

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΗΚΟΤΗΤΑΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ  
ΧΑΝΤΗΟΜΟΝΑΣ SPP ΠΟΥ ΠΡΟΣΒΑΛΟΥΝ ΤΗΝ ΤΟΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΙΠΕΡΙΑ**



**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ:** Λιναρδάτου Αλεξάνδρα

**ΑΡ.ΜΗΤΡΩΟΥ:** 2014057

**ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ:** Δρ. Βασίλειος Δημόπουλος

**ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ:** Μαρία Χολέβα

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

1	Περίληψη	5
1.α	Περίληψη Συνεδρίου	6
1.1	Εισαγωγή	8
1.1.1	Η καλλιέργεια πιπεριάς και τομάτας στην Ελλάδα	8
1.1.2	Πιπεριά	8
1.1.3	Τομάτα	9
1.2	Ποικιλίες πιπεριάς	10
1.3	Βακτηριολογικές ασθένειες της πιπεριάς και τομάτας	10
1.4	Φωτογραφικό υλικό	11

## **ΜΕΡΟΣ Α**

2.	Εξάπλωση και οικονομική σημασία της ασθένειας στην Ελλάδα και στον κόσμο	13
2.1	Γεωγραφική κατανομή	14
3.	Συμπτώματα ασθένειας	20
3.1	Φυτά ξενιστές παθογόνου	22
3.2	Επιδημιολογία της ασθένειας	23
3.3	Μέτρα διαχείρισης της ασθένειας	23
4.	Περιγραφή του παθογόνου	24
4.1	Ταξινομική θέση του παθογόνου	24
4.2	Μορφολογικά - Βιοχημικά χαρακτηριστικά	24
5.	Διαγνωστικές μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης του παθογόνου	25

## **ΜΕΡΟΣ Β**

1.1	Υλικά και μέθοδοι	26
1.1.1	Ως προς την διατήρηση των στελεχών	28
1.1.2	Ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά	28
1.1.3	Βιοχημικές δοκιμές	29
1.1.4	Ορολογική δοκιμή	31
1.1.5	Δοκιμές παθογένειας	31
1.1.6	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR	32

## **ΜΕΡΟΣ Γ**

2.1	Αποτελέσματα ως προς την μορφολογία	33
2.2	Αποτελέσματα Δοκιμής χρώσης Gram	37
2.3	Αποτελέσματα στη δοκιμή παραγωγής οξειδάσης	37
2.4	Αποτελέσματα Παραγωγής διαχεόμενης φθορίζουσας χρωστικής	37
2.5	Αποτελέσματα στη δοκιμή παρεμπόδισης ανάπτυξης σε θρεπτικό υλικό nutrient agar με TTC	38
2.6	Αποτελέσματα στη δοκιμή αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού	38
2.7	Αποτελέσματα στη δοκιμή παραγωγής αμυλάσης	39
2.8	Αποτελέσματα στη δοκιμή παραγωγής υδρόθειου (H <sub>2</sub> S)	40
2.9	Αποτελέσματα στη δοκιμή παθογένειας των απομονώσεων σε λοβούς φασολιού	41
3.1	Αποτελέσματα στην ορολογική δοκιμή ανοσοφθορισμού IF	41
3.2	Αποτελέσματα Δοκιμής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και οριζόντια ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR...	42
	Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων	47

## **Ευχαριστίες**

Ευχαριστώ την υπεύθνη ευρευνήτρια του εργαστηρίου βακτηριολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, Χολέβα Μαρία για την καθοδήγησή της, την επίβλεψή της, και τον χρόνο που αφιέρωσε ώστε να γίνουν όλα τα πειράματα που χρειάστηκαν για την εργασία, καθώς και για τις πολύτιμες καινούριες γνώσεις που απέκτησα. Τους υπόλοιπους εργαζομένους στο εργαστήριο της βακτηριολογίας που με βοήθησαν στα πειράματα της εργασίας . Και τέλος ευχαριστώ πολύ τον υπεύθυνο καθηγητή τον Κυριο Δημόπουλο Βασίλειο που βοήθησε πολύ στην ολοκλήρωση της εργασίας.

## 1.Περίληψη

Τα βακτήρια *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas vesicatoria* παθογόνα αίτια της βακτηριακής κηλίδωσης της πιπεριάς (*Capsicum annum*) και τομάτας (*Lycopersicon esculentum*) απομονώθηκαν από σπορόφυτα πιπεριάς, που στάλθηκαν στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο Ν.Π.Δ.Δ από περιοχές που αναγράφονται στον πίνακα 3.2. Επίσης απομονώθηκαν και τα εξής είδη *X.axonopodis* pv *vesicatoria*, *X.axonopodis* pv *phaseoli*, *X.campestris* pv *phaseoli* τα οποία προσβάλουν κυρίως τα φασολάκια και βοήθησαν στη σύγκριση μεταξύ των συγγενικών ειδών.

Η προσβολή εκδηλώνεται με μικρές υδαρείς κηλίδες στα φύλλα που σταδιακά εξελίσσονται σε νεκρωτικές κηλίδες και συνήθως περιβάλλονται από χλωρωτικό περιθώριο. Συχνά οι κηλίδες συνενώνονται, προκαλώντας τη νέκρωση και την πρόωρη πτώση των φύλλων. Πρόκειται για ένα κατά Gram αρνητικό βάκιλο που σχηματίζει τις τυπικές κίτρινες και βλενώδης αποικίες σε θρεπτικά υποστρώματα NA, YDC, YPGA και αναπτύσσεται στο εκλεκτικό υπόστρωμα Tween.

Τα απομονωθέντα βακτήρια παρατηρείται ότι, παράγουν οξέα από αραβινόζη, μαννόζη και γλυκόζη, τα στελέχη δεν αναπτύσσονται σε 0,1% TTC. Στην δοκιμή παραγωγής φθορίζουσας χρωστικής ως προς το UV δεν φθορίζουν τα στελέχη, σε αντίθεση με τον θετικό μάρτυρα *Pseudomonas.syringae*. Ένα σημαντικό μορφολογικό χαρακτηριστικό που παραλλάσσεται αποδίδεται στην συνήθη κροκίδωση που δημιουργείται στις αποικίες όταν καλλιεργηθούν στο υλικό TMB(m) όμως δεν παρατηρείται σε όλα τα απομονωθέντα βακτήρια. Επίσης δεν είναι όλα αμυλολυτικά, από την δοκιμή άμυλου (starch) (RA Lelliot) παρατηρείται ότι δεν χρησιμοποιούν το άμυλο όλα τα στελέχη. Επίσης ήταν αρνητικά στην οξειδάση όμως κάποια στελέχη μετά από λίγα δευτερόλεπτα είχαν ελαφρώς θετικά αποτελέσματα.

Όλα Τα στελέχη έδωσαν την αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού, ενώ παρουσίασαν συμπτώματα παθογένειας σε φύλλα τομάτας, και λοβούς φασολιών.

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής θα παρουσιασθούν στο 19<sup>ο</sup> Φυτοπαθολογικό Συνέδριο .

## 1.α Περίληψη Συνεδρίου

**Η ασθένεια της Βακτηριακής κηλίδωσης της πιπεριάς: Φαινοτυπική και γενετική παραλλακτικότητα τοπικών στελεχών *Xanthomonas spp.* που προκαλούν την ασθένεια στην Ελλάδα**

Π.Ε. Γλυνός<sup>1</sup>, Χ.Δ. Καραφλά<sup>1</sup>, Α. Λιναρδάτου<sup>1</sup>, Ε. Σιδερέα<sup>1</sup>, Α. Τόγιας<sup>1</sup>, Χ. Ρέππα<sup>1</sup>, Μ.Κ. Χολέβα<sup>1</sup>  
*Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Τμήμα Φυτοπαθολογίας, Εργαστήριο Βακτηριολογίας, Στ. Δέλτα 8, 14561 Κηφισιά<sup>1</sup>*  
e-mail: m.holeva@bpi.gr

Η ασθένεια 'βακτηριακή κηλίδωση της πιπεριάς' (ΒΚΠ), έχει αναφερθεί στην Ελλάδα από το 1976 και από τότε, βάσει στοιχείων αρχείου των εξεταζόμενων στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο (ΜΦΙ) σχετικών δειγμάτων, φαίνεται πως η ασθένεια προκαλεί σοβαρές απώλειες στην παραγωγή, υπό ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξή της. Στην παρούσα αναρτημένη ανακοίνωση παρουσιάζονται προκαταρκτικά αποτελέσματα μελέτης της φαινοτυπικής και γενετικής παραλλακτικότητας στελεχών του γένους *Xanthomonas*, που απομονώθηκαν από ασθενή φυτά πιπεριάς την τελευταία δεκαετία στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας του ΜΦΙ. Ειδικότερα, η μελέτη περιλαμβάνει το χαρακτηρισμό των στελεχών με βάση: α) τη μορφολογία των αποικιών τους σε γενικής χρήσης και ημικλεκτικά θρεπτικά υλικά, β) την αντίδρασή τους σε εμπορικά διαθέσιμους αντιορούς με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού, γ) τα αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμών, δ) τη μοριακή ταυτοποίηση, ε) την ανάλυση του γενετικού αποτυπώματος, στ) την αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού και ζ) τις δοκιμές παθογένειας. Ως προς την παθογένεια, μελετώνται γονίδια σχετιζόμενα με την αλληλεπίδραση παθογόνων-ξενιστών, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν και ως βάση ανάλυσης του φυλογενετικού συσχετισμού των μελετώμενων στελεχών. Η μελέτη αποσκοπεί στην ταυτοποίηση του πληθυσμού *Xanthomonas spp.* που επικρατεί στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια προσβάλλοντας καλλιέργειες πιπεριάς, και στην απόκτηση νέων στοιχείων για τα φαινοτυπικά και γενετικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού αυτού, που βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα της διάγνωσης και αντιμετώπισης της ΒΚΠ.

**The bacterial spot disease of pepper: Phenotypic and genetic variability of local strains of *Xanthomonas* spp. which cause the disease in Greece**

P.E. Glynos<sup>1</sup>, C. D. Karafli<sup>1</sup>, A. Linardatou<sup>1</sup>, E. Siderea<sup>1</sup>, A. Toghias<sup>1</sup>, C. Reppa<sup>1</sup>, M.C. Holeva<sup>1</sup>  
*Benaki Phytopathological Institute, Department of Phytopathology, Laboratory of Bacteriology, 8 Stefanou Delta Street, Kifissia, Athens, 14561<sup>1</sup>*  
e-mail: m.holeva@bpi.gr

The 'bacterial spot disease of pepper' (BSP) was first reported in Greece in 1976 and since then, based on records kept at the Benaki Phytopathological Institute (BPI) it seems that, the disease is causing serious crop losses, under favourable conditions for its development. This poster communication presents preliminary results of a study on the phenotypic and genetic variability of strains of the genus *Xanthomonas* isolated from BSP affected pepper plants at the Laboratory of Bacteriology of the BPI the last decade. In specific, the study encompasses the characterization of strains, based on: a) colony morphology in general and semi-selective culture media, b) their reaction to commercial antisera used in immunofluorescence assays, c) the results of biochemical testing, d) molecular identification techniques, e) genomic fingerprinting, f) hypersensitivity reaction tests on tobacco, and g) pathogenicity tests. Regarding pathogenicity, the study is focused on host-pathogen interaction genes, which could be used as a base for the phylogenetic correlation analysis of the strains under examination. The study aims at determining the prevailing *Xanthomonas* spp. population in Greece the recent years which affects pepper cultivars, and at acquiring new data on genetic and phenotypic characteristics of this population which contribute to more effective diagnosis and management of BSP.

## 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1.1 Η καλλιέργεια της πιπεριάς και της τομάτας στην Ελλάδα

Η τομάτα και η πιπεριά είναι σημαντικές καλλιέργειες στην Ελλάδα όπως φαίνεται στα παρακάτω στοιχεία από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.

#### 1.1.2 Πιπεριά

Από τα στοιχεία που παρουσιάστηκαν διαπιστώνεται ότι οι εκτάσεις που καλλιεργούνται με πιπεριά υπό κάλυψη, δεν είναι πολύ μεγάλες. Σε γενικές γραμμές τόσο οι υπαίθριες καλλιέργειες, όσο και η υπό κάλυψη μαζί, παρουσιάζουν μια αύξηση τα τελευταία χρόνια και αυτό οφείλεται κυρίως στις τάσεις αύξησης των εξαγωγών. Η έκταση της συνολικής καλλιέργειας το 2012 ήταν 42.327 στρέμματα και η παραγωγή 164.273 τόνους σύμφωνα με τον ΥΠΠΑΤ (Ολύμπιος, 2015). Στον Πίνακα 1.1. αναγράφεται η έκταση, παραγωγή καθώς και η στρεμματική απόδοση της υπαίθριας και της υπό κάλυψη καλλιέργειας πιπεριάς συνολικά στην Ελλάδα κατά τη χρονική περίοδο 2008-2012.

**Πίνακας 1.1.** Καλλιέργεια πιπεριάς στην Ελλάδα 2008-2012

ΕΤΟΣ	ΕΚΤΑΣΗ (στρέμματα)	ΠΑΡΑΓΩΓΗ (tn)	ΣΤΡΕΜΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΔΟΣΗ (Kg/στρ.)
<b>Υπαίθρια</b>			
2008	30.750	70.340	2.287
2009	30.010	68.316	2.276
2010	27.910	44.010	1.577
2011	29.560	60.889	2.060
2012	33.118	73.383	2.220
<b>Υπό κάλυψη</b>			
2008	7.790	69.353	8.898
2009	7.270	65.100	8.955
2010	10.770	96.965	9.003
2011	8.610	77.139	8.959
2012	9.209	90.890	9.869

Πηγή: Στατιστική υπηρεσία Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων



### 1.1.3. Τομάτα

Το 2012 η συνολική καλλιέργεια και παραγωγή της τομάτας είχε μειωθεί σημαντικά, κυρίως λόγω μείωσης των καλλιεργούμενων εκτάσεων της βιομηχανικής τομάτας και επίσης ότι από το σύνολο των καλλιεργούμενων εκτάσεων το 2012, το 57% ήταν οι υπαίθριες με μέση παραγωγή 11,68 τόνους/στρ. και 25% η βιομηχανική τομάτα με μέση απόδοση 7,7 τόνους/στρ.(Ολύμπιος 2015). Στον πίνακα 1.2. αναγράφεται η έκταση, παραγωγή της υπαίθριας και της υπό κάλυψη καλλιέργειας τομάτας και της βιομηχανικής τομάτας συνολικά στην Ελλάδα κατά τη χρονική περίοδο 2008-2012.

