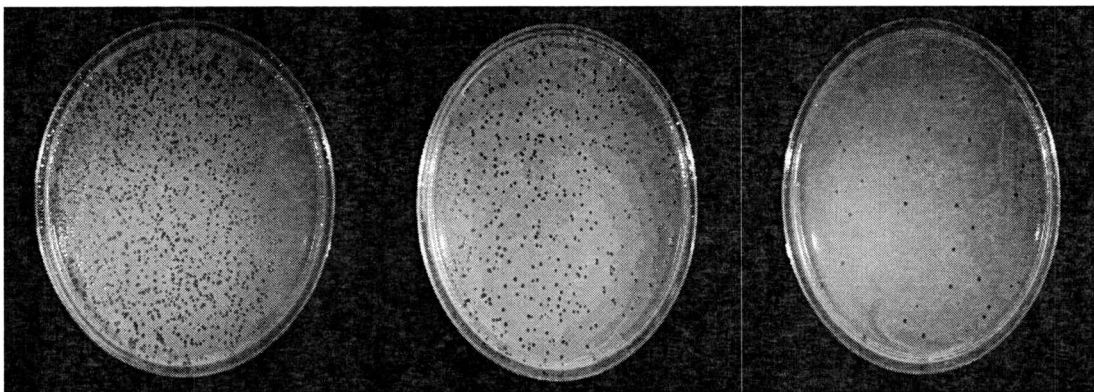
Εικόνα 4.7 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 6 με φάγο G2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



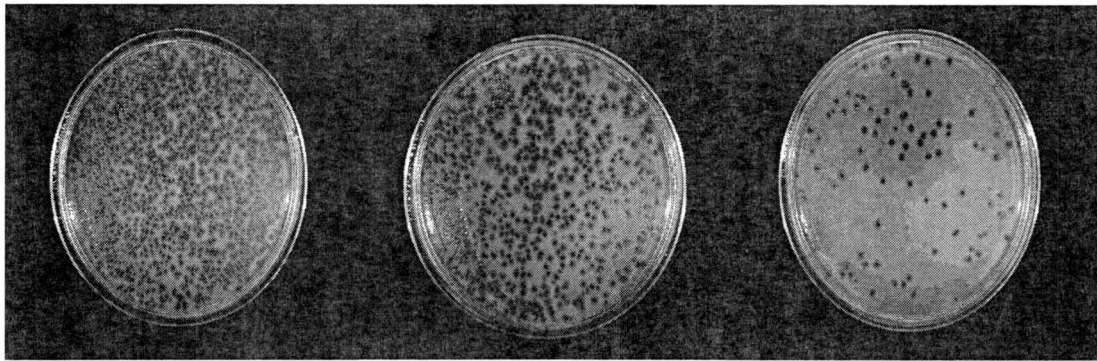
Εικόνα 4.8 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 7 με φάγο G2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



Εικόνα 4.9 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 8 με φάγο G2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



Εικόνα 4.10 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 9 με φάγο G2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



Εικόνα 4.11 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 10 με φάγο G2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.

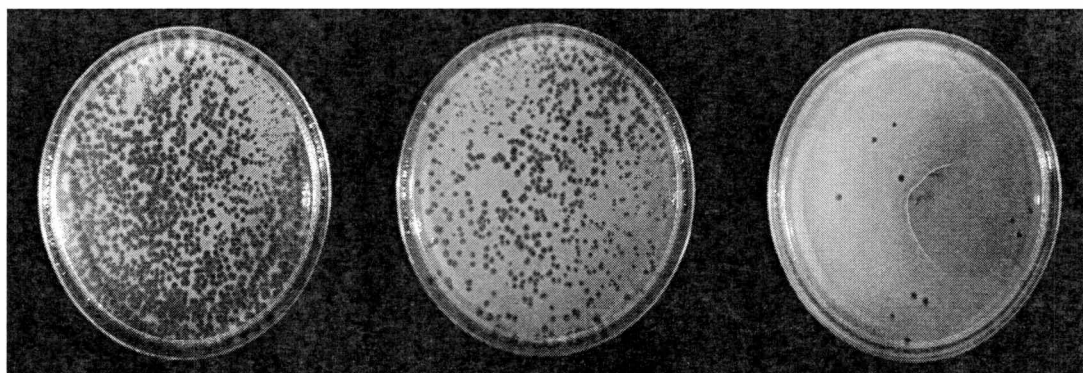
4.1.3 Αποτελέσματα βιοδοκιμών του φάγου A1 στις βακτηριακές απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του φάσματος λύσης του φάγου A1 (αριθμός πλακών ανά αραιώση, μέγεθος και μορφολογικός χαρακτηρισμός πλακών) στις 5 βακτηριακές απομονώσεις.

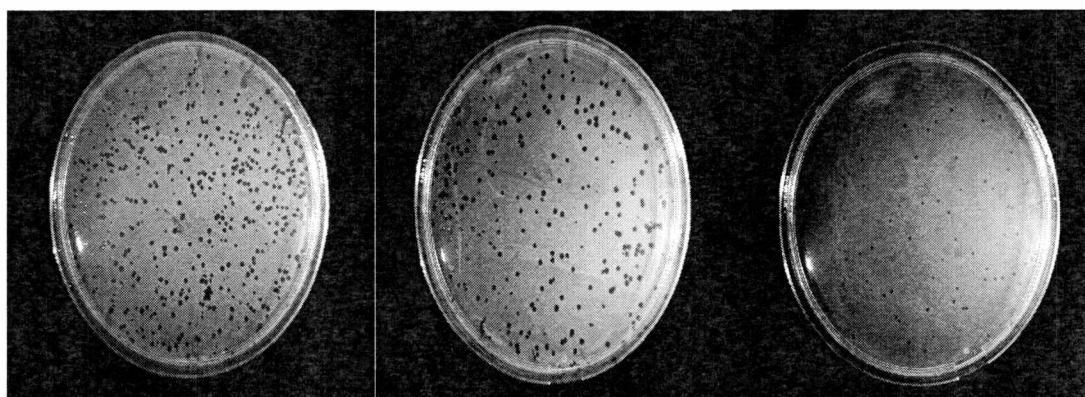
Πίνακας 4.3 Βιοδοκιμές φάγου A1 στις απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10. Δίδονται ο αριθμός και ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των πλακών ανά δεκαδική αραιώση.

Φάγος A1			
Βακτηριακή απομόνωση	Αραιώση	Αριθμός πλακών (μέσος όρος)	Χαρακτηρισμός πλάκας (διάμετρος, διαύγεια)
Pss6	10^{-5}	1341,33	2 mm (μεγάλο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	600	
	10^{-7}	10,66	
Pss7	10^{-5}	624	2 mm (μεγάλο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	453,33	
	10^{-7}	152	
Pss8	10^{-5}	772	1 mm (μέτριο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	400	
	10^{-7}	14	
Pss9	10^{-5}	925,33	1 mm (μέτριο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	557,33	
	10^{-7}	56	
Pss10	10^{-5}	589,33	2,5 mm (μεγάλο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	293,33	
	10^{-7}	114,66	

