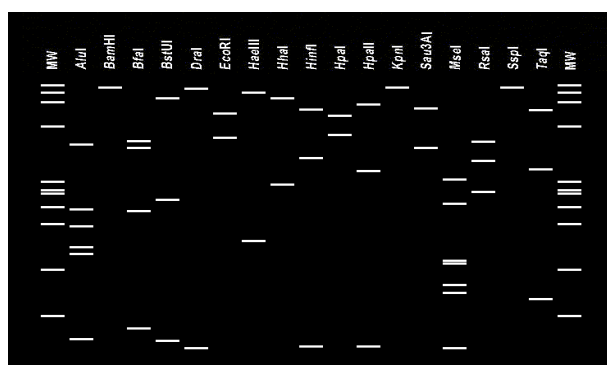
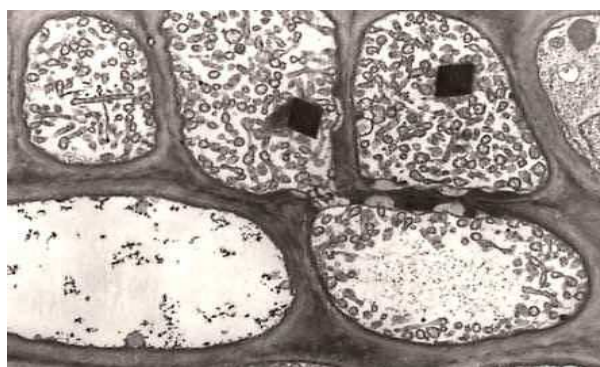


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ:**

***‘Ανίχνευση και γενετικός χαρακτηρισμός των  
φυτοπλάσμάτων που προσβάλλουν πυρηνόκαρπα στην  
Ελλάδα’***



**ΚΑΡΑΤΣΙΩΡΗ ΕΛΕΝΗ**

**ΒΟΛΟΣ 2010**



## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

<b>Ε. Βέλλιος</b>	<b>Λέκτορας Φυτοπαθολογίας</b>	<b>Εισηγητής</b>
<b>Α. Παππάς</b>	<b>Καθηγητής Φυτοπαθολογίας</b>	<b>Μέλος</b>
<b>Α. Μαυρομάτης</b>	<b>Επ. Καθηγητής Γενετικής Βελτίωσης Φυτών</b>	<b>Μέλος</b>

## **Ευχαριστίες**

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Λέκτορα, κ. Βέλλιου Ευάγγελου.

Με την ολοκλήρωση της θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς τον κ. Βέλλιο που με εισήγαγε στον ‘κόσμο’ της Μοριακής Φυτοπαθολογίας αναθέτοντας μου ένα τόσο ενδιαφέρον ερευνητικό θέμα. Το συνεχές ενδιαφέρον του, οι σημαντικές υποδείξεις του, η καθοδήγηση του και το επιστημονικό του υπόβαθρο συνέβαλαν σημαντικά στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εξαιρετική συνεργασία και επικοινωνία το χρονικό αυτό διάστημα, καθώς και για τις ουσιαστικές παρεμβάσεις του στη διόρθωση της διατριβής.

Για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης ήταν σημαντικές και οι επισημάνσεις, η βοήθεια και το συνεχές ενδιαφέρον της Δρ. Λιολιοπούλου Φένιας που την ευχαριστώ θερμά.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, Καθηγητή κ. Παππά Αθανάσιο αρχικά για τη φιλοξενία στο εργαστήριο και κατά δεύτερον για τις υποδείξεις του και την κριτική ανάγνωση της μελέτης.

Επίσης, ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μαυρομάτη Αθανάσιο για το χρόνο που διέθεσε για την ανάγνωση και διόρθωση της μελέτης μου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο προσωπικό του Εργαστηρίου Ιχθυολογίας και κυρίως στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κορμά για την παροχή πάγου.

Ευχαριστώ, επίσης, τον υποψήφιο Διδάκτορα του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας Χατζηδημόπουλο Μιχάλη και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Παπαευαγγέλου Δημήτρη, Κουτσιώνη Βαγγέλη και Παπαδοπούλου Άρτεμις για το ενδιαφέρον τους και τη φιλική τους διάθεση που έκαναν ευχάριστη την εργασία μου στο Εργαστήριο. Ευχαριστώ ιδιαίτερα και τον συνάδελφο και μεταπτυχιακό φοιτητή Κωστιάνη Γεώργιο για την ηθική συμπαράσταση, υπομονή και στήριξη κατά τα χρόνια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τη συνεχή υποστήριξή τους σε κάθε προσπάθειά μου.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