**Πίνακας 1.2.** Καλλιέργεια Υπαίθρου τομάτας 2008-2012

<b>ΕΤΟΣ</b>	<b>ΕΚΤΑΣΗ (στρέμματα)</b>	<b>ΠΑΡΑΓΩΓΗ (tn)</b>	<b>ΣΤΡΕΜΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΔΟΣΗ (Kg/στρ.)</b>
<b>Υπαίθρια</b>			
2008	101.260	352.280	3.478
2009	101.260	352.280	3.478
2010	144.380	699.040	4.841
2011	8.610	467.867	54.339
2012	93.153	340.937	3.659
<b>Υπό κάλυψη</b>			
2008	34.800	391.191	11.241
2009	30.052	358.295	11.922
2010	22.870	274.691	12.010
2011	29.400	341.392	11.611
2012	29.115	340.339	11.689
<b>Βιομηχανική</b>			
2008	93.030	1.082.699	11.6381
2009	113.000	813.675	7.194
2010	74.720	432.501	5.788
2011	93.580	776.292	8.295
2012	40.339*	310.937*	7.708

Πηγή: Στατιστική υπηρεσία Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων

\*Παρουσιάζεται σημαντική μείωση σε σύγκριση με άλλες χρονικές περιόδους.

## 1.2. Ποικιλίες της πιπεριάς στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα καλλιεργούνται οι παρακάτω εμπορικοί τύποι.

- α) Οι φλάσκες πιπεριές, (κυρίως στη Βόρεια Ελλάδα και στη Θεσσαλία).
- β) Οι τύπου Lamυγο (που μοιάζουν με τις φλάσκες αλλά είναι ελαφρά επιμήκεις), σε θερμοκήπια της Νότιας Ελλάδος.
- γ) Οι μακριές ανοιχτοπράσινες (τύπου Κέρατο), σε θερμοκήπια της Ιεράπετρας και της Ημαθίας.
- δ) Οι καυτερές, οι γλυκές πιπεριές (τύπου Φλωρίνης) και οι τοματο- πιπεριές, σε μικρές εκτάσεις στη Βόρεια Ελλάδα.
- ε) Οι καρποί τύπου Φλάσκας σε διάφορα χρώματα (κόκκινο, κίτρινο, πορτοκαλί κ.α.), είναι κατά 90% εισαγόμενοι και μόνο ένα 10% παράγεται σε θερμοκήπια της Κρήτης (Ιεράπετρα), (Ολύμπιος 2015), (Σάββας, 2000)

## 1.3. Βακτηριολογικές ασθένειες της πιπεριάς και της τομάτας

Οι σημαντικότερες βακτηριολογικές ασθένειες που προσβάλουν την τομάτα και την πιπεριά αναγράφονται στον πίνακα 2.1 καθώς και το παθογόνο που προκαλεί την κάθε ασθένεια.

**Πίνακας 1.3.** Βακτηριολογικές ασθένειες τομάτας και πιπεριάς

ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ	ΤΟΜΑΤΑ	ΠΙΠΕΡΙΑ
Βακτηριακό έλκος	<i>Clavibacter michiganesis</i> subsp. <i>michiganesis</i>	+	+
Βακτηριακή στιγματώση	<i>Pseudomonas syringae</i>  v. <i>tomato</i>	+	+
Βακτηριακή μάρανση	<i>Ralstonia solanacearum</i>	+	+
Βακτηριακή κηλίδωση	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	+	+
Νέκρωση της εντεριώνης	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	+	+
	<i>Pseudomonas corrugata</i>	+	+
	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> )	+	+
Ασθένεια από φυτόπλασμα stolbur	<i>Candidatus Phytoplasma solani</i>	+	+

#### 1.4.Φωτογραφικό υλικό

Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα συμπτώματα των ασθενειών.

Στην εικόνα 1.1 το βακτηριακό έλκος, στην 1.2 η βακτηριακή στιγματώση και στην εικόνα 1.3 της βακτηριακής κηλίδωσης σε φύλλο.



**Εικόνα 1.1.**Βακτηριακό έλκος



**Εικόνα 1.2.** Βακτηριακή στιγματώση



**Εικόνα 1.3 . Βακτηριακή Κηλίδωση**

## ΜΕΡΟΣ Α

### 2.Εξάπλωση και οικονομική σημασία της Βακτηριακής Κηλίδωσης στην Ελλάδα και στον κόσμο

Στην Ελλάδα διαπιστώθηκε η ασθένεια το 1976 σε καρπούς τομάτας στη περιοχή της Θεσσαλονίκης, χωρίς όμως να μελετηθεί ή και να απομονωθεί το παθογόνο. (Παναγόπουλος, 2000). Στον πίνακα 3.1 αναγράφονται τα δείγματα με συμπτώματα που έχουν σταλεί στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο από το 1970 ως σήμερα(Μ.Φ.Ι),τον Πίνακα 3.2 αναγράφονται τα δείγματα από τα οποία έγιναν όλες οι δοκιμές καθώς και το ποσοστό προσβολής της κάθε καλλιέργειας.

**Πίνακας 3.1:** Δείγματα πιπεριάς και τομάτας που έχουν σταλεί στο Μ.Φ.Ι από το 2001

Δείγμα	Περιοχή	Χρονολογία	Πληροφοριακό Δελτίο
Τομάτα	Σκοπιά Φαρσάλων	2001	2028
Τομάτα	Λάρισα	2002	3459
Τομάτα	Κωπαΐδα	2007	4048
Πιπεριά	Κοζάνη	2008	2469, 4017
Πιπεριά	Φάρσαλα		4143, 4144
Πιπεριά	Καβάλα	2009	4016, 4017
Πιπεριά	Κοζάνη		4930
Πιπεριά	Καρδίτσα		5238
Πιπεριά	Καρδίτσα	2010	1923
Πιπεριά	Κοζάνη	2010	4720
Τομάτα	Θήβα	2013	4747
Πιπεριά Φλωρίνης	Καβάλα		4210, 4187
Πιπεριά	Καστοριά	2014	5263
Πιπεριά	Καρδίτσα	2018	5963

Η δριμύτητα ασθενειών στην ντομάτα έφθασε σε 30.22% με μια συνολική παραγωγικότητα 117.88 τόνων στη Βραζιλία. Μια μείωση από 30% σε 43% στην εμπορεύσιμη τομάτα καταγράφηκε από την προσβολή του βακτηρίου που προκαλεί βακτηριακή κηλίδωση στη τομάτα. Αν και κανένα πρόσφατο στοιχείο δεν είναι διαθέσιμο στις οικονομικές απώλειες που προκαλούνται από το παθογόνο στην ΕΕ, οργανισμός θεωρείται σημαντικό παθογόνο της τομάτας και της πιπεριάς. Οι απώλειες των καλλιεργειών έχουν αναφερθεί ότι είναι ως 30%.

**Πίνακας 3.2** Στοιχεία δειγμάτων των απομονώσεων

Είδος φυτού	Περιφερειακή Ενότητα	Ποικιλία ή Υβρίδιο	Ποσοστό
			Συμπτωματικών Φυτών
Πιπεριά	Θεσσαλονίκης	Μυτερό	5%
Πιπεριά	Λάρισα Αγροκηλιό	Κεράσι	7-8%
Πιπεριά	Θεσσαλονίκης	Δ.Α*	Δ.Α*
Τομάτα	Θεσσαλονίκης	Δ.Α*	Δ.Α*
Πιπεριά Φλωρίνης	Νομός Ηλίας	Φλωρίνης	20%
Πιπεριά	Καλαμπάκα	Μακεδονικό	Δ.Α*
Πιπεριά Φλωρίνης	Καβάλα	Φλωρίνης	80%
Πιπεριά	Καστοριά	Ντολμάς	70%

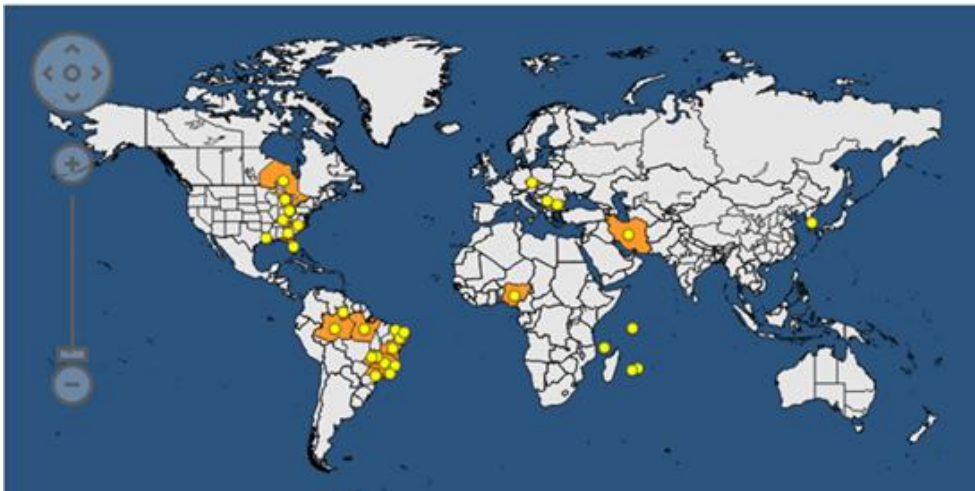
\*Δεν αναφέρθηκε στο πληροφοριακό δελτίο

## 2.1.Γεωγραφική κατανομή της βακτηριακής κηλίδωσης

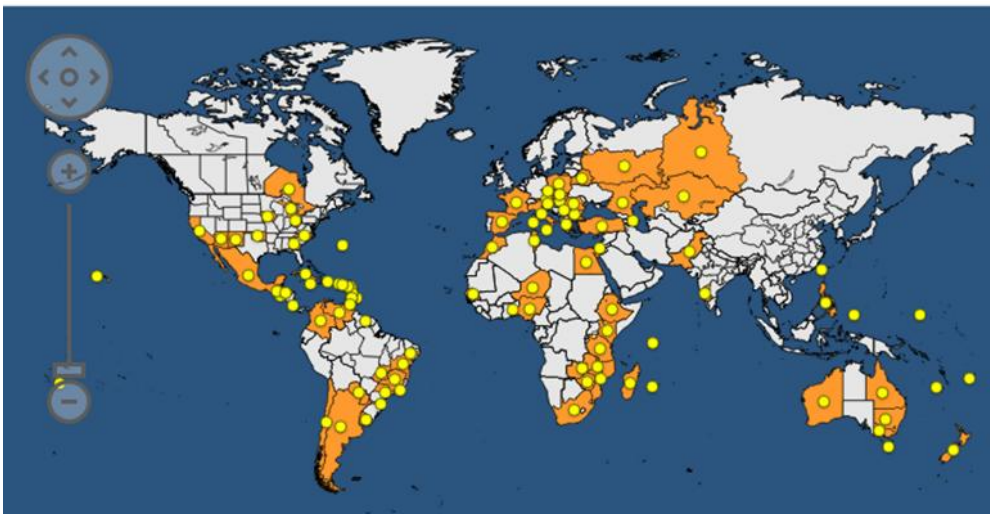
Στους παρακάτω πίνακες 3.3, 3.4, 3.5 και 3,6 αναγράφεται η εμφάνιση του βακτηρίου στον κόσμο για τα παθογόνα βακτήρια αντίστοιχα, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas perforans* και *Xanthomonas gardneri* που οφείλονται για την βακτηριακή κηλίδωση της πιπεριάς και τομάτας, καθώς και οι αντίστοιχοι χάρτες στις εικόνες 3.3, 3.4, 3.5 και 3.6.

**Πίνακας 3.3:** Διασπορά *Xanthomonas euvesicatoria* στον κόσμο

Ήπειρος	Χώρα	Περιοχή	Κατάσταση
Αφρική	Comoros		Εμφάνιση
	Mauritius		
	Nigeria		
	Reunion		
	Σεϋχέλλες		
	Τανζανία		
Αμερική	Βραζιλία		
		Amazonas	
		Bahia	
		Ceara	
		Distrito Federal	
		Espirito Santo	
		Goias	
		Minas Gerais	
		Para	
		Pernambuco	
		Rio de Janeiro	
		Rio Grande do Norte	
		Roraima	
	Sao Paulo		
	Καναδάς		
		Ontario	
	Η.Π.Α		
		Florida	
		Georgia	
		Kentucky	
Louisiana			
Michigan			
North Carolina			
Ohio			
Ασία	Ιράν		Εμφάνιση, περιορισμένης εξάπλωσης
	Κορέα		Εμφάνιση
Ευρώπη	Βουλγαρία		
	Τσεχία		
	Σερβία		Εκτεταμένη εμφάνιση



Εικόνα 3.3.: Γεωγραφική κατανομή *Xanthomonas euvesicatoria*



Εικόνα 3.3.:Γεωγραφική κατανομή *Xanthomonas vesicatoria*



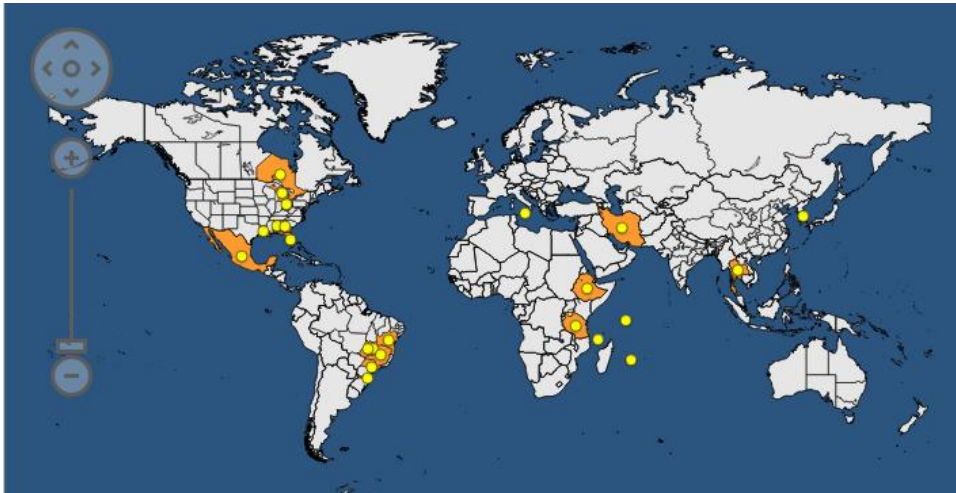
**Πίνακας 3.4.** Διασπορά *Xanthomonas vesicatoria* στον κόσμο

Ήπειρος	Χώρα	Περιοχές	Κατάσταση		
Αφρική	Όλες		Εμφάνιση		
Αμερική	Όλες				
Ασία	Ινδία				
		Karnataka			
	Ισραήλ				
	Καζακιστάν				
	Pakistan				
	Φιλιππίνες				
	Ταϊβαν		Εμφάνιση,εκτεταμένη		
Ευρώπη	Αυστρία		Εμφάνιση,εκτεταμένη		
	Αζερμπαϊζάν				
	Λευκορωσία		Εμφάνιση, περιορισμένη κατανομή		
	Βουλγαρία				
	Czech Republic				
	Γαλλία		Εμφάνιση,εκτεταμένη		
	Ελλάδα				
	Ουγγαρία		Εμφάνιση,περιορισμένη κατανομή		
	Ιταλία			Εμφάνιση, εκτεταμένη	
		Σαρδηνία		Εμφάνιση	
		Σικελία			
	Πολωνία		Εμφάνιση, Εκτεταμένη		
	Ρουμανία				
	Ρωσία	Central Russia			Εμφάνιση
		Southern Russia			Εμφάνιση
		Western Siberia			Εμφάνιση,εκτεταμένη
	Σερβία		Εμφάνιση,περιορισμένη κατανομή		
	Σλοβακία				
	Σλοβενία		Εμφάνιση,περιορισμένη κατανομή		
	Ισπανία		Εμφάνιση		
Τουρκία		Εμφάνιση,περιορισμένη κατανομή			
Ωκεανία	Αυστραλία	New South Wales	Εμφάνιση		
		Queensland			
	Fiji				
	Micronesia				
	New Caledonia		Εμφάνιση,περιορισμένη κατανομή		
	New Zealand		Εμφάνιση		
Palau					

