ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ
ΓΕΩΠΟΝΩΝ

TECHNOLOGICAL
EDUCATIONAL
INSTITUTE *of* CRETE
SCHOOL of AGRICULTURE FOOD
and NUTRITION
DEPARTMENT of AGRICULTURE

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS* ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΑΙΤΙΟΥ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΕΛΚΟΥΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ 2010-2013



ΜΑΡΙΑ ΑΝΤΑΛΟΥΔΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ. ΓΚΟΥΜΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2014

ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΔΡ. ΓΚΟΥΜΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΓΚΑΤΖΙΛΑΚΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ

ΓΟΥΤΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ

ΤΟ ΕΡΓΟ ΑΥΤΟ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΤΟΥ ΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ

Στους ανθρώπους μου, που τόσο με αγαπούν και με στηρίζουν.
Ιδιαίτερα στην πολυαγαπημένη μου κόρη Μαρίσα.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Βακτηριολογίας του τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων, της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας και Τεχνολογίας Τροφίμων, του ΤΕΙ Κρήτης με την επιστημονική υποστήριξη του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας. Αυτή τη στιγμή που το έργο έχει ολοκληρωθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εισηγητή καθηγητή Δρ. Γκούμα Δημήτριο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εμπλακώ σε ερευνητική δραστηριότητα με την ανάθεση της πτυχιακής εργασίας στο εργαστήριό του και να αποκτήσω με αυτό τον τρόπο εμπειρίες πολύτιμες καθώς και βασικές εργαστηριακές γνώσεις στον τομέα της Βακτηριολογίας. Η υποστήριξη και εμπιστοσύνη που μου επέδειξε έχουν ανεκτίμητη αξία για μένα.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές που είχα καθ'όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, ιδιαίτερα τους καθηγητές και συνεργάτες των εργαστηρίων Βακτηριολογίας και Φυτοπαθολογίας καθώς και της Βιοτεχνολογίας για την πολύτιμη βοήθεια και το χρόνο που μου προσέφεραν. Τέλος, αναμφίβολα πολλά ευχαριστώ αξίζουν η κόρη μου Μαρίσα και γενικότερα η οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση τη στήριξη και την αγάπη που μου πρόσφεραν κατά την διάρκεια των σπουδών μου, καθώς όλοι τους πίστεψαν στις δυνατότητες μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟ ..... **V**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ..... **VI**

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ ..... **VVIIII**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ..... **IIX**

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ **1**

1.1 Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ 1

1.2 ΤΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP.*MICHIGANENSIS* 2

1.3 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ 5

1.4 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *CMM*. 9

1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ 11

1.6 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ 12

1.6.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΑ ΜΕΤΡΑ 12

1.6.2 ΧΡΗΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ 13

1.6.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ 14

1.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *CMM* 16

1.7.1 ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ 16

1.7.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ, POLYMERASECHAINREACTION (PCR) 17

1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 20

2 ΥΛΙΚΑ **21**

2.1 ΕΞΑΓΩΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ 21

2.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ 25

2.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ 26

2.3.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΥΠΕΡΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΕ ΦΥΤΑ *MIRABILIS JALAPA* 26

2.3.2 ΤΕΧΝΗΤΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΣΕ ΣΠΟΡΟΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ 26

2.3.3 ΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΕ M-SCM 26

2.4 ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ 27

2.5 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *CMM*. 27

2.5.1 Επενβαση με λυσοζυμη για την λυση των βακτηριακων κυτταρων των βακτηριακων στελεχων *Cmm.* 27
2.5.2 Απομονωση γενωμικου DNA απο βακτηριακα κυτταρα *Cmm.* 28
2.5.3 Ηλεκτροφορηση απομονωμενου DNA σε πηκτωμα αγαροζης 29
2.5.4 Φωτομετρηση των δειγματων 29
2.5.5 Αλυσιδωτη αντιδραση πολυμερασης (Polymerase Chain Reaction, pcr)..... 29
2.5.6 Εκκινητες που χρησιμοποιηθηκαν για τις αντιδρασεις pcr 30
2.6 CMM-PCR και PSA-PCR 31
2.7 Επιβεβαιωση των προιοντων της pcr με ηλεκτροφορηση σε πηκτωμα αγαροζης 32

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 33
3.1 Ελεγχος απομονωσεων 33
3.2 Δοκιμες Παθογενειας 34
3.2.1 Αντιδραση υπερευαισθησιας σε φυτα Mirabilis jalapa 34
3.2.2 Τεχνητες μολυνσεις σε σποροφυτα τοματας 35
3.3 Αποτυπωμα μολυσμενου φυτικου ιστου σε εκλεκτικο θρεπτικο υποστρωμα m-SCM. 37
3.4 Ορολογικη ταυτοποιηση..... 38
3.5 Επιλογη στελεχων για μοριακη ταυτοποιηση..... 38
3.6 Μοριακη ταυτοποιηση απομονωσεων του βακτηριου *Cmm.* 41
3.6.1 Ανιχνευση απομονωμενων DNAσε πηκτωμα αγαροζης..... 41
3.7 Αποτελεσματα με τους εκκινητες CMM-PCR και PSA-PCR 42
3.7.1 CMM5 / CMM6 – PCR..... 42
3.7.2 PSA-4/PSA-R-PCR 43
3.8 Συσχετιση βακτηριακων στελεχων και εξειδικευμενων εκκινητων που χρησιμοποιηθηκαν 45

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ 49

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 50

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

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

Σύντμηση	**Πλήρες όνομα**
Cmm	*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το **«βακτηριακό έλκος»** αποτελεί μία από τις πιο σοβαρές ασθένειες που αντιμετωπίζει η τομάτα σήμερα. Πρόκειται για μία πολύ σοβαρή αδροβακτηρίωση η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά στις ΗΠΑ το 1909 ενώ στην Ελλάδα διαπιστώθηκε για πρώτη φορά το 1958 στην περιοχή της Πρέβεζας και έκτοτε έχει εξαπλωθεί σε όλη τη χώρα. Οι προσβολές της ασθένειας μπορεί να είναι διασυστηματικές και τοπικές και τα συμπτώματα που προκαλούν είναι: η μάρανση με μορφή ημιπληγίας στα φύλλα, κίτρινος μέχρι καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του βλαστού, επιμήκη ανοικτά έλκη στους βλαστούς, κ.α.

Το *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* είναι το παθογόνο αίτιο αυτής της ασθένειας το οποίο είναι ένα κορυνόμορφο βακτήριο, θετικό κατά Gram, δεν έχει αυτόνομη κίνηση, παρουσιάζει αργή ανάπτυξη και οι αποικίες που σχηματίζει έχουν ανοιχτό κίτρινο χρώμα. Στη μελέτη αυτή αναλύονται βακτηριακά στελέχη του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που υπήρχαν στη συλλογή του εργαστηρίου Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης και που έχουν προέλθει από διάφορες περιοχές της Ελλάδας κατά το χρονικό διάστημα 2010 έως 2013 καθώς και στελέχη που απομονώθηκαν στη διάρκεια του πειράματος. Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να γίνει μελέτη του φαινοτυπικού τους προφίλ αλλά και ο έλεγχος της παθογένεια τους με τεχνητές μολύνσεις σε φυτά τομάτας. Περαιτέρω θα εφαρμοστεί η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των βακτηριακών κυττάρων. Τέλος θα προχωρήσουμε σε μοριακή ταυτοποίηση των απομονώσεων με μεθοδολογίες όπως η PCR με την χρήση εξειδικευμένων, για το συγκεκριμένο βακτήριο, εκκινητών (CMM5/CMM6 και PSA-4/PSA-R).

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η Ασθένεια

Η ασθένεια που στα ελληνικά είναι γνωστή με τις ονομασίες **«βακτηριακό έλκος της τομάτας»** ή **«κορυνοβακτηρίωση»** προκαλείται από το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Η ονομασία του παθογόνου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) προέρχεται από την πολιτεία Michigan των Η.Π.Α. όπου βρέθηκε για πρώτη φορά το 1909, ενώ φαίνεται πως η ασθένεια ήταν γνωστή στη ΝέαΥόρκη από το 1892 με διάφορα ονόματα (Grand Rapinds disease, stem rot bacterial tomato wilt, bird's eyes pot). Το κοινό όνομα της ασθένειας στην αγγλική γλώσσα είναι Bacterial canker, στη γαλλική Chancre bacterien, στη γερμανική Bacterien welke, ενώ στην Ισπανική Cancro batterico. Πρόκειται για μια πολύ σοβαρή τυπική αδροβακτηρίωση, η οποία υπάρχει σχεδόν σε όλες τις περιοχές που καλλιεργείται η τομάτα (Εικόνα 1). Οι ζημιές από την ασθένεια μπορεί να φτάσουν το 70 έως και το 80% της παραγωγής (Παναγόπουλος, 1992). Στην Ελλάδα διαπιστώθηκε για πρώτη φορά στην περιοχή της Πρέβεζας το 1958, ενώ σήμερα έχει εξαπλωθεί σε όλη τη χώρα και αποτελεί σοβαρό πρόβλημα τόσο στις υπαίθριες όσο και στις υπό κάλυψη τοματοκαλλιέργειες. Για το λόγο αυτό στην Ε.Ε. και σε άλλες χώρες θεωρείται «παθογόνο καραντίνας» (Leon *et al*., 2011; Παναγόπουλος, 2000; Μπαγκής & Γκούμας, 2012).



***Εικόνα*Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**.*: Φυτά τομάτας με έντονα συμπτώματα μάρανσης και ξήρανσης σε προσβολής από Cmm, σε συμβατική και υδροπονική καλλιέργεια. (Αρχείο καθ. Γκούμα Δ.,ΤΕΙ Κρήτης)*

Παρόλο που η τομάτα είναι ο πιο σημαντικός ξενιστής, προσβολές από το παθογόνο έχουν εντοπιστεί επίσης και σε κάποια άλλα είδη του γένους *Solanum* όπως: *Solanum nigrum*, *Solanum douglasii*, *Solanum trifolium* και *Solanum mammosum* (Anonymous, 2005). Τέλος, ως ξενιστές του παθογόνου σε τεχνητές ή φυσικές μολύνσεις αναφέρονται ακόμη τα φυτά *Solanum melongena*, *Capsicum frutescens*, *Chypomandrabetaceae* αλλά και διάφορα είδη των γενών *Solanum* και *Nicotiana* (Kado, 2010).

1.2 Το παθογόνο βακτήριο Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*

Η ασθένεια το «**βακτηριακό έλκος της τομάτας**» προκαλείται από το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) με προγενέστερες συνώνυμες ονομασίες: *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* (Smith) Jensen και *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* (Smith). Ταξονομικά, ανήκει στην οικογένεια *Microbacteriaceae* (Σχήμα 1.1).

Σχήμα 1.1: Συστηματική ταξινόμηση του παθογόνου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Kingdom: Monera

Division: Actinobacteria

Class: High GH Gram+

Subclass: Actinobacteridae

Order: Actinomycetales

Suborder: Micrococcineae

Family: *Microbacteriaceae*

Genus: *Clavibacter*

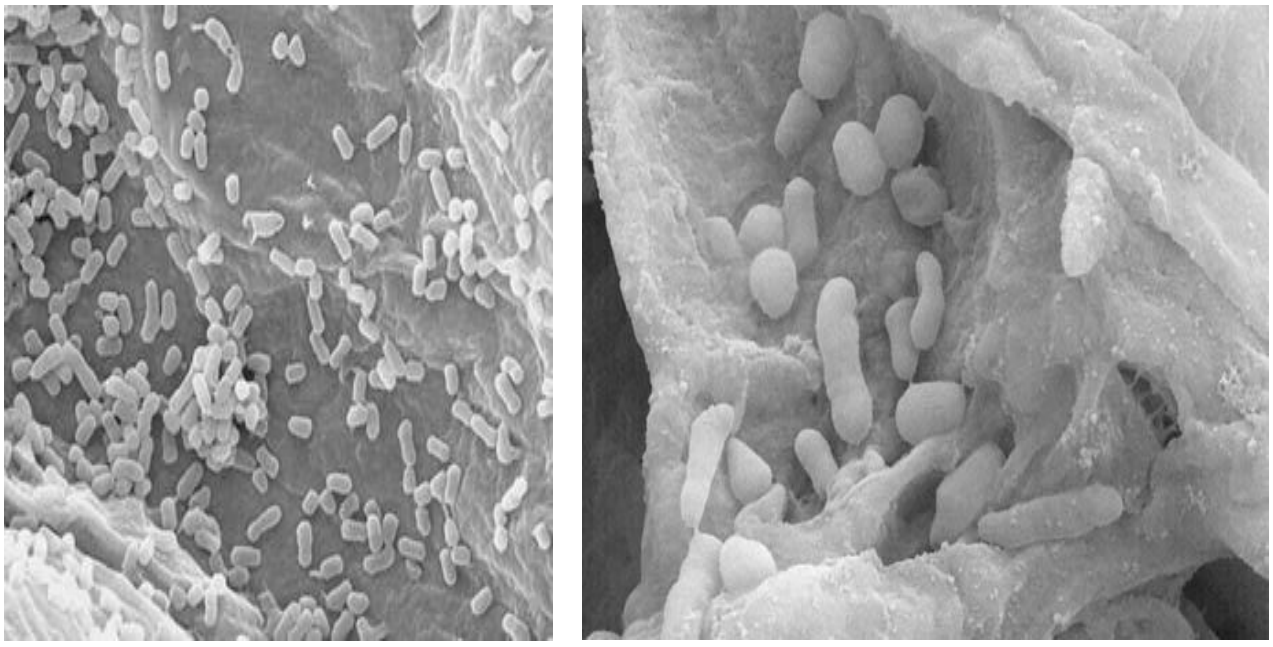
Species: *Clavibacter michiganensis*

Subspecies: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Σε επίπεδο γένους η ταξινόμηση βασίζεται στην παρουσία του 2,4-διαμινοβουτυρικού οξέος στις πεπτιδογλυκάνες του κυτταρικού τοιχώματος. Το γένος *Clavibacter* περιλαμβάνει ένα είδος με 5 υποείδη των οποίων ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφοροποίηση τους ως προς τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, την πρωτεϊνική τους κατατομή, τις ορολογικές αντιδράσεις και το εύρος των ξενιστών (Louws *et al*., 1998). Τα 5 υποείδη προσβάλλουν τους παρακάτω ξενιστές (Gartemann *et al*., 2003):

Clavibacter michiganensis subsp. *sependonicus* με ξενιστή την πατάτα,
Clavibacter michiganensis subsp. *nebraskensis* με ξενιστή τον αραβόσιτο,
Clavibacter michiganensis subsp. *tesselarius* με ξενιστή το σιτάρι
Clavibacter michiganensis subsp. *insidiosus* με ξενιστή τη μηδική

Το *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* είναι ένα βακτήριο που μορφολογικά όταν μολύνει τον ξενιστή, έχει κατά κανόνα σχήμα κορύνης. Είναι θετικό κατά Gram, παρουσιάζει αργή ανάπτυξη, δε φέρει μαστίγια επομένως στερείται την αυτόνομη κίνηση και έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 26 ^{o}C με ελάχιστη τους 11 ^{o}C και μέγιστη τους 35 ^{o}C. Τα βακτηριακά κύτταρα στην καλλιέργεια διατάσσονται σε χαρακτηριστικά σχήματα V και Y και οι αποικίες που σχηματίζει έχουν ανοικτό κίτρινο λαμπερό χρώμα στα συνηθισμένα υποστρώματα ανάπτυξης όπως το NAG-Nutrient Agar Glucose (Murtaza, 2009), (Εικόνα 2). Το παθογόνο αυτό μπορεί να επιβιώσει για πολλούς μήνες σε μολυσμένα υπολείμματα της καλλιέργειας τα οποία είναι στην επιφάνεια του εδάφους, παρά σε υπολείμματα τα οποία βρίσκονται μέσα στο έδαφος. Το βασικότερο όμως σημείο επιβίωσης του παθογόνου είναι ο σπόρος και το βασικότερο μέσο διασποράς του μολύσματος είναι τα νεαρά σπορόφυτα που μεταφέρονται σε αμόλυντες περιοχές με λανθάνουσες μολύνσεις (Anonymus, 2005; Leon *et al*., 2011; Μπαγκής και Γκούμας, 2012).