## **Σελίδα**

Σκοπός της εργασίας.....	6
<b>Κεφάλαιο I. Εισαγωγή- Βιβλιογραφική Ανασκόπηση.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b> Εισαγωγή.....	<b>8</b>
<b>1.2</b> Μορφολογία και γενοτυπική μορφή φυτοπλάσμάτων.....	<b>9</b>
<b>1.3</b> Ανίχνευση φυτοπλάσμάτων.....	<b>11</b>
<b>1.4</b> Ταξινόμηση φυτοπλάσμάτων.....	<b>13</b>
<b>1.5</b> Φυτοπλάσματα που προσβάλλουν τα πυρηνόκαρπα.....	<b>20</b>
<b>1.6</b> Ευρωπαϊκός Ίκτερος των πυρηνοκάρπων.....	<b>21</b>
<b>1.6.1</b> Εύρος ξενιστών και συμπτώματα.....	<b>21</b>
<b>1.6.2</b> Το παθογόνο αίτιο.....	<b>24</b>
<b>Κεφάλαιο II. Υλικά &amp; Μέθοδοι.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1</b> Φυτικό Υλικό.....	<b>27</b>
<b>2.2</b> Απομόνωση ολικού DNA από πυρηνόκαρπα.....	<b>30</b>
<b>2.3</b> Ανίχνευση φυτοπλάσμάτων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	<b>32</b>
<b>2.3.1</b> Επιλογή της προς ενίσχυσης περιοχής.....	<b>32</b>
<b>2.3.2</b> Επιλογή εκκινητών.....	<b>32</b>
<b>2.3.3</b> Συνθήκες Αντίδρασης.....	<b>35</b>
<b>2.3.4</b> Οριζόντια Ηλεκτροφόρηση.....	<b>36</b>
<b>2.4</b> Ταυτοποίηση φυτοπλάσμάτων με τη μέθοδο του πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP).....	<b>37</b>
<b>2.4.1</b> Κάθετη Ηλεκτροφόρηση.....	<b>38</b>
<b>2.5</b> Αλληλούχηση της περιοχής 16S rRNA- ITS1- 23S rRNA του γονιδιώματος φυτοπλάσμάτων.....	<b>39</b>
<b>2.6</b> <i>In silico</i> πέψη με περιοριστικά ένζυμα και αναπαράσταση σε εικονικό πήγμα.....	<b>40</b>
<b>Κεφάλαιο III. Αποτελέσματα.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b> Ανίχνευση φυτοπλάσμάτων σε πυρηνόκαρπα.....	<b>42</b>
<b>3.2</b> Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP).....	<b>44</b>
<b>3.3</b> Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας φυτοπλασματικού DNA.....	<b>48</b>
<b>3.4</b> <i>In silico</i> RFLPs.....	<b>54</b>
<b>Κεφάλαιο IV. Συζήτηση- Συμπεράσματα.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b> Συζήτηση.....	<b>56</b>
<b>4.2</b> Συμπεράσματα.....	<b>60</b>
Κατάλογος εικόνων, πινάκων.....	<b>62</b>

<b>Κεφάλαιο V. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>64</b>
<b>5.1 Διεθνής Βιβλιογραφία.....</b>	<b>65</b>
<b>5.2 Ελληνική Βιβλιογραφία.....</b>	<b>70</b>

## **Σκοπός της εργασίας**

Σκοπός της εργασίας είναι η ταυτοποίηση και ο μοριακός χαρακτηρισμός των φυτοπλάσμάτων που προκαλούν την πρώιμη έκπτυξη των φύλλων σε πυρηνόκαρπα (δαμασκηινές, βερικοκιές, αμυγδαλιές, ροδακινιές) της χώρας μας. Το σύμπτωμα αυτό καθώς και μια σειρά άλλων (χλώρωση και καρούλιασμα των φύλλων, μεταχρωματισμός καμβίου, νέκρωση του φυτού) έχουν αναφερθεί σε διάφορα είδη του γένους *Prunus* σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες και έχουν αποδοθεί στο φυτόπλασμα ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’ που προκαλεί την ασθένεια του Ευρωπαϊκού Ίκτερου των Πυρηνοκάρπων, γνωστή διεθνώς ως European Stone Fruit Yellows (ESFY). Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των φυτοπλάσμάτων, επιλέχθηκαν οι μοριακές μέθοδοι της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με γενικεύμενους εκκινητές για ανίχνευση φυτοπλάσμάτων και εξειδικευμένους για την ομάδα X-B (όπου ανήκει το φυτόπλασμα ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’) καθώς και του πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP) σε τμήμα των ριβοσωμικών γονιδίων (rRNAs). Επίσης, η μέθοδος της αλληλούχισης (sequencing) στην ίδια περιοχή του γενώματος κρίθηκε σκόπιμο να συμπεριληφθεί για την ταυτοποίηση ώστε οι αλληλουχίες των φυτοπλάσμάτων από τα δείγματα που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας να συγκριθούν με τις αντίστοιχες αλληλουχίες που έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων EMBL/Genbank.

# **I. Εισαγωγή & Βιβλιογραφική Ανασκόπηση**

## **1.1 Εισαγωγή**

Τα φυτοπλάσματα είναι προκαρυωτικά φυτοπαθογόνα που προσβάλλουν πληθώρα φυτών προκαλώντας ασθένειες μεγάλης οικονομικής σημασίας σε παγκόσμιο επίπεδο (Bertaccini, 2007; Lee *et al.*, 2000). Χαρακτηρίζονται ως υποχρεωτικά παράσιτα των φυτών, όπου διαβιούν στον ηθμό τους και απαιτούν έντομο- φορέα για τη μετάδοσή τους (Whitcomb and Tully, 1989; Hogenhout *et al.*, 2008). Οι φορείς των φυτοπλάσμάτων είναι νύσσοντος- μυζητικού τύπου έντομα που ανήκουν στην τάξη των Ημιπτέρων (Hemiptera) -*Cicadellidae*, *Fulgoromorpha*, *Psyllidae*- (Weintraub and Beanland, 2006). Τα φυτοπλάσματα αποικίζουν τον ηθμό των φυτών καθώς και το στομάχι, την αιμόλεμφο, τους σιελογόνους αδένες και άλλα όργανα των εντόμων- φορέων τους. (Lee *et al.*, 2000).