**Πίνακας 3.5** Διασπορά *Xanthomonas perforans* στον κόσμο

Ήπειρος	Χώρα	Περιοχή	κατάσταση
Αφρική	Κομόρες		Εμφάνιση
	Αιθιοπία		
	Mauritius		
	Seychelles		
	Τανζανία		
Αμερική	Βραζιλία	Bahia	
		Distrito Federal	
		Goias	
		Minas Gerais	
		Santa Catarina	
		Sao Paulo	
	Καναδάς	Ontario	
		Μεξικό	Εμφάνιση, εκτεταμένη
	Η.Π.Α	Alabama	Εμφάνιση
		Florida	
Georgia			
Louisiana			
Michigan			
Ohio			
Ασία	Ιράν	Εμφάνιση ,πολλά κρούσματα	
	Κορέα		
	Ταϊλάνδη		
Ευρώπη	Ιταλία	Σικελία	Εμφάνιση πολλά κρούσματα

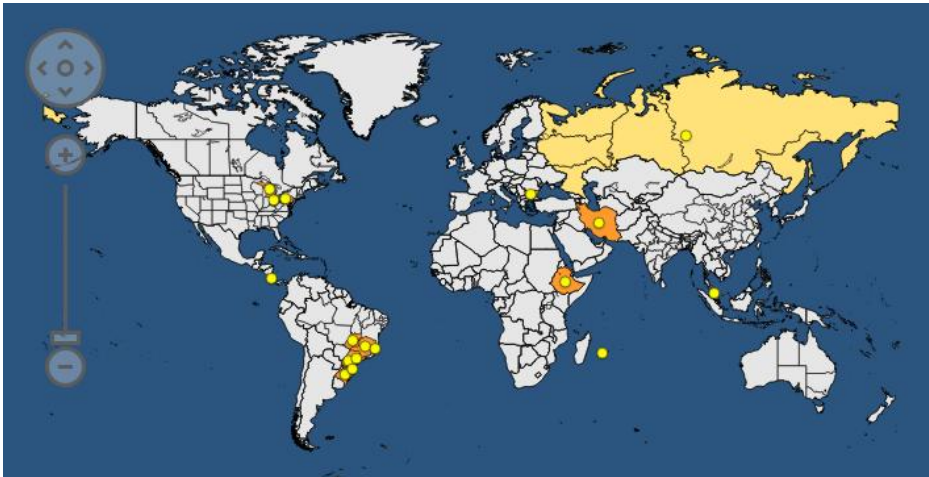
Πηγή: EPPO Global Database



Εικόνα 3.5 Γεωγραφική κατανομή *Xanthomonas perforans*

Πίνακας 3.6: Διασπορά *Xanthomonas gardneri* στον κόσμο

Ήπειρος	Χώρα	Περιοχή	Κατάσταση
Αφρική	Αιθιοπία		Εμφάνιση
	Reunion		
Αμερική	Βραζιλία	Espirito Santo	
		Goias	
		Minas Gerais	
		Parana	
		Rio Grande do Sul	
		Santa Catarina	
		Sao Paulo	
	Καναδάς	Ontario	
	Costa Rica		
	Η.Π.Α	Michigan	
Ohio			
Pennsylvania			
Ασία	Ιράν		Εμφάνιση, περιορισμένη εξάπλωση
	Μαλαισία	West	
Ευρώπη	Βουλγαρία		Εμφάνιση
	Ρωσία		



Εικόνα 3.6 Γεωγραφική κατανομή *Xanthomonas gardneri* στον κόσμο

### 3.Συμπτώματα της βακτηριακής κηλίδωσης

Επειδή το πιο εμφανές σύμπτωμα λαμβάνει χώρα στα φύλλα η ασθένεια συχνά αναφέρεται ως “βακτηριακή κηλίδωση των φύλλων”.

Προκαλεί κηλίδωση των φύλλων και των στελεχών παρόμοια με εκείνη που προκαλείται από την αλτερναρίωση και τη βακτηριακή στιγματώση. Η διαφορά είναι ότι εδώ οι κηλίδες αρχικά είναι λιπαρές και σταδιακά το κέντρο τους γίνεται σκοτεινότερου χρώματος και νεκρώνεται (Ritchie), ή ως ακανόνιστες, λιπαρές κηλίδες, διαμέτρου 2–3 mm σκοτεινού χρώματος στα παλαιότερα φύλλα το κέντρο των οποίων νεκρώνεται και σχίζεται (Παναγόπουλος, 2000).

Η περιφέρεια των κηλίδων συχνά περιβάλλεται από κίτρινη ζώνη, και παρόμοιες κηλίδες εμφανίζονται επί των στελεχών. Ειδικά στα φύλλα, εκτός από τις κηλίδες, παρατηρείται συχνά και περιφερειακό κιτρίνισμα του ελάσματος και φυλλόπτωση. Πιο χαρακτηριστικά είναι τα συμπτώματα στους καρπούς στους οποίους οι κηλίδες είναι αρχικά υδατώδεις μικρές και εξελίσσονται σταδιακά σε μεγαλύτερες (3-8 χιλ.), καστανές, νεκρωτικές και βυθισμένες. Στα μεγαλύτερης ηλικίας φυτά η κηλίδωση είναι περισσότερο συχνή επί των παλαιότερων φύλλων και οδηγεί σε αποφύλλωση (Ανακοίνωση ΔΑΟΚ), που έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση των καρπών στον ήλιο αυξάνοντας τα ηλιοκαύματα (Ritchie, 2000). Σύμπτωμα χαρακτηριζόμενο από εντοπισμένη ή διάχυτη αλλοίωση των επιφανειακών ιστών, ιδίως σαρκωδών οργάνων, η οποία αποκτά τραχιά υφή και φολιδωτή όψη ή παρουσιάζει ρωγμές ή ανώμαλη πάχυνση και φέλλωση, συχνά με ελαφρές υπεγέρσεις ή κοιλάνσεις αυτών (Domonique, 2012).

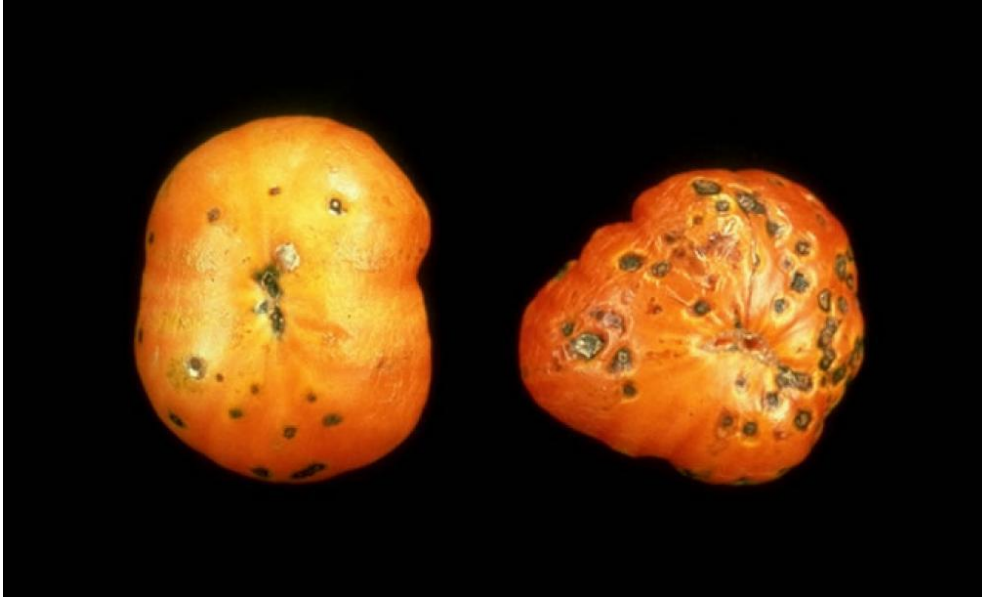
Στις παρακάτω εικόνες 1,2,3 φαίνονται τα συμπτώματα των παθογόνων *Xanthomonas euvesicatoria*, και *Xanthomonas vesicatoria*.



**Εικόνα 1:** Σύμπτωμα από το παθογόνο *Xanthomonas euvesicatoria*



**Εικόνα 2 :**Συμπτώματα από το παθογόνο *Xanthomonas vesicatoria* σε καρπό και φύλλο πιπεριάς



**Εικόνα 3:** Συμπτώματα από το παθογόνο *Xanthomonas vesicatoria* καρπός τομάτα

Πηγή: EPPO Global Database

### **3.1. Φυτά ξενιστές *Xanthomonas euvesicatoria***

Η ασθένεια προκαλείται από αρκετά είδη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων του γένους *Xanthomonas* spp (Ritchie, 2000) [*X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*, *X. vesicatoria* (EPPO, 2013)]. Η άριστη θερμοκρασία αναπτύξεως τους είναι 25–30°C (Παναγόπουλος,1995). Εκτός από την τομάτα και την πιπεριά, τα βακτήρια του γένους *Xanthomonas* προσβάλλουν στη φύση και διάφορα φυτά του γένους *Capsicum* και φυτά *Datura ferox*, *Datura innoxia*, *Licopersicon peruvianum*, *Nicardia physalodes*, *Physalis minima*, *Physalis peruviana*, *Physalis virginiana* (Παναγόπουλος,2000). Έχουν περιγραφεί διάφορες φυλές του παθογόνου μερικές από τις οποίες προσβάλλουν ορισμένα φυτά ξενιστές (π.χ. την τομάτα ή την πιπεριά) ενώ άλλες είναι εξίσου παθογόνες στην τομάτα και στην πιπεριά (Παναγόπουλος,2000, Ritchie, 2000).

### 3.2.Επιδημιολογία της Βακτηριακής Κηλίδωσης

Τα φύλλα μολύνονται διάμεσου των στομάτων, και οι καρποί διάμεσου μικρών πληγών π.χ τραύματα, τρυπήματα εντόμων κ.τ.λ. Μόνο οι νεαροί καρποί είναι ευαίσθητοι. Το βακτήριο μπορεί να πολλαπλασιαστεί επιφυτικά σε νεαρά φυτά με απουσία συμπτωμάτων. (Ritchie, 2000). Η ασθένεια προκαλείται από αρκετά είδη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων του γένους *Xanthomonas* [*X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*, *X. vesicatoria* (EPPO, 2013)]. Το βακτήριο επιβιώνει στον μολυσμένο σπόρο για πολλά χρόνια. Η ύπαρξη λίγων προσβεβλημένων φυτών στην καλλιέργεια μπορεί να οδηγήσει σε έξαρση της ασθένειας. Οι μολυσμένοι σπόροι και η διακίνηση μολυσμένων φυτών που προορίζονται για φύτευση ευθύνονται για τη διασπορά του παθογόνου σε μεγάλες αποστάσεις (Ανακοίνωση ΔΑΟΚ)

Η διασπορά των μολυσμάτων και η διενέργεια των μολύνσεων γίνεται με τη βροχή, ιδιαίτερα όταν συνοδεύεται από άνεμο, ή με την τεχνητή βροχή. Είναι καταστροφικό ειδικά στις καλλιέργειες που ευδοκούν σε θερμά, και υγρά κλίματα (Παναγόπουλος, 2000). Οι μολυσμένοι σπόροι και τα μολυσμένα σπορόφυτα είναι οι κύριες πηγές πρωτογενούς μολύσματος. Οι μολυσμένοι σπόροι και η διακίνηση μολυσμένων φυτών που προορίζονται για φύτευση ευθύνονται για τη διασπορά του παθογόνου σε μεγαλύτερες αποστάσεις. Επιπροσθέτως, φυτά εθελοντές και μολυσμένα φυτικά υπολείμματα μπορεί να αποτελούν πηγές αρχικού μολύσματος. Δευτερογενή μολύσματα παράγονται στον αγρό, είναι πρωτίστως βακτηριακά κύτταρα σε βακτηριακά εκκρίματα, σε κηλίδες αναπτυσσόμενες σε προσβεβλημένα υπέργεια μέρη. Η βακτηριακή εξίδρωση που σχηματίζεται πάνω στους προσβεβλημένους ιστούς αποτελεί την πηγή μολύσματος από όπου το παθογόνο μπορεί να διασπαρεί σε σχετικά μικρές αποστάσεις μέσω των μολυσμένων καλλιεργητικών εργαλείων, των εντόμων, της βροχής, του νερού άρδευσης και του ανέμου.

### 3.3.Μέτρα διαχείρισης της Βακτηριακής Κηλίδωσης

Για την διαχείριση της ασθένειας είναι απαραίτητη η χρησιμοποίηση υγιούς πιστοποιημένου σπόρου [βλ. Παναγόπουλο, 1995 και Φυτοϋγειονομικά μέτρα στο (European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) quarantine pest)]. Χρήση υγιών σποροφύτων. Απομάκρυνση και καταστροφή με καύση, των ασθενών φυτών λαμβάνοντας τα απαραίτητα μέτρα πυρασφάλειας (Hamza, I et al). Περιορισμός τυχόν υπερβολικής εδαφικής υγρασίας και αποφυγή χρήσης τεχνητής βροχής. Αποφυγή κυκλοφορίας των εργαζομένων μέσα στην καλλιέργεια όταν τα φυτά είναι βρεγμένα (βροχή, άρδευση, κ.λπ.) για να μην ευνοείται η μεταφορά του παθογόνου από ασθενή σε υγιή φυτά. Χρησιμοποίηση των εργαλείων κοπής πρώτα στα υγιή και μετά στα ύποπτα προσβολής φυτά. Απολύμανση εργαλείων κοπής συνεχώς με εμβάπτιση σε καθαρό οινόπνευμα για τον περιορισμό της εξάπλωσης της ασθένειας. Προληπτικοί ψεκασμοί με εγκεκριμένα για την πιπεριά χαλκούχα σκευάσματα, σύμφωνα με τις οδηγίες των παρασκευαστικών Οίκων. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται για την εφαρμογή προληπτικών ψεκασμών κάθε φορά που δημιουργούνται πληγές στα φυτά από κλαδέματα, χαλάζι κ.ά. Εκρίζωση και καταστροφή των υπολειμμάτων της καλλιέργειας με καύση μετά το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου, λαμβάνοντας τα απαραίτητα μέτρα πυρασφάλειας. Αμειψισπορά με φυτά μη ξενιστές του παθογόνου. Χρήση ανθεκτικών ποικιλιών. (Εικόνα 4. Βιολογικός κύκλος της ασθένειας.)