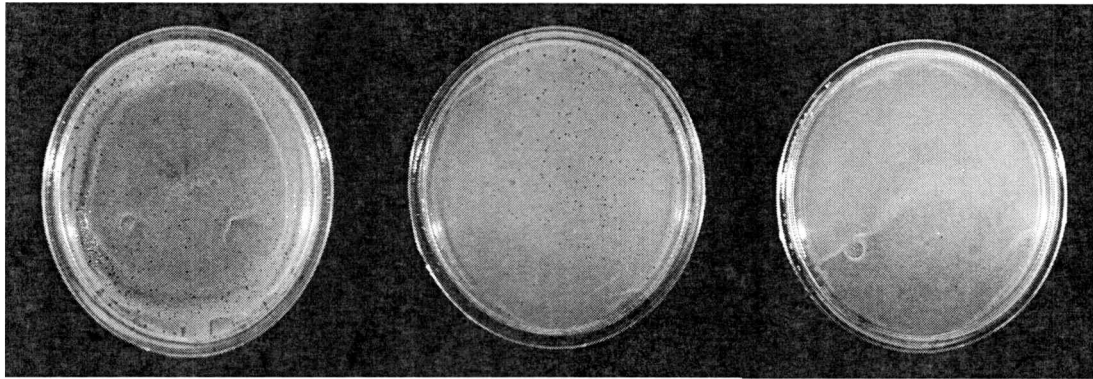
Σύμφωνα με τον πίνακα 4.3, οι πλάκες που προκύψαν από τη δράση του φάγου A1 στις 5 βακτηριακές απομονώσεις ήταν όλες καθαρές, πράγμα που σημαίνει υψηλή τοξικότητα του φάγου προς τις απομονώσεις, ιδίως των Pss6, Pss7 και Pss10 όπου το μέγεθος των πλακών ήταν μεγάλο. Περισσότερο ευαίσθητη στη δράση του A1 εμφανίζεται η βακτηριακή απομόνωση Pss6 καθότι έδωσε τις περισσότερες πλάκες συνολικά σε όλες τις δεκαδικές αραιώσεις, ενώ αντίθετα η Pss10 έδωσε τις λιγότερες.



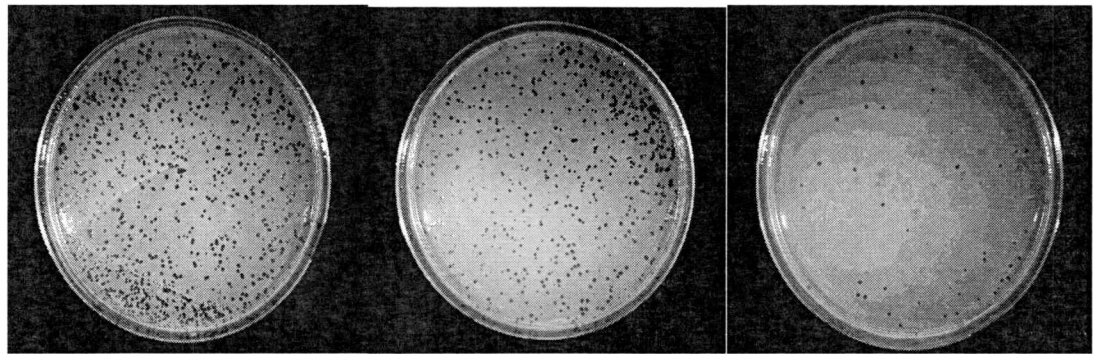
Εικόνα 4.12 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 6 με φάγο A1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



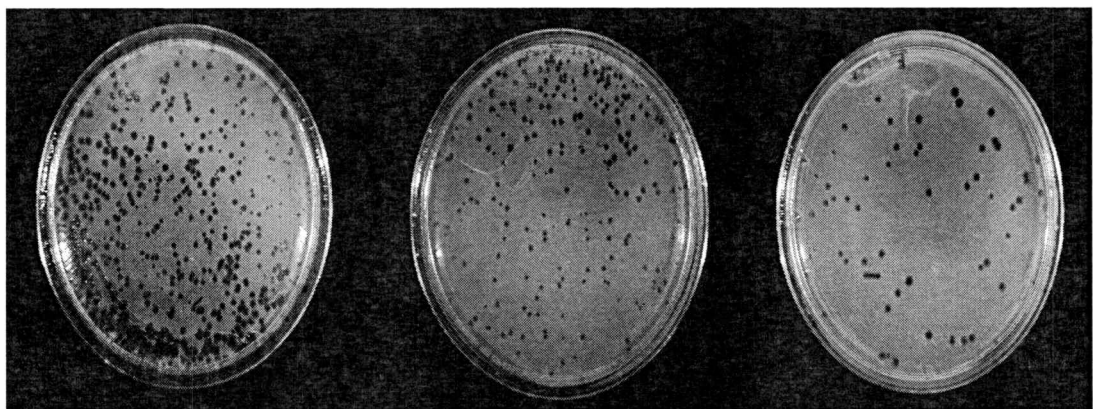
Εικόνα 4.13 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 7 με φάγο A1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



Εικόνα 4.14 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 8 με φάγο A1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



Εικόνα 4.15 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 9 με φάγο A1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



Εικόνα 4.16 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 10 με φάγο A1. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.

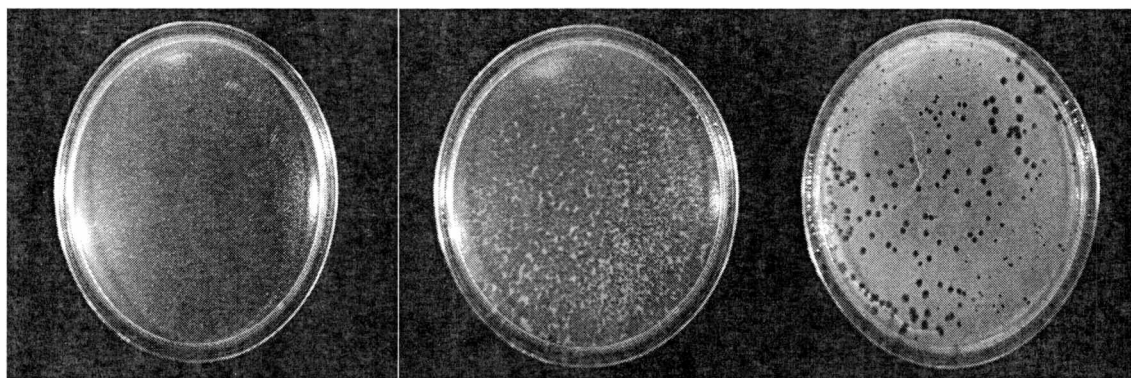
4.1.4 Αποτελέσματα βιοδοκιμών του φάγου A2 στις βακτηριακές απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του φάσματος λύσης του φάγου A2 (αριθμός πλακών ανά αραιώση, μέγεθος και μορφολογικός χαρακτηρισμός πλακών) στις 5 βακτηριακές απομονώσεις.

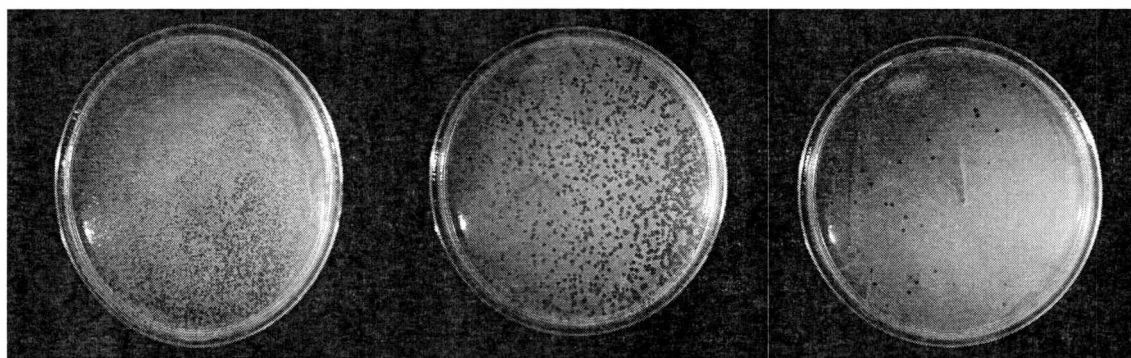
Πίνακας 4.4 Βιοδοκιμές φάγου A2 στις απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10. Δίδονται ο αριθμός και ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των πλακών ανά δεκαδική αραιώση.