Εικόνα2*: Βακτηριακά κύτταρα του Cmm σε ιστούς φυτού τομάτας http://bacmap.wishartlab.com και http://www.oardc.ohio-state.edu/.*

1.3 Συμπτώματα της ασθένειας

Το παθογόνο προκαλεί ποικίλα συμπτώματα στους ξενιστές του. Η εμφάνιση και η πολυπλοκότητα των συμπτωμάτων καθορίζεται από μια σειρά παραγόντων όπως η ηλικία του ξενιστή, η θέση της μόλυνσης, η ευαισθησία της ποικιλίας, οι καλλιεργητικές και περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς επίσης και ο τύπος της προσβολής (διασυστηματική ή τοπική) (Leon *et al*., 2011; Μπαγκής & Γκούμας, 2012). Η εκδήλωση των συμπτωμάτων εξαρτάται από το αν η μόλυνση προέρχεται από πρωτογενή διασυστηματική ή δευτερογενή παρεγχυματική προσβολή (τοπική). Αν λάβουμε υπόψη τη θέση της μόλυνσης παρατηρούμε ότι σε περιπτώσεις τοπικής μόλυνσης, μέσω των φυσικών ανοιγμάτων της φυλλικής επιφάνειας, τα πρώτα τοπικά συμπτώματα είναι η περιφερειακή νέκρωση και η μάρανση των φυλλαρίων (Εικόνα 3,4). Στη περίπτωση διασυστηματικής μόλυνσης το παθογόνο εισχωρεί στο φυτό από πληγές στις ρίζες και το λαιμό, εγκαθίσταται αρχικά στα αγγεία του ξύλου και στη συνέχεια στο φλοιό και την εντεριώνη προκαλώντας έτσι την διασυστηματική προσβολή (Leon *et al.,* 2011). Τα φυτάρια τομάτας του σπορείου συνήθως φτάνουν σε μαρασμό και ξηραίνονται. Αν όμως επιζήσουν παρουσιάζουν έντονο νανισμό ενώ πολλές φορές τα συμπτώματα μπορούν να εμφανιστούν αργότερα, μετά τη μεταφύτευση. Στα μεγαλύτερης ηλικίας φυτά παρατηρούνται τα τυπικά συμπτώματα αδροβακτηρίωσης το είδος και η έκταση των συμπτωμάτων ποικίλλουν, πιο συγκεκριμένα, στα μεγαλύτερα φυτά παρατηρείται το σύνδρομο του βραδέως μαρασμού, στα οποία σε πολλά φύλλα, ιδίως τα κατώτερα, παρατηρείται επιναστία και μαραίνονται αργότερα βαθμιαία, ενώ τα ανώτερα φύλλα διατηρούν τη σπαργή τους. Ο μαρασμός μπορεί να είναι μονόπλευρος, ημιπληγία, (Εικόνα 10) η οποία μπορεί να είναι παροδική ή μόνιμη και παρατηρείται πιο συχνά στα φύλλα της κορυφής. Τα παλαιότερα φύλλα του φυτού γέρνουν προς τα κάτω, ενώ τα φυλλάρια τους εμφανίζουν κατσάρωμα και συστρέφονται προς τα επάνω χωρίς μάρανση (Γκούμας, 2011).

Στην περίπτωση που η μόλυνση αρχίζει από πληγή κλαδέματος, τότε τα συμπτώματα εμφανίζονται πρώτα επάνω και προχωρούν ταχύτατα προς τα κάτω, θανατώνοντας το φυτό (Παναγόπουλος 1995). Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι ένας κίτρινος ως καστανός μεταχρωματισμός των ηθμαγγειωδών σωλήνων σε ολόκληρο το μήκος των προσβεβλημένων βλαστών και μίσχων των φύλλων (Εικόνα 5,6,7). Οι μεταχρωματισμοί αυτοί είναι πιο εμφανείς στους κόμβους των φυτών. Σε εγκάρσια τομή στη βάση του μίσχου

του φύλλου, παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων ημισεληνοειδούς μορφής ή πετάλου αλόγου (Εικόνα 6).



Εικόνα 3,4*: Συμπτώματα σε φυτά υπαίθριας τομάτας περιφερειακή νέκρωση και μάρανση των φυλλαρίων μετά την προσβολή από το Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis (φώτο: αρχείο Γκούμας Δ.).*

Εικόνα 5,6,7*: Συμπτώματα σε στέλεχος: Κίτρινος-καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων σε βλαστό τομάτας. Έλκη σε μίσχο και στο βλαστό τομάτας μετά την προσβολή από Cmm (φώτο: αρχείο Γκούμας Δ.).*

Εικόνα 8,9*: Τυπικές κηλίδες- στίγματα «μάτι πτηνού» σε καρπούς τομάτας.*

Οι μεταχρωματισμένοι ιστοί εμφανίζουν μαλακή σήψη και λόγω καταστροφής της αγγειακής μοίρας από τη δράση του παθογόνου, παρατηρείται αποκόλληση του κεντρικού κυλίνδρου από την εντεριώνη.



***Εικόνα 10**: Σύνδρομο βραδέως μαρασμού στα μεγαλύτερης ηλικίας φυτά και συμπτώματα μαρασμού στα φύλλα κορυφής νεαρού φυτού τομάτας μετά την προσβολή από Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis.*

Στα προχωρημένα στάδια της προσβολής καταστρέφεται ο φλοιός των βλαστών και σχίζεται η επιδερμίδα με αποτέλεσμα να σχηματίζονται επιμήκη ανοικτά έλκη στην επιφάνεια του στελέχους. Η παρουσία τέτοιων ελκών (ρωγμών) εξηγεί την ονομασία της ασθένειας και επιπλέον αποτελεί χαρακτηριστικό σύμπτωμα αυτής (Παναγόπουλος, 1995).

Όσον αφορά τους καρπούς η μόλυνση τους μπορεί να γίνει από την επιφάνεια τους από βακτήρια που μεταφέρονται μέσω βροχής ή υψηλής ατμοσφαιρικής υγρασίας τα οποία μπαίνοντας από τα στομάτια, φακίδια, προκαλούν τοπικές μολύνσεις. Κύριο σύμπτωμα είναι οι κυκλικές κηλίδες, χρώματος αρχικά υπόλευκου και αργότερα καστανού που περιβάλλονται από μια υπόλευκη άλω (υπόλευκος δακτύλιος). Οι κηλίδες έχουν διάμετρο 3-6mm, συχνά σχίζονται στο κέντρο και μοιάζουν με «μάτι πτηνού» (bird’s eye) (Εικόνα 8,9).Ο άλλος

τρόπος μόλυνσης των καρπών είναι εσωτερικά μέσω των αγγείων μετά από διασυστηματική κίνηση του παθογόνου από τους βλαστούς. Η εσωτερική προσβολή παρουσιάζει κίτρινες αγγειώδεις δεσμίδες που φτάνουν στα σπέρματα, καθώς και κίτρινο μεταχρωματισμό στην περιοχή του κάλυκα (Εικόνα 11). Οι ώριμοι καρποί φαίνονται εξωτερικά υγιείς ενώ οι άωροι παραμένουν μικροί και παραμορφώνονται (Παναγόπουλος, 1995).



Εικόνα 11*: Κίτρινος μεταχρωματισμός στην περιοχή του κάλυκα και κίτρινες αγγειώδεις δεσμίδες που φτάνουν στα σπέρματα, σε καρπούς τομάτας μετά από προσβολή από Cmm* http://aem.asm.org/content/79/22/6948/F2.large.jpg3.

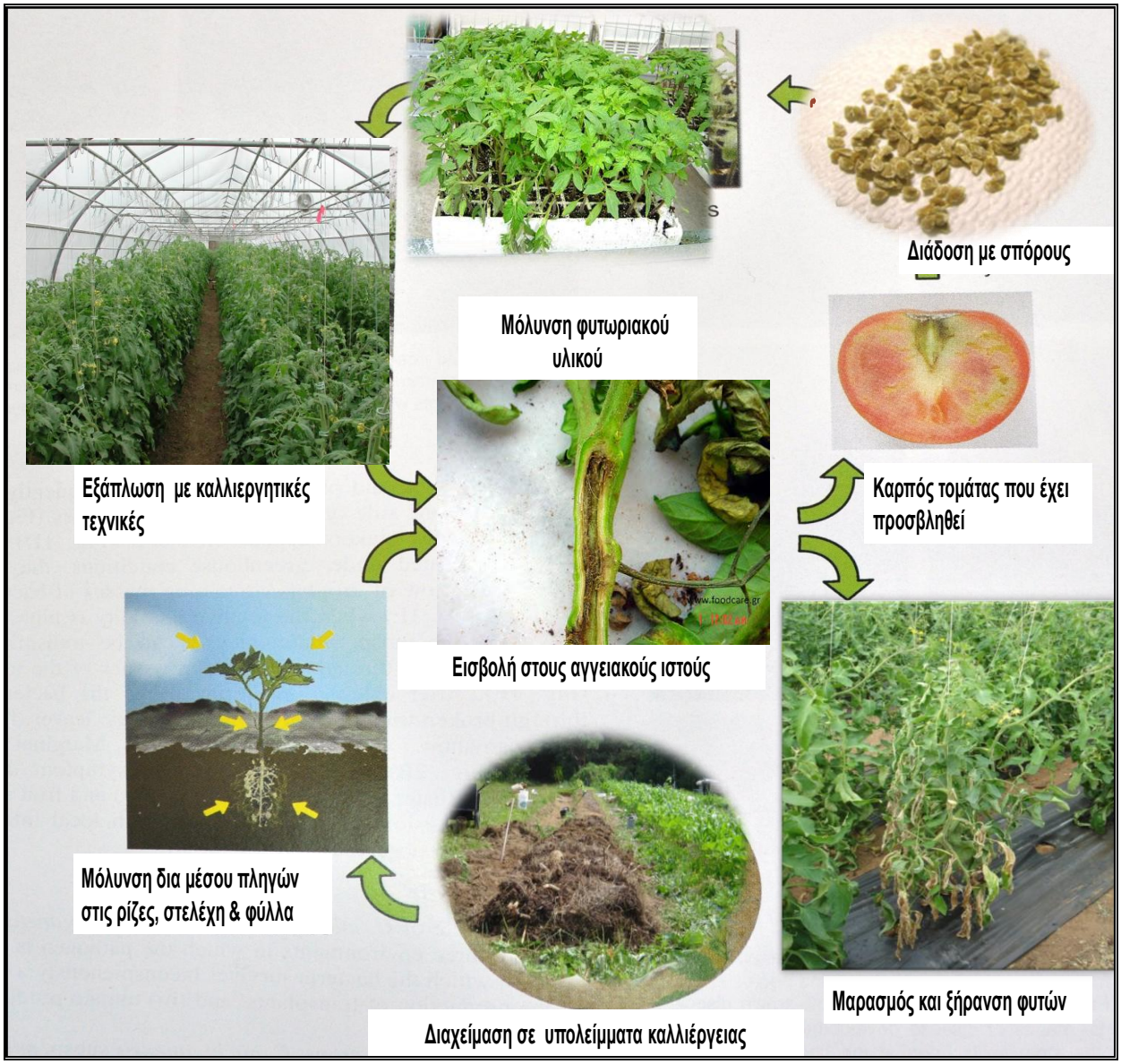
1.4 Στοιχεία βιολογίας και επιδημιολογίας του παθογόνου βακτηρίου.

Τα κύρια στοιχεία του βιολογικού κύκλου του παθογόνου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* αποτυπώνονται στην εικόνα 12. Το βακτήριο μπορεί να χαρακτηριστεί ως εδαφογενές παθογόνο, αλλά μπορεί να μεταδίδεται και με το σπόρο. Στο φυτό μπαίνει από τις πληγές των ριζών και του λαιμού που προκαλούνται από έντομα και νηματώδεις, κατά τη μεταφύτευση, με τα καλλιεργητικά εργαλεία. Εγκαθίσταται στο ξύλο και εν συνεχεία στο φλοιό και την εντεριώνη προκαλώντας διασυστηματική προσβολή με πληθυσμό άνω του 10^9 βακτηριακών κυττάρων ανά γραμμάριο φυτικού ιστού. Η είσοδος του παθογόνου μπορεί να γίνει και από φυσικά ανοίγματα του ξενιστή όπως στομάτια, υδατώδη ή ακόμη και από άλλες εναέριες πληγές ή λύσεις της συνέχειας της επιδερμίδας. Στην περίπτωση των εναέριων πληγών, οι μολύνσεις έχουν κατά κανόνα τοπικό χαρακτήρα (Gartemann *et al*., 2003). Η μετάδοση του παθογόνου στον αγρό και το θερμοκήπιο γίνεται με τα μολυσμένα φυτάρια καθώς και με ορισμένες καλλιεργητικές επεμβάσεις, μέσω των τομών που δημιουργούνται. Σε συνθήκες αγρού, το πότισμα με τεχνητή βροχή ή ο βροχερός καιρός σε συνδυασμό με τον άνεμο, αλλά και στα θερμοκήπια η υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία και η πυκνή φύτευση των φυτών, αποτελούν ευνοϊκές συνθήκες διάδοσης του παθογόνου. Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί, το παθογόνο μπορεί να επιβιώσει στον σπόρο και να μεταδοθεί μέσω αυτού σε περιοχές μη μολυσμένες. Φυσικά μολυσμένος σπόρος σε αναλογία 1:10000 μπορεί να οδηγήσει σε επιδημική εμφάνιση της ασθένειας στον αγρό εφόσον επικρατήσουν ευνοϊκές συνθήκες για την ασθένεια. Μετά την εγκατάσταση του παθογόνου σε μια αμόλυντη περιοχή, μεγάλη σημασία έχει για την επιβίωση του η διαχείριση των υπολειμμάτων της καλλιέργειας. Σε εδάφη που έχουν υπολείμματα προσβεβλημένων φυτών, το παθογόνο μπορεί να επιβιώσει 2 έτη. Επίσης το παθογόνο μπορεί να επιβιώσει και σε ορισμένα ζιζάνια, ιδιαίτερα στα πολυετή σολανώδη (Gleason *et al*., 1991, Μωραΐτης, 2011).