#### 4.Περιγραφή του *Xanthomonas spp*

Για την περιγραφή του παθογόνου *Xanthomonas spp* που ευθύνεται για την ασθένεια της Βακτηριακής Κηλίδωσης είναι απαραίτητη η αναφορά της ταξινομικής θέσης και των μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών του.

##### 4.1.Ταξινομική θέση *Xanthomonas spp*.

Το *X.euvesicatoria* και τα είδη *X. gardneri*, *X. perforans* και *X. vesicatoria* προκαλούν την ασθένεια με το κοινό όνομα «Βακτηριακή κηλίδωση» (αγγλ. bacterial spot, scab3), σύμφωνα με την European plant protection organization (EPPO, 2013, Ritchie, 2000). Η βακτηριακή κηλίδωση στην τομάτα αναφέρθηκε αρχικά στη Νότια Αφρική και τις ΗΠΑ (Jones et all) και περιγράφηκαν αρχικά στη πιπεριά στη Φλόριντα (Gardner & Kendrick 1923). Η ασθένεια έχει παρατηρηθεί από τότε στις περιοχές όλων των ηπείρων όπου η τομάτα κ η πιπεριά καλλιεργούνται. Το 1976 διαπιστώθηκε στην Ελλάδα σε καρπούς τομάτας στη περιοχή της Θεσσαλονίκης, χωρίς όμως να μελετηθεί ή και να απομονωθεί το παθογόνο. (Παναγόπουλος, 2000). Το *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* που ήταν μία ταξινομική οντότητα αμφισβητήθηκε (Erro 2013). Στελέχη γνωστά στο παρελθόν με αυτό το όνομα ως παθογόνα αίτια της βακτηριακής κηλίδωσης της τομάτας και της πιπεριάς, σήμερα κατηγοριοποιούνται σε τέσσερα διαφορετικά είδη: *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* και *X. vesicatoria* Δύο από τα τέσσερα είδη μόνο το *X. gardneri* δεν έχει αναφερθεί στην Ευρώπη. Το *Xanthomonas perforans* έχει βρεθεί ότι μολύνει μόνο την τομάτα (Rosselo-Mora R et all).

##### 4.2.Μορφολογικά-Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Είναι αερόβιο, αρνητικό κατά Gram, κινούμενο με ένα μόνο πολικό μαστίγιο, διαστάσεων 0,6x1,0-1,5μm και εμφανίζεται μονό ή σε ένα ζεύγος. Σε θρεπτικό υπόστρωμα και Nutrient Agar, οι αποικίες είναι μεγάλες, λείες και θολές, γλοιώδεις ρευστές και κίτρινες με ομαλά όρια. Το *X.vesicatoria* και *X.euvesicatoria* σχηματίζουν αποικίες γλοιώδεις ρευστές και κίτρινες με ομαλά όρια, το *X.axonopodis* p.v phaseoli προκαλεί ένα καστανό μεταχρωματισμό στο θρεπτικό υλικό λόγω μιας χρωστικής που εκκρίνει.(EPPO 2013)

Στην δοκιμή παραγωγής φθορίζουσας χρωστικής ως προς το UV δεν φθορίζουν τα στελέχη σε αντίθεση με τον θετικό μάρτυρα *Pseudomonas.syringae*. Επίσης είναι ευαίσθητο στο triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 0,1% και είναι οξειδωτικό.

Τα είδη των ξανθομονάδων παρουσιάζουν διαφορετική συμπτωματολογία. Στην δοκιμή αμύλου με το υλικό Starch (RA Lelliot et all) κάποια είδη είναι αμυλολυτικά και κάποια όχι. Παρατηρείται ότι δεν χρησιμοποιούν το άμυλο όλα τα στελέχη. Ένα σημαντικό μορφολογικό χαρακτηριστικό που παραλλάσσεται αποδίδεται στην συνήθη κροκίδωση που δημιουργούνται στις αποικίες όταν καλλιεργηθούν στο υλικό TMB(m), καθώς η κροκίδωση δεν παρατηρείται σε όλα τα στελέχη. Η ανάπτυξη καλλιεργειών στο TMB(m) μετά από 48 ώρες έδειξε κιτρινωπές αποικίες. Μετά από 3 μέρες παρατηρούμε κροκίδωση λόγω του λιπαντικού στοιχείου του TMB (tween).

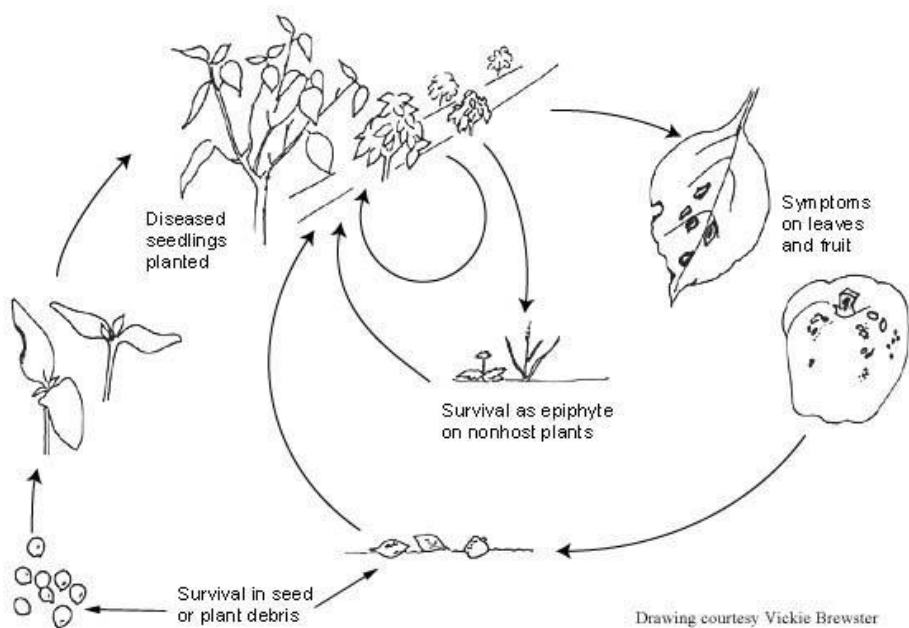
Σε διάστημα 24 ωρών, το βακτήριο μπορεί να πολλαπλασιαστεί ταχύτατα και να παράγει εκατομμύρια κύτταρα.(EPPO),(6). Το *Xanthomonas euvesicatoria* δεν είναι αμυλολυτικό, δεν χρησιμοποιεί το άμυλο για την ενέργεια του κυττάρου του.(Jones et all).



## 5. Διαγνωστικές μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης του *Xanthomonas euvesicatoria*

Τα γένη του *Xanthomonas spp* που μελετήθηκαν προκαλούν χαρακτηριστικές κηλίδες στις κοτυληδόνες νεαρών σποροφύτων τομάτας και πιπεριάς όταν αναπτύσσονται σε υψηλή υγρασία. Ένα ημικλεκτικό υπόστρωμα απομόνωσης (NA) προτείνεται από τον Mc Guire et al. (1986). Οι Sharon et al. (1982) και Bashan & Assouline (1983) περιέγραψαν μια μέθοδο καλλιέργειας εμπλουτισμού, για την ανίχνευση του βακτηρίου στο σπόρο ή σε φύλλα χωρίς συμπτώματα. (Jeri D et all)

Οι Cruz & Fernandez (1979) δοκίμασαν πρώτοι τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού IF (immunofluorescence technique) για ανίχνευση σε σπόρο. Έχει αναπτυχθεί μια μεθοδολογία προκαταρκτικής εξέτασης με ανοσοφθορισμό, και η οποία πρέπει να συνοδεύεται από την απομόνωση, ορολογικές δοκιμές (slide agglutination, IF ή ELISA, και όταν κρίνεται αναγκαίο από επιβεβαιωτικές δοκιμές παθογένειας στα φύλλα. (EPPO 2009). Κάθε είδος δοκιμασμένο δημιουργεί ένα μοναδικό φαινοτυπικό δακτυλικό αποτύπωμα το οποίο συγκρίνεται αυτόματα με μια βάση δεδομένων που δημιουργείται από 1.200 αερόβια είδη σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. (EPPO 2013).



Εικόνα 4. Βιολογικός κύκλος της ασθένειας

## ΜΕΡΟΣ Β

### 1.1.Υλικά και μέθοδοι

Τα αντιδραστήρια και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία της πειραματικής μελέτης καθώς και οι μέθοδοι διάγνωσης ήταν του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Μ.Φ.Ι.).

Οι απομονώσεις του βακτηρίου *Xanthomonas* spp που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την συλλογή του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Μ.Φ.Ι.) και αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα (1.1) ο αριθμός της συλλογής ο ξενιστής από τον οποίο απομονώθηκαν η περιοχή και η ποικιλία φυτού.

Τμήματα προσβεβλημένου ιστού από τα όρια των κηλίδων, τεμαχίστηκαν σε 2ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού. Είκοσι μl από το αιώρημα που δημιουργήθηκε απλώθηκε σε τριβλία, σε θρεπτικό υλικό Nutrient Agar, με τη μέθοδο της διασποράς (βλ παράρτημα 1). Τα τριβλία επώαστηκαν στους 27°C για 48 ώρες. Οι επικρατέστερες αποικίες που παρατηρήθηκαν κατά τις απομονώσεις υπό-καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα NA+cyclohexamide μέχρι να δημιουργηθεί καθαρή καλλιέργεια. Οι απομονώσεις που επιλέχθηκαν, κωδικοποιήθηκαν και διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια σωλήνα σε θρεπτικό υπόστρωμα NA, στους 4°C σε όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε, για την ταυτοποίηση των στελεχών, είναι σύμφωνα με αυτή που περιγράφεται στην βιβλιογραφία. (Ra Lelliot et all)

Χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά τα στελέχη με κωδικοποιημένους αριθμούς (13, 14, 15,22, 23, 25, 26, 32) *Xanthomonas axonopodis* p.v *phaseoli*, και το στέλεχος (34) *Xanthomonas axonopodis* p.v *junglans*.

**Πίνακας 1.1** Στοιχεία των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν

Είδη	Μέρος φυτού	φυτό που απομονώθηκε	Έτος	Στελέχη	Αποικίες
<i>Xanthomonas.euvesicatoria</i>			2015	1	col 1 col1
				2	col 1 col2
			2014	3	col 1 ,1
				4	col 1,2
			2015	5	col 4 ,2
				6	col 4,1
			2014	7	col2,2
				8	col 3,1
			2015	9	col3,2
				10	col3,1
				11	col2,2
<i>Xanthomonas.euvesicatoria</i>	φύλλο	πιπεριά	2016	27	
<i>Xanthomonas.euvesicatoria</i>	φύλλο	πιπεριά	2016	30	

**Πίνακας 1.1** Στοιχεία των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν (συνέχεια)

Είδη	Μέρος φυτού	φυτό που απομονώθηκε	Έτος	Στελέχη	Αποικίες
Xanthomonas.euvesicatoria	φύλλο	πιπεριά	2016	17	
	φύλλο			18	col 1.1
	φύλλο		2015	20	col 1
Xanthomonas.euvesicatoria	καρποί	πιπεριά	2015	35	col 4
	καρποί	πιπεριά	2015	36	col 3
Xanthomonas.euvesicatoria( similar)			2016	28	col 7
			2016	29	col 6
Xanthomonas.campestris vesicatoria			2013	52	col 2
Xanthomonas.campestris pv phaseoli	φύλλο	φασόλι	2017	15	col 1
Xanthomonas.campestris pv phaseoli	λοβός	φασόλι	2017	25	col 8
	φύλλο	φασόλι	2017	26	col 5
Xanthomonas campestris pv. vesicatoria		πιπεριά	2009	37	col 1
		πιπεριά	2009	38	col2
		πιπεριά	2009	39	col 3
		πιπεριά	2009	40	col 1
		πιπεριά	2009	41	col 2
		πιπεριά	2009	42	col 1
		πιπεριά	2009	43	col 2
		πιπεριά	2009		
		πιπεριά	2009	44	col 1
		πιπεριά	2009	45	col 2
Xanthomonas.axonopodis pv phaseoli	σπέρματα	φασόλι	2015	13	
	σπέρματα	φασόλι		14	
Xanthomonas.axonopodis pv phaseoli	σπέρματα	φασόλι	2015	22	
	σπέρματα		2015	23	
Xanthomonas.axonopodis pv phaseoli	σπέρματα	φασόλι	2015	32	
Xanthomonas.axonopodis pv juglans				34	
Xanthomonas.vesicatoria		πιπεριά	2014	33	col 2
Xanthomonas.vesicatoria		πιπεριά	2014	46	col 1
				47	col 2
				48	col 3
			2015	49	col 1
				50	col 2
				51	col 3
Xanthomonas.vesicatoria		μαρούλι	2014	24	col 3

### 1.1.1.Ως προς την διατήρηση των στελεχών

Nutrient agar oxoid: 28 gr<sup>-1</sup>lt

Συστατικά	gr <sup>-1</sup> ltr
`Lab-Lemco' powder	1.0
Yeast extract	2.0
Peptone	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	15.0
pH 7.4 ± 0.2 25°C	

### Μέθοδος

- Σε 1lt απεσταγμένο νερό προσθήκη 28 gr Nutrient agar και αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

### 1.1.2.Ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά

#### Tween medium B

##### Υλικά

##### A)

	gr <sup>-1</sup> ltr
Bacto peptone	10 gr
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	0,1 gr
KBR	10 gr
cacl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,33 gr
Bacto agar	18 gr

##### B)

##### Υλικά

	ml/200 ml
Tween 80	2 ml
Cephalexin	1,3 ml
Tobramycin sulphate	40 μ
Cycloheximide	10 μl

## **Μέθοδος**

Γίνετε ανάμειξη των υλικών Α σε 1lt απεσταγμένο νερό χωρίζεται ανα 200 ml και αποστειρώνεται στην συνέχεια γίνετε προσθήκη του Β

### **NA +0.1% triphenyl tetrazolium chloride (TTC)**

#### **Υλικά**

- Tetrazol (triphenyl tetrazolium chloride)
- Απιονισμένο νερό

(RA Lelliot) βιβλιογραφία

### **1.1.3.Βιοχημικές δοκιμές**

#### **Χρώση Gram**

Η μέθοδος χρώσης κατά Gram χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Δανό Christian Gram το 1884 και βασίζεται στην διαφορετική χρώση που παίρνουν τα διάφορα είδη βακτηριών μετά από την επίδραση ειδικής χρωστικής λόγω της διαφορετικής χημικής σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος βακτηριακού κυττάρου.

Η μέθοδος διαχωρίζει τα βακτήρια σε δυο ομάδες τα αρνητικά κατά (- Gram) και τα θετικά κατά (+Gram)(Βλ. παράρτημα).