Φάγος A2			
Βακτηριακή απομόνωση	Αραιώση	Αριθμός πλακών (μέσος όρος)	Χαρακτηρισμός πλάκας (διάμετρος, διαύγεια)
Pss6	10^{-5}	πλήρης λύση	2 mm (μεγάλο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	αμέτρητες πλάκες	
	10^{-7}	285,33	
Pss7	10^{-5}	αμέτρητες πλάκες	1,7 mm (μέτριο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	1352	
	10^{-7}	144	
Pss8	10^{-5}	αμέτρητες πλάκες	1 mm (μέτριο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	αμέτρητες πλάκες	
	10^{-7}	320	
Pss9	10^{-5}	αμέτρητες πλάκες	1,5 mm (μέτριο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	αμέτρητες πλάκες	
	10^{-7}	2480	
Pss10	10^{-5}	πλήρης λύση	3 mm (μεγάλο μέγεθος) καθαρές πλάκες
	10^{-6}	αμέτρητες πλάκες	
	10^{-7}	960	

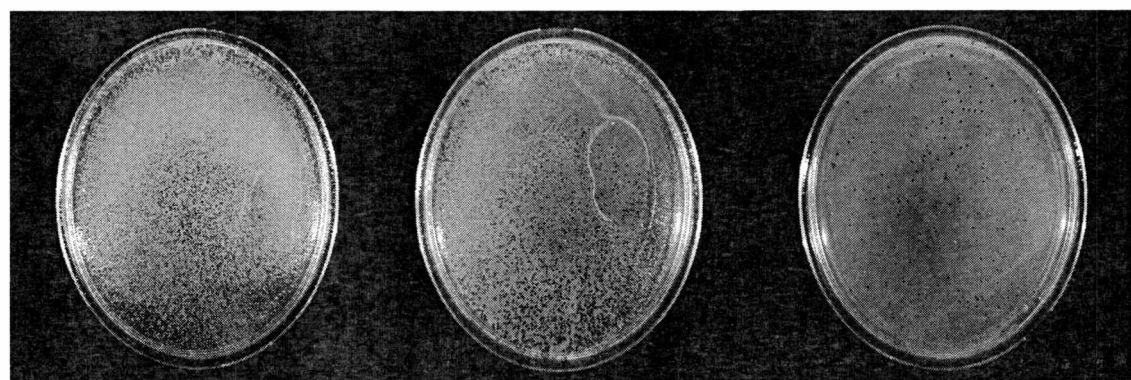
Όπως προκύπτει από τον πίνακα 4.4, μεγαλύτερη ευαισθησία στον φάγο A2 έδειξε η απομόνωση Pss9 καθώς έδωσε τις περισσότερες πλάκες στη δεκαδική αραιώση 10^{-7} , σε αντίθεση με την Pss7 που έδωσε τις λιγότερες, δείχνοντας έτσι μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από όλες τις απομονώσεις. Επίσης οι πλάκες όλων των βακτηριακών απομονώσεων ήταν καθαρές, κάτι που σημαίνει καλή τοξικότητα του φάγου A2 απέναντί τους.



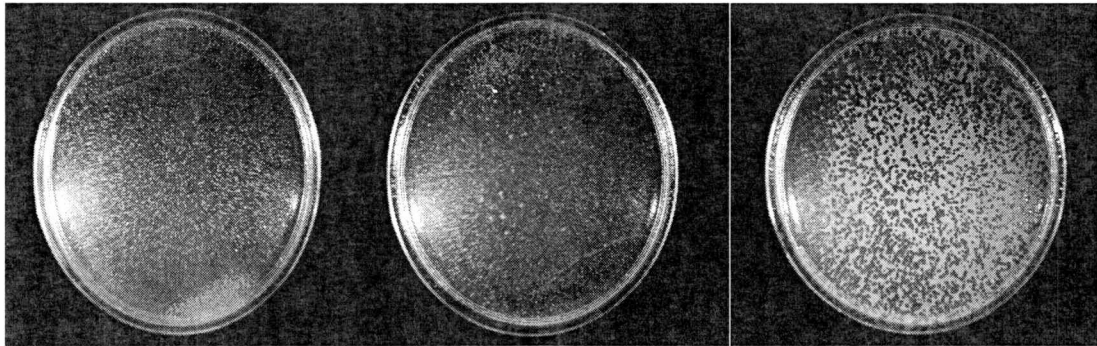
Εικόνα 4.17 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 6 με φάγο A2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



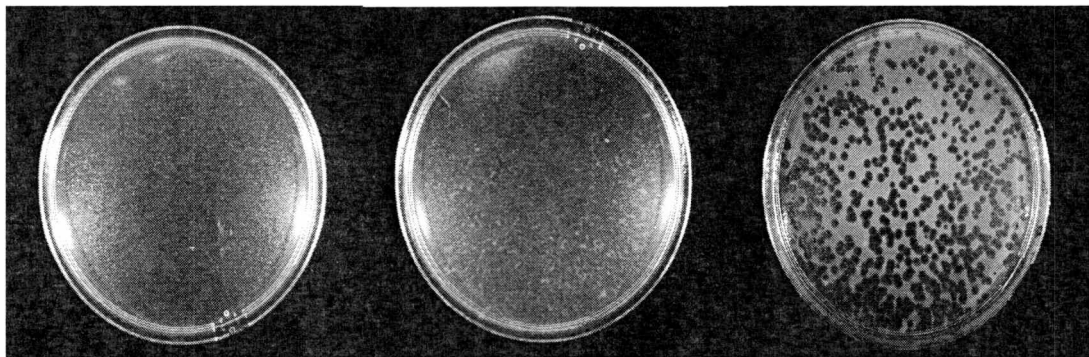
Εικόνα 4.18 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 7 με φάγο A2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



Εικόνα 4.19 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 8 με φάγο A2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