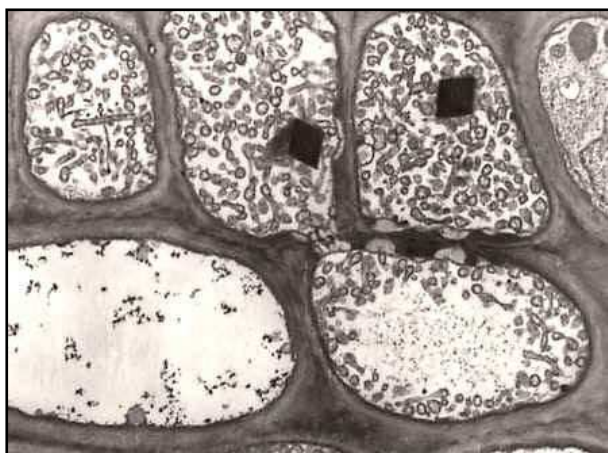
Τα φυτά που προσβάλλονται από φυτοπλάσματα εμφανίζουν μία πλειάδα συμπτωμάτων εξαιτίας των διαταραχών στην φυσιολογική ισορροπία των ορμονών ή των ρυθμιστών ανάπτυξης τους. Τα συμπτώματα αυτά περιλαμβάνουν τη χλωρανθία, τη φυλλωδία, τη βλαστομανία, το νανισμό και τη βραχυγονάτωση, τη στειρότητα των ανθέων (γιγαντοφθαλμία), τον ίκτερο (κίτρινο, χρυσοκίτρινο ή κόκκινο μεταχρωματισμό των φύλλων κατά θέσεις ή με ομοιόμορφη παρουσία σε όλο το φύλλο), το καρούλιασμα των φύλλων, την παρακμή, τη μείωση της παραγωγής, την νέκρωση των προσβεβλημένων φυτών, ενώ εσωτερικά του φυτού παρουσιάζεται εκτεταμένη νέκρωση του φλοιού και συχνά σχηματισμός βοθρίων. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη μόλυνση των φυτών από τα έντομα- φορείς έως την εμφάνιση των συμπτωμάτων ποικίλλει από λίγες μέρες έως αρκετούς μήνες (6-24), αναλόγως του είδους του φυτοπλάσματος και του φυτού (Lee *et al.*, 2000; Hogenhout *et al.*, 2008). Στα έντομα –φορείς έχει παρατηρηθεί μείωση της γονιμότητάς και της επιβιώσής τους (Hogenhout *et al.*, 2008).

Τέλος, όσον αφορά την αντιμετώπισή τους, τα φυτοπλάσματα έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν ευαισθησία στις τετρακυκλίνες, αλλά όχι στην πενικιλίνη (IRPCM Phytoplasma/ Spiroplasma Working Team- Phytoplasma taxonomy group, 2004).

## **1.2 Μορφολογία και γενοτυπική δομή φυτοπλάσμάτων**



Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα φυτοπλάσματα είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί χωρίς κυτταρικό τοίχωμα, γεγονός που τους προσδίδει ευπλαστικότητα και έντονο πλειομορφισμό. Τα κύτταρα περιβάλλονται μόνο από κυτοπλασματική μεμβράνη τριών στρωμάτων και όταν το σχήμα τους είναι σφαιρικό, η διαμετρός τους κυμαίνεται μεταξύ 220 και 800  $\mu\text{m}$  (Lee *et al.*, 2000). Το γενετικό τους υλικό είναι ένα κυκλικό δίκλωνο χρωμοσωμικό DNA με μικρή περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη (G+C 23-29% mol), το οποίο περιέχει δύο ριβοσωμικά RNA οπερόνια και μικρό αριθμό tRNA γονιδίων (IRPCM Phytoplasmata/ Spiroplasma Working Team-Phytoplasmata taxonomy group, 2004; Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006). Το μέγεθος του γενόματος είναι μικρό και κυμαίνεται μεταξύ 530 και 1200 kbp. Επιπλέον, έχουν χαρακτηριστεί ως «η μικρότερη, αυτόνομη οντότητα που μπορεί να αυτό-αντιγράφεται» κατά τον Maniloff (1996). Το Candidatus *Phytoplasmata cynodontis* (Λεύκανση των φύλλων της αγριάδας, Bermuda grass white leaf phytoplasmata) έχει το μικρότερο γένωμα (530 kbp) που έχει παρατηρηθεί μέχρι στιγμής σε ζωντανό οργανισμό (Lee *et al.*, 2000; Bai *et al.*, 2006).



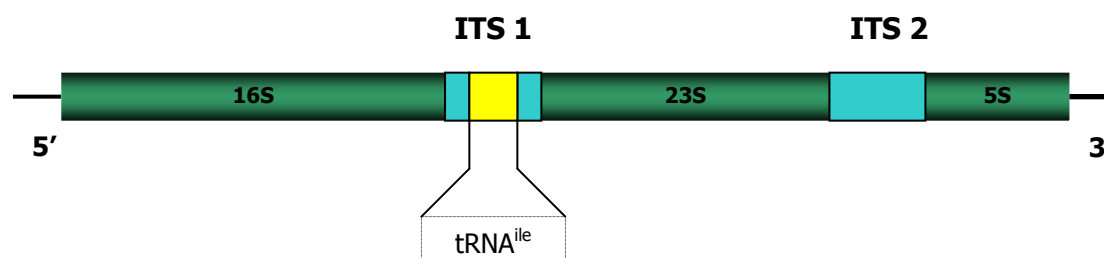
**Εικόνα 1.1.** Κάθετη τομή σε ηθμό του φυτού αλεξανδρινού προσβεβλημένου από φυτοπλάσμα. Πολυάριθμα φυτοπλασματικά κύτταρα διακρίνονται στα στοιχεία του ηθμού στην πάνω σειρά, ενώ το στοιχείο του ηθμού που βρίσκεται κάτω αριστερά είναι φανερά απαλλαγμένο από φυτοπλασματικά κύτταρα (ηλεκτρονική μικροσκοπία x6000).

(Πηγή:  
<http://www.apsnet.org/education/feature/poinsettia/> )

Κατά την εξελικτική τους πορεία τα φυτοπλάσματα υπέστησαν μείωση του γενόματός τους και απώλεια αρκετών γονιδίων που ρυθμίζουν διάφορες μεταβολικές διεργασίες (Bai *et al.*, 2006). Η απώλεια των γονιδίων που ελέγχουν την σύνθεση του ATP, καθώς και τη σύνθεση αμινοξέων και νουκλεοτιδίων είναι ένας από τους πλέον πιθανούς λόγους που δεν μπορούμε να τα καλλιεργήσουμε σε τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα. Πιθανόν τα φυτοπλάσματα να προσλαμβάνουν τους παραπάνω μεταβολίτες από το πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά περιβάλλον διαβίωσής τους εντός των ξενιστών τους, ενώ δεν τους παρέχονταν στα τεχνητά θρεπτικά

υποστρώματα που έχουν δοκιμασθεί. Πιθανόν, η αλληλούχιση του γενώματος μερικών ειδών φυτοπλάσμάτων να δώσει σημαντικές πληροφορίες ώστε να αποτελέσει οδηγό για παρασκευή κατάλληλων μέσων καλλιέργειας (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Hogenhout *et al.*, 2008).