Θετικά χαρακτηρίστηκαν τα δείγματα στα οποία τα κύτταρα είχαν κυανό χρωματισμό, ενώ αρνητικά χαρακτηρίστηκαν τα δείγματα στα οποία δεν παρατηρείται κυανή χρώση. (RA Lelliot and DE Stead)

#### **Μέθοδος**

Η χρώση έγινε σύμφωνα με την διαδικασία που εφαρμόζεται στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας του ΜΦΙ.

- Στις αντικειμενοφόρες πλάκες εξάπλωση μίας σταγόνας αιωρήματος του βακτηρίου.
- Αφήνουμε να στεγνώσει το αιώρημα και προσήλωση του αιωρήματος στις αντικειμενοφόρες πλάκες με διέλευση για μικρό χρονικό διάστημα πάνω από ήπια φλόγα έτσι ώστε να προσκολληθεί το αιώρημα πάνω στην πλάκα.
- Τοποθέτηση πάνω στην πλάκα διάλυμα Carbomethyl Violet για διάστημα τουλάχιστον 1 min ξεπλένεται η κάθε αντικειμενοφόρος πλάκα.
- Μετά απορρίπτεται η χρωστική με τίναγμα της πλάκας και το υπόλοιπο της χρωστικής απομακρύνεται με διάλυμα ιωδίνης.
- Προσθήκη διαλύματος ιωδίνης και αφήνεται να δράσει για τουλάχιστον 1 min.
- Τέλος ξεπλένονται οι πλάκες με αιθυλική αλκοόλη, μέχρι απομακρύνσεως της ιωδίνης.
- Οι πλάκες παρατηρούνται στο μικροσκόπιο αντιθέσεως φάσεως με φακό αντικειμενικό 100X ώστε να ελεγχθεί η παρουσία κυττάρων και ακολούθως με διερχόμενο φωτισμό για διαπίστωση χρώσης των κυττάρων.

### Παραγωγή οξειδάσης

- Λήψη βακτηριακής ανάπτυξης υπό ασηπτικές συνθήκες εντός Laminar flow με βακτηριακή βελόνη λευκόχρυσου (loop) από τους δοκιμαστικούς σωλήνες
- Τοποθέτηση σε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με 1% αντιδραστηρίου οξειδάσης.

### Δοκιμές για την αμυλολυτική δραστηριότητα.

#### Μέθοδος

- Διάλυση του Άγαρ σε απεσταγμένο νερό 1 lt.
- Ανάμειξη του διαλυτού αμύλου σε 10 ml νερό και προσθήκη του διαλυμένου άγαρ.
- Ανάδευση και κατανομή σε 100 ml.
- Γίνετε αποστείρωση στους 115 °C για 10 λεπτά.
- Κατανομή στα τριβλία petri.
- Γίνετε επώαση για 4 μέρες στου 27°C.

### Δοκιμή παραγωγής φθορίζουσας χρωστικής ως προς το UV ( King's medium B )

#### Υλικά

- Proteose peptone :2,0%
- Glycerol: 1%
- $K_2HPO_4$ : 0,15%
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,15%

Από βιβλιογραφία (RA Lelliott and DE Stead)

#### Μέθοδος

- Ποσότητα βακτηριακής ανάπτυξης (ηλικίας 24h) εξαπλώθηκε πάνω σε τριβλία με υλικό Kings B ακτινωτά και σε απόσταση η μία καλλιέργεια από την άλλη.
- Μετά από 24-48h επώασης, ελέγχεται η παραγωγή διαχεόμενης φθορίζουσας χρωστικής με έκθεση των τριβλίων σε υπεριώδη ακτινοβολία (254 nm και 360nm).

### Δοκιμή για παραγωγή υδρόθειου ( $H_2S$ )

#### Υλικά

Συστατικά	ml, gr
Αποστειρωμένο νερό:	500 ml
$NH_4H_2PO_4$	0.25 g
$K_2HPO_4$	0.25 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g
NaCl	2.5 g
Yeast extract	2.5 g
Cysteine hydrochloride	0.05 g

## Μέθοδος

- Μοιράζεται σε σωλήνες 5ml και αποστειρώνεται.
- Μετά την μόλυνση των σωλήνων με τα στελέχη τοποθέτηση χαρτιού εμποτισμένο με μόλυβδο.
- Έλεγχος για αλλαγή χρώματος του χαρτιού με μόλυβδο, μετά το πέρας των 14 ημερών το μαύρισμα του χαρτιού από μόλυβδο δείχνει απελευθέρωση H<sub>2</sub>S από την κυστεΐνη

### 1.1.4.Ορολογική δοκιμή

#### Χρώση ανοσοφθορισμού Immunofluorescence technique (IF)

Αυτή η τεχνική βασίζεται στην ικανότητα μιας ένωσης φθορισμού να αναγνωρίζει το αντίσωμα. Όταν αυτό το συζευγμένο αντίσωμα συνδέεται με βακτήρια, η παρουσία του μπορεί να γίνει ορατή σε μικροσκόπιο χρησιμοποιώντας μία πηγή υπεριώδους φωτός και κατάλληλα φίλτρα για τη χρησιμοποιούμενη χρωστική φθορισμού. Τα κύτταρα που συνδυάζονται με τον αντιγόνο εμφανίζονται με ένα φθορίζον φωτοστέφανο γύρω από το κυτταρικό τοίχωμα. ( RA Lelliot et all)

## Μέθοδος

Θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου πολλαπλών παραθύρων με πλαστική επίστρωση για τον προσδιορισμό.

- Ρίχνεται με σιφώνιο 20 ml ενός αιωρήματος των 10<sup>6</sup> κυττάρων / ml του βακτηρίου.
- Ζέσταμα απαλά σε μια φλόγα Bunsen ,και αφήνουμε να στεγνώσει στον αέρα.
- Ρίχνουμε με σιφώνιο 20 ml αντιγόνο vesicatoria και επώαση για 30 min.
- Πραγματοποίηση τριών πλύσεων για 5 λεπτά η κάθε πλύση με rbs tween και rbs
- Στέγνωμα των πλακών στον αέρα
- Ρίχνεται με σιφώνιο 20 ml FITC 1:100
- Επώαση για 30 min
- Πραγματοποίηση τριών πλύσεων.

### 1.1.5.Δοκιμές παθογένειας

#### Τεστ υπερευαισθησίας HR

## Μέθοδος

- Μοιράζεται 1 ml νερό σε κάθε μπουκαλάκι
- Προστίθενται με την Ιοορ από τους σωλήνες με τις απομονώσεις μια ποσότητα αποικιών
- Αναμειγνύεται μέσα στα μπουκαλάκια,
- Ομογενοποίηση με τη βοήθεια του vortex
- Δημιουργία αιωρήματος.
- Έγχυση σε φύλλα καπνού και τομάτας με χρήση σύριγγας.

### 1.1.6.Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράση (PCR)

#### Περιγραφή

Η μέθοδος αυτή αποβλέπει στη σύνθεση DNA του υπό μελέτη βακτηρίου και την παρατήρησή του σε πηκτή αγαρόζη ύστερα από ηλεκτροφόρηση. Είναι ένας απλός τρόπος πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων τμημάτων του αρχικού γενετικού υλικού, έτσι ώστε να είναι εφικτή η περαιτέρω μελέτη του με διάφορες μεθόδους, όπως η αλληλούχιση, η πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η ηλεκτροφόρηση κ.ά. Το ιδιαίτερα κρίσιμο αντιδραστήριο στο διάλυμα αντίδρασης είναι οι ειδικοί εκκινητές (primers) DNA (ολιγονουκλεοτίδια 18-20 βάσεων). Η μέθοδος που θεωρείται η πλέον σύγχρονη και ευαίσθητη (1 cfu/PCR) απαιτεί ειδικό όργανο, το θερμικό κυκλοποιητή DNA για τη σύνθεση του DNA (27). Η μέθοδος εφαρμόζεται από το 1994 στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας του Μπεννακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Η ταχύτητα, η ειδικότητα, η μεγάλη ευαισθησία και το χαμηλό της κόστος την έχουν κάνει μια από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους σε ερευνητικό και διαγνωστικό επίπεδο. Η αντίδραση εκτελείται σε τρία επαναλαμβανόμενα στάδια: (α) αποδιάταξη του γενετικού υλικού, (β) υβριδισμός των εκκινητών στη συμπληρωματική τους αλληλουχία του DNA και (γ) επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί πολυάριθμες παραλλαγές της PCR.(EPPO, 2013, 2009),(Alison et all)

#### Μέθοδος PCR

- Από τις αραιώσεις βράζονται 100 μl
- Πραγματοποίηση Φυγοκέντρωσης.
- Η αντίδραση PCR εκτελείται στον Θερμικό κυκλοποιητή.
- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη.

#### Συνθήκες κύκλου duplex PCR :

- 2 λεπτά στους 94 ° C,
- 40 κύκλοι των 30 δευτερολέπτων στους 95 ° C,
- 30 δευτερόλεπτα στους 64 ° C,
- 30 δευτερόλεπτα στους 72 ° C,
- 10 λεπτά σε 72 ° C και ψύξη στους 20 ° C.

#### Συνθήκες κύκλου για primers *X.euvesicatoria* 2.4- *X.euvesicatoria* 2.5

- 3 λεπτά στους 94°C
- 45 δευτερόλεπτα στους 94°C 35 κύκλοι
- 50 δευτερόλεπτα στους 64°C 35 κύκλοι
- 50 δευτερόλεπτα στους 72°C 35 κύκλοι
- 10 λεπτά στους 72°C

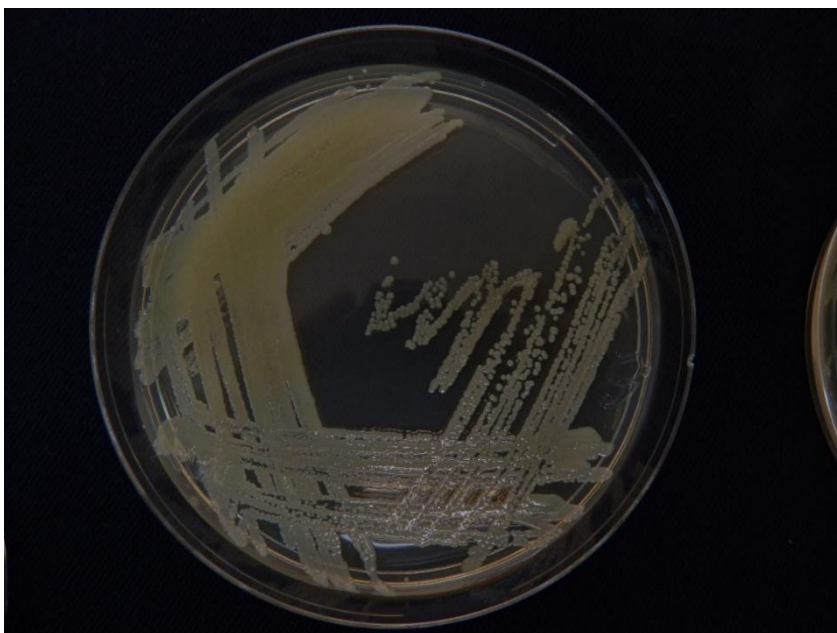


## ΜΕΡΟΣ Γ

Σε αυτό το μέρος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από όλες τις δοκιμές ταυτοποίησης και χαρακτηρισμού που πραγματοποιήθηκαν για τα στελέχη.

### 2.1.Αποτελέσματα ως προς την μορφολογία

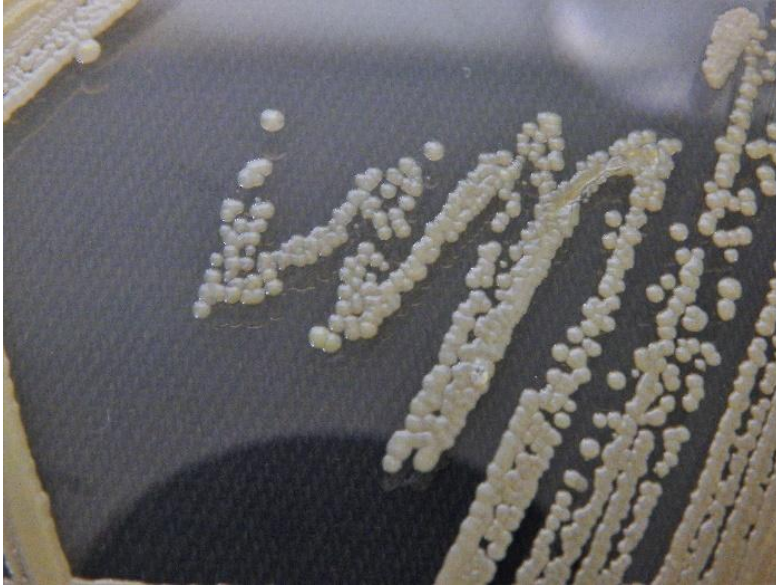
Στις εικόνες (1-8)φαίνονται οι αποικίες και η μορφολογία επιλεγμένων στελεχών, *Xanthomonas euvesicatoria*, και συγκριτικά το *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.