Η ασθένεια ευνοείται σε θερμοκρασίες 24 -32 ^oC με άριστη τους 26 ^oC, και είναι σοβαρότερη στα ελαφρότερα αμμώδη εδάφη, όταν τα φυτά καλλιεργούνται σε περιβάλλον που ευνοείται η ανάπτυξη σαρκώδους βλαστήσεως και υπό συνθήκες ελλιπούς φωτισμού.

Η υψηλή σχετική υγρασία ή οι βροχές αποτελούν επίσης ευνοϊκούς παράγοντες για την εξέλιξη της ασθένειας (Παναγόπουλος, 1995). Γενικά αξίζει να σημειωθεί ότι το παθογόνο μολύνει τους ξενιστές του με τρείς κύριους μηχανισμούς. Πρώτον, μέσω μηχανικής

απόφραξης των αγγείων του ξύλου, δεύτερον μέσω τοξικής δράσης των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS) και τρίτον μέσω της καταλυτικής δράσης εξωκυτταρικών ενζύμων κατά των φυτικών ιστών (Μωραΐτης, 2011). Τα διαδοχικά στάδια στο βιολογικό κύκλο του παθογόνου εμφανίζονται στην εικόνα 12.



***Εικόνα 12**: Σχηματική απεικόνιση του βιολογικού κύκλου του παθογόνου βακτηρίου Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis (προσαρμογή από Leon et al, 2011).*

1.5 Διάγνωση του παθογόνου βακτηρίου Cmm.

Η ανίχνευση και η απομόνωση του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ιδιαίτερα σε ασυμπτωματικά φυτά είναι δύσκολη, έτσι για την διάγνωση του παθογόνου βακτηρίου γίνεται εφαρμογή μιας σειράς κατάλληλων διαδικασιών. Η κλινική διάγνωση αποτελεί την πρώτη διαγνωστική προσέγγιση, ωστόσο όμως δεν είναι πάντοτε εμπεριστατωμένη και ακριβής καθώς απαιτεί ιδιαίτερη εμπειρία. Η εργαστηριακή διάγνωση ξεκινά με την μελέτη της συμπτωματολογικής εικόνας του φυτού και στη συνέχεια γίνεται η απομόνωση του παθογόνου σε ασηπτικές συνθήκες και η γραμμική διασπορά σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Εφόσον αναπτυχθούν αποικίες στο υπόστρωμα, εφαρμόζεται η δοκιμή αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά δειλινού (*Mirabilis jalapa*) και σπορόφυτα καπνού (*Nicotiana tabacum*). Στην εργαστηριακή διάγνωση εκτός από τη δοκιμή υπερευαισθησίας περιλαμβάνεται και η χρώση Gram. Η χρώση Gram διαφοροποιεί τα βακτήρια σε δύο κατηγορίες: τα Gram(+) και τα Gram(-). Το *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σαν Gram(+) βακτήριο διατηρεί τον συνδυασμό της χρωστικής του κρυσταλλικού ιώδους με το ιώδιο, έχοντας σαν αποτέλεσμα κατά την εφαρμογή της δοκιμής να αποκτά ένα ιώδες χρώμα. Για την διάγνωση του παθογόνου μπορεί να εφαρμοστούν επίσης μορφολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές δοκιμές. Οι ορολογικές μέθοδοι έχουν ευρεία χρήση στην ανίχνευση των βακτηρίων μέσα στους ιστούς των φυτών, όπως ενδεικτικά αναφέρεται η δοκιμή ανοσοφθορισμού, η ανοσοδιάχυση και η ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος (ELISA).

Παρά τη μεγάλη σημασία ορισμένων από τις παραπάνω τεχνικές, η μεγάλη πρόοδος στην ανίχνευση και διάγνωση όχι μόνο των βακτηρίων αλλά του συνόλου των παθογόνων, έχει επέλθει με την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών και ιδιαίτερα η εφαρμογή τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

1.6 Αντιμετώπιση της ασθένειας «βακτηριακό έλκος της τομάτας».

Το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* αποτελεί φυτοπαθογόνο καραντίνας στην Ευρωπαϊκή Ένωση καθώς και σε πολλές άλλες χώρες παραγωγής τομάτας. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει κάποιο χημικό σκεύασμα φυτοπροστατευτικού προϊόντος το οποίο να είναι εγκεκριμένο για χρήση εναντίον του βακτηριακού έλκους της τομάτας, όπως επίσης και η χρήση αντιβιοτικών στα φυτά έχει απαγορευτεί. Πιο συγκεκριμένα η αντιμετώπιση του παθογόνου γίνεται με την βοήθεια καλλιεργητικών μέτρων αλλά και με τη χρήση σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται για απολύμανση του σπόρου. Γενικά όμως όταν εκδηλωθεί η ασθένεια είναι δύσκολο να αντιμετωπιστεί.

1.6.1 Καλλιεργητικά μέτρα

- Η χρησιμοποίηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, έχει ιδιαίτερη σημασία για την αντιμετώπιση της ασθένειας. Επιπλέον είναι αναγκαία η απολύμανση του εδάφους του σπορείου αλλά και οποιοδήποτε άλλου εδαφικού υποστρώματος.
- Ο ύποπτος μολύνσεως σπόρος να απολυμαίνεται με εμβάπτιση του σε νερό θερμοκρασίας 52^{o}C για 20 λεπτά (Fatmi *et al.,* 1991). Άλλοι συγγραφείς συνιστούν 56^{o}C για 30 λεπτά.
- Εκρίζωση των προσβεβλημένων φυτών μαζί με το ριζικό σύστημα αλλά και μέρος εδάφους και οπωσδήποτε καταστροφή τους με φωτιά εκτός του αγρού.
- Καταστροφή των υπολειμμάτων μετά το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου.
- Το κλάδεμα να γίνεται με το χέρι ή τα εργαλεία κλαδέματος να απολυμαίνονται συνεχώς. Είναι σκόπιμο αμέσως μετά το κλάδεμα να γίνεται ψεκασμός των φυτών με ένα χαλκούχο φάρμακο (βορδιγάλιος πολτός, οξυχλωριούχος χαλκός, υδροξείδιο του χαλκού).
- Το νερό άρδευσης να μη διέρχεται από προσβεβλημένες φυτείες.
- Καταπολέμηση των σολανωδών ζιζανίων.
- Εφαρμογή αμειψισποράς 2-3 ετών. Εφόσον τούτο δεν είναι δυνατό, να γίνεται απολύμανση του εδάφους με τη μέθοδο της ηλιοαπολύμανσης. Η εφαρμογή της

ηλιοαπολύμανσης του εδάφους, με διαφανή φύλλα πολυαιθυλενίου και διάρκεια κάλυψης 1,5-2 μήνες, βρέθηκε ότι είναι πολύ αποτελεσματική για την αντιμετώπιση της ασθένειας στη χώρα μας (Αντωνίου *et al.*, 1992; Τζάμος, 2011).

- Εφόσον είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται ανθεκτικές ποικιλίες. Ανθεκτικές ποικιλίες θεωρούνται οι: Bulgaria 12, Utah 737, Utah 20, H2990, Heinz 2274 και BOG AT69 (Παναγόπουλος, 1995). Επιπλέον, σε μελέτη των Kabelka *et al.* ,(2002), έγινε χρήση μοριακών δεικτών (quantitative trait loci, QTL) που συμβάλλουν στην ικανότητα ανθεκτικότητας του ξενιστή εναντίον του βακτηριακού έλκους της τομάτας. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τουλάχιστον δύο γονίδια από το *Lycopersicon hirsutum*, και συγκεκριμένα το γονίδιο Rcm 2.0 στο χρωμόσωμα 2 και Rcm 5.1 στο χρωμόσωμα 5, συμβάλουν στην ανθεκτικότητα.

1.6.2 Χρήση χημικών σκευασμάτων

Η χρήση χαλκούχων σκευασμάτων και αυτή της στρεπτομυκίνης έχουν δοκιμασθεί προστατευτικά σε φυτά μολυσμένα με *Cmm* στο χωράφι για την αποφυγή δευτερογενών μολύνσεων με καλά αποτελέσματα που όμως δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες τομάτας στη Νότια Ευρώπη (de Leon *et al.*, 2008). Βέβαια η χρήση της στρεπτομυκίνης και γενικότερα αντιβιοτικών για τη καταπολέμηση βακτηριακών ασθενειών έχει απαγορευθεί στην Ε.Ε. όπως προανέφερα. Σε πείραμα των de Leon *et al.* (2008) σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες τομάτας μετά από τεχνητή μόλυνση επιφυτικά και διασυστηματικά, αναφέρουν ότι το αντιβιοτικό kasugamisin (εγκεκριμένο για χρήση σε πολλές χώρες της Ε.Ε.) δεν κατάφερε να μειώσει την ανάπτυξη της ασθένειας σε φυτά με διασυστηματικές προσβολές. Ο χαλκός σε συνδυασμό με το mancozeb, φάνηκε να έχει συνεργιστική δράση στη μείωση του πληθυσμού του *Cmm* και την εξάπλωση του ενώ η χρήση του mancozeb μόνο του δεν ήταν αποτελεσματικό. Ο θειικός χαλκός σε συνδυασμό με το 8-hydroxy-quinoline (και τα δύο στη μισή συνιστώμενη δόση) ήταν η πιο αποτελεσματική επέμβαση στη καταπολέμηση των επιφυτικών προσβολών στα φύλλα και τους καρπούς, σημαντικά καλύτερη από τη μεμονωμένη εφαρμογή του καθενός. Συμφωνά με τους de Leon *et al.* (2008) μπορεί να χρησιμοποιηθεί προστατευτικά πριν τη προσβολή αλλά και μετά την

προσβολή για τη μείωση των δευτερογενών επιφυτικών μολύνσεων. Παρόμοια καλά αποτελέσματα για το χαλκό και συγκεκριμένα το υδροξείδιο του χαλκού, είτε μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με το mancozeb αναφέρονται και από τους Werner *et al.*, (2002).

1.6.3 Βιολογική καταπολέμηση

Σε έρευνα που έχει γίνει για την επίδραση φυτικών ουσιών στο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, έχει δειχθεί ότι αιθέρια έλαια της ρίγανης του θυμαριού και του δίκταμου παρουσιάζουν παρεμπόδιση σε in vitro καλλιέργεια του παθογόνου. Επίσης εκχυλίσματα πρόπολης και εκκρίματα ρητίνης είχαν θετικά αποτελέσματα αλλά αποκλειστικά και αυτά σε in vitro πειράματα (de Leon *et al.*, 2008). Ακόμα το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του φυτού *Artemisia absinthium* παρουσίασε υψηλή αντιμικροβιακή δράση στο παθογόνο βακτήριο *Cmm* (Κωνσταντίνου, 2012). Τα αιθέρια έλαια ως αντιμικροβιακές ουσίες πλεονεκτούν ως προς τη φυσική τους προέλευση με την έννοια ότι είναι ασφαλή για τον άνθρωπο και το περιβάλλον αλλά και εκτιμώνται ως χαμηλού κινδύνου για ανάπτυξη ανθεκτικότητας από το παθογόνο εξαιτίας του πολυάριθμου μίγματος ουσιών των αιθέριων ελαίων τα οποία προφανώς και διέπονται από διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης (Daferera *et al.*, 2003; Μωραΐτης 2011).

Έχουν παρουσιασθεί μελέτες με δοκιμές επαγωγής αντοχής και βακτηριακούς ανταγωνιστές του *Cmm*, που όμως δεν παρουσιάζουν σταθερή αποτελεσματικότητα και επαναληψιμότητα στην καταπολέμηση της ασθένειας στο χωράφι (de Leon *et al*., 2008).

Οι Boudyach *et al*., (2001) δοκίμασαν 178 στελέχη ριζοβακτηρίων εναντίον του *Cmm* σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια τομάτας, απομονωμένων από το έδαφος, τη ριζόσφαιρα και την επιφάνεια των ριζών. Αποτελεσματικότερα στη γρήγορη και επιτυχή αποίκηση της ρίζας αποδείχθηκαν τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από την επιφάνεια της ρίζας (ριζοπλάνο). Ταυτοποιήθηκαν ως στελέχη των γενών *Bacillus* και *Pseudomonas*, ακτινομυκήτων και άλλων κατά Gram αρνητικών βακτηρίων. Αυτά δοκιμάσθηκαν για την αποτελεσματικότητα τους εναντίον του *Cmm* και αποδείχθηκε ότι η εφαρμογή τους με ψεκασμό πρώτα σε σπόρο τεχνητά μολυσμένο με *Cmm* και κατόπιν στις ρίζες των αναπτυσσόμενων φυταρίων, τα προστάτευσαν από την ασθένεια για 45 μέρες, διάστημα

αρκετό για τη τομάτα μέχρι να ενεργοποιηθεί η αντίσταση του φυτού. Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η αποτελεσματικότητα των στελεχών οφείλεται στην καλή ανταγωνιστική τους ικανότητα κατάληψης του χώρου και λήψης των θρεπτικών στοιχείων.

Στη μελέτη των Werner *et al*. (2002), εφαρμόσθηκε ο επαγωγέας αντοχής Asibenzolar-S-methyl (ABM) σε φυτάρια στο θερμοκήπιο και αποδείχθηκε ότι έχει ικανοποιητική αποτελεσματικότητα ως προστατευτικό προϊόν, ειδικά όταν εφαρμόζεται σε συνδυασμό με οξυχλωριούχο χαλκό, αλλά είναι σημαντικά λιγότερο αποτελεσματικό συγκριτικά με την χημική καταπολέμηση και ειδικά με τη χρήση και τον συνδυασμό χαλκούχων σκευασμάτων με το mancozeb.

Επίσης, στη μελέτη των Utkhede και Koch (2004), αξιολογήθηκε μια σειρά βιολογικών σκευασμάτων στην ικανότητα αντιμετώπισης του βακτηριακού έλκους της τομάτας. Μελετήθηκε η επίδραση στην ανάπτυξη του παθογόνου in vitro και σε φυτά τομάτας σε συνθήκες θερμοκηπίου των σκευασμάτων Bacillus subtilis, Rhodosporidium diobovatum, Tricoderma harzianum, vermin compostea και του ενζύμου λυσοζύμη, έδειξαν αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση της ασθένειας.

Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι σε μελέτη, των Kasselaki *et al*. (2011) αναφέρουν ότι εμβάπτιση σε μολυσμένους σπόρους τομάτας με *Cmm*, η αποτελεσματικότητα της επέμβασης με το υδροξείδιο του χαλκού εκτιμήθηκε στο 98%, ενώ επέμβαση με κόμποστ, με ανταγωνιστικά στελέχη του Bacillus spp. και η επέμβαση με διάλυμα νιτρώδους νατρίου είχε ως αποτέλεσμα την ολική παρεμπόδιση ανάπτυξης του *Cmm* σε συνθήκες *in vitro*.

1.7 Μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης του παθογόνου βακτηρίου Cmm.

Η ταυτοποίηση έχει σαν στόχο την κατάταξη ενός οργανισμού σε συγκεκριμένο γένος και είδος με τη χρήση δοκιμών που στηρίζονται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά, σε ορολογικές μεθόδους, σε μεταβολικές ιδιότητες καθώς και στην ανίχνευση χαρακτηριστικών αλληλουχιών βάσεων στο γενετικό υλικό (DNA) των οργανισμών.

1.7.1 Ορολογικές μέθοδοι

Οι ορολογικές μέθοδοι στηρίζονται στη μελέτη των αντιδράσεων μεταξύ των αντιγόνων των μικροοργανισμών ή των ιών και των αντισωμάτων τα οποία δημιουργούνται στο αίμα των ανοσοποιηθέντων από αυτούς ζώων. Αντιγόνο ονομάζεται η ουσία που προκαλεί μια ειδική ανοσογόνο αντίδραση στα θερμόαιμα ζώα όταν εισάγεται στους ιστούς τους δηλαδή τη παραγωγή αντισωμάτων που αντιδρούν ειδικά με το αντιγόνο που διέγειρε το σχηματισμό τους. Αντίσωμα είναι μία πρωτεΐνη που έχει τις μοριακές ιδιότητες μίας ανοσογλοβουλίνης ικανής να συνδυαστεί ειδικά με ένα αντιγόνο. Το μόριο του αντισώματος φέρει θέσεις που συνδυάζονται ειδικά με τις αντιγονικές θέσεις του αντιγόνου. Τέλος, ο αντιορός είναι ορός του αίματος που περιέχει αντισώματα τα οποία αντιδρούν ειδικά με το αντιγόνο που διέγειρε το σχηματισμό τους (Γκούμας, 2011). Κάποιες από τις ορολογικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* είναι: η αντίδραση δημιουργίας συσσωματωμάτων (agglutination test reaction),ο ανοσοφθορισμός (immunofluoresence) και η μέθοδος ELISA (EPPO, 2005).

Ο ανοσοφθορισμός είναι τεχνική κατά την οποία το αντιγόνο ή το αντίσωμα, συνήθως το δεύτερο, έχει συνδεθεί με μία φθορίζουσα ουσία και αφήνονται να αντιδράσουν με το αντίστοιχο αντίσωμα ή αντιγόνο. Η αντίδραση μπορεί να λάβει χώρα είτε απευθείας πάνω στους ιστούς του φυτού ή σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η εξέταση γίνεται στο μικροσκόπιο με τον ελαιοκαταδυτικό φακό (Χ100). Η παρουσία των αντιγόνων ή των αντισωμάτων στο δείγμα προσδιορίζεται από τον προκύπτοντα φθορισμό των βακτηριακών κυττάρων. Υπάρχουν δύο βασικές τεχνικές: 1. άμεσος ανοσοφθορισμός 2. έμμεσος ανοσοφθορισμός, με διαφορετικές παραλλαγές η κάθε μία (Γκούμας, 2011).

1.7.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, Polymerase Chain Reaction (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μία μέθοδος που επιτρέπει τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πάρα πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η PCR αποτελεί μία νέα τεχνική της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της μοριακής βιολογίας όσο και της ιατρικής. Εφευρέτης της μεθόδου αυτής είναι ο Karry Mullis, ο οποίος την ανακοίνωσε το 1984 και τιμήθηκε για αυτήν με βραβείο Νόμπελ το 1993. Η PCR αποδείχτηκε επαναστατική μέθοδος και χρησιμοποιείται σε πληθώρα πρακτικών εφαρμογών. Χρησιμοποιείται στην Ιατρική για τη διάγνωση ασθενειών όπως το AIDS, στην εγκληματολογία για την διαλεύκανση υποθέσεων κ.α. Η μέθοδος επίσης αποτελεί σημαντικό εργαλείο στα χέρια των βελτιωτών για την ταυτοποίηση και την επιλογή φυτών.

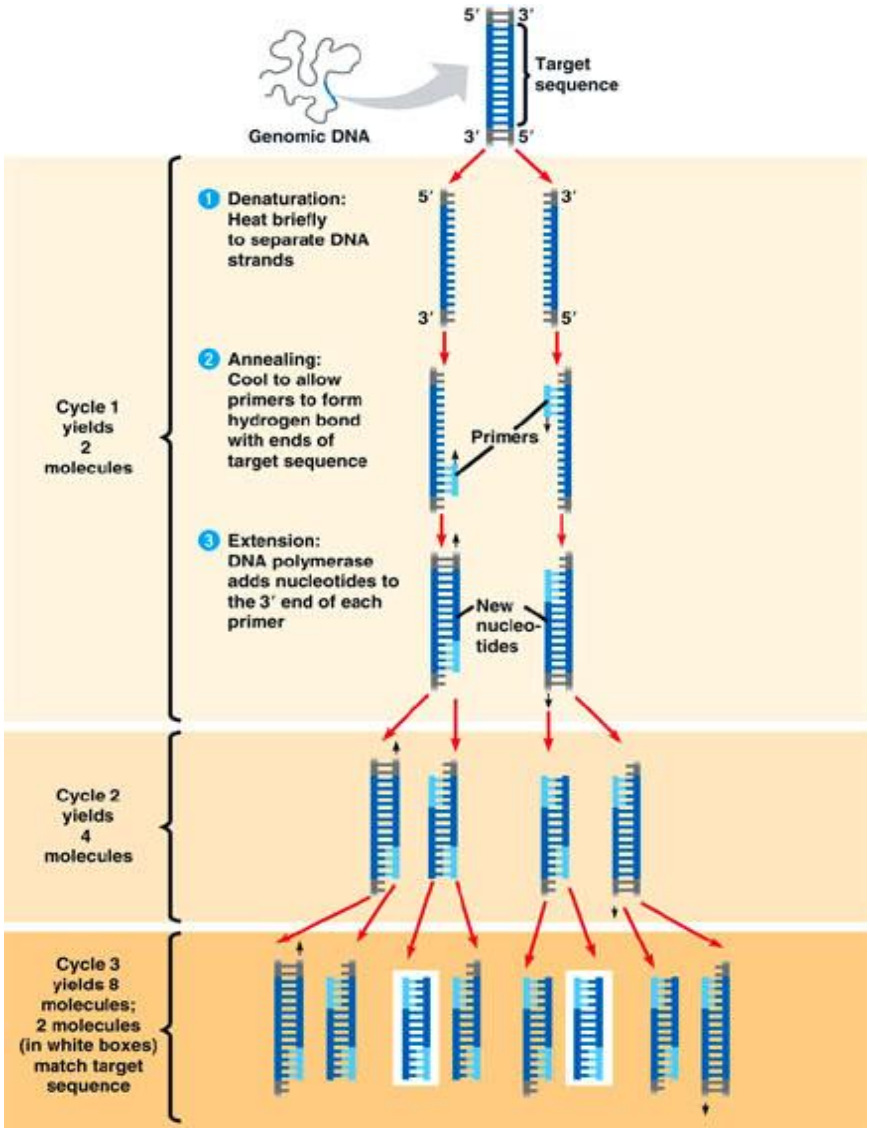
Η PCR χρησιμοποιεί το ένζυμο DNA-πολυμεράση και ειδικούς εκκινητές οι οποίοι κατασκευάζονται με βάση την αλληλουχία των άκρων του προς αντιγραφή τμήματος DNA. Η DNA-πολυμεράση, χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα την μία αλυσίδα του DNA, καταλύει την αντίδραση προσθήκης νουκλεοτιδίων στο 3’ άκρο της νεοσυντιθέμενης αλληλουχίας, έτσι ώστε να συντεθεί η συμπληρωματική αλυσίδα, αρκεί στο 3’ άκρο τους να υπάρχει μία μικρή δίκλωνη περιοχή (Εικόνα 13). Οι δίκλωνες αυτές περιοχές μπορούν να δημιουργηθούν με την χρήση εκκινητών, δηλαδή μικρά συνθετικά τμήματα μονόκλωνου DNA μεγέθους 15-30 νουκλεοτιδίων κι έχουν αλληλουχία συμπληρωματική με το 3’ της αλυσίδας που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Για τον πολλαπλασιασμό μιας δίκλωνης περιοχής DNA απαιτούνται δύο εκκινητές, ένας για το 3’ άκρο της κάθε αλυσίδας.

Η PCR πραγματοποιείται σε τρία κύρια βήματα τα οποία επαναλαμβάνονται 30-40 φορές και εκτελείται σε αυτοματοποιημένο θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος μπορεί να θερμαίνει και να ψύχει τα δοκιμαστικά δοχεία στα οποία γίνεται η αντίδραση με ακρίβεια και πολύ γρήγορα. Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής:

1)Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation).

2)Υβριδοποίηση εκκινητών (primerannealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου.

3)Επιμήκυνση εκκινητών (extension).



***Εικόνα13**: Σχηματική απεικόνιση των τριών κύριων βημάτων της PCR. Αποδιάταξη (denaturation) τουDNA, αναδιάταξη (annealing) με υβριδισμό των εκκινητών στις συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA και σύνθεση των νέων μορίων DNA (extension) http://fridge.gr/21667/stiles/pcr-dna/.*

Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει υποβάλλεται σε θερμοκρασία 94^{o}C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA (αποδιάταξη/denaturation). Στο δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-65^{o}C κι έτσι επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing). Στο τρίτο και

τελευταίο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72^{o}C και με τη βοήθεια της DNA-πολυμεράση, η οποία προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, έτσι επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA-πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3'. Η όλη διαδικασία της αντίδρασης PCR εκτελείται με ένα αυτοματοποιημένο θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος θερμαίνει και ψύχει τα δοκιμαστικά σωληνάκια (tubes) σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια, ακολουθεί η ανάλυση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η επιτυχία μιας αντίδρασης PCR κρίνεται από πολλές παραμέτρους. Η αλληλουχία και η συγκέντρωση των εκκινητών συσχετίζεται άμεσα με την επιτυχία της δοκιμής. Οι 20 εκκινητές θα πρέπει να σχεδιάζονται έτσι ώστε να έχουν μήκος 18-24bp, να μην περιέχουν καμία δευτερεύουσα δομή, η αναλογία γουανίνης προς κυτοσίνη να κυμαίνεται μεταξύ 40-60%, και να υπάρχει ισόρροπη κατανομή αδενίνης, θυμίνης, γουανίνης και κυτοσίνης. Η θερμοκρασία αποδιάταξης (Time, melting temperature), θα πρέπει να είναι ίδια για το ζεύγος των εκκινητών και να έχει τιμή μεταξύ 55 -65 ^{o}C ώστε να επιτρέπεται ο υβριδισμός τους στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA στόχου. Η συγκέντρωση του ενζύμου της DNA-πολυμεράσης θα πρέπει να κυμαίνεται από 0,5-2,5 u/μl, διαφορετικά η αυξημένη συγκέντρωση του ενζύμου οδηγεί σε μείωση της ακρίβειας των αποτελεσμάτων της αντίδρασης (Roche, 1999). Το διάλυμα των τριφωσφορικών δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) αποτελείται από τα νουκλεοτίδια ATP, TTP, CTP, GTP, τα οποία είναι απαραίτητα για την σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων κλώνων. Το διάλυμα αυτό θα πρέπει να περιέχει ίσες ποσότητες από κάθε νουκλεοτίδιο, ώστε να μην επηρεάζεται η δράση του ενζύμου. Αυξημένη συγκέντρωση του διαλύματος των dNTPs σε μια αντίδραση PCR, οδηγεί σε μείωση των ελευθέρων ιόντων Mg+2 και συνεπώς επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα της DNA-(πολυμεράσης). Η σύνδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλυσίδες του επιθυμητού τμήματος DNA μπορεί να μειωθεί, με την χρήση αυξημένης συγκέντρωσης διαλύματος dNTPs (Roche, 1999).

1.8 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι ο μοριακός προσδιορισμός και ο έλεγχος της παθογένειας απομονώσεων του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που απομονώθηκαν από συμπτωματικά φυτά τομάτας από καλλιέργειες τομάτας σε διάφορες περιοχές της Κρήτης και της Ελλάδας κατά το χρονικό διάστημα 2010 έως 2013. Για την επίτευξη του στόχου χρησιμοποιήθηκαν οι εξειδικευμένοι εκκινητές CMM5/CMM6 και PSA-4/PSA-R, ελέγχθηκε η αντίδραση στη δοκιμή ανοσοφθορισμού.

2 ΥΛΙΚΑ

2.1 Εξαγωγή βακτηριακών στελεχών από τη συλλογή

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από τη συλλογή του εργαστηρίου Βακτηριολογίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης. Με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας μεταφυτεύτηκαν από τους σωλήνες διατήρησης και καλλιεργήθηκαν σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα NAG (Nutrient Agar Glucose) και σε όλη τη διάρκεια της εργασίας αναπτύσσονταν σε τριβλία με το ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα. Επίσης, βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από νέα δείγματα που έφτασαν στο εργαστήριο, από τα οποία και απομονώθηκαν. Τα στελέχη με τα χαρακτηριστικά τους εμφανίζονται στον Πίνακας 2.