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και των φυτοπλάσμάτων, το ριβόσωμα διαχωρίζεται σε μια μεγάλη (50S) και μια μικρή (30S) υπομονάδα. Η υπομονάδα 30S περιέχει 21 διαφορετικές πρωτεΐνες και ένα μόριο RNA 16S και η υπομονάδα 50S περιέχει 34 διαφορετικές πρωτεΐνες και δύο είδη μορίων RNA, ένα 23S και ένα 5S (Stryer, 1995). Τα γονίδια που εκφράζουν αυτά τα μόρια RNA του ριβοσώματος χαρακτηρίζονται ως ριβοσωμικά RNA (rRNA) γονίδια, και η διάταξή τους στο γένωμα των φυτοπλάσμάτων είναι παρόμοια με αυτή των ευκαρυωτικών κυττάρων, δηλαδή: 5' 16S rRNA – παρεμβαλλόμενη περιοχή μεταξύ γονιδίων (ITS 1) – 23S rRNA- ITS 2- 5S- 3' όπως απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 1.2) (Lee *et al.*, 2000). Οι Schneider και Seemuller (1994) διατύπωσαν την ύπαρξη δύο rRNA οπερονίων στα φυτοπλάσματα, δηλαδή την παρουσία δύο ομάδων rRNA γονιδίων στο γένωμά τους, οι οποίες είναι ετερογενείς ως ένα βαθμό (Schneider and Seemuller, 1994; Liefting *et al.*, 1996)



**Εικόνα 1.2.** Σχηματική απεικόνιση της οργάνωσης των ριβοσωμικών γονιδίων στο γονιδίωμα των φυτοπλάσμάτων.

Η αλληλούχιση της παρεμβαλλόμενης περιοχής μεταξύ των 16/23S rRNA γονιδίων (ITS1 -Internal Transcribe Spacer) αποκάλυψε την ύπαρξη αλληλουχίας μεταφορικού RNA ισολευκίνης (tRNA<sup>ile</sup>) σε όλα τα φυτοπλάσματα (Lim and Sears, 1989; Kuske *et al.*, 1992).

### 1.3 Ανίχνευση φυτοπλάσμάτων

Μέχρι τη δεκαετία του 1980, η ανίχνευση των φυτοπλάσμάτων βασιζόταν κυρίως στην μακροσκοπική παρατήρηση των συμπτωμάτων, στην επίδραση της τετρακυκλίνης και της πενικιλίνης στην εμφάνιση συμπτωμάτων, στη μετάδοση με εμβολιασμό, στην μικροσκοπική παρατήρηση των φυτοπλασματικών κυττάρων σε λεπτές τομές φυτικών ιστών μετά από χρώση με DAPI (4,6- διάμινο- φαινυλο- ινδόλη) (Lee *et al.*, 2000; Musetti and Favali, 2004). Οι ορολογικές δοκιμές, όπως η ELISA και η ανοσοπροσοφητική μικροσκοπία αναπτύχθηκαν κυρίως τη δεκαετία του 1980 και διαδόθηκαν λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας τους συγκριτικά με τις έως τότε εφαρμοζόμενες μεθόδους (Lee *et al.*, 2000). Σημαντικό μειονέκτημα των ορολογικών μεθόδων ήταν η παραγωγή εξειδικευμένου αντιορού με υψηλό τίτλο καθώς και το γεγονός ότι είχαν χαμηλή ευαισθησία ανίχνευσης σε ξυλώδεις ξενιστές, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης και της ανισοκατανομής των φυτοπλάσμάτων στον ηθμό των ασθενών φυτών (Seemuller *et al.*, 1998). Επίσης, στη δεκαετία του 1980 αναπτύχθηκαν οι μοριακές τεχνικές που βασίζονται στον υβριδισμό των νουκλειικών οξέων όπως της σημειακής εκτύπωσης (Dot blot) και εκτύπωσης Southern στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν κλωνοποιημένα τμήματα του DNA των φυτοπλάσμάτων και έγινε φανερό ότι υπάρχει ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των φυτοπλάσμάτων (Kison *et al.*, 1994; Ko and Lin, 1994; Lee *et al.*, 1998).

Στα τέλη της δεκαετίας του 1980 και στις αρχές της δεκαετίας του 1990, η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) άρχισε να εφαρμόζεται για τη διάγνωση των ασθενειών που οφείλονται σε φυτοπλάσματα (Lee *et al.*, 1992). Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης αποτελεί το πιο ευαίσθητο διαγνωστικό εργαλείο και επιτρέπει την ανίχνευση των φυτοπλάσμάτων σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τις ορολογικές δοκιμές ή με τις δοκιμές υβριδοποίησης του DNA (Lee *et al.*, 2000). Αρχικά, οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν βασίστηκαν στις αλληλουχίες τυχαίων κλωνοποιημένων τμημάτων DNA του γονιδιώματος και χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των φυτοπλάσμάτων, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις στους φυτικούς ιστούς με αμφισβητούμενα, όμως, αποτελέσματα. Αργότερα, η σχεδίαση γενικευμένων και εξειδικευμένων εκκινητών, μικρών σε μέγεθος στην υψηλά συντηρημένη γενετικά περιοχή του 16S ριβοσωμικού RNA γονιδίου έκανε δυνατή την ανίχνευση ενός ευρέως φάσματος διαφορετικών φυτοπλάσμάτων (Deng and Hiruki, 1991; Lee *et al.*, 1992; Schaff *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993a; Goodwin *et al.*, 1994; Harisson *et al.*, 1994; Jaraush *et al.*, 1994; Harisson 1996).