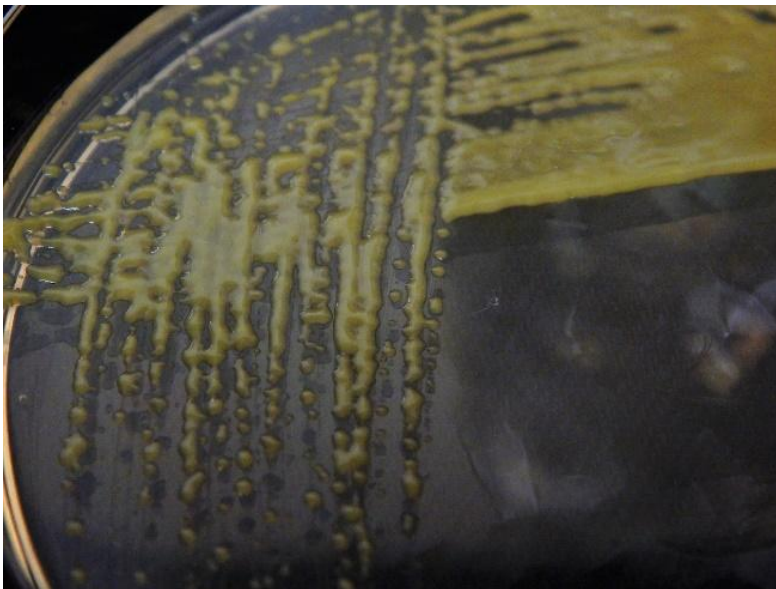
Εικόνα 1 YPGA *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*



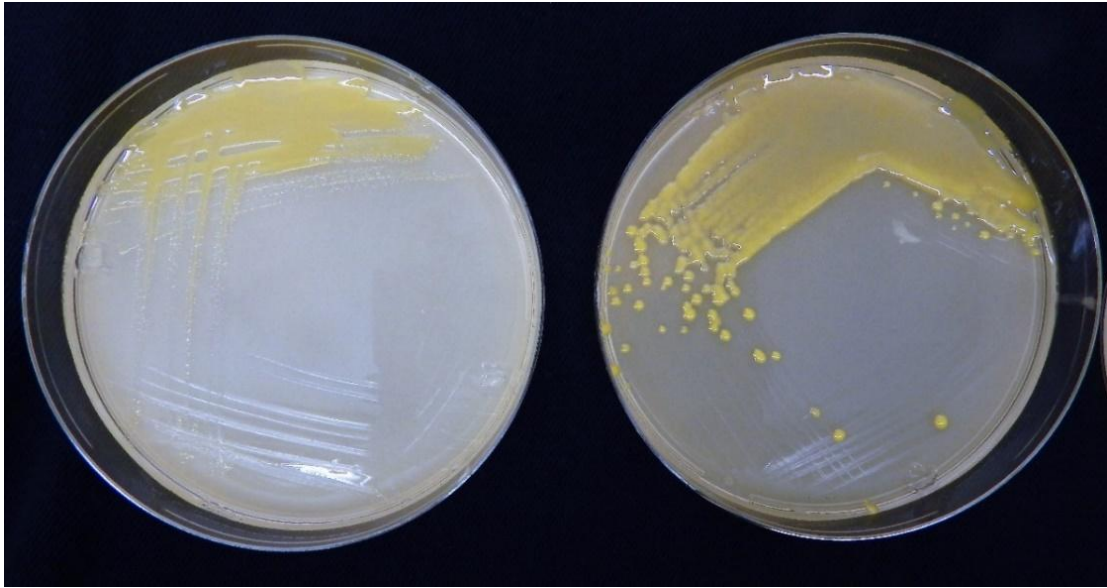
Εικόνα 2 YPGA *Xanthomonas euvesicatoria*



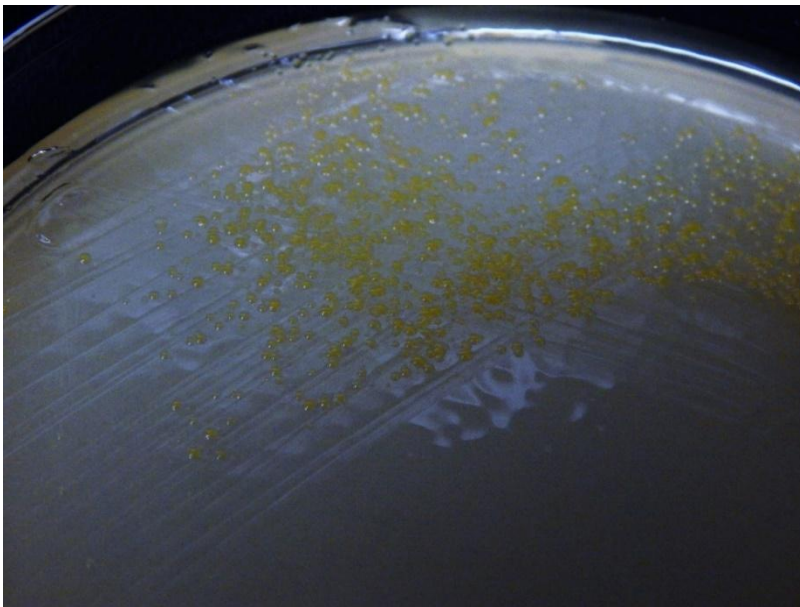
**Εικόνα 3:** YPGA *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*



**Εικόνα 4:** YPGA *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

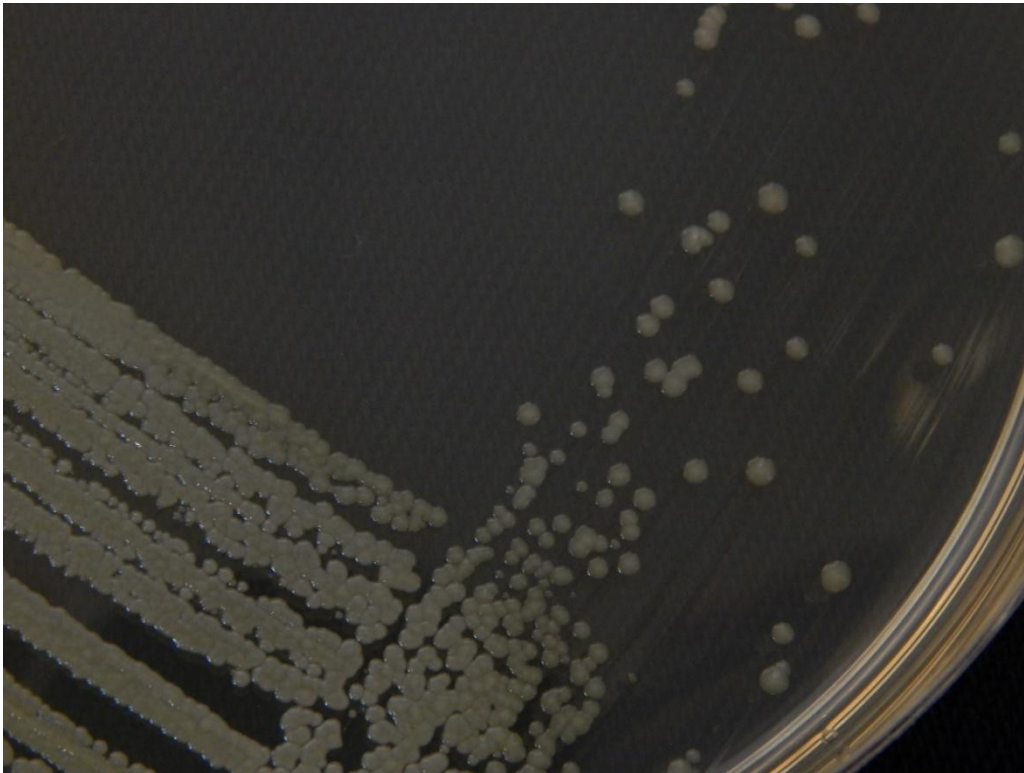


Εικόνα 5: YDC *Xanthomonas euvesicatoria* 2<sup>η</sup> μέρα και 4<sup>η</sup> μέρα

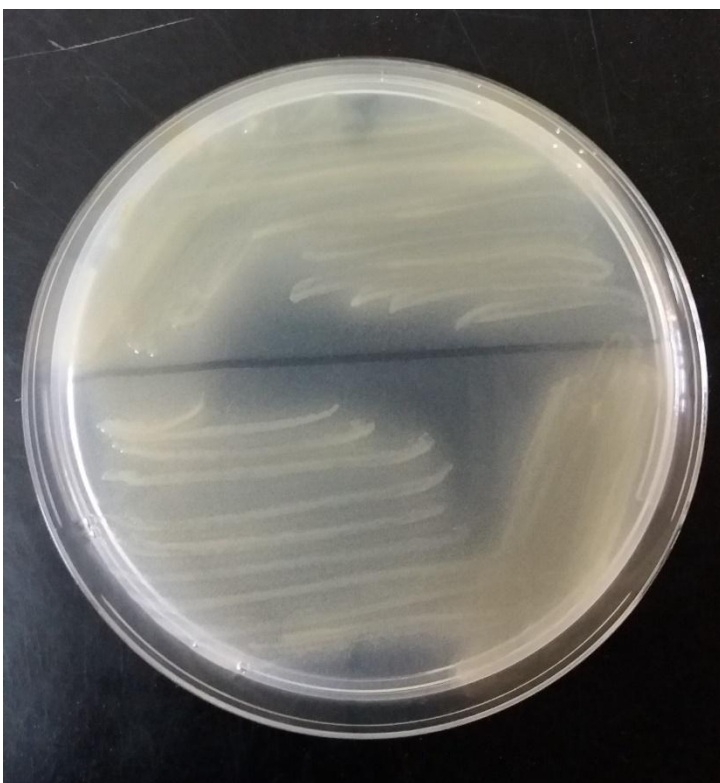


Εικόνα 6 :YDC *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*





**Εικόνα 7:** YPGA *Xanthomonas similar*



**Εικόνα 8:** Δοκιμή TMB

## 2.2.Αποτελέσματα Δοκιμής χρώσης Gram

Στην δοκιμή χρώσης Gram όλα τα στελέχη είναι αρνητικά κατά gram καθώς δεν παρατηρείται κυανή χρώση των κυττάρων.

## 2.3.Αποτελέσματα Δοκιμής παραγωγής οξειδάσης

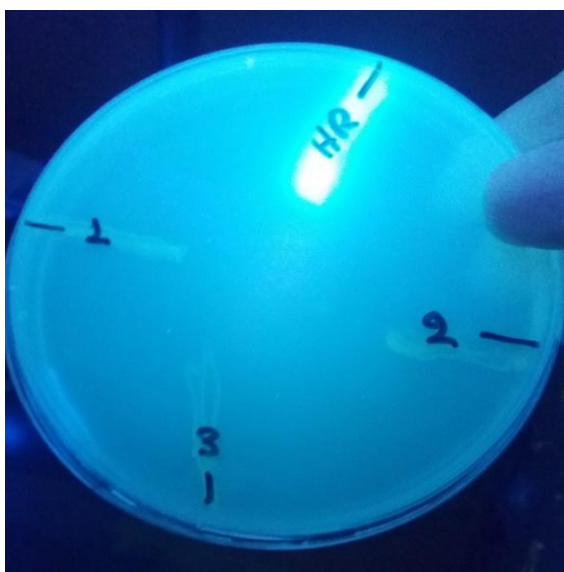
Με την δοκιμή της οξειδάσης προσδιορίζεται αν ένας μικροοργανισμός μπορεί να οξειδώνει κάποιες αρωματικές αμίνες, όπως την τετραμέθυλη φαινυλενεδιαμίνη. Αυτή η οξείδωση συσχετίζεται με τη δραστηριότητα της οξειδάσης μερικών μικροοργανισμών. Η αρωματική αμίνη, η οποία συμπεριφέρεται ως δότης ηλεκτρονίων, δίνει ηλεκτρόνια στην οξειδωμένη μορφή του κυτοχρώματος η οξειδωμένη μορφή παρουσιάζει ένα ιώδες χρώμα (θετική αντίδραση), ενώ η αναγωγική μορφή είναι άχρωμη (αρνητική αντίδραση). ενώ κάποια παραλλάσσονται και είναι ελαφρώς θετικά, και είναι θετικά στην καταλάση

Σε περίπτωση θετικής αντίδρασης εμφανίζεται στα όρια της βακτηριακής καλλιέργειας μπλε χρωματισμός εντός 10 sec. Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* παρουσιάζουν θετική αντίδραση στην δοκιμή της οξειδάσης, ενώ τα βακτήρια που ανήκουν στην Οικ Enterobacteriaceae είναι αρνητικά ως προς την οξειδάσης

Στη δοκιμή παραγωγής οξειδάσης όλα τα στελέχη ήταν αρνητικά.

## 2.4.Αποτελέσματα στη δοκιμή Παραγωγή διαχεόμενης φθορίζουσας χρωστικής King's B

Στην παρακάτω εικόνα 2.3 φαίνεται ο φθορισμός του θετικού μάρτυρα, σε αντίθεση με τις αποικίες 1,2,3 που είναι στελέχη *Xanthomonas euvesicatoria*. Όλα τα στελέχη έδωσαν αρνητική αντίδραση. Το *Pseudomonas syringae* HR παράγει χρωστική η οποία φαίνεται κάτω από την UV ακτινοβολία σε αντίθεση με το *Xanthomonas* spp που δεν παράγει χρωστική.



**Εικόνα 2.3 :** Θετικός μάρτυρας *Pseudomonas syringae*.

## 2.5.Αποτελέσματα στη δοκιμή παρεμπόδισης ανάπτυξης σε θρεπτικό υλικό nutrient agar με TTC (0.1% triphenyl tetrazolium chloride)

Κάποια βακτήρια όπως για παράδειγμα το *Pseudomonas syringae* αναπτύσσονται στο θρεπτικό υλικό TTC στο οποίο όμως το *Xanthomonas spp* είναι ευαίσθητο καθώς τα στελέχη δεν επιβιώνουν λόγω του triphenyl tetrazolium chloride. Όλα τα στελέχη έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα, καθώς δεν αναπτύχθηκαν.

## 2.6.Αποτελέσματα στη δοκιμή αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού

Η αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού έγινε με έγχυση αιωρημάτων των στελεχών με χρήση σύριγγας στα φύλλα. Παρατηρήθηκαν τα συμπτώματα στις 48 ώρες και συγκεκριμένα νέκρωση του φυτικού ιστού. Τα άλλα είδη του γένους *Xanthomonas spp* όπου χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά δεν προκάλεσαν νέκρωση του φυτικού ιστού (βλ. πίνακα 2.1).

Στην παρακάτω εικόνα 4.1 φαίνεται η νεκρωτική περιοχή.



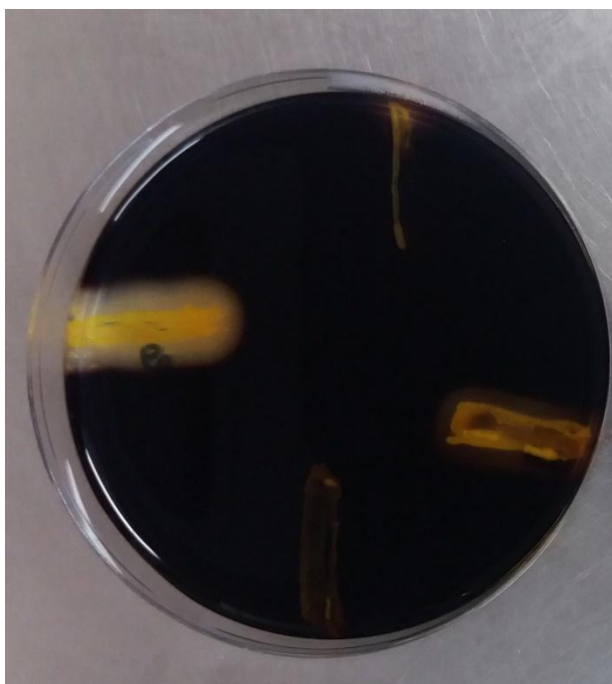
Εικόνα 4.1: Δοκιμή υπερευαισθησίας σε φύλλο καπνού

Πίνακας 2.1: Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού.