Πίνακας 2: Στελέχη βακτηρίων *Cmm* που χρησιμοποιήθηκαν

Α/Α	*Cmm* ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΕΤΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ
1.	4010	Ηράκλειο Τυμπάκι	1995
2.	4072	Ηράκλειο Ψαρή Φοράδα	1997
3.	4096-Β	Ηράκλειο Λέντας	2000
4.	4205	Πελοπόννησος Πάτρα	2003
5.	4209	Ηράκλειο Τυμπάκι	2008
6.	4214	Ηράκλειο Τυμπάκι	2008
7.	4219	Ρόδος	2008
8.	4221	Ρόδος	2008
9.	4223	Πελοπόννησος Κόρινθος	2008
10.	4225	Πελοπόννησος σε Heman	2008
11.	4235	Πελοπόννησος Κόρινθος	2008
12.	4237	Πελοπόννησος Κόρινθος	2008
13.	4249	Πελοπόννησος Κόρινθος	2008
14.	4250	Πελοπόννησος Κόρινθος	2008
15.	4255	Ιεράπετρα Λασιθίου	2008
16.	4256	Ιεράπετρα Λασιθίου	2008
17.	4258	Χαλκιδική	2008
18.	4259	Χαλκιδική	2008
19.	4260	Χαλκιδική	2008
20.	4261	Χαλκιδική	2008
21.	4262	Πελοπόννησος Κόρινθος	2008
22.	4266	Πελοπόννησος Κόρινθος	2008
23.	4267	Πελοπόννησος Κόρινθος	2008
24.	4268	Πελοπόννησος Κόρινθος	2008
25.	4274	Χανιά Κουντούρα	2009

Α/Α	*Cmm* ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΕΤΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ
26.	4275	Χανιά Κουντούρα	2009
27.	4276	Χανιά Κουντούρα	2009
28.	4280	Χανιά Κουντούρα	2009
29.	4281	Χανιά Κουντούρα	2009
30.	4282	Πελοπόννησος Κυπαρισσία	2010
31.	4283	Πελοπόννησος Κυπαρισσία	2010
32.	4284	Πελοπόννησος Κυπαρισσία	2010
33.	4287	Πελοπόννησος Κυπαρισσία	2010
34.	4288	Πελοπόννησος Κυπαρισσία	2010
35.	4289	Πελοπόννησος Κυπαρισσία	2010
36.	4290	Ιεράπετρα Λασιθίου	2009
37.	4300	Χανιά Κουντούρα	2009
38.	4302	Πελοπόννησος Κόρινθος	2011
39.	4306	Πελοπόννησος Κόρινθος	2011
40.	4307	Πελοπόννησος Κόρινθος	2011
41.	4309	Χανιά Κουντούρα	2012
42.	4310	Χανιά Κουντούρα	2012
43.	4314	Χανιά Κουντούρα	2012
44.	4315	Χανιά Κουντούρα	2012
45.	4321	Χανιά Κουντούρα	2012
46.	4322	Χανιά Κουντούρα	2012
47.	4325	Χανιά Κουντούρα	2012
48.	4326	Χανιά Κουντούρα	2012
49.	4329	Χανιά Κουντούρα	2012
50.	4330	Χανιά Κουντούρα	2012
51.	4333	Χανιά Κουντούρα	2012
52.	4334	Χανιά Κουντούρα	2012

Α/Α	*Cmm* ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΕΤΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ
53.	4337	Χανιά Κουντούρα	2012
54.	4338	Χανιά Κουντούρα	2012
55.	4341	Ιεράπετρα Λασιθίου	2012
56.	4342	Ιεράπετρα Λασιθίου	2012
57.	4345	Ιεράπετρα Λασιθίου	2012
58.	4346	Ιεράπετρα Λασιθίου	2012
59.	4349	Χερσόνησος Ηρακλείου	2012
60.	4352	Χερσόνησος Ηρακλείου	2012
61.	4357	Χανιά Κουντούρα	2013
62.	4358	Χανιά Κουντούρα	2013
63.	4361	Ιεράπετρα Λασιθίου	2013
64.	4362	Ιεράπετρα Λασιθίου	2013
65.	4373	Ελαφονήσι Χανιά	2013
66.	4374	Ελαφονήσι Χανιά	2013
67.	4380	Ελαφονήσι Χανιά	2013
68.	4381	Ελαφονήσι Χανιά	2013
69.	4384	Ελαφονήσι Χανιά	2013
70.	4385	Ελαφονήσι Χανιά	2013
71.	4389	Ιεράπετρα Λασιθίου	2013
72.	4390	Ιεράπετρα Λασιθίου	2013
73.	4396	Ιεράπετρα Λασιθίου	2013

Α/Α	*Cmm* ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΕΤΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ
74.	4397	Ιεράπετρα Λασιθίου	2013
75.	4404	Τυμπάκι Ηρακλείου	2013
76.	4405	Τυμπάκι Ηρακλείου	2013
77.	4412	Ξάνθη	2013
78.	4413	Ξάνθη	2013
79.	4414	Ξάνθη	2013
80.	4415	Ξάνθη	2013
81.	4416	Ξάνθη	2013
82.	4417	Ξάνθη	2013

2.2 Έλεγχος απομονώσεων

Αρχικά, όλες οι απομονώσεις ελέγχθηκαν ως προς την συμπεριφορά τους σε διάλυμα 3% KOH. Κατά τη μέθοδο αυτή γίνεται έγχυση με την βοήθεια εργαστηριακής πιπέτας 10μl KOH 3% πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και έπειτα με την βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας μικρή ποσότητα του βακτηρίου αναμιγνύεται με το διάλυμα KOH. Η αδυναμία δημιουργίας βλεννώδους ίνας υποδηλώνει ότι το βακτηριακό στέλεχος είναι αρνητικό στη δοκιμή δηλαδή πρόκειται για κατά Gram θετικό βακτήριο.

Στη συνέχεια όλες οι απομονώσεις ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα. Το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα είναι το m-SCM του οποίου η σύνθεση είναι η εξής: Mannose 10g/l, Yeast extract 0.1 g/l,K_2HPO_4 2 g/l, KH_2PO_4 0.5 g/l, $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.25 g/l και Boric acid 1.5 g/l. Μετά την αποστείρωση προστίθενται: Cyclohexamide 200 mg (διάλυση σε 1 ml μεθανόλης), Nalidixic acid 30 mg (διάλυση σε 1 ml 0.1 MNaOH) και Nicotinic acid 100 mg (διάλυση σε 20 ml AAH_2O).

2.3 Έλεγχος Παθογένειας

2.3.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά Mirabilis jalapa

Για τον έλεγχο της παθογένειας των απομονώσεων πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις. Αρχικά όλα τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα εκδήλωσης αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) σε φύλλα δειλινού (*Mirabilis jalapa* L.) με έγχυση βακτηριακού αιωρήματος συγκέντρωσης 10^8cfu/ml με την βοήθεια σύριγγας. Η παρασκευή των αιωρημάτων έγινε σε αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό με την βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας από καλλιέργεια 48 ωρών σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG. Τα φυτά μετά την έγχυση καλύφθηκαν με διάφανες πλαστικές σακούλες για την διατήρηση υψηλής σχετικής υγρασίας. Μετρήσεις για την πρόκληση αντίδρασης υπερευαισθησίας λήφθηκαν μετά από 24 μέχρι 48 ώρες.

2.3.2 Τεχνητές μολύνσεις σε σπορόφυτα τομάτας

Πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις σε σπορόφυτα στο στάδιο των 2-3 πραγματικών φύλλων τομάτας με τα επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: με το άκρο αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας έγινε παραλαβή βακτηριακής 24ωρης καλλιέργειας από θρεπτικό υπόστρωμα NAG και βύθιση αυτού, με πλάγια κλίση, σε βάθος 0.5 περίπου εκατοστών στο στέλεχος των σπορόφυτων. Στη συνέχεια τα φυτάρια μεταφέρθηκαν στο θερμοκήπιο όπου και παρέμειναν σε συνθήκες υγρασίας 60-70% και θερμοκρασίας 15-26^{o}C. Από τη συγκεκριμένη επέμβαση πήραμε τρεις μετρήσεις μετά από 20, 28 και 44 ημέρες.

2.3.3 Αποτύπωμα μολυσμένου φυτικού ιστού σε m-SCM

Μετά το πέρας των 44 ημερών ή όταν κρίνετε απαραίτητο λόγω της εξέλιξης των μολύνσεων τμήμα ιστού σε μορφή ροδέλας κόπηκε ασηπτικά (πέρα από τη θέση μόλυνσης) από τα τεχνητά μολυθέντα φυτά με σκοπό να ανιχνεύσουμε την παρουσία του βακτηρίου. Οι απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία του «αποτυπώματος των ιστών» σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m–SCM. Η παρουσία του βακτηρίου διαπιστώνεται με την τυπική ανάπτυξη του βακτηρίου γύρω από τον φυτικό ιστό.

2.4 Ορολογική ταυτοποίηση

Η ορολογική ταυτοποίηση των επιλεχθέντων βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Η μέθοδος αυτή αποτελεί τεχνική κατά την οποία τα ειδικά αντισώματά του προς ανίχνευση παθογόνου συνδέονται με τα εξειδικευμένα αντιγόνα του προς ανίχνευση βακτηρίου, τα οποία σε μία επόμενη διαδικασία συνδέονται με μία φθορίζουσα ουσία. Έτσι, γίνεται ορατή η ειδική αναγνώρισή τους σε οπτικό πεδίο μικροσκοπίου με επισκοπικό φθορισμό. Χρησιμοποιήθηκαν ο αντιορός antiClav782 του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας σε αραίωση 1/1000 και το φθορίζον σύμπλοκο της Alexa Fluor, σε αραίωση 1/100.

2.5 Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων του βακτηρίου Cmm.

Μετά την ολοκλήρωση των δοκιμών παθογένειας και του ελέγχου των χαρακτηριστικών των απομονώσεων, επιλέχθηκαν ορισμένα βακτηριακά στελέχη για μοριακή ταυτοποίηση. Η επιλογή έγινε με βάση την περιοχή και τη χρονολογία απομόνωσης, έτσι ώστε να αντιπροσωπεύονται απομονώσεις από διάφορες περιοχές και έτη. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν καταγράφονται στον Πίνακα 2. Με τη βοήθεια του βακτηριακού κρίκου (λούπα) τοποθετήθηκε ποσότητα βακτηριακών κυττάρων σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 4 ml υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Lysogeny Broth ή Luria-Bertani (10gr Bacto-tryptone,5gr Bactoyeast extract, 10gr NaCl, pH 7.0). Στη συνέχεια οι υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης όπου αναδεύονταν για να επωαστούν για 48 ώρες στους 27^{o}C.

2.5.1 Επέμβαση με λυσοζύμη για την λύση των βακτηριακών κυττάρων των βακτηριακών στελεχών Cmm.

Το βακτήριο *Cmm* είναι θετικό κατά Gram και το κυτταρικό του τοίχωμα, όπως κάθε βακτηρίου που ανήκει σε αυτή την κατηγορία, είναι φτιαγμένο από την πρωτεΐνη πεπτιδογλυκάνη (Τζάμος, 2004). Η πεπτιδογλυκάνη καταλαμβάνει ένα ποσοστό 50-90% του κυτταρικού τοιχώματος. Έτσι για να επιτευχθεί η λύση του κυτταρικού τοιχώματος (προκειμένου να ελευθερωθεί το DNA) έγινε μεταχείριση όλων των βακτηριακών στελεχών με διάλυμα λυσοζύμης**.** Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα ενζυματικής λύσης 5ml για την λύση των βακτηριακών κυττάρων το οποίο περιείχε: 50ml TrisCl2M, 20ml EDTA 0.5M, 60ml TritonX 100, 100mgr lysozyme και 4.87ml H_2O. Έπειτα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1) Όγκος 1 ml από κάθε υγρή καλλιέργεια βακτηριακού στελέχους μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένους σωλήνες eppendorf, οι οποίοι φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 7500rpm. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό.
2) Στη συνέχεια επαναδιαλύθηκαν οι βακτηριακές πελλέτες σε 180 ml διαλύματος ενζυματικής λύσης και ακολούθησε επώαση στους 37^{o}Cγια30 λεπτά στο υδατόλουτρο.
3) Προστέθηκαν 25 ml Proteinase K και 200ml Buffer AL σε σωλήνες eppendorf και ακολούθησε ανακίνηση των σωλήνων με vortex και επώαση στους 56^{o}C για 30 λεπτά.
4) Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 ml αιθανόλης (καθαρότητας 99%) και ακολούθησε ανακίνηση των σωλήνων eppendorf με vortex μέχρι να σχηματιστεί ομοιογενές διάλυμα.

Μετά από αυτήν την μεταχείριση ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης γενωμικού DNA από τα επιλεχθέντα βακτηριακά στελέχη.

2.5.2 Απομόνωση γενωμικού DNAαπό βακτηριακά κύτταρα του Cmm

Η απομόνωση DNA από υγρές καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών έγινε με τη βοήθεια του συστήματος DN easy Blood and Tissue Kit της εταιρείας QIAGEN. Το πρωτόκολλο αναλύεται παρακάτω:

1) Το περιεχόμενο των σωλήνων eppendorf μεταφέρθηκε σε στήλες διαχωρισμού (DN easy Mini spincolumn) οι οποίες τοποθετήθηκαν μέσα σε σωλήνες συλλογής των 2 ml. Εφαρμόστηκε φυγοκέντρηση σε 8000rpm για ένα λεπτό. Οι σωλήνες συλλογής αφαιρέθηκαν στη συνέχεια και η κάθε στήλη διαχωρισμού τοποθετήθηκε σε καινούργιο σωλήνα συλλογής.
2) Προστέθηκαν 500 ml buffer AW1 στις στήλες διαχωρισμού και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 8000 rpm για 1 λεπτό. Οι σωλήνες συλλογής αφαιρέθηκαν ξανά.
3) Οι στήλες διαχωρισμού τοποθετήθηκαν σε καινούργιους σωλήνες συλλογής και προστέθηκαν 500 ml AW2. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 14000 rpm για 3 λεπτά.
4) Οι ειδικές στήλες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν εκ νέου σε καθαρούς αποστειρωμένους σωλήνες eppendorf (όγκου 1.5 ml) και προστέθηκαν 200ml buffer AE. Ακολούθησε επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκέντρηση σε 8000rpm για 1 λεπτό.
   Οι σωλήνες eppendorf αποθηκεύθηκαν στους -20^{o}C μέχρι να γίνουν οι αντιδράσεις PCR.

2.5.3 Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.

Για να επαληθευτεί η απομόνωση του DNA από τα βακτηριακά κύτταρα έγινε ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου DNAσε πήκτωμα αγαρόζης. Η συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.8%. Σε 50ml ρυθμιστικού διαλύματος 0.5 x TBE (Trisborate EDTA) προστέθηκαν 0.4g αγαρόζης και διαλύθηκαν με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για κάποια λεπτά. Έπειτα προστέθηκαν 2ml χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου. Το διάλυμα της αγαρόζης αφέθηκε τουλάχιστον 20 λεπτά για να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου, στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία είχε τοποθετηθεί αρχικά χτενάκι. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα TBE και αφού αφαιρέθηκε το χτενάκι, δημιουργήθηκαν τα «πηγαδάκια» στα οποία τοποθετήθηκαν 5 ml από το απομονωμένο DNA των στελεχών και 1 ml χρωστική. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε λDNA κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο PstI. Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος για 45 λεπτά σε 55 V. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση.