Ακολουθώντας την τάση που επικρατεί στην περιβαλλοντική μικροβιολογία να χρησιμοποιούν το οπερόνιο των ριβοσωμικών γονιδίων για τη φυλογενετική ταξινόμηση των προκαρυωτικών μικροοργανισμών με μοριακές μεθόδους, έτσι και για την ανίχνευση και κατάταξη των φυτοπλάσμάτων με μοριακές μεθόδους (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης,-PCR-, πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού, -RFLP-, αλληλούχιση) χρησιμοποιείται αυτή η περιοχή (5'- 16S- ITS1- 23S- ITS2- 5S- 3') και ως επί το πλείστον το γονίδιο 16S rRNA. Ο λόγος είναι η εναλλαγή συντηρημένων με μη συντηρημένες περιοχές στο γονίδιο 16S rRNA όσο και στο υπόλοιπο οπερόνιο, που επιτρέπουν το σχεδιασμό εκκινητών PCR για ανίχνευση φυτοπλάσμάτων (γενικευμένοι εκκινητές) και για διαχωρισμό τους σε ομάδες και είδη (εξειδικευμένοι εκκινητές) (Ahrens and Seemuller, 1992; Davis and Lee, 1993; Firrao *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993b; Lee *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1998). Τελευταία εκτός από το γονίδιο 16S rRNA διερευνάται και η δυνατότητα χρησιμοποίησης άλλων περιοχών του γονιδιώματος για ενίσχυση με PCR με στόχο την ανίχνευση και φυλογενετική κατάταξη των φυτοπλάσμάτων, όπως το γονίδιο 23S rRNA, η μη εκφραζόμενη περιοχή ITS1 μεταξύ των γονιδίων 16S rRNA και 23S rRNA, και τα γονίδια *rp*, *tuf*, *secA* (Hodgetts *et al.*, 2008; Lorenz *et al.*, 1995; Martini *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 1995; Smart *et al.*, 1996)

Η μέθοδος των RFLPs ενισχυμένων αλληλουχιών του 16S rRNA γονιδίου μαζί με ένα πλήθος ενζύμων, χρησιμοποιήθηκαν αρχικά από τους Lee *et al.* (1993b) και Schneider *et al.* (1993) για τη διαφοροποίηση των φυτοπλάσμάτων. Η τεχνική αυτή αποδείχτηκε απλή, πρακτική και αξιόπιστη. Βάση της ανάλυσης των RFLP με τα 15-18 περιοριστικά ένζυμα έχουν προταθεί έως και σήμερα τα διάφορα συστήματα ταξινόμησης των φυτοπλάσμάτων, όπως παρουσιάζονται στην ενότητα 1.4.

## 1.4 Ταξινόμηση φυτοπλάσμάτων

Πριν το 1967, πολλές φυτοπλασματικές ασθένειες αποδίδονταν σε ιούς λόγω του γεγονότος ότι δεν είχαν απομονωθεί τα παθογόνα, η μετάδοση του αιτίου γινόταν με έντομα και τα συμπτώματά τους ήταν όμοια με τις ιολογικές ασθένειες (Lee *et al.*, 2000). Το 1967, ο Doi και οι συνεργάτες του παρομοίασαν τα κύτταρα που εντόπισαν στον ηθμό των φυτών με μυκοπλάσματα και ο όρος MLO (mycoplasma-like organisms, οργανισμοί που μοιάζουν με μυκοπλάσματα) χρησιμοποιήθηκε κατόπιν για την απόδοση του αιτίου πολλών ασθενειών με συμπτώματα ίκτερου, νανισμού και βλαστομανίας. Οι Lim και Seers το 1989 πρότειναν την κατάταξη των φυτοπαθογόνων MLO's στη τάξη των Mollicutes και διατύπωσαν τη συγγενική σχέση αυτών περισσότερο με το γένος *Acholeplasma* spp., παρά με το γένος *Spiroplasma* spp. ή τα μυκοπλάσματα των ζωικών οργανισμών. Η φυλογενετική ανάλυση βασισμένη στην αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου αποδεικνύει την παραπάνω θέση, ότι δηλαδή τα MLO's αντιπροσωπεύουν ένα ξεχωριστό, μονοφυλετικό κλάδο μέσα στην τάξη των Mollicutes (Εικόνα 1.3) (Gundersen *et al.*, 1994; Hogenhout, 2008).

Μόλις, το 1994 κατά το 10<sup>ο</sup> Διεθνές Συνέδριο του Διεθνούς Οργανισμού Μυκοπλασμάτων ο όρος «φυτόπλασμα» αντικατέστησε τον όρο MLO's (Hogenhout *et al.*, 2008) και πρόσφατα υιοθετήθηκε ο χαρακτηρισμός γένος (προσωρινό) γνωστό με την ονομασία '*Candidatus* Phytoplasma' (IRPCM Phytoplasma/ Spiroplasma Working Team- Phytoplasma taxonomy group, 2004). Για τη κατάταξη των φυτοπλάσμάτων στα διάφορα γένη '*Ca. Phytoplasma*' μεταξύ των κριτηρίων ταξινόμησης, έκτος από τα φυλογενετικά χαρακτηριστικά, ελήφθησαν υπόψη και τα βιολογικά χαρακτηριστικά καθώς και η οικολογία των οργανισμών (Firrao, *et al.*, 2005).