Αντίδραση βακτηριακών στελεχών	Βακτηριακά στελέχη
Θετική	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> : 1-11,17,18,20,27,30,33,35-52
Αρνητική	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> : 13,14,15,22,23,25,26,32 <i>Xanthomonas euvesicatoria similar</i> :28,29

## 2.7.Αποτελέσματα στη δοκιμή παραγωγής αμυλάσης

Προσθήκη ιωδίου για τη παρατήρηση εάν το άμυλο παραμένει ακέραιο μέσα στο άγαρ ή έχει υδρολυθεί. Στην περίπτωση που δεν έχει υδρολυθεί, το ιώδιο αντιδρά με το άμυλο και παρατηρείται σκούρο καφέ ή μπλε/μαύρο χρώμα. Ενώ στην περίπτωση εκείνη που το άμυλο έχει υδρολυθεί, παρατηρείται μία καθαρή ζώνη γύρω από την αναπτυγμένη καλλιέργεια, αφού δεν υπάρχει το άμυλο πλέον για να αντιδράσει με το ιώδιο και σημαίνει ότι το βακτήριο χρησιμοποιεί το άμυλο για την ενέργεια του. Ερυθρόχρωμες ζώνες δείχνουν ότι το άμυλο έχει μερικώς υδρολυθεί σε δεξτρίνες, (Βλ. εικόνα 4.2 και πίνακα 2.2).



Εικόνα 4.2 Δοκιμή αμύλου

Πίνακας 2.2: Αντίδραση βακτηριακών στελεχών στην δοκιμή αμύλου

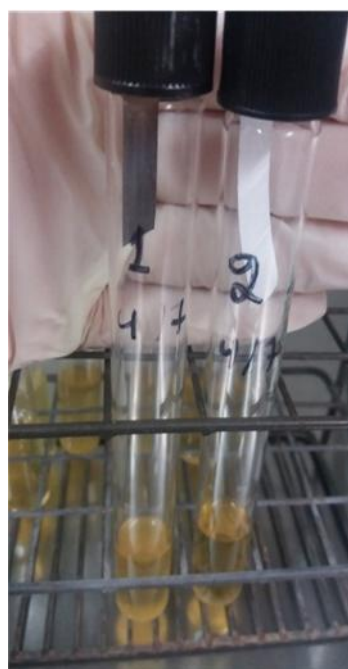
Αντίδραση βακτηριακών στελεχών	Βακτηριακά στελέχη
Θετική	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> : 28*,29*,35 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>juglans</i> : 34 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> : 13,14,15,22,23,25,26,32 *Similar
Αρνητική	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> : 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,17,18,19,20,27,30,33,34 και 36-52

## 2.8. Αποτελέσματα στη δοκιμή για παραγωγή υδρόθειου (H<sub>2</sub>S)

Η δοκιμή για παραγωγή υδρόθειου γίνεται με χρήση χαρτιού εμποτισμένο με μόλυβδο. Αφήνονται για τουλάχιστον 14 ημέρες σε σωλήνες, μετά το πέρας των 14 ημερών παρατηρήθηκε μαύρισμα του χαρτιού σε κάποια από τα στελέχη. Η αλλαγή χρώματος του χαρτιού από άσπρο σε μαύρο δείχνει απελευθέρωση H<sub>2</sub>S από την κυστεΐνη που περιέχει το υλικό στο σωλήνα. (εικόνες 5.1, 52).



Εικόνα 5.1 Αποτελέσματα H<sub>2</sub>S μετά από 5 μέρες



Εικόνα 5.2 Αποτελέσματα H<sub>2</sub>S μετά από 14 μέρες

Πίνακας 2.3: Αντίδραση βακτηριακών στελεχών στην δοκιμή H<sub>2</sub>S

Αντίδραση βακτηριακών στελεχών	Βακτηριακά στελέχη
Θετική ++*	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> : 1,3,4,5,6,7,18,20,27,28*,29*,30,33,35-52 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>juglans</i> : 34 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Phaseoli</i> : 32 *similar
Θετική	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> : 8,9,10 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Phaseoli</i> : 23,25
Αρνητική	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> : 2,11,17 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Phaseoli</i> : 13,14,15,22,26

\*Πολύ θετική αντίδραση



## 2.9.Αποτελέσματα στην δοκιμή παθογένειας των απομονώσεων σε λοβούς φασολιών

Στην παρακάτω εικόνα (5.1) το στέλεχος 24 το οποίο απομονώθηκε από μαρούλι προκαλεί ασθένεια στο φασολάκι και στην (5.2) υπερευαισθησία.



Εικόνα 5.1 Στέλεχος 24 ασθένεια.



Εικόνα 5.2 Υπερευαισθησία

### Πίνακας 2.4: Τεστ υπερευαισθησίας σε λοβούς φασολιών

Αντίδραση βακτηριακών στελεχών	Βακτηριακά στελέχη
Θετική	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> : 1-11,17,18,20,28*,29*,30,33,35-38,40-48,50-52 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> :13,14,15,22,23,25
Αρνητική	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> :27,39,49 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> : 26

### 3.1.Αποτελέσματα Ορολογικής δοκιμής ανοσοφθορισμού IF

#### Πίνακας 2.5: Αποτελέσματα δοκιμής ανοσοφθορισμού IF

Αποτελέσματα δοκιμής ανοσοφθορισμού IF	Βακτηρικά στελέχη
Θετικά	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> : 1-11,17,20,27,30,33,35,36,37,39-52 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> :13,14,15
Αρνητικά	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> : 38 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> : 22,23,32, <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>juglans</i> : 34

### **3.2.Αποτελέσματα Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και οριζόντιας ηλεκτροφόρησης του προϊόντος.**

Στους παρακάτω πίνακες 6.1 ,6.2 και 6.3 αναγράφεται η σύνθεση μείγματος PCR με χρήση διαφορετικών πρωτοκόλλων και primers.(Hamza et all), (Alison et all),(EPPO PM 7/110)

Για τον συνδυασμό primer Bac16-F /Bac16-R

- ο *X. euvesicatoria* θα πρέπει να δώσει ένα προϊόν των 173 bp.
- Το *X. vesicatoria* θα πρέπει να δώσει ένα προϊόν 138 bp

#### **Αποτελέσματα**

Οι μπάντες από τα προϊόντα PCR *X.euvesicatoria* δίνουν 173 bp και τα *X. vesicatoria* δίνουν μπάντες 138 bp. Συμπεραίνουμε ότι όσα έδειξαν είναι *Xanthomonas euvesicatoria*.

Για το συνδυασμό primers RST65 /69 το *X.euvesicatoria* δίνει 420 bp (journal phytopathology).

Για το συνδυασμό primers Xeu2.4-Xeu 2.5 δίνει 208 bp.

Το προϊόν από το πρωτόκολλο με τους primers RST 65-RST 69 δίνει προϊόν 420 bp, ενώ με τους primers X.eu 2.4-2.5 δίνει 208 bp. [Βλ. πίνακα 6.1, 6.2 και εικόνα 6.2,(,2004)]

**Πίνακας 6.1 Primers χευ2.4 2.5**

	c διαλ.	1r
<b>SUPW</b>		18,25
<b>PCR Buffer, InVitrogen</b>	10x	2,5
<b>MgCl<sub>2</sub>, InVitrogen</b>	50mM	0,75
<b>dNTP's</b>	10mM	0,5
<b>χευ2,4</b>	10μM	0,4
<b>χευ2,5</b>	10μM	0,4
<b>Platinum Taq DNA polymerase, InVitrogen</b>	5u/μl	0,2
<b>Sub total</b>		23
<b>Sample</b>		2
<b>TOTAL</b>		25

**Πίνακας6.2 Primers RST65,69**

	c διαλ.	1
<b>SUPW</b>		17,05
<b>PCR Buffer, InVitrogen</b>	10x	2,5
<b>MgCl<sub>2</sub>, InVitrogen</b>	50mM	0,75
<b>dNTP's</b>	10mM	0,5
<b>RST65</b>	10μM	1
<b>RST69</b>	10μM	1
<b>Platinum Taq DNA polymerase, InVitrogen</b>	5u/μl	0,2
<b>Sub total</b>		23
<b>Sample</b>		2
<b>TOTAL</b>		25

**Πίνακας 6.3 Primers BAC16SF-R**

	c διαλ	1r
<b>SUPW</b>		15,75
<b>PCR Buffer, InVitrogen</b>	10x	2,5
<b>MgCl<sub>2</sub>, InVitrogen</b>	50mM	0,75
<b>dNTP's</b>	10mM	0,5
<b>Primer Bs-XeF</b>	10μM	0,5
<b>Primer Bs-XeR</b>	10μM	0,5
<b>Primer Bs-XvF</b>	10μM	1
<b>Primer Bs-XvR</b>	10μM	1
<b>BAC16S-F</b>	10μM	0,15
<b>BAC16S-R</b>	10μM	0,15
<b>Platinum Taq DNA polymerase, InVitrogen</b>	5u/μl	0,2
<b>Sub total</b>		23
<b>Sample</b>		2
<b>TOTAL</b>		25

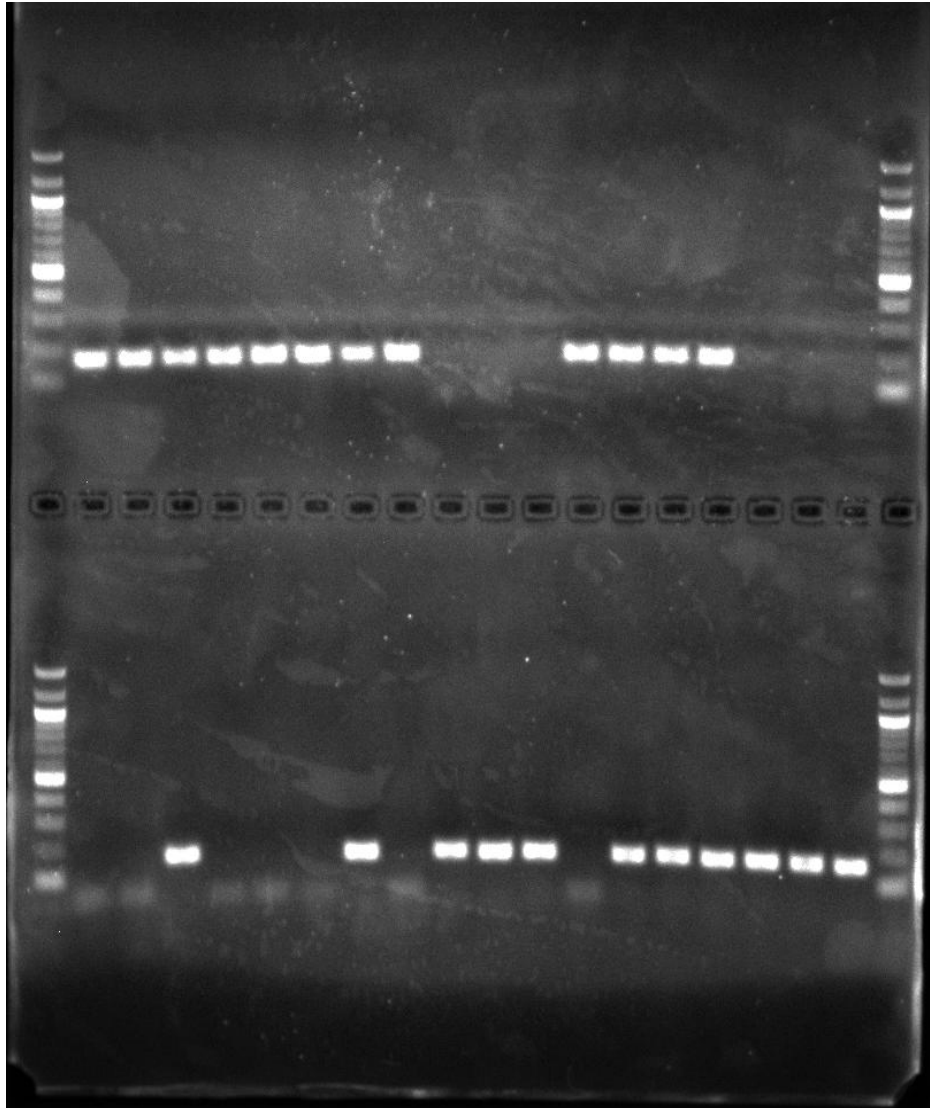
C διαλ.: Συγκέντρωση διαλύματος

1r: 1 reaction : 1 αντίδραση σε μl

Από βιβλιογραφία (EPPO PM 7/110)

Ο προσδιορισμός του μεγέθους του προϊόντος γίνεται με τη χρήση του κατάλληλου δείκτη μοριακών βαρών (DNA Ladder) ο οποίος υποβάλλεται σε ηλεκτροφόρηση ταυτόχρονα. Το προϊόν του *Xanthomonas euvesicatoria* αντιστοιχεί σε 173 bp, ενώ το *Xanthomonas vesicatoria* σε 138 bp από το πρωτόκολλο.[βλ. πίνακα 6.3 και εικόνα 6.1 (EPPO PM 7/110)]

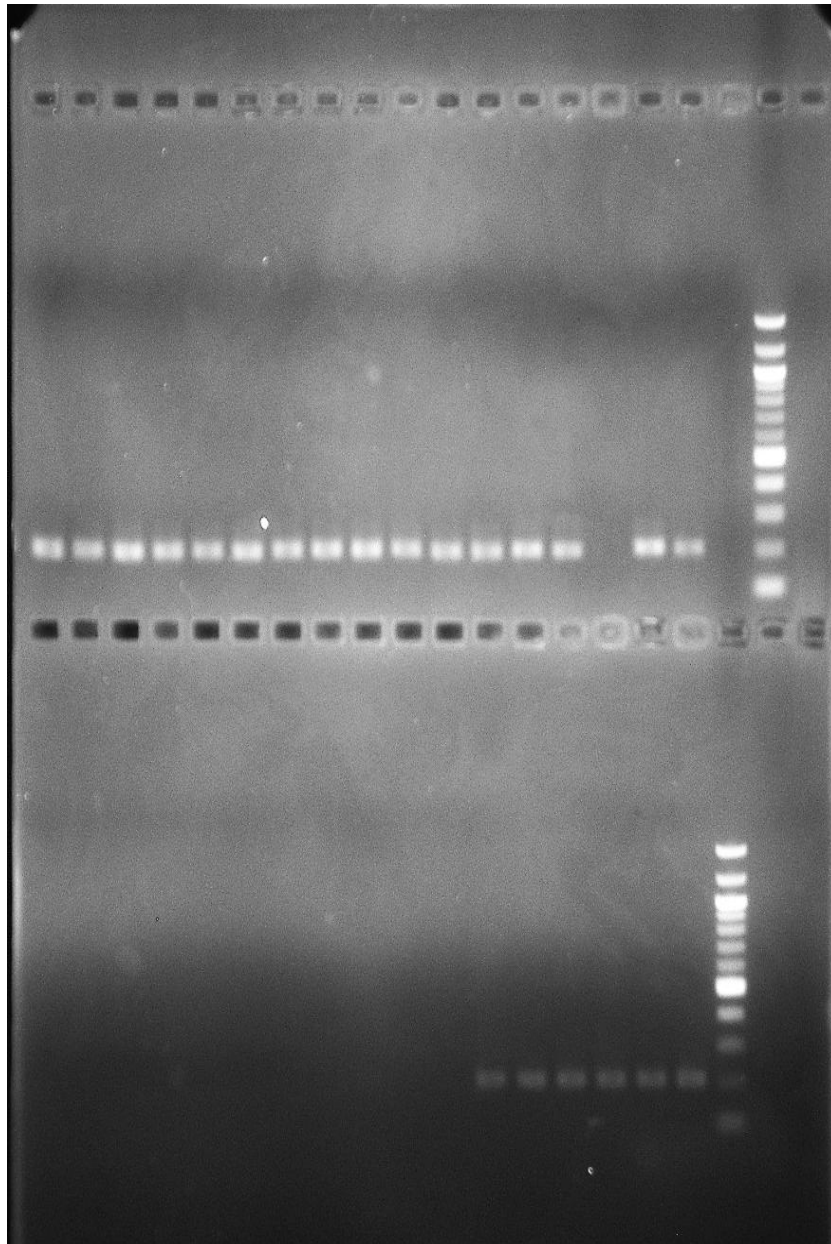
Ladder 2 4 5 6 7 8 9 10 13 14 15 11 17 18 20 22 23 23 ladder