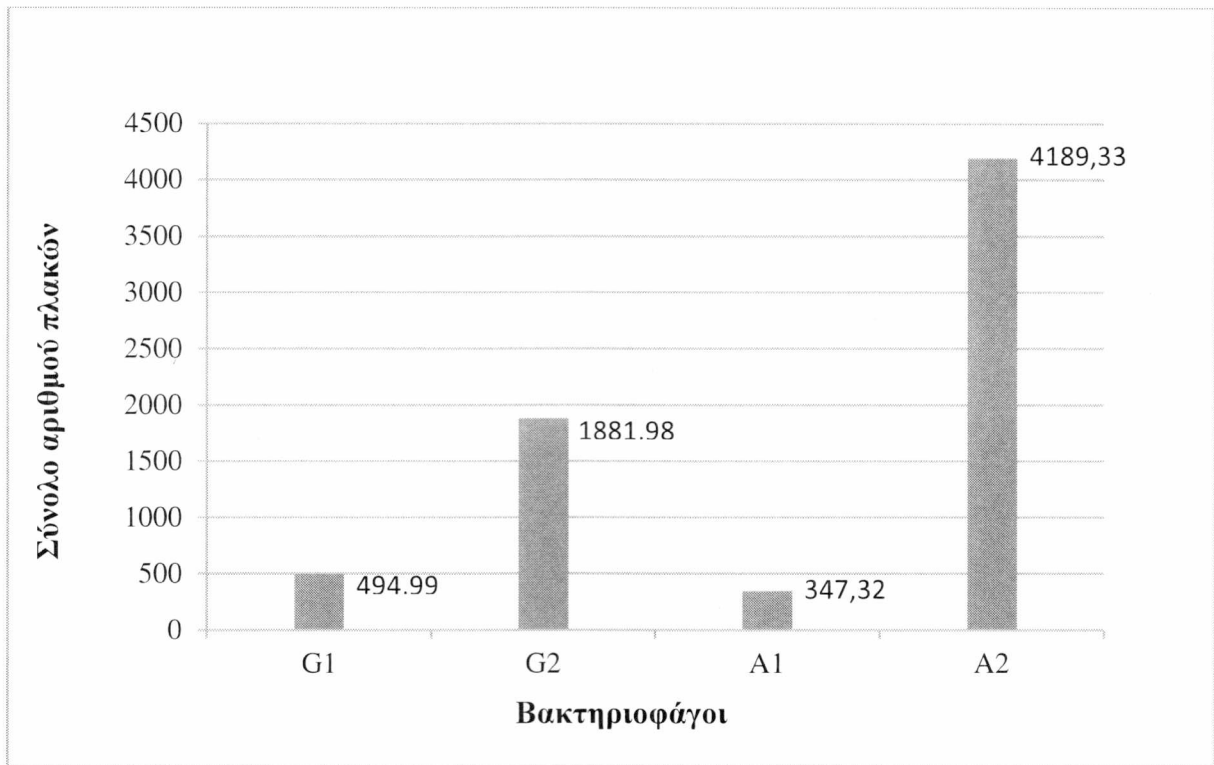
Εικόνα 4.20 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 9 με φάγο A2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.



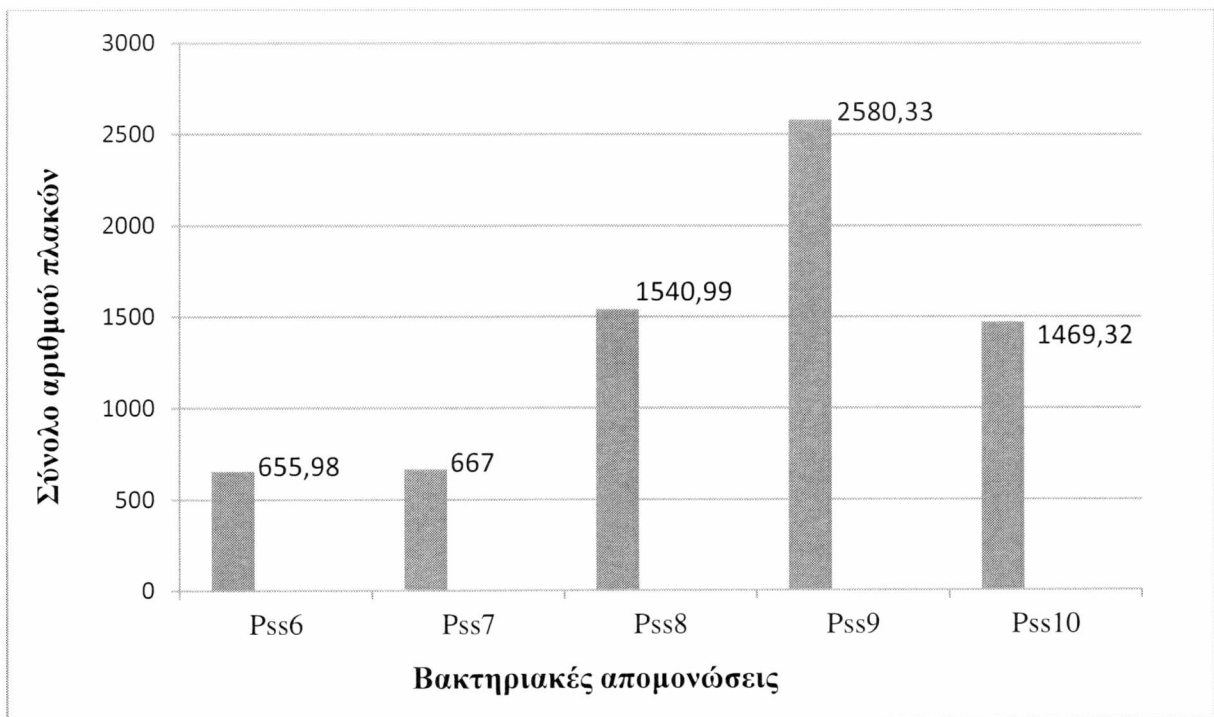
Εικόνα 4.21 Συνδυασμός απομόνωσης Pss 10 με φάγο A2. Πλάκες που προκάλεσε ο φάγος στις δεκαδικές αραιώσεις 10^{-5} , 10^{-6} και 10^{-7} , μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.

4.1.5 Φάσμα λύσης των G1,G2,A1 και A2 σε σχέση με τις βακτηριακές απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10

Στα γραφήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται το φάσμα λύσης των βακτηριοφάγων στο σύνολο των απομονώσεων, με βάση τον συνολικό αριθμό πλακών στη δεκαδική αραιώση 10^{-7} . Με αυτό τον τρόπο προκύπτει ο πιο τοξικός αλλά και λιγότερο τοξικός φάγος προς τις 5 βακτηριακές απομονώσεις. Επίσης παρουσιάζεται η ευαισθησία αλλά και ανθεκτικότητα των 5 βακτηριακών απομονώσεων, συνολικά και στους 4 βακτηριοφάγους. Αυτό προκύπτει από το σύνολο του αριθμού πλακών που έδωσε η κάθε βακτηριακή απομόνωση και στους 4 φάγους, στη δεκαδική αραιώση 10^{-7} .



Γράφημα 4.1 Σύνολο αριθμού πλακών του κάθε βακτηριοφάγου στις 5 βακτηριακές απομονώσεις, στη δεκαδική αραιώση 10^{-7} .



Γράφημα 4.2 Σύνολο αριθμού πλακών που έδωσε η κάθε βακτηριακή απομόνωση στους 4 βακτηριοφάγους, στη δεκαδική αραιώση 10^{-7} .

Σύμφωνα με το γράφημα 4.1 μεγαλύτερη τοξικότητα στις απομονώσεις Pss6, Pss7, Pss8, Pss9 και Pss10, με βάση το σύνολο του αριθμού πλακών στη δεκαδική αραιώση 10^{-7} , έδειξε ο βακτηριοφάγος A2 (4189,33), με τους G2 (1881,98), G1 (494,99) και A1 (347,32) να ακολουθούν. Όσον αφορά την ευαισθησία και την ανθεκτικότητα των βακτηριακών απομονώσεων απέναντι στους φάγους G1, G2, A1 και A2, από το γράφημα 4.2 συμπεραίνουμε πως ανθεκτικότερη όλων ήταν η απομόνωση Pss6, ενώ περισσότερο ευαίσθητη η Pss9.

4.2 Ταξινόμηση των βακτηριοφάγων έπειτα από παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τύπου διελεύσεως (T.E.M.)