2.5.4 Φωτομέτρηση των δειγμάτων

Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων PCR έπρεπε να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις του DNA των βακτηριακών στελεχών. Ο υπολογισμός αυτός πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Κρήτης με την βοήθεια νανοφωτόμετρου (Nanodrop). Στην ειδική ακίδα δειγματοληψίας, τοποθετήθηκε 1ml του υπό ανάλυση δείγματος, και η μέτρησή του καταγράφηκε με την βοήθεια ειδικού προγράμματος σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στο τέλος της κάθε μέτρησης, η ακίδα καθαριζόταν ελαφρά με απορροφητικό χαρτί. Ακολούθησε η ίδια διαδικασία για όλα τα προς ανάλυση δείγματα. Μετά τη φωτομέτρηση, τα δείγματα αραιώθηκαν, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση όλων των δειγμάτων να είναι ίδια και ίση με 5 ng/ml.

2.5.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction,PCR)

Για την μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών του παθογόνου εφαρμόστηκαν οι παρακάτω τεχνικές PCR μοριακού αποτυπώματος: CMM-PCRκαι PSA-PCR.

2.5.6 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR

Για την διεξαγωγή των αντιδράσεων PCR, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές της εταιρείας VBC-Biotech. Για τις CMM-PCR χρησιμοποιήθηκαν 2 ζευγάρια εξειδικευμένων εκκινητών οι: CMM5/CMM6 που στοχεύουν στο pCM2 plasmidgenpat-1 και έχουν μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος τα 614bp και PSA-4/PSA-R που στοχεύουν στο 16S-23SrDNA intergenicregion έχουν μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος τα 270bp. Στον Πίνακα 3 αναγράφονται αναλυτικά οι αλληλουχίες των εκκινητών. Για όλες τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Master cycler Gradient της εταιρείας Eppendorf (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. *Θερμικός κυκλοποιητής Master cycler Gradient της εταιρίας Eppendorf.*

Πίνακας 3: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR.

Εκκινητής	Αλληλουχία 5'-3'	DNA στόχος
CMM5	**GCGAATAAGCCCATATCAA**	**pCM2 plasmid gen pat-1**
CMM6	**CGTCAGGAGGTCGCTAATA**	**pCM2 plasmid gen pat-1**
PSA-4	**TCATTGGTCAATTCTGTCTCCC**	**16S-23S rDNA intergenic region**
PSA-R	**TACTGAGATGTTTCACTTCCCC**	**16S-23S rDNA intergenic region**

2.6 CMM-PCR και PSA-PCR

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν οι CMM-PCR. Για την πραγματοποίηση της κάθε αντίδρασης υπάρχει ένα πρωτόκολλο πρόγραμμα θερμοκρασιών και χρόνου το οποίο χρειάζεται για να γίνουν τα διάφορα στάδια της αντίδρασης (αποδιατάξη DNA, υβριδοποίηση εκκινητών στις αλληλουχίες του DNA-στόχου και επιμήκυνση εκκινητών) και το οποίο είναι εξειδικευμένο για το κάθε ζευγάρι εκκινητών. Για τις αντιδράσεις αυτές όπως προαναφέρθηκε σε άλλη παράγραφο χρησιμοποιήθηκαν 2 ζεύγη εκκινητών.

Για το ζευγάρι **CMM5/CMM6** το πρόγραμμα αυτό είναι το εξής:

1) 2 λεπτά στους 96^{o}C
2) 30 κύκλοι από:60 δευτερόλεπτα στους 96^{o}C, 90 δευτερόλεπτα στους 55^{o}C και 60 δευτερόλεπτα στους 72^{o}C
3) Τέλος 10 λεπτά στους 72^{o}C.

Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση αναγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ/ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
DNA template	**4 μl**	**100ngr**
Kapa Buffer (10x)	**2.5 μl**	**1x**
CMM5	**0.1 μl**	**0.625pMol**
CMM6	**0.1 μl**	**0.25mM**
dNTPs (από 10 mM)	**0.5 μl**	**1 mM**
Taq DNA Polymerase 5units/μl	**0.2 μl**	**1.75units/μl**
ddH2O	**17.6 μl**	
Τελικός όγκος	**25 μl**	

Για το ζευγάρι **PSA-4/PSA-R** το πρόγραμμα είναι το εξής:

1) 2,5 λεπτά στους 94^{o}C
2) 30 κύκλοι από:30 δευτερόλεπτα στους 94^{o}C, 20 δευτερόλεπτα στους 63^{o}C (ramp 0.5^{o}Cs^{-1}) και 45 δευτερόλεπτα στους 72^{o}C.
3) Τέλος 10 λεπτά στους 72^{o}C.

Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση αναγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ/ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
DNA template	**10 μl**	**100ngr**
Kapa Buffer (10x)	**2.5 μl**	**1x**
PSA-4	**0.1 μl**	**0.625pMol**
PSA-R	**0.1 μl**	**0.25mM**
dNTPs (από 10 mM)	**0.5 μl**	**1 mM**
Taq DNA Polymerase 5units/μl	**0.2 μl**	**1.75units/μl**
ddH2O	**11.6 μl**	
Τελικός όγκος	**25 μl**	

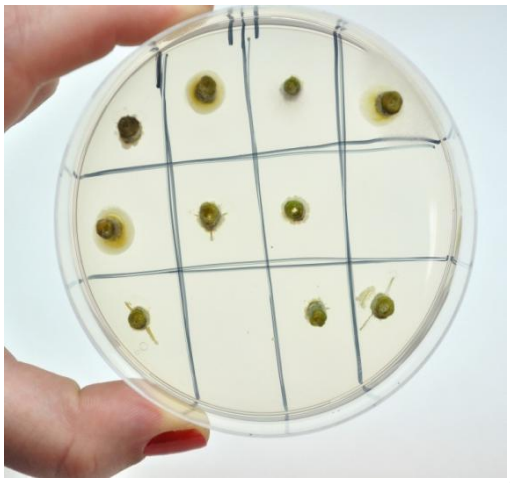
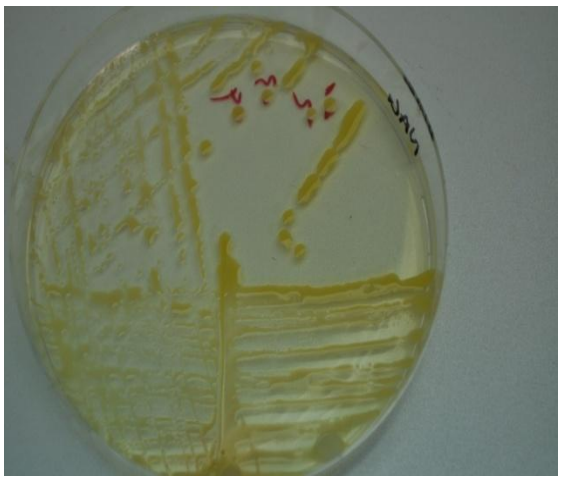
2.7 Επιβεβαίωση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης1.3% w/v

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης, συγκέντρωσης 1.3% w/v. Σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0.5x TBE, διαλύθηκαν 1,3 gr αγαρόζης με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων και στη συνέχεια προστέθηκαν 5 μl χρωστικής βρωμιούχο αιθύδιο. Το διάλυμα της αγαρόζης, αφέθηκε να πολυμεριστεί για περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε διάλυμα TBE αφού είχε τοποθετηθεί χτενάκι για να δημιουργηθούν οι θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων. Μετά τον πολυμερισμό, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα «πηγαδάκια» και ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση για 90 λεπτά σε 100 V. Η ποσότητα των δειγμάτων που φορτώθηκε ήταν 5 μl και ως μάρτυρας για την εκτίμηση του μεγέθους των ζωνών χρησιμοποιήθηκε DNA του φάγου λ κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο PstI. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Έλεγχος απομονώσεων

Οι απομονώσεις που εξήχθησαν από τη συλλογή ελέγχθηκαν με τη δοκιμή διαλυτότητας σε 3% KOH και διαπιστώθηκε η απουσία βλεννώδους ίνας γεγονός που υποδηλώνει ότι πρόκειται για κατά $Gram^+$ βακτήρια. Επίσης διαπιστώθηκε ότι όλες οι παραπάνω απομονώσεις αναπτύσσονται στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m-SCM και οι αποικίες τους εμφάνισαν τον αναμενόμενο φαινότυπο δηλαδή ήταν γυαλιστερές, κίτρινες και βλεννώδεις (Εικόνα 15α). Οι ίδιες απομονώσεις σε θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Glucose Agar εμφάνισαν βλεννώδη κίτρινη ανάπτυξη σε μικρές διαφοροποιήσεις στην ένταση του κίτρινου χρωματισμού τους (Εικόνα 15β) και (Πίνακας 1).

α)  β) 

Εικόνα 15 *α) Ανάπτυξη του βακτηρίου σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m- SCM. β) Τυπική καλλιέργεια του βακτηρίου σε υπόστρωμα NAG.*

3.2 Δοκιμές Παθογένειας

3.2.1 Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά Mirabilis jalapa

Κατά την εξέταση ικανότητας εκδήλωσης αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) όλες οι απομονώσεις προκάλεσαν την τυπική αντίδραση στα φύλλα των φυτών δειλινού (*Mirabilis jalapa* L.) στο προβλεπόμενο χρονικό διάστημα των 24-48 ωρών (Πίνακας 4) και (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. *Έλεγχος παθογένειας βακτηριακών στελεχών Cmm. Αντίδραση υπερευαισθησίας στο φυτό Miriabilis jalapa με στελέχη του Cmm που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία (σημειώνεται η αρνητική HR με το στέλεχος 4).*

3.2.2 Τεχνητές μολύνσεις σε σπορόφυτα τομάτας

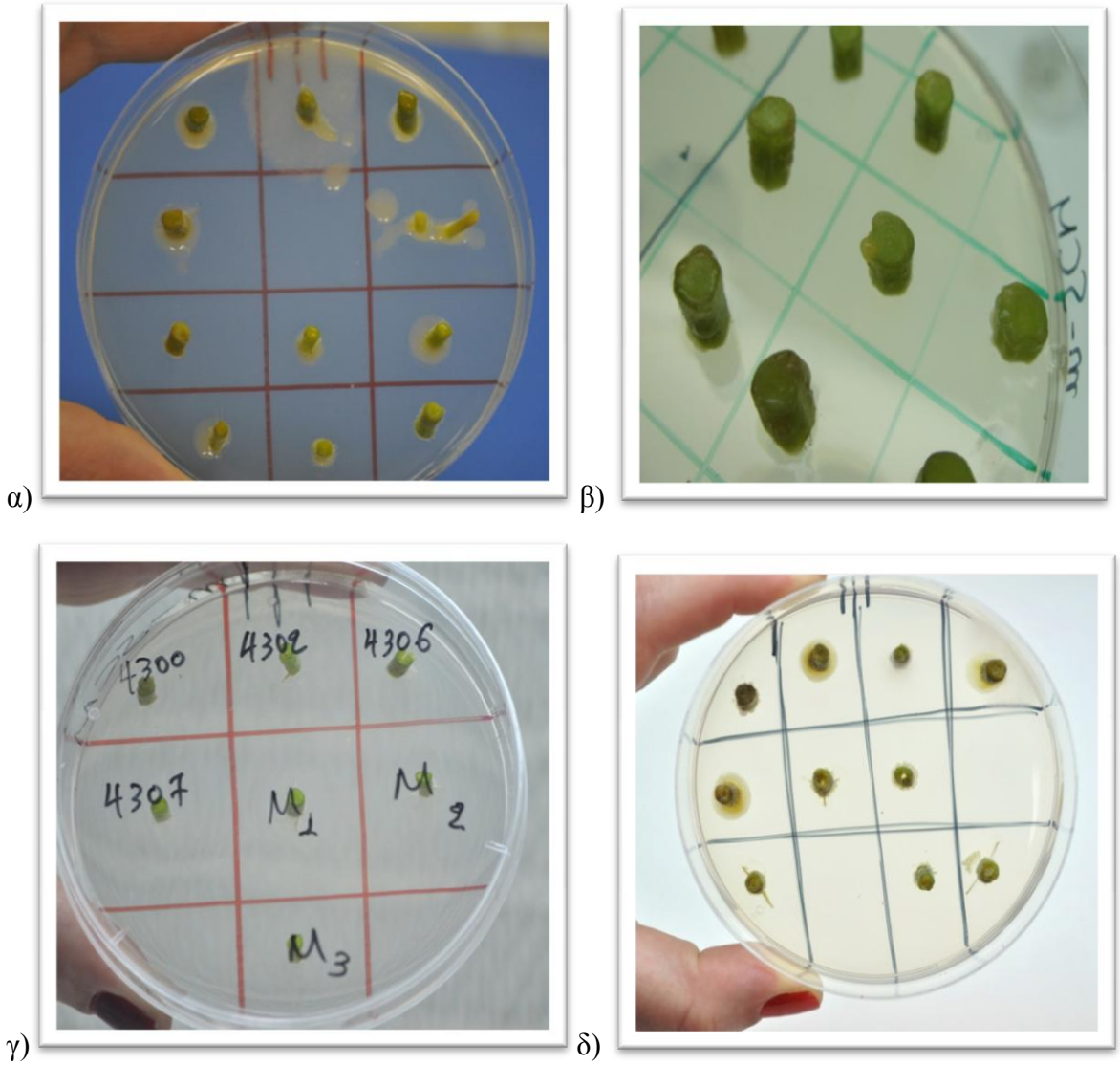
Πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις σε σπορόφυτα με την μεθοδολογία της αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας (Εικόνα 17) και (Πίνακας 3). Από τα 82 σπορόφυτα, τα 76 από αυτά με ποσοστό (92,68%) εμφάνισαν σε διάστημα 30 ημερών στο σύνολο ή μέρος των τυπικών συμπτωμάτων της ασθένειας βακτηριακού έλκους της τομάτας, δηλαδή: μάρανση, ημιπληγία φύλλου, συστροφή του ελάσματος προς τα πάνω, περίκαυμα, μεταχρωματισμό των αγγείων, νανισμό, νέκρωση και ξήρανση των φυτών. Σε όλες τις περιπτώσεις τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα όσο αφορά τα συμπτώματα που προκάλεσαν, ενώ όπου χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό, δεν παρατηρήθηκε εκδήλωση συμπτωμάτων. Σε επαναπομονώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG, επαναπομονώθηκε το ίδιο παθογόνο.