Ladder 25 26 27 28 29 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 ladder

**Εικόνα 6.1:** Αγαρόζη μετά από ηλεκτροφόρηση με χρήση των Primers BAC16SF-R

12 3 4 5 6 7 8 9 10 11 17 18 20 27 30 33 34 ladder



13 14 15 22 23 25 26 32 28 29 24 35 36 37 38 39 40 ladder

**Εικόνα 6.2:** Αγαρόζη μετά από ηλεκτροφόρηση με χρήση των primers X.eu 2.4, 2.5

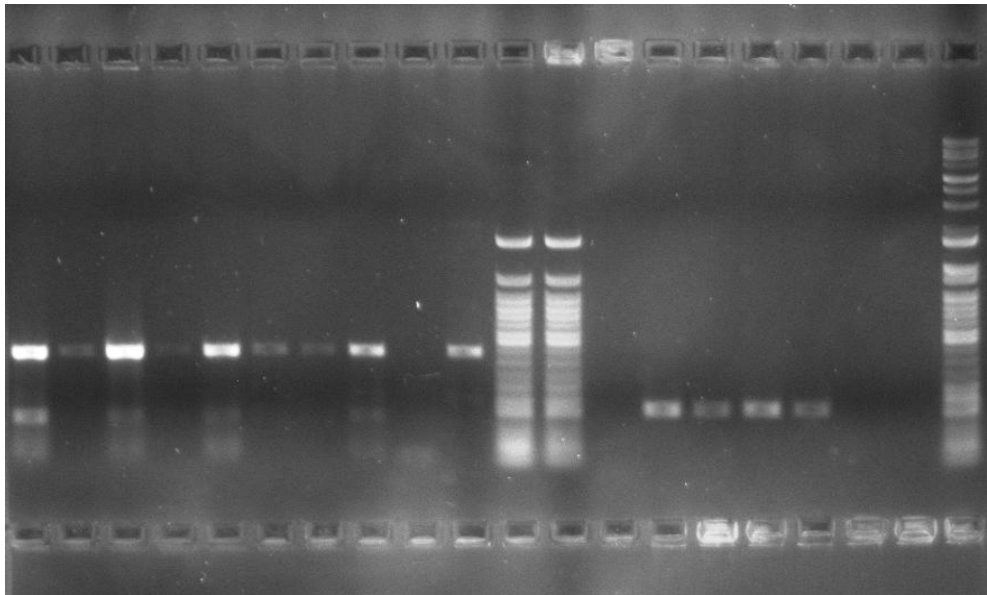
**RST**

**X.eu**

1(0) 1(-2) 2(0) 2(-2) 3(0) 3(-2) 4(-2) 3(-1)

c- 1(0) 1(-1) 2(0) 2(-2)

c- ladder



Ladder 50 bp

**Εικόνα 6.3** Αγαρόζη μετά από ηλεκτροφόρηση με χρήση Primers RST65,69 και X.eu 2.4, 2.5

Στον παρακάτω πίνακα 1.2 παρουσιάζονται συνολικά όλα τα αποτελέσματα από τις δοκιμές ταυτοποίησης χαρακτηρισμού.

**Πίνακας 1.2** Δοκιμές ταυτοποίησης χαρακτηρισμού

Στελέχη	άμυλο	king's B	παθογένεια τομάτ	HRκαπνό	TTC	οξειδάση	TMB(m)	IF
1	-	-	+	+	-	-	+	+
2	-	-	+	+	-	-	+	+
3	-	-	+	+	-	-	+	+
4	-	-	+	+	-	-	+	+
5	-	-	+	+	-	-	+	+
6	-	-	+	+	-	-	+	+
7	-	-	+	+	-	-	+	+
8	-	-	+	+	-	-	+	+
9	-	-	+	+	-	-	+	+
10	-	-	+	+	-	-	+	+
11	-	-	+	+	-	-	+	+
<b>P.syringea</b>		<b>+</b>	<b>+</b>					
13	+	-	-	-	-	-	+	+
14	+	-	-	-	-	-	+	+
15	+	-	-	-	-	-	+	+
17	-	-	+	+	-	-	-	+
18	-	-	+	+	-	-	-	+
20	-	-	+	+	-	-	-	+
22	+	-	-	-	-	-	-	-
23	+	-	-	-	-	-	+	-
24	-	-	-	+	+	-	-	-
25	+	-	-	-	-	-	-	+
26	+	-	-	-	-	-	-	+
27	-	-	+	+	-	-	-	+
28	+	-	-	+	-	-	-	-
29	+	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	+	+	-	-	+	+
32	+	-	-	-	-	-	-	(-)
33	-	-	+	+	-	-	-	+
34	+	-	-	+	-	-	-	-
35	+	-	+	+	-	-	-	+
36	-	-	+	+	-	-	-	+
<b>X.VESICATORIA</b>						-		<b>+</b>
37	-	-	+	+	-	-		+
38	-	-	+	+	-	-		-
39	-	-	+	+	-	-		+
40	-	-	+	+	-	-		+
41	-	-	+	+	-	-		+
42	-	-	+	+	-	-		+
43	-	-	+	+	-	-		+
44	-	-	+	-	-	-		+
45	-	-	+	+	-	-		+
46	-	-	+	-	-	-		+
47	-	-	+	+	-	-		+
48	-	-	+	+	-	-		+
49	-	-	+	+	-	-		+
50	-	-	+	+	-	-		+
51	-	-	+	-	-	-		+
52	-	-	+	-	-	-		+

Πίνακας 1.2

Στελέχη	TMB(m) 2	TMB 29/5	HR φασολακία	PCR (EPPO)	παραγωγή H <sub>2</sub> S
1			+	+	2+
2			+	+	-
3			+	+	2+
4			+	+	2+
5			+	+	2+
6			+	+	2+
7			+	+	2+
8			+	+	+
9			+	+	+
10			+	+	+
11			+	+	-
P.syringea					
13	+	+	+	-	-
14	+	+	+	-	-
15	+	+	+	-	-
17	-	-	+	+	-
18	-	-	+	+	2+
20	-	-	+	-	
22	+	+	+	-	-
23	+	+	+	-	+
24	-	-	ασθένεια	-	+
25	+	+	+	-	+
26	+	+	-	-	-
27	-	-	-	+	2+
28	+	+	+	-	2+
29			+	-	2+
30	-	-	+	+	2+
32	+	+	+	-	2+
33	-	-	+	+	2+
34	+	+	-	-	2+
35	+	+	+	+	2+
36	-	-	+	+	2+
X.VESICATORIA					
37	+	+	+	+	2+
38	-	+	+	-	2+
39	+		-	+	2+
40	-	+	+	+	2+
41	-	+	+	+	2+
42	-	+	+	+	2+
43	+	+	+	+	2+
44	+	+	+	+	2+
45	+	+	+	+	2+
46	-	+	+	+	2+
47	-	+	+	+	2+
48	+	+	+	+	2+
49	-	-	-	+	2+
50	-	-	+	+	2+
51	-	-	+	+	2+
52	-	-	+	+	2+



## Συμπεράσματα

Στην Ελλάδα διαπιστώθηκε η ασθένεια το 1976, χωρίς όμως να είχε αναφερθεί ότι προκαλεί προβλήματα στις καλλιέργειες. Στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο (Μ.Φ.Ι) από το 2001 ως σήμερα, έχουν σταλεί δείγματα συμπτωματικών φυτών προς εξέταση από διάφορες περιοχές, τα οποία βρέθηκαν να έχουν συμπτώματα προσβολής μέχρι και 80%, σύμφωνα με τα στοιχεία. Τα στελέχη του βακτηρίου *Xanthomonas euvesicatoria* που απομονώθηκαν μόλυναν την τομάτα και προκάλεσαν υπερευαισθησία στον καπνό και σε λοβούς φασολιών.

Ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά σε διάφορα θρεπτικά υλικά τα αποτελέσματα ήταν τα αναμενόμενα σε όλα τα στελέχη. Υπήρξε παραλλακτικότητα μεταξύ των στελεχών στη δοκιμή TMB, διότι κάποια στελέχη παρουσίασαν κροκίδωση, ενώ κάποια δεν εμφάνισαν.

Ως προς τις δοκιμές ταυτοποίησης-χαρακτηρισμού, ήταν όλα τα στελέχη αρνητικά κατά την χρώση Gram, παρουσίασαν αρνητική αντίδραση στην δοκιμή παραγωγής οξειδάσης. Τα επιλεγόμενα στελέχη έδωσαν 100% αρνητική αντίδραση στην παραγωγή διαχεόμενης φθορίζουσας χρωστικής. Δεν αναπτύχθηκαν τα στελέχη στο θρεπτικό υλικό με Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC 0,1%),κατά 100% καθώς είναι ευαίσθητα. Όλα τα στελέχη προκάλεσαν νέκρωση του φυτικού ιστού στην αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού. Στην δοκιμή παραγωγής αμυλάσης υπήρξε παραλλακτικότητα, καθώς κάποια στελέχη έδωσαν θετικά αποτελέσματα, και κάποια αρνητικά. Θετικά ήταν τα στελέχη *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, και αρνητικά όλα τα στελέχη *Xanthomonas euvesicatoria* εκτός από ένα στέλεχος.

Στην δοκιμή παραγωγής υδρόθειου (H<sub>2</sub>S) τα στελέχη έδωσαν αρνητικά και θετικά αποτελέσματα, καθώς μερικά απελευθερώνουν υδρόθειο ενώ κάποια όχι, συγκεκριμένα παρατηρείτε παραλλακτικότητα που δεν συνδέεται με το φυτικό ιστό από τον οποίο απομονώθηκαν, όμως στελέχη που εμφάνισαν διαφορετικά αποτελέσματα είναι από την ίδια περιοχή στον ίδιο αγρό.

Στην δοκιμή για παθογένεια των απομονώσεων σε λοβούς φασολιού τα στελέχη έδωσαν κατά 92% θετική αντίδραση αλλά και αρνητικά αποτελέσματα καθώς δεν εμφάνισαν κάποια στελέχη τα συμπτώματα.

Στην ορολογική δοκιμή ανοσοφθορισμού τα αποτελέσματα ήταν τα αναμενόμενα για τα στελέχη *Xanthomonas euvesicatoria* καθώς φθόριζαν, υπήρξαν όμως και θετικά αποτελέσματα στα συγκρινόμενα στελέχη *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* καθώς έδειξαν θετικά αποτελέσματα.

Τέλος στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, όλα τα στελέχη είχαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα καθώς τα προϊόντα που έδωσαν ήταν τα αναμενόμενα για όλα τα στελέχη και έδειξαν ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν ήταν *Xanthomonas euvesicatoria* και όχι *Xanthomonas vesicatoria* και *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

## Βιβλιογραφία

1. Dominique Blancard, Tomato diseases, Identification, biology and control, second edition, 2012.
2. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΚΕΝΤΡΙΚΗΣ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ ΓΕΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ «Παρουσία του επιβλαβούς οργανισμού καραντίνας *Xanthomonas euvesicatoria* σε φυτά πιπεριάς» Αριθ. Πρωτ.: οικ. 8764,2016
3. Παναγόπουλος, Χ.Γ. Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών. εκδ.Β'. ΑΘ. ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ, Αθήνα. 2000.
4. Jones, J. B., and Stall, R. E., H. Bouzar. Diversity Among Xanthomonads Pathogenic on Pepper and Tomato, Annual Review of Phytopathology 36:4158, 1998
5. Ritchie, D.F. Bacterial spot of pepper and tomato. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1027-01, 2007.
6. European and Mediterranean Plant Protection Organization EPPO (PM 7/097 (1) Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2009)
7. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. Diagnostics Diagnostic PM 7/110 (1) Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2013).
8. RA Lelliott and DE Stead, Methods for the Diagnosis of bacterial Diseases of plants, Blackwell Scientific Publications LTD
9. Σάββας, Δ. Γενική Λαχανοκομία. Εκδόσεις Πεδίο, Αθήνα, 2016
10. Χρίστος Μ Ολύμπιος, ομότιμος καθηγητής Κηπευτικών Καλλιεργειών Γεωπονικού πανεπιστημίου Αθηνών, Η τεχνική της καλλιέργειας των υπαίθριων κηπευτικών, εκδόσεις Αθ.Σταμούλη.2015
11. Rosselló-Mora, Amann The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiol, 2001.
12. Jeri D. Barak, TacaVancheva, PierreLefeuvre ,JeffreyB.Jones,, SujanTimilsina , Gerald V. Minsavage5, GaryE.Vallad and RalfKoebnik. Whole-Genome Sequences of *Xanthomonas euvesicatoria* Strains Clarify Taxonomy and Reveal a Stepwise Erosio of Type 3 Effectors. (NCBI) PubMed

13. Ebrahim Osdaghi, S. Mohsen Taghavi, Habiballah Hamzhezarghani and Jay Ram Lamichhane, Occurrence and Characterization of the Bacterial Spot Pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on Pepper in Iran, *Journal of Phytopathology*,

14. Hamza, I. Robène-Soustrade, E. Jouen, L. Gagnevin, and P. Lefeuvre, Research Plant Pathologists, Saint Pierre, La Réunion, France; F. Chiroleu, Statistician, CIRAD, UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes, chemin de l'Irat, France; and O. Pruvost, Research Plant Pathologist, Saint Pierre, La Réunion, Franc. Genetic and Pathological Diversity Among *Xanthomonas* Strains Responsible for Bacterial Spot on Tomato and Pepper in the Southwest Indian Ocean Region.

15. Allison R.Schwartz, NehaPotnis, SujanTimilsina, MarkWilson, JoséPatané, Joaquim MartinsJr, GeraldV.Minsavage, DouglasDahlbeck, AlinaAkhunova, Nalvo Almeida, GaryE.Vallad, JeriD.Barak, FrankF.White, SallyA.Miller , David Ritchie , EricaGoss, RebeccaS.Bart , JoãoC.Setubal JeffreyB.Jones and BrianJ.Staskawicz1. Phylogenomics of *Xanthomonas* field strains infecting pepper and tomato reveals diversity in effector repertoires and identifies determinants of host specificity. NCBI. PubMed.