Μετά από την παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τύπου διελεύσεως και τη λήψη φωτογραφιών των βακτηριοφάγων που εντοπίστηκαν, έγινε προσπάθεια ταξινόμησης αυτών. Η ταξινόμηση έγινε με βάση το μορφολογικό χαρακτηρισμό των φάγων, το σχήμα και το μέγεθός τους δηλαδή. Η μέτρηση του μεγέθους τους έγινε σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με το πρόγραμμα Motic Images Plus 2.0. Ωστόσο σύμφωνα με τη διεθνή επιτροπή για την ταξινόμηση των ιών (ICTV), για την ακριβή ταξινόμηση των βακτηριοφάγων, απαιτείται επιπλέον ο προσδιορισμός της σύνθεσης του νουκλεϊκού οξέος.

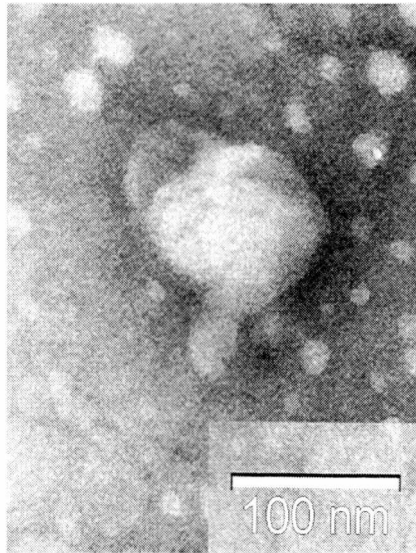
Τα δείγματα που εξετάστηκαν ήταν οι βακτηριοφάγοι G1, G2, A1 και A2. Παρά το γεγονός ότι οι φάγοι είχαν καθαριστεί με τη μέθοδο της μεταφοράς μεμονωμένης πλάκας για τουλάχιστον τρεις φορές, όπως αποδείχτηκε κατά την ηλεκτρονική μικροσκοπία σε κάθε δείγμα υπήρχαν περισσότερα από ένα είδη βακτηριοφάγων. Οπότε από εδώ και πέρα θα αναφέρονται ως απομονώσεις βακτηριοφάγων. Δυστυχώς όσον αφορά την απομόνωση G2 δεν καταφέραμε να δούμε κάτι.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι φωτογραφίες των βακτηριοφάγων που λήφθηκαν κατά την ηλεκτρονική μικροσκοπία, και γίνεται ταξινόμηση αυτών με βάση τον προσδιορισμό του σχήματος και του μεγέθους τους. Η ταξινόμηση βασίστηκε στην ένατη έκθεση της διεθνούς επιτροπής για την ταξινόμηση των ιών (King *et al.*, 2012).

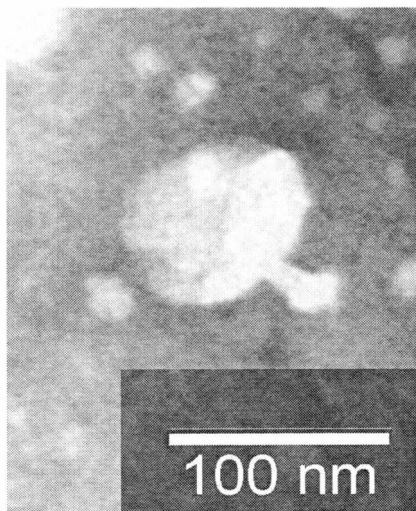
4.2.1 Ταξινόμηση βακτηριοφάγων της απομόνωσης G1

Στην απομόνωση G1 εντοπίστηκαν δύο διαφορετικά είδη βακτηριοφάγων. Και τα δύο είδη με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά ανήκουν στην οικογένεια *Podoviridae*. Ωστόσο με βάση τις διαστάσεις τους δεν ήταν δυνατό να ταξινομηθούν σε κάποιο από τα ήδη γνωστά γένη ή είδη.

Οικογένεια *Podoviridae*



Εικόνα 4.22 Φάγος G1-1 της οικογένειας *Podoviridae* που εντοπίστηκε στην απομόνωση G1.



Εικόνα 4.23 Φάγος G1-2 της οικογένειας *Podoviridae* που εντοπίστηκε στην απομόνωση G1.

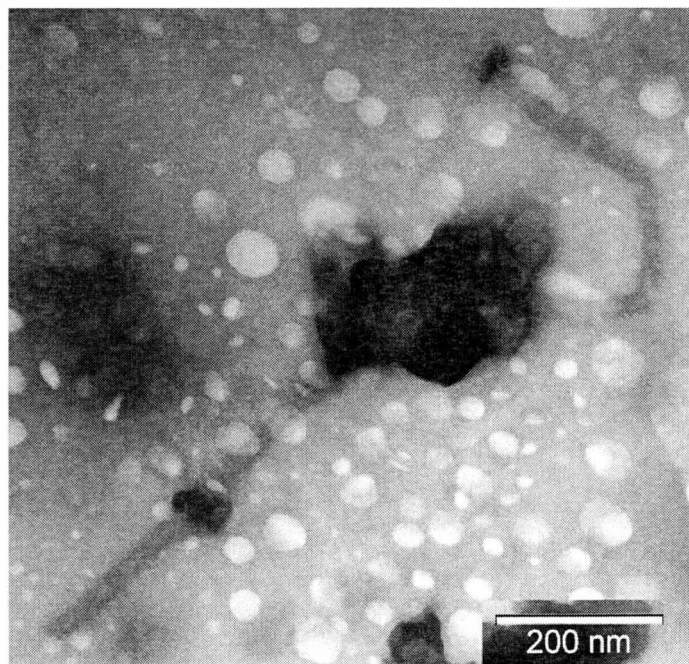
Η οικογένεια *Podoviridae* ανήκει στην τάξη *Caudovirales* και περιλαμβάνει φάγους με μικρές και μη συσταλτές ουρές. Οι κεφαλές είναι οι πρώτες που σχηματίζονται, και στη συνέχεια προστίθενται σε αυτές και τα τμήματα της ουράς. Το γονιδίωμά τους είναι δίκλωνο DNA (King *et al.*, 2012).

Ο βακτηριοφάγος της εικόνας 4.22 διαθέτει κεφαλή με διάμετρο 98 nm, και ουρά μήκους 37 nm και πλάτους 27 nm. Ο βακτηριοφάγος της εικόνας 4.23 έχει αντίστοιχα διάμετρο κεφαλής 90 nm, μήκος ουράς 30 nm και πλάτος ουράς 14 nm.

4.2.2 Ταξινόμηση βακτηριοφάγων της απομόνωσης A1

Στην απομόνωση A1 εντοπίστηκαν τέσσερα διαφορετικά είδη φάγων που με βάση τη μορφολογία τους ταξινομήθηκαν στις οικογένειες *Lipothrixviridae*, *Myoviridae*, *Fuselloviridae* και *Cystoviridae*.

Οικογένεια *Lipothrixviridae*

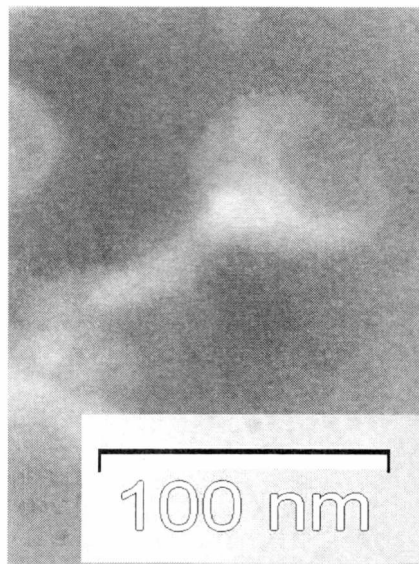


Εικόνα 4.24 Φάγος A1-1 της οικογένειας *Lipothrixviridae* που εντοπίστηκε στην απομόνωση A1. Στο κέντρο διακρίνονται πιθανά υπολείμματα βακτηριακών κυττάρων.