Εικόνα 17. *Τεχνητές μολύνσεις με βακτηριακά στελέχη Cmm σε σπορόφυτα με την μεθοδολογία της αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Παρατηρούνται συμπτώματα της ασθένειας όπως μάρανση, ημιπληγία, στα φύλλα συστροφή του ελάσματος προς τα πάνω νέκρωση και τέλος ξήρανση των φυτών.*

3.3 Αποτύπωμα μολυσμένου φυτικού ιστού σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m-SCM

Η απομόνωση του βακτηρίου με τη μεθοδολογία του «αποτυπώματος» σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα βρέθηκε απόλυτα ικανοποιητική αφού από τα 82 στα 76 (92,68%) ανιχνεύθηκε η παρουσία του βακτηρίου γύρω από τον φυτικό ιστό.

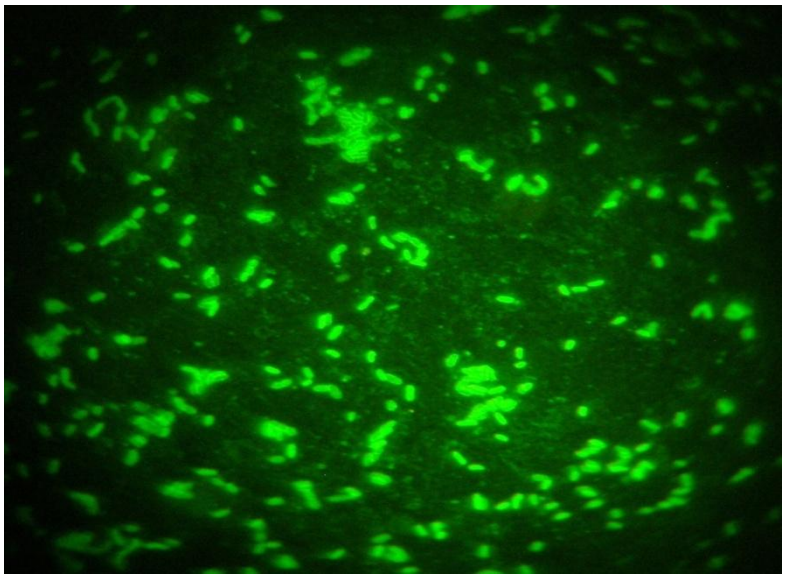


Εικόνα 18 *Εμφάνιση των αποτελεσμάτων μετά την εφαρμογή της μεθοδολογίας του «αποτυπώματος» σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m-SCM. Ανίχνευση της παρουσίας του βακτηρίου Cmm γύρω από τους φυτικούς ιστούς (εικόνα 18α,β,δ), καθώς και επιβεβαίωση της μεθοδολογίας με μάρτυρες υγιών φυτικών ιστών (εικόνα 18γ).*

3.4 Ορολογική ταυτοποίηση

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 με τη δοκιμή του έμμεσου ανοσοφθορισμού προέκυψε ότι από τα 82 βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, αντέδρασαν και τα 82 ποσοστό 100% με τον αντιορό antiClav 782, δίνοντας τον τυπικό φθορισμό (Εικόνα 19).

Επίσης με την δοκιμή του έμμεσου ανοσοφθορισμού με τον αντιορό antiClav 782 ελέγχθηκαν για την παρουσία βακτηριακών κυττάρων 82 φυτικά εκχυλίσματα από τα φυτάρια τομάτας που χρησιμοποιήθηκαν στις τεχνητές μολύνσεις για τον έλεγχο της παθογένειας. Και στα 82 εκχυλίσματα, που αντιστοιχεί σε ποσοστό 100% ανιχνεύτηκε η παρουσία του *Cmm*.



Εικόνα 19 . *Δοκιμή ανίχνευσης ανοσοφθορισμού. Παρατηρείται η φθορίζουσα χρώση των βακτηριακών κυττάρων του Cmm.*

3.5 Επιλογή στελεχών για μοριακή ταυτοποίηση

Επιλέχθηκαν σαράντα δύο στελέχη *Cmm* για μοριακή ανάλυση βασιζόμενοι: στη χρονολογία και στην περιοχή απομόνωσης, την ανάπτυξη συμπτωμάτων σε τουλάχιστον μια από τις μεθόδους ελέγχου της παθογένειας καθώς και στη θετική αντίδραση σε μια από τις δοκιμές ανοσοφθορισμού. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν εμφανίζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Βακτηριακά στελέχη *Cmm* που επιλέχθηκαν για μοριακή ταυτοποίηση με τους εξειδικευμένους εκκινητές CMM5/CMM6 και PSA-4/PSA-R αντίστοιχα καθώς και τα αποτελέσματα αυτών.

Α/Α	*CMM* ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	PCR ΜΕ CMM5/CMM6	PCR ΜΕ PSA-4/PSA-R
1	4282	Πελοπόννησος Κυπαρισσία	+	+
2	4284	Πελοπόννησος Κυπαρισσία	+	+
3	4287	Πελοπόννησος Κυπαρισσία	+	+
4	4288	Πελοπόννησος Κυπαρισσία	+	+
5	4309	Κουντούρα Χανιά	-	+
6	4310	Κουντούρα Χανιά	-	+
7	4314	Κουντούρα Χανιά	NT	+
8	4315	Κουντούρα Χανιά	NT	+
9	4321	Κουντούρα Χανιά	-	+
10	4322	Κουντούρα Χανιά	-	+
11	4325	Κουντούρα Χανιά	-	+
12	4326	Κουντούρα Χανιά	-	+
13	4329	Κουντούρα Χανιά	-	+
14	4330	Κουντούρα Χανιά	-	+
15	4333	Κουντούρα Χανιά	NT	+
16	4334	Κουντούρα Χανιά	NT	+
17	4337	Κουντούρα Χανιά	NT	+
18	4338	Κουντούρα Χανιά	-	+
19	4341	Ιεράπετρα Λασιθίου	NT	+
20	4342	Ιεράπετρα Λασιθίου	-	+
21	4345	Ιεράπετρα Λασιθίου	-	+
22	4346	Ιεράπετρα Λασιθίου	-	+
23	4349	Χερσόνησος Ηρακλείου	-	+
24	4352	Χερσόνησος Ηρακλείου	NT	+
25	4357	Κουντούρα Χανιά	-	+

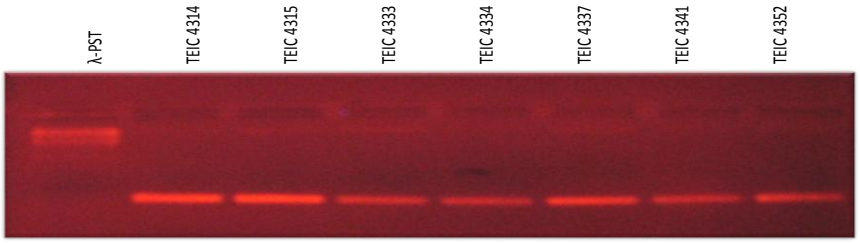
26	**4358**	**Κουντούρα Χανιά**	**-**	**+**
27	**4361**	**Ιεράπετρα Λασιθίου**	**NT**	**+**
28	**4362**	**Ιεράπετρα Λασιθίου**	**+**	**+**
29	**4373**	**Ελαφονήσι Χανιά**	**NT**	**+**
30	**4374**	**Ελαφονήσι Χανιά**	**+**	**+**
31	**4380**	**Ελαφονήσι Χανιά**	**NT**	**+**
32	**4381**	**Ελαφονήσι Χανιά**	**-**	**+**
33	**4384**	**Ελαφονήσι Χανιά**	**+**	**+**
34	**4385**	**Ελαφονήσι Χανιά**	**-**	**+**
35	**4389**	**Ιεράπετρα Λασιθίου**	**-**	**+**
36	**4390**	**Ιεράπετρα Λασιθίου**	**-**	**+**
37	**4396**	**Ιεράπετρα Λασιθίου**	**-**	**+**
38	**4397**	**Ιεράπετρα Λασιθίου**	**-**	**+**
39	**4404**	**Τυμπάκι Ηρακλείου**	**+**	**+**
40	**4405**	**Τυμπάκι Ηρακλείου**	**+**	**+**
41	**4414**	**Ξάνθη**	**+**	**+**
42	**4415**	**Ξάνθη**	**+**	**+**

NT: Δεν δοκιμάστηκαν

3.6 Μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων του βακτηρίου Cmm.

3.6.1 Ανίχνευση απομονωμένων DNAσε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την ολική απομόνωση του DNA έγινε έλεγχος για να αξιολογηθεί η ποιότητα της κάθε μιας απομόνωσης DNA από τα βακτηριακά στελέχη. Στην Εικόνα 20 παρουσιάζεται ένα πήκτωμα αγαρόζης (0.8% w/v) στο οποίο φορτώθηκαν απομονώσεις ολικού DNA από τα βακτηριακά στελέχη: TEIC4314, TEIC4315,TEIC4333,TEIC4334,TEIC4337,TEIC4341,και TEIC4352.

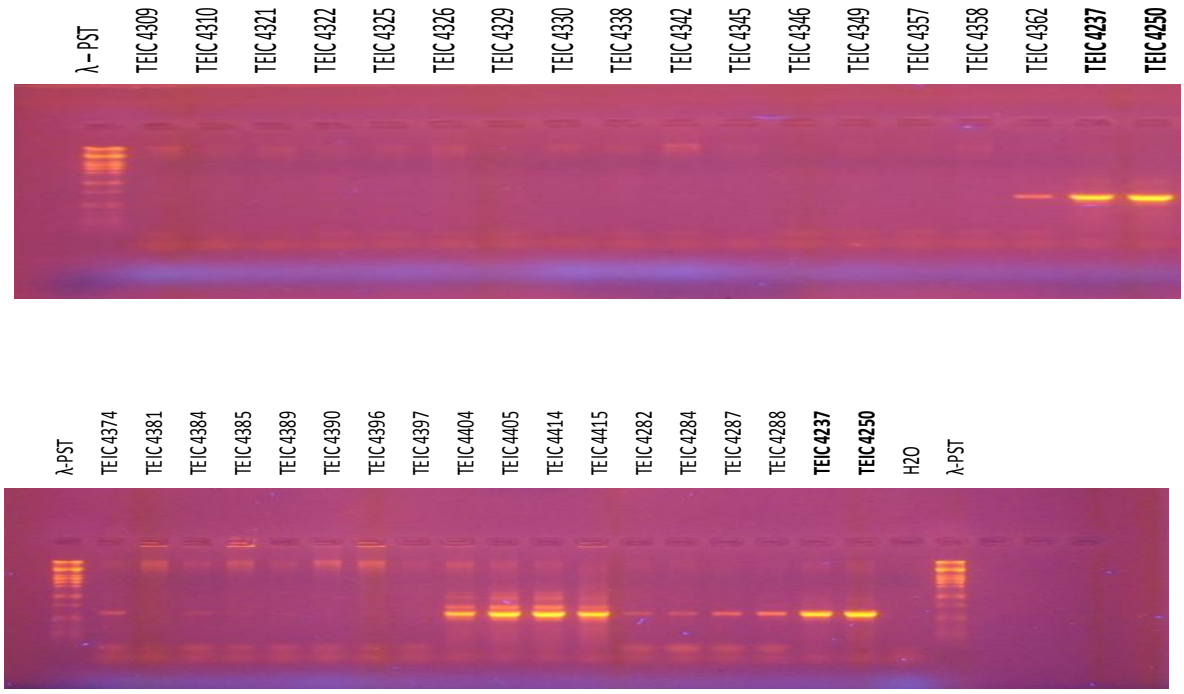


***Εικόνα20**. Πήκτωμα αγαρόζης ανάλυσης DNA με μοριακό δείκτη τον λ/PstI και DNA των βακτηριακών στελεχών που αναγράφονται και αποτελούν μέρος των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.*

3.7 Αποτελέσματα με τους εκκινητές CMM-PCR και PSA-PCR

3.7.1 CMM5 / CMM6 – PCR

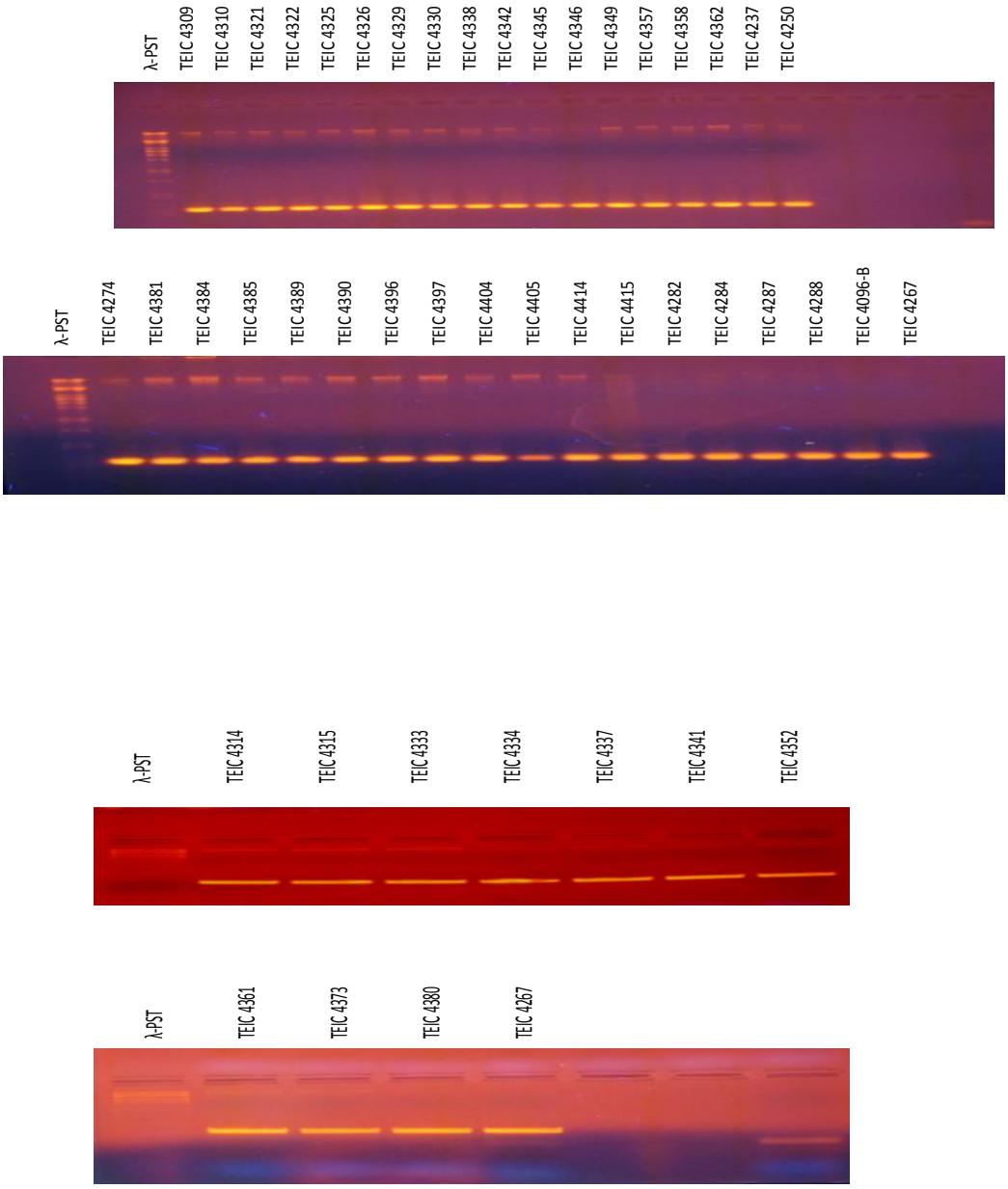
Για τη διεξαγωγή της CMM5/CMM6–PCR χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές CMM5/CMM6 που ανιχνεύουν τα βακτηριακά στελέχη του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Στην εικόνα 21 και στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα πρότυπα των ζωνών τα οποία έδωσαν οι συγκεκριμένοι εκκινητές σε πήκτωμα αγαρόζης 1.3% w/v. Αναλύοντας τα αποτελέσματα από τα 32 βακτηριακά στελέχη που ταυτοποιήθηκαν μοριακά, 11 συνολικά αντέδρασαν με το συγκεκριμένο ζευγάρι εκκινητών παράγοντας το αναμενόμενο προϊόν στα 614 bp και 21 δεν παρήγαγαν προϊόντα. Το ποσοστό ανίχνευσης με τους εκκινητές CMM5/CMM6 ήταν χαμηλό, 34.38%