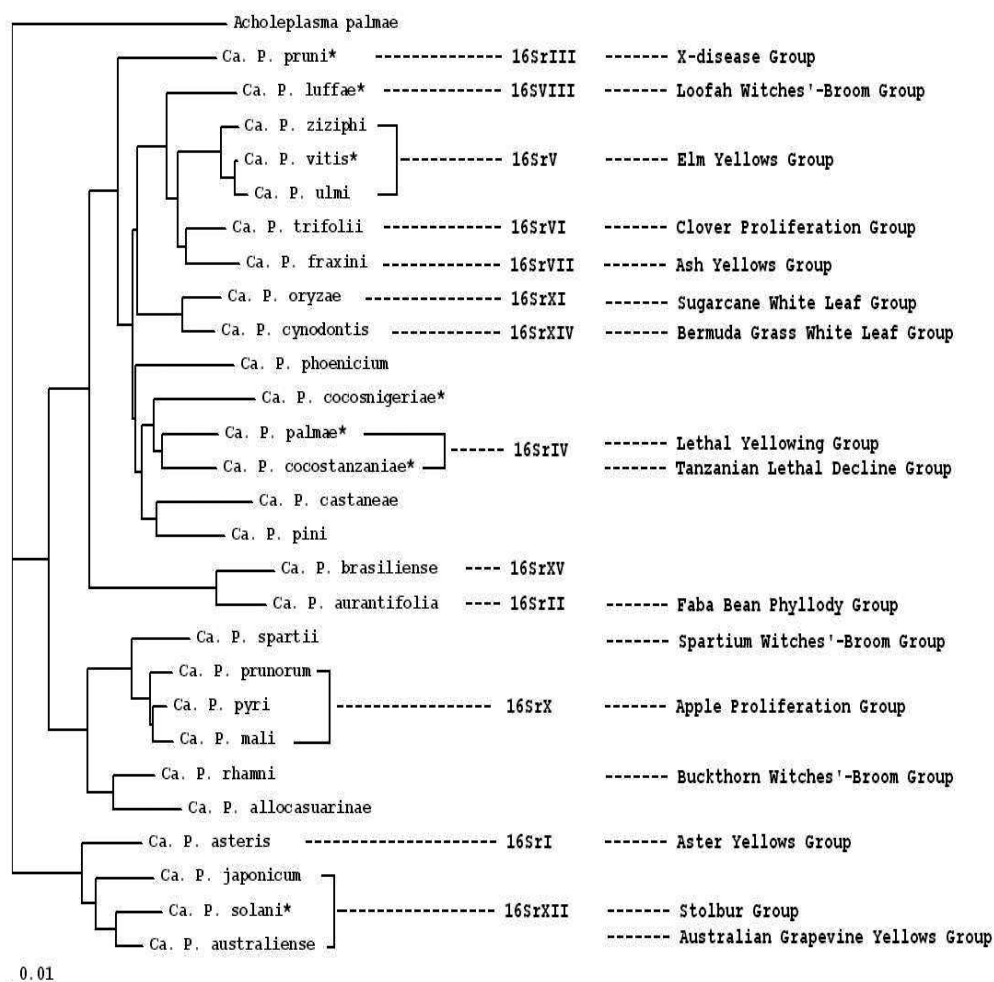
Βασιζόμενοι στη φυλογενετική ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου, οι Seemuller *et al.* (1998) κατέταξαν τα φυτοπλάσματα σε είκοσι ξεχωριστές ομάδες, ενώ οι Lee *et al.* (2000) σε δεκαέξι που περιλαμβάνουν συνολικά και 41 υποομάδες. Ανάμεσα στα μέλη των υπό- ομάδων οι ομοιότητες της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA κυμαίνονται μεταξύ 95% έως >99%, ενώ για μέλη διαφορετικών ομάδων οι ομοιότητες αυτές βρίσκονται στο 88% έως 94% (Lee *et al.*, 2000).

Το 2005, ο Firrao εισήγαγε τον όρο του φυτοπλασματικού είδους και κατέταξε τα φυτοπλάσματα σε 26 είδη (ή σύμφωνα με την παλαιότερη κατάταξη σε 16 ομάδες). Σύμφωνα με την Ομάδα Ταξινόμησης των Φυτοπλάσμάτων (IRPCM) τα

φυτοπλάσματα που παρουσιάζουν ομοιότητες μικρότερες από 97.5% στην αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου, κατατάσσονται σε διαφορετικά είδη. Όμως, δύο φυτοπλάσματα που εμφανίζουν ομοιότητα μεγαλύτερη του 97.5% μπορεί να αντιπροσωπεύουν και διαφορετικά είδη όταν εμφανίζουν τα παρακάτω κριτήρια:

(i) μεταδίδονται μέσω διαφορετικού εντόμου- φορέα, (ii) έχουν διαφορετικό φυσικό ξενιστή(-ες) και (iii) υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για μοριακή διαφοροποίηση (Bertaccini, 2007).

Βάση της Bertaccini (2007), τα είδη των φυτοπλασμάτων φθάνουν τα 20, στα οποία ανήκουν 15 ομάδες και 59 υποομάδες σύμφωνα με την παλαιότερη κατάταξη (Πίνακας 1.1). Η τελευταία έρευνα που αφορά την κατάταξη των φυτοπλασμάτων από τους Wei *et al.* (2007) του USDA αναφέρει την ύπαρξη 26 ειδών και 28 ομάδων με 51 υποομάδες.