Η οικογένεια *Lipothrixviridae* περιλαμβάνει εύκαμπτους νηματοειδείς βακτηριοφάγους με γονιδίωμα δίκλωνο DNA (King *et al.*, 2012). Τα ισωμάτια στα άκρα τους φέρουν ειδικές δομές που διαφέρουν μεταξύ των γενών αλλά και μεταξύ των ειδών (Fauquet *et al.*, 2005).

Ο νηματοειδής βακτηριοφάγος της εικόνας 4.24 έχει μήκος 1241 nm και διάμετρο 26 nm.

Οικογένεια *Myoviridae*

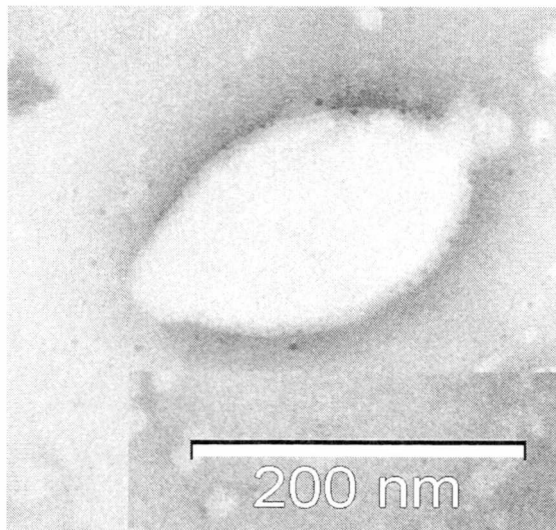


Εικόνα 4.25 Φάγος A1-2 της οικογένειας *Myoviridae* που εντοπίστηκε στην απομόνωση A1.

Η οικογένεια *Myoviridae* περιλαμβάνει βακτηριοφάγους με δίκλωνο DNA και συσταλή χοντρή ουρά. Η ουρά αποτελείται από ένα κεντρικό πυρήνα, ο οποίος ενσωματώνεται σε έξι υπομονάδες που περιβάλλονται από ελικοειδώς διατεταγμένη συσταλή θήκη. Η κεφαλή διαχωρίζεται από την ουρά με το λαιμό. Κατά τη διαδικασία της μόλυνσης η ουρά συστέλλεται με αποτέλεσμα να εξέρχεται ο κεντρικός πυρήνας ο οποίος έρχεται σε επαφή με τη βακτηριακή μεμβράνη (King *et al.*, 2012).

Στην εικόνα 4.25 εμφανίζεται ένας φάγος της οικογένειας *Myoviridae*, με διάμετρο κεφαλής 93 nm, μήκος ουράς 83 nm και πλάτος ουράς 23 nm.

Οικογένεια *Fuselloviridae*

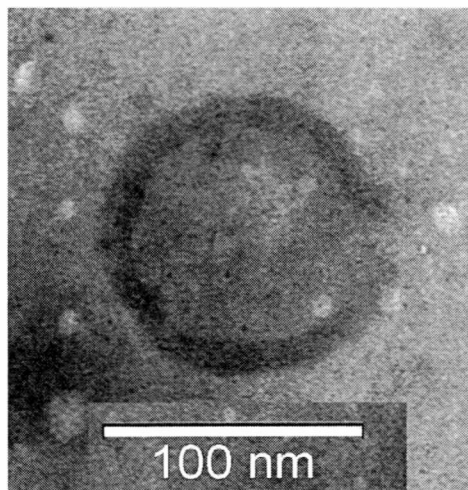


Εικόνα 4.26 Φάγος A1-3 της οικογένειας *Fuselloviridae* που εντοπίστηκε στην απομόνωση A1.

Τα ιοσωμάτια της οικογένειας *Fuselloviridae* έχουν λεμονοειδές σχήμα και κοντές ίνες που εφάπτονται στον ένα πόλο. Το γονιδίωμά τους είναι επίσης δίκλωνο DNA (King *et al.*, 2012).

Ο φάγος της εικόνας 4.26 έχει πλάτος 142 nm στη μικρή του διάσταση και μήκος 249 nm στη μεγάλη του διάσταση.

Οικογένεια *Cystoviridae*



Εικόνα 4.27 Φάγος A1-4 της οικογένειας *Cystoviridae* που εντοπίστηκε στην απομόνωση A1.

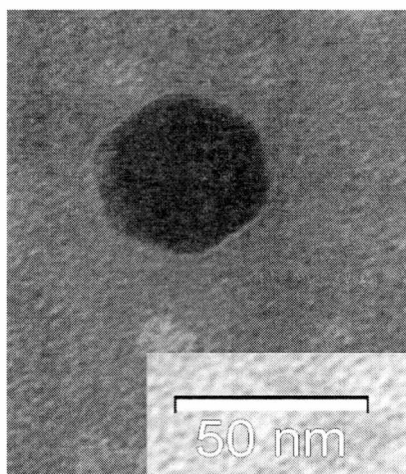
Τα ιοσωμάτια της οικογένειας *Cystoviridae* διαθέτουν ένα σφαιρικό περίβλημα το οποίο καλύπτεται από ακίδες. Επίσης διαθέτουν δίκλωνο RNA γονιδίωμα (King *et al.*, 2012).

Η διάμετρος του βακτηριοφάγου της εικόνας 4.27 που ανήκει στην οικογένεια *Cystoviridae* είναι 82 nm.

4.2.3 Ταξινόμηση βακτηριοφάγων της απομόνωσης A2

Η απομόνωση A2 περιείχε δύο διαφορετικά είδη φάγων όπου σύμφωνα με τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά συγκαταλέγονται στις οικογένειες *Corticoviridae* και *Microviridae*.

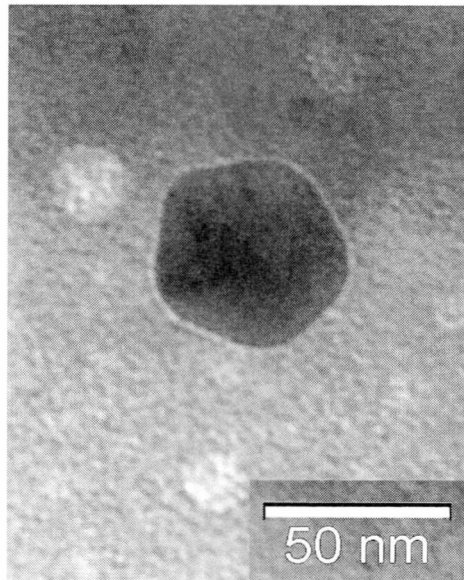
Οικογένεια *Corticoviridae*



Εικόνα 4.28 Φάγος A2-1 της οικογένειας *Corticoviridae* που εντοπίστηκε στην απομόνωση A2.

Τα μέλη της οικογένειας *Corticoviridae* είναι φάγοι χωρίς ουρά, εικοσαεδρικά ιοσωμάτια, και το γονιδίωμά τους είναι δίκλωνο DNA (King *et al.*, 2012).

Ο φάγος της εικόνας 4.28 ανήκει στην οικογένεια *Corticoviridae* και έχει διάμετρο πλευρά-πλευρά 43nm.



Εικόνα 4.29 Φάγος A2-2 της οικογένειας *Microviridae* που εντοπίστηκε στην απομόνωση A2.