Εικόνα 21. *Πήκτωμα αγαρόζης με τα προϊόντα CMM5/CMM6-PCR μοριακό δείκτη τον λ/PstI και DNA των βακτηριακών στελεχών. Φαίνονται το ζευγάρι των εξειδικευμένων εκκινητών για τα βακτηριακά στελέχη Cmm τα οποία δίνουν ζώνη μεγέθους 614 bp*

3.7.2 PSA-4/PSA-R-PCR

Για τη διεξαγωγή της PSA-4/PSA-R–PCR χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές PSA-4/PSA-R που ανιχνεύουν τα βακτηριακά στελέχη του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Στην εικόνα 22 και στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα πρότυπα των ζωνών τα οποία έδωσαν οι συγκεκριμένοι εκκινητές σε πήκτωμα αγαρόζης 1.3% w/v. Αναλύοντας τα αποτελέσματα από τα 42 βακτηριακά στελέχη που ταυτοποιήθηκαν μοριακά ήταν άριστα αφού και τα 42 στελέχη αντέδρασαν με το συγκεκριμένο ζευγάρι εκκινητών παράγοντας το αναμενόμενο προϊόν στα 270 bp. Το ποσοστό ανίχνευσης με τους εκκινητές PSA-4/PSA-R ήταν 100%.



Εικόνα 22. *Πήκτωμα αγαρόζης με τα προϊόντα PSA-4/PSA-RPCR μοριακό δείκτη τον λ/PstI και DNA των βακτηριακών στελεχών Cmm. Φαίνονται το ζευγάρι των εξειδικευμένων εκκινητών για τα βακτηριακά στελέχη Cmm τα οποία δίνουν ζώνη μεγέθους 270bp.*

3.8 Συσχέτιση βακτηριακών στελεχών και εξειδικευμένων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

Όπως προαναφέρθηκε με τους CMM5/CMM6 αντέδρασαν 11 βακτηριακά στελέχη από τα 32 ενώ με τους PSA-4/PSA-R αντέδρασαν 42 βακτηριακά στελέχη από τα 42. Συγκεκριμένα από τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την μοριακή ταυτοποίηση παρατηρούμε ότι 11 βακτηριακά στελέχη από τα 32 αντέδρασαν και με τα δύο ζευγάρια εξειδικευμένων εκκινητών CMM5/CMM6 και PSA-4/PSA-R, δηλαδή ποσοστό 34,38%.

<u>Πίνακας 5.</u> Αναλυτικά αποτελέσματα δοκιμών για την επιλογή στελεχών του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* από τη συλλογή του εργαστηρίου Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης.

Cmm ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	ΧΡΩΣΗ GRAM ΚΟΗ (3%)	IF	ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ PCR		ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ		ΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΕ m-SCM
			PRIMER CMM5/CMM6	PRIMER PSA-4/PSA-R	HR	ΤΕΧΝΗΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΣΕ ΣΠΟΡΟΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ	
4010	+	+	+	+	+	-	-
4072	+	+	-	+	+	+	+
4096-B	+	+	+	+	+	-	-
4205	+	+	-	+	+	+	+
4209	+	+	+	+	+	+	+
4214	+	+	-	+	+	+	+
4219	+	+	-	-	+	-	-
4221	+	+	-	-	+	-	+
4223	+	+	+	+	+	+	+
4225	+	+	+	+	+	-	-
4235	+	+	+	+	+	+	+
4237	+	+	+	+	+	+	+
4249	+	+	+	+	+	+	+
4250	+	+	+	+	+	+	+

Cmm **ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕ-ΧΟΥΣ**	**ΧΡΩΣΗ GRAM**	**IF**	**PRIMER CMM5/CMM6**	**PRIMER PSA-4/PSA-R**	**HR**	**ΤΕΧΝΗΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΣΕ ΣΠΟΡΟΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ**	**ΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΕ m-SCM**
4255	+	+	+	+	+	+	+
4256	+	+	+	+	+	+	+
4258	+	+	+	+	+	+	+
4259	+	+	+	+	+	+	+
4260	+	+	+	+	+	+	+
4261	+	+	+	+	+	+	+
4262	+	+	-	+	+	+	+
4266	+	+	+	-	+	+	+
4267	+	+	+	+	+	+	+
4268	+	+	+	+	+	+	+
4274	+	+	-	+	+	+	+
4275	+	+	+	+	+	+	+
4276	+	+	+	+	+	+	+
4280	+	+	+	+	+	+	+
4281	+	+	+	+	+	+	+
4282	+	+	+	+	+	+	+
4283	+	+	+	+	+	+	+
4284	+	+	+	+	+	+	+
4287	+	+	+	+	+	+	-
4288	+	+	+	+	+	+	+
4289	+	+	+	+	+	+	+
4290	+	+	-	+	+	+	-
4300	+	+	+	+	+	+	+
4302	+	+	+	+	+	+	+
4306	+	+	+	+	+	+	+
4307	+	+	+	+	+	+	+
4309	+	+	-	+	+	+	+

Cmm **ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕ-ΧΟΥΣ**	**ΧΡΩΣΗ GRAM**	**IF**	**PRIMER CMM5/CMM6**	**PRIMER PSA-4/PSA-R**	**HR**	**ΤΕΧΝΗΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΣΕ ΣΠΟΡΟΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ**	**ΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΕ m-SCM**
4310	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**
4314	**+**	**+**	**NT**	**+**	**+**	**+**	**+**
4315	**+**	**+**	**NT**	**+**	**+**	**+**	**+**
4321	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**
4322	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**
4325	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**
4326	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**
4329	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**
4330	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**
4333	**+**	**+**	**NT**	**+**	**+**	**+**	**+**
4334	**+**	**+**	**NT**	**+**	**+**	**+**	**+**
4337	**+**	**+**	**NT**	**+**	**+**	**+**	**+**
4338	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**
4341	**+**	**+**	**NT**	**+**	**+**	**+**	**+**
4342	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**
4345	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**
4346	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**
4349	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**
4352	**+**	**+**	**NT**	**+**	**+**	**+**	**+**
4357	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**-**	**+**
4358	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**
4361	**+**	**+**	**NT**	**+**	**+**	**+**	**+**
4362	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**
4373	**+**	**+**	**NT**	**+**	**+**	**+**	**+**
4374	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**
4380	**+**	**+**	**NT**	**+**	**+**	**+**	**+**
4381	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**

Cmm **ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ**	**ΧΡΩΣΗ GRAM**	**IF**	**PRIMER CMM5/CMM6**	**PRIMER PSA-4/PSA-R**	**HR**	**ΤΕΧΝΗΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΣΕ ΣΠΟΡΟΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ**	**ΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΕ m-SCM**
4384	+	+	+	+	+	+	+
4385	+	+	-	+	+	+	+
4389	+	+	-	+	+	+	+
4390	+	+	-	+	+	+	+
4396	+	+	-	+	+	+	+
4397	+	+	-	+	+	+	+
4404	+	+	+	+	+	+	+
4405	+	+	+	+	+	+	+
4412	+	+	**NT**	**NT**	+	+	+
4413	+	+	**NT**	**NT**	+	+	+
4414	+	+	+	+	+	+	+
4415	+	+	+	+	+	+	+
4416	+	+	**NT**	**NT**	+	+	+
4417	+	+	**NT**	**NT**	+	+	+

IF= Δοκιμή έμμεσου ανοσοφθορισμού σε αιώρημα βακτηρίου.

HR= Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά Mirabilis jalapa.

NT= Δεν δοκιμάστηκαν.

=διαφορές αποτελεσμάτων

=στέλεχη βακτηρίων για μοριακή ταυτοποίηση

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το βακτηριακό έλκος της τομάτας αποτελεί μία σημαντική ασθένεια της τομάτας. Στην Ελλάδα η ασθένεια είναι γνωστή από πολύ παλιά. Τις καλλιεργητικές περιόδους 2010-2013 η ασθένεια παρουσίασε ιδιαίτερη έξαρση στην Κρήτη έχοντας σαν αποτέλεσμα σημαντικές ζημιές σε διάφορες περιοχές καλλιέργειας της τομάτας και ιδιαίτερα στην περιοχή της Κουντούρας Χανίων (Γκούμας, 2012). Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε η μελέτη στελεχών του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis.* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας που είχαν απομονωθεί το διάστημα 2010-2013 και προκαταρτικά είχαν ταυτοποιηθεί με μορφολογικές και βιοχημικές δοκιμές ως μέλη του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Από τα αποτελέσματα μας προκύπτει ότι όλα τα βακτηριακά στελέχη με βάση τη δοκιμή του ανοσοφθορισμού ανήκουν στο είδος *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis.* Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από τις μοριακές δοκιμές αφού από το σύνολο των 82 εξετασθέντων στελεχών τα 76 ανιχνεύτηκαν με ένα από τα δύο σετ ζευγών των εξειδικευμένων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Το γεγονός ότι 6 στελέχη δεν ανιχνεύθηκαν με κανένα από τους δύο primers, ότι ανιχνεύθηκαν μη παθογόνα στελέχη αλλά και η μη ομοιόμορφη ανίχνευση από τα δύο ζεύγη εκκινητών, πιθανά να οφείλεται στη μεγάλη ποικιλομορφία που εμφανίζεται μέσα στο είδος *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* και η οποία έχει διαπιστωθεί και από άλλους ερευνητές (Leon *et al*., 2011). Η εργασία αυτή μπορεί να αποτελέσει τη βάση για τη παραπέρα μελέτη της πιθανής ποικιλομορφίας των στελεχών του βακτηρίου στην Κρήτη. Τέλος στην εργασία αυτή επιβεβαιώθηκε η αξιοπιστία των μεθοδολογιών που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο για τον έλεγχο της παθογένειας των απομονώσεων αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) και της απομόνωσης του παθογόνου από σπορόφυτα τομάτας («αποτύπωμα» σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα m-SCM).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική βιβλιογραφία

Αντωνίου, Π., Τζάμος, Ε.Κ., Παναγόπουλος, Χ.Γ., 1992. Η αντιμετώπιση του βακτηριακού έλκους της τομάτας με την εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης του εδάφους. *6ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο*, 6-8/10/92, Πάτρα (σελ.45-46).

Γκούμας, Δ., 2011 «Εργαστηριακές ασκήσεις φυτοπαθολογίας». Ηράκλειο 2011. Σελ. 48,52.

Κωνσταντίνου, 2012. Μελέτη αντιξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων φυτών των οικογενειών Asteraceae και Geraceae που φυτεύονται στην Κύπρο. http://ktisis.cut.ac.cy/handle/10488/5487

Μπαγκής & Γκούμας, 2012 «Βακτηριακό έλκος της τομάτας». Γεωργικές προειδοποιήσεις. Δεκέμβριος 2012, ΠΚΠΦ/ΠΕ Ηρακλείου.

Μωραΐτης, 2011. Αξιολόγηση επιφανειοδραστικών ουσιών για την αντιμετώπιση του βακτηριακού έλκους της τομάτας. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. σελ.9-21.

Παναγόπουλος, Γ.Χ., 1992. Ασθένειες της τομάτας, Αθήνα, σελ. 38-41.

Παναγόπουλος Χ. Γ., 2000. «Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών». Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.

Τζάμος, Ε. Κ., 2004. «Φυτοπαθολογία». Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.

Ξένη βιβλιογραφία

Anonymous, 2005. EPPO Standards PM 7/42 (1) Diagnostic. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis.* Bull. OEPP-EPPO Bull. 35:275-283.

Antoniou P. P., Tjamos E. C., & Panagopoulos C. G., 1995. Use of soil solarization for controlling bacterial canker of tomato in plastic houses in Greece. Plant Pathology, 44: 438-447.

Daferera D., Ziogas B., Polissiou M., 2003. The effectiveness of plant essential oil on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protectio, 22 39-44.

De Leon, L., Siverio, F., Lopez, M. M., Rodriguez, A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a Seddborne Tomato Pathogen: Healthy Seeds Are Still the Goal. Plant Disease. 95(11):1328-1338.

George, M. L. C., Nelson, R. J., Zeigler, R. S., Leung, H., 1998. Rapid Population Analysis of *Magnaporthe grisea* by Using rep-PCR and Endogenous Repetitive DNA Sequences. *Phytopathology*, *88*(3), 223-229.

Kasselaki, A.M., Goumas, D. Tamm, L., Fuchs, J. Cooper, J., Leifert, C., 2011 Effect of alternative strategies for the disinfection of tomato seed infected with bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences* 58 145– 147.

Kritzman, G., 1993. A chemi-thermal treatment for control of seedborne bacterial pathogens of tomato. *Phytoparasitica*, 21:101-109.

Louws, F. J., Rademaker, J. L. W., Bruijn, F. J., 1999. The three Ds of PCR-basedgenomic analysis of phytobacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis.*Annual Review of Phytopathology*, *37*, 81-125.

Roche, 1999. "Manual for successful PCR", Roche, Σελ. 12-15

http://en.wikipedia.org/wiki/Clavibacter_michiganensis

http://bacmap.wishartlab.com

http://www.oardc.ohio-state.edu/

http://aem.asm.org/content/79/22/6948/F2.large.jpg3

http://fridge.gr/21667/stiles/pcr-dna/

<Εδώ μπορείτε να τοποθετήσετε μια συντομογραφία του τίτλου της πτυχιακής εργασίας σας – το πολύ έως 6 λέξεις – Διαφορετικά να μείνει κενό