**Εικόνα 1.3.** Φυλογενετικό δέντρο του γένους '*Candidatus Phytoplasma*' βασισμένο στην ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου. (Πηγή: Firrao *et al.*, 2005)

**Πίνακας 1.1.** Κατάταξη των φυτοπασμάτων σε 15 ομάδες που περιλαμβάνουν συνολικά 20 είδη, βάση της Bertaccini (2007)

ΦΥΤΟΠΛΑΣΜΑ	ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΗ ΥΠΟ-ΟΜΑΔΑ	ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ
<b>Ίκτερος της αστήρος (Aster yellows)</b>	<b>16SrI</b>	
Ίκτερος της αστήρος	16SrI-A	Β. Αμερική
Ίκτερος της αστήρος ' <i>Ca. P. asteris</i> '	16SrI-B	Παγκοσμίως
Φυλλωδία τριφυλλίου	16SrI-C	Αμερική, Ευρώπη
Βλαστομανία Παυλοβνίας	16SrI-D	Ασία
Νανισμός βακινίου	16SrI-E	Β. Αμερική
Ίκτερος της αστήρος - στέλεχος βερικοκιάς	16SrI-F	Ισπανία
Ίκτερος της αστήρος - στέλεχος AV976	16SrI-L	Γερμανία
Ίκτερος της αστήρος - στέλεχος AVUT	16SrI-M	Γερμανία
Βλαστομανία Ιπομόιας της μαύρης	16SrI-N	Ταϊβάν
Ίκτερος κρεμμυδιού	16SrI-O	Η.Π.Α.
Παρακμή ή καχεξία της λεύκας της Κροατίας	16SrI-P	Κροατία
<b>Βλαστομανία αραχίδας (Peanut witch's broom)</b>	<b>16SrII</b>	
Βλαστομανία αραχίδας	16SrII-A	Ασία
Βλαστομανία 'Κίτρου Λιμεττίας' ' <i>Ca. P. aurantifolia</i> '	16SrII-B	Αραβική Χερσόνησος
Φυλλωδία κουκιών	16SrII-C	Αφρική, Ασία
Ίκτερος μετά τραχύτητας φύλλων Καρικής παπάγυας	16SrII-D	Αυστραλία, Αραβική Χερσόνησος
Ίκτερος του φυτού αγριοζοχίου	16SrII-E	Ιταλία
Φυλλωδία βάμβακος	16SrII-F	Αφρική
<b>Ασθένεια X της ροδακινιάς (Peach X disease)</b>	<b>16SrIII</b>	
Ασθένεια X της ροδακινιάς ' <i>Ca. P. pruni</i> '	16SrIII-A	Β. Αμερική
Επάκριος ίκτερος του τριφυλλίου	16SrIII-B	Αμερική, Ασία, Ευρώπη
Έκπτυξη ανθέων υπό μορφή μπουκέτου στο πεκάν	16SrIII-C	Η.Π.Α.
Ίκτερος του φυτού Σολιδαγου η χρυσόβεργα	16SrIII-D	Η.Π.Α.
Νανισμός του φυτού Σπειραίας	16SrIII-E	Η.Π.Α.
Ίκτερος Ασκληπιάδος	16SrIII-F	Β. Αμερική
Βλαστομανία καρυδιάς	16SrIII-G	Η.Π.Α.



ΦΥΤΟΠΛΑΣΜΑ	ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΗ ΥΠΟ-ΟΜΑΔΑ	ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ
Έκπτυξη ξυλοφόρων οφθαλμών της Ευφορβίας της κομποτάτης	16SrIII-H	Παγκοσμίως
Ίκτερος της αμπέλου της Βιρτζίνια	16SrIII-I	Η.Π.Α.
Ίκτερος Σέχιου του εδάδιμου	16SrIII-J	Βραζιλία
<b>Νεκρωτικός ίκτερος καρύδας (Coconut lethal yellowing)</b>	<b>16SrIV</b>	
Νεκρωτικός ίκτερος καρύδας 'Ca. P. palmae'	16SrIV-A	Φλόριδα, Καραϊβική
Νεκρωτικός ίκτερος καρύδας του Γιουκατάν	16SrIV-B	Γιουκατάν (Μεξικό)
Νεκρωτικός ίκτερος καρύδας της Τανζανίας	16SrIV-C	Αφρική
Ίκτερος Καρλουδοβίνης της φοινικοειδούς	16SrIV-D	Μεξικό, Τέξας
Βλαστομανία καρυδιάς 'Ca. P. castaneae'	16SrIV-E	Κορέα
<b>Ίκτερος της φτελιάς (Elm yellows)</b>	<b>16SrV</b>	
Ίκτερος της φτελιάς 'Ca. P. ulmi'	16SrV-A	Β. Αμερική, Ευρώπη
Βλαστομανία τζιτζυφιάς 'Ca. P. ziziphi'	16SrV-B	Ασία
Ίκτερος σκλήθρας	16SrV-C	Ευρώπη
Χρυσίζουσα χλώρωση 'Ca. P. vitis'	16SrV-D	Ευρώπη
Νανισμός φυτών του γένους <i>Rubus</i> spp.	16SrV-E	Ευρώπη
<b>Βλαστομανία τριφυλλιού (Clover proliferation)</b>	<b>16SrVI</b>	
Βλαστομανία τριφυλλιού 'Ca. P. trifolii'	16SrVI-A	Β. Αμερική
	16SrVI-B	Καναδάς, Φλόριδα
Φυλλωδία βίνκας του Σουδάν	16SrVI-C	Αφρική
<b>Ίκτερος μελίας (Ash yellows)</b>	<b>16SrVII</b>	
Ίκτερος μελίας 'Ca. P. fraxini'	16SrVII-A	Αμερική, Ευρώπη
Βλαστομανία Ηριγέροντος	16SrVII-B	Βραζιλία
<b>Βλαστομανία Λούφφας (Loofah witches' broom)</b>	<b>16SrVIII</b>	
Βλαστομανία λούφφας	16SrVIII-A	
<b>Βλαστομανία Καγιάνου του ινδικού (Pigeon pea witches' broom)</b>	<b>16SrIX</b>	
Βλαστομανία Καγιάνου του ινδικού	16SrIX-A	Β. Αμερική