Οι βακτηριοφάγοι της οικογένειας *Microviridae*, δεν διαθέτουν ουρά, χαρακτηρίζονται από εικοσαεδρική συμμετρία και το γονιδίωμά τους είναι μονόκλωνο DNA (King *et al.*, 2012).

Η διάμετρος του φάγου της εικόνας 4.29 ανέρχεται στα 55 nm και ανήκει στην οικογένεια *Microviridae*.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με βάση τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών προκύπτει πως η κάθε απομόνωση φάγου (G1,G2,A1,A2) έδινε διαφορετικά αποτελέσματα σε κάθε μια από τις 5 βακτηριακές απομονώσεις (Pss6, Pss7, Pss8, Pss9, Pss10), όχι μόνο ως προς τον αριθμό των πλακών αλλά και ως προς τη μορφή και το μέγεθος των πλακών. Αυτό ενισχύει και επαληθεύει την άποψη σύμφωνα με την οποία το εύρος ξενιστών των φάγων μπορεί είναι αρκετά περιορισμένο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν περιορίζεται απλά σε ένα μόνο βακτηριακό γένος ή είδος, αλλά σε ένα περιορισμένο αριθμό στελεχών του ίδιου είδους (Gill and Abedon, 2003).

Παρά το γεγονός ότι η κάθε απομόνωση των βακτηριοφάγων είχε καθαριστεί τουλάχιστον τρεις φορές (μέθοδος μεταφοράς μεμονωμένης πλάκας), έτσι ώστε να

απομονωθεί ένας βακτηριοφάγος από κάθε απομόνωση, η ηλεκτρονική μικροσκοπία έδειξε πως αυτό δε συνέβη. Πιο συγκεκριμένα από τα αποτελέσματα της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας προέκυψε πως στην απομόνωση φάγων G1 εντοπίστηκαν δύο διαφορετικά είδη της ίδιας οικογένειας, στην απομόνωση A1 τέσσερα διαφορετικά είδη τεσσάρων οικογενειών, και στην απομόνωση A2 δύο διαφορετικά είδη φάγων σε δύο οικογένειες. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό το φαινόμενο είναι η λυσιγονία. Κάποιοι βακτηριοφάγοι να βρίσκονται δηλαδή στα βακτηριακά κύτταρα του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, στην κατάσταση του προφάγου (αδρανή κατάσταση), και ξαφνικά για κάποιο λόγο να εισήλθαν σε λυτικό κύκλο, με αποτέλεσμα τη λύση των βακτηριακών κυττάρων και την απελευθέρωση νέων ιοσωματίων (Guttman *et al.*, 2005).

Κατά την ταξινόμηση των φάγων που μολύνουν το *P. savastanoi* pv. *savastanoi* έπειτα από ηλεκτρονική μικροσκοπία, προέκυψαν οκτώ διαφορετικοί βακτηριοφάγοι και επτά οικογένειες (*Podoviridae*, *Lipothrixviridae*, *Myoviridae*, *Fuselloviridae*, *Cystoviridae*, *Corticoviridae* και *Microviridae*). Σύμφωνα με τους ήδη γνωστούς βακτηριοφάγους που μολύνουν είδη του γένους *Pseudomonas*, στην οικογένεια *Podoviridae* συμπεριλαμβάνεται ο βακτηριοφάγος □IBB-PF7A που μολύνει το *Pseudomonas fluorescens* (Sillankorva *et al.*, 2011), ο Bf7 ο οποίος μολύνει το *Pseudomonas tolaasii* (Sajben-Nagy *et al.*, 2012), ο □RSB1 που μολύνει το *Pseudomonas solanacearum* (Fujiwara *et al.*, 2011), και οι φάγοι LUZ24, LUZ7 και LIT1 του *Pseudomonas aeruginosa* (Ceyssens, 2009). Επίσης στην οικογένεια *Myoviridae* συγκαταλέγεται ο □RSA1 που μολύνει το *Pseudomonas solanacearum* (Fujiwara *et al.*, 2011) και ο Lu11 του *Pseudomonas putida* (Adriaenssens *et al.*, 2012).

Για την ασφαλή ταξινόμηση και κατάταξη ωστόσο απαραίτητη είναι ανάλυση και ο προσδιορισμός του νουκλεϊκού οξέος των βακτηριοφάγων, μέσω κάποιας μοριακής τεχνικής.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά λοιπόν τέσσερις απομονώσεις βακτηριοφάγων δοκιμάστηκαν ως προς το φάσμα λύσης τους σε πέντε βακτηριακές απομονώσεις του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν διέφεραν ως προς την τοξικότητα των φάγων και ως προς την ανθεκτικότητα των βακτηριακών απομονώσεων. Διαφορετικός αριθμός πλακών δηλαδή και διαφορετικός μορφολογικός χαρακτηρισμός μεταξύ των εκάστοτε βακτηριοφάγων και των απομονώσεων του *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Πιο συγκεκριμένα τοξικότερος βακτηριοφάγος βρέθηκε πως είναι ο A2, έπειτα ο G2, ο G1 και τελευταίος ο A1. Ανθεκτικότερη βακτηριακή απομόνωση αποδείχτηκε πως είναι η Pss6, με τις Pss7, Pss10 και Pss8 να ακολουθούν, ενώ μεγαλύτερη ευαισθησία στην προσβολή των βακτηριοφάγων έδειξε η Pss9.

Από την ηλεκτρονική μικροσκοπία και την ταξινόμηση των βακτηριοφάγων προέκυψε πως στην απομόνωση G1 απαντώνται δύο διαφορετικά είδη που ανήκουν στην οικογένεια *Podoviridae*, στην απομόνωση A1 βρέθηκαν τέσσερα διαφορετικά είδη που ταξινομήθηκαν στις οικογένειες *Lipothrixviridae*, *Myoviridae*, *Fuselloviridae* και *Cystoviridae*, και στην απομόνωση A2 δύο διαφορετικά είδη που ανήκουν στις οικογένειες *Corticoviridae* και *Microviridae*.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βερίλλης, Π. (2015). *Οπτική και Ηλεκτρονική Μικροσκοπία*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος
- Παναγόπουλος, Χ.Γ. (2007). *Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων & Αμπέλου*. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα
- Adams, M.H. (1959). *Bacteriophages*. Interscience publishers, New York
- Ackermann, H. (2006). Classification of Bacteriophages. *In The Bacteriophages SECOND EDITION*. R. Calendar Ed. Oxford University Press, New York, USA, pp. 8-16.
- Ackermann, H.W. (2006). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol*. 152, 227-43.
- Abedon, S. and Yin, J. (2008). Impact of spatial structure on phage population growth. *In Bacteriophage Ecology Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses*. S. Abedon Ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 94-113.
- Ackermann, H., and Heldal, M. (2010). Basic electron microscopy of aquatic viruses. *MAVE Chapter* 18, 182–192.
- Adriaenssens, E., Mattheus, W., Cornelissen, A., Shaburova, O., Krylov, V., Kropinski, A., and Lavigne, R. (2012). Complete Genome Sequence of the Giant Pseudomonas Phage Lu11. *Journal of Virology* 86, 6369–6370.
- Aragon, I., Perez-Martinez, I., Moreno-Perez, A., Cerezo, M., and Ramos, C. (2014). New insights into the role of indole-3-acetic acid in the virulence of Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi. *FEMS Microbiol Lett* 356, 184–192.
- Balogh, B., Jones, J., Momol, M., Olson, S., Obradovic, A., King, P., and Jackson, L. (2003). Improved Efficacy of Newly Formulated Bacteriophages for Management of Bacterial Spot on Tomato. *Plant Dis*. 87, 949-954.
- Bozkurt, I., Soylu., S., Mirik, M., Ulubas Serce, C., and Baysa, O. (2014). Characterization of bacterial knot disease caused by Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi on pomegranate (Punica granatum L.) trees: a new host of the pathogen. *Letters in Applied Microbiology* 59, 520-527.
- Comai, L., and Kosuge, T. (1980). Involvement of Plasmid Deoxyribonucleic Acid in Indoleacetic Acid Synthesis in Pseudomonas savastanoi. *Journal of Bacteriology*, 143, 950-957.