ΦΥΤΟΠΛΑΣΜΑ	ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΗ ΥΠΟ-ΟΜΑΔΑ	ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ
Βλαστομανία αμυγδαλιάς ' <i>Ca. P. phoenicium</i> '	16SrIX-B	Λίβανος
Παρακμή ή καχεξία φυτών του γένους <i>Ruscus</i>	16SrIX-C	Ιταλία
<b>Βλαστομανία της μηλιάς (Apple proliferation)</b>	<b>16SrX</b>	
Βλαστομανία μηλιάς ' <i>Ca. P. mali</i> '	16SrX-A	Ευρώπη
Ευρωπαϊκός ίκτερος πυρηνοκάρπων ' <i>Ca. P. prunorum</i> '	16SrX-B	Ευρώπη
Παρακμή ή καχεξία αχλαδιάς ' <i>Ca. P. pyri</i> '	16SrX-C	Ευρώπη, Β. Αμερική
Βλαστομανία σπάρτου ' <i>Ca. P. spartii</i> '	16SrX-D	Ιταλία, Ισπανία
<b>Κίτρινος νανισμός του ρυζιού (Rice yellow dwarf)</b>	<b>16SrXI</b>	
Κίτρινος νανισμός του ρυζιού ' <i>Ca. P. oryzae</i> '	16SrXI-A	Ασία
Λεύκανση φύλλων του ζαχαροκάλαμου	16SrXI-B	Ασία
Στέλεχος μεταδιδόμενο με τζιτζικάκια- BVK	16SrXI-C	Γερμανία
<b>Stolbur</b>	<b>16SrXII</b>	
Stolbur ' <i>Ca. P. solani</i> '	16SrXII-A	Ευρώπη, Β. Αμερική
Ίκτερος της αμπέλου Αυστραλίας ' <i>Ca. P. australiense</i> '	16SrXII-B	Αυστραλία
<b>Χλωρανθία βίνκας του Μεξικό (Mexican periwinkle virescence)</b>	<b>16SrXIII</b>	
Χλωρανθία βίνκας του Μεξικό	16SrXIII-A	Μεξικό
Πρασίνισμα πετάλων της φράουλας	16SrXIII-B	Φλόριδα
<b>Λεύκανση φύλλων αγριάδας (Bermudagrass white leaf)</b>	<b>16SrXIV</b>	
Λεύκανση φύλλων αγριάδας ' <i>Ca. P. cynodontis</i> '	16SrXIV-A	Ασία, Ιταλία
<b>Βλαστομανία Ιβίσκου (Hibiscus witches' broom)</b>	<b>16SrXV</b>	
Βλαστομανία Ιβίσκου ' <i>Ca. P. brasiliense</i> '	16SrXV-A	Βραζιλία

## 1.5 Φυτοπλάσματα που προσβάλλουν τα Πυρηνόκαρπα

Όπως έχει αποδειχθεί τα τελευταία χρόνια, τα φυτοπλάσματα είναι το αίτιο πολλών ασθενειών των πυρηνοκάρπων που έχουν παρατηρηθεί σε χώρες της Αμερικής, της Ευρώπης και της Μεσογειακής ζώνης. Στη Β. Αμερική (Καναδάς, Η.Π.Α.) είναι επικρατέστερη η ασθένεια X (X- disease) σε κερασιές και ροδακινιές με συμπτώματα ίκτερου και καρουλιάσματος των φύλλων και το φυτόπλασμα που την προκαλεί ανήκει στην 16SrIII-A ομάδα (Lee 1992; EPPO/CABI, 1997). Στην Ευρώπη, η κυριότερη φυτοπλασματική ασθένεια των πυρηνοκάρπων είναι ο Ευρωπαϊκός Ίκτερος των Πυρηνοκάρπων (ESFY) που αποδίδεται στο παθογόνο ‘*Ca. P. prunorum*’ που ανήκει στη 16SrX-B ομάδα (Seemuller *et al.*, 1998; Seemuller and Schnaider, 2004). Τα συμπτώματα και οι ξενιστές της συγκεκριμένης ασθένειας αναλύονται εκτενέστερα στη παράγραφο 1.6. Επίσης, μόλις το 2007 υπήρξε η πρώτη αναφορά της ασθένειας X στην Ευρώπη, και συγκεκριμένα σε δύο δέντρα κερασιάς στη Β. Ιταλία (Landi *et al.*, 2007).

Σε έρευνες των Paltineiri *et al.* (2001) βρέθηκαν ότι φυτοπλάσματα των ομάδων 16Sr X-A, I και XII-A προσβάλλουν δέντρα ροδακινιάς και των ομάδων I-B, X-C, XII-A και III δέντρα κερασιάς. Επιπροσθέτως, το φυτόπλασμα που προκαλεί την ασθένεια ‘βλαστομανίας της μηλιάς’, συγγενές είδος του ‘*Ca. P. prunorum*’ (ομάδα 16S rX-A), αποδείχτηκε κατά τους Mehle *et al.* (2007) ότι προσβάλλει και την κερασιά και τη δαμασκηλιά. Πρόσφατα, μία νέα φυτοπλασματική ασθένεια της αμυγδαλιάς και της ροδακινιάς αναφέρθηκε από τους Verdin *et al.* (2004). Η ασθένεια αυτή με συμπτώματα βλαστομανία και ταχεία παρακμή των δέντρων εντοπίστηκε σε οπωρώνες της Μεσογειακής ζώνης του Λιβάνου και του Ιράν και αποδόθηκε στο φυτόπλασμα ‘*Candidatus Phytoplasma phoenicium*’ της ομάδας 16SrIX-A. Τέλος, σε κερασιές της Λιθουανίας ανιχνεύτηκε η παρουσία ενός νέου είδους φυτοπλάσματος το οποίο προκαλεί συμπτώματα πρώιμης έκπτυξης βλαστοφόρων οφθαλμών και μικροφυλλίας των δέντρων. Η νέα αυτή ασθένεια που ονομάστηκε και ασθένεια της μικροφυλλίας της κερασιάς (cherry little leaf, ChLL) ταξινομήθηκε σε μια νέα υποομάδα της ομάδας 16SrI, την 16SrI-Q (Valiunas *et al.*, 2009).

## 1.6 Ευρωπαϊκός Ίκτερος των Πυρηνοκάρπων