- Casjens, S. and Hendrix, R. (1988). Control mechanisms in dsDNA bacteriophage assembly. In *The Bacteriophages Volume 1*. R. Calendar Ed. Plenum Press, New York, USA, pp. 15-75.
- Campos, A., Costa, G., Varela Coelho, A., and Fevereiro, P. (2009). Identification of bacterial protein markers and enolase as a plant response protein in the infection of *Olea europaea* subsp. *europaea* by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Eur J Plant Pathol* 125, 603–616.
- Ceyssens, P.J. (2009). *Isolation and characterization of lytic bacteriophages infecting Pseudomonas aeruginosa*. Unpublished BSc (Hons) dissertation, University of Leuven, Leuven
- Erskine, J. (1973). Characteristics of *Erwinia amylovora* bacteriophage and its possible role in the epidemiology of fire blight. *Canadian Journal of Microbiology* 19, 73-134.
- Egerton, R. (2005). *Physical Principles of Electron Microscopy An Introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer Science, New York
- Fauquet, C., Mayo, M., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L. (eds.). (2005). *Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Inc, USA
- Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T. (2011). Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by Treatment with Lytic Bacteriophages. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 77, 4155–4162.
- Gill, J., and Abedon, S.t. (2003). Bacteriophage Ecology and Plants. *APSnet Feature*, 2003-1103.
- 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, 1-12.
- Jones, J., Vallad, G., Iriarte, F., Obradović, A., Wernsing, M., Jackson, L., Balogh, B., Hong, J., and Momol, M. (2012). Considerations for using bacteriophages for plant disease control. *Bacteriophage* 2, 208–214.
- Kutter, E. and Sulakvelidze, A. (eds.). (2005). *BACTERIOPHAGES Biology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, Florida

- Kim, M., Park, S., and Kim, Y. (2011). Bacteriophages of *Pseudomonas tolaasii* for the Biological Control of Brown Blotch Disease. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54, 99-104.
- King, A., Adams, M., Carstens, E. and Lefkowitz, E. (eds.). (2012). *Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Inc, USA
- McKenna, F., El-Tarabily, K., Hardy, G., and Dell, B. (2001). *Plant Pathology* 50, 666-675.
- Leiman, P., Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V., Arisaka, F., and Rossmann, M. (2003). Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2356–2370.
- Marchi, G., Viti, C., Giovannetti, L., and Surico, G. (2005). Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy. *European Journal of Plant Pathology* 112, 101–112.
- Miller, R. and Day, M. (2008). Contribution of lysogeny, pseudolysogeny, and starvation to phage ecology. In *Bacteriophage Ecology Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses*. S. Abedon Ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 114-146.
- Marchi, G., Mori, B., Pollacci, P., Mencuccini, M., and Surico, G. (2009). Systemic spread of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive explants. *Plant Pathology* 58, 152–158.
- Murugaiyan, S., Bae, J., Wu, J., Lee, S., Um, H., Choi, H., Chung, E., Lee, J., and Lee, S. (2010). Characterization of filamentous bacteriophage PE226 infecting *Ralstonia solanacearum* strains. *Journal of Applied Microbiology* 110, 296–303.
- 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.
- Maldonado-González, M., Prieto, P., Ramos, C., and Mercado-Blanco, J. (2013). From the root to the stem: interaction between the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7 and the pathogen *Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335 in olive knots. *Microbial Biotechnology* 6, 275–287.
- 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.
- 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 \square Pto-bp6g, a novel phage that lyses *Pseudomonas tolaasii* causing brown blotch disease in mushrooms. *Journal of Microbiological Methods* 91, 514–519.
- Novik, S., and Savich, V. (2105) Bacteriophages of *Pseudomonas* bacteria: application in medicine and agriculture. *FORMATEX*, 295-304.
- Obradovic, A., Jones, J., Momol, M., Olson, S., Jackson, L., Balogh, B., Guven, K., and Iriarte, F. (2005). Integration of Biological Control Agents and Systemic Acquired Resistance Inducers Against Bacterial Spot on Tomato. *Plant Dis.* 89, 712-716.
- Quesada, J., Perez-Martinez, I., Ramos, C., Lopez, M., and Penyalver, R. (2008). IS53: an insertion element for molecular typing of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Research in Microbiology* 159, 207-215.
- Quesada, J., Penyalver, R., Pérez-Panadés, J., Salcedo, C., Carbonell, E., and López, M. (2010). Comparison of chemical treatments for reducing epiphytic *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and for improving subsequent control of olive knot disease. *Crop Protection* 29, 1413-1420.
- Quesada, J., Penyalver, R., Perez-Panades, J., Salcedo, C., Carbonell, E., and Lopez, M. (2010). Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease. *Plant Pathology* 59, 262–269.
- Randhawa, P., and Civerolo, E. (1986). Interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* with Pruniphage and Epiphytic Bacteria on Detached Peach Leaves. *Ecology and Epidemiology* 76, 549-553.
- Rodríguez-Moreno, L., Barceló-Muñoz, A., and Ramos, C. (2008). In Vitro Analysis of the Interaction of *Pseudomonas savastanoi* pvs. *savastanoi* and *nerii* with Micropropagated Olive Plants. *Phytopathology* 98, 815-822.
- Rodríguez-Palenzuela, P., Matas, I., Murillo, J., López-Solanilla, E., Bardaji, L., Pérez-Martínez, I., Rodríguez-Mosquera, M., Penyalver, R., López, M., Quesada, J., Biehl, B., Perna, N., Glasner, J., Cabot, L., Neeno-Eckwall, E. and Ramos, C. (2010). Annotation and overview of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts. *Environmental Microbiology* 12, 1604–1620.

- 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.
- Smidt, M., and Kosuge., T. (1978). The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha methyl tryptophan-resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders. *Physiological Plant Pathology* 13, 203-214.
- Surico, G., Iacobellis, N., and Sisto, A. (1985). Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Physiological Plant Pathology* 26, 309-320.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning A laboratory manual-volume I*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria*. APS PRESS, Minnesota
- Scortichini, M., Rossi, M., and Salerno, M. (2004). Blackwell Publishing, Ltd. Relationship of genetic structure of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations from Italian olive trees and patterns of host genetic diversity. *Plant Pathology* 53, 491–497.
- 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., Kluskens, L., Lingohr, E., Kropinski, A., Neubauer, P., and Azeredo, J. (2011). Complete genome sequence of the lytic *Pseudomonas fluorescens* phage jIBB-PF7A. *Virology Journal* 8, 142.
- Teviotdale, B., and Krueger, W. (2004). Effects of Timing of Copper Sprays, Defoliation, Rainfall, and Inoculum Concentration on Incidence of Olive Knot Disease. *Plant Dis.* 88, 131-135.
- Tegli, S., Cerboneschi, 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.
- Young, J. (2004). Olive knots and its pathogens. *Australasian Plant Pathology* 33, 33-39.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000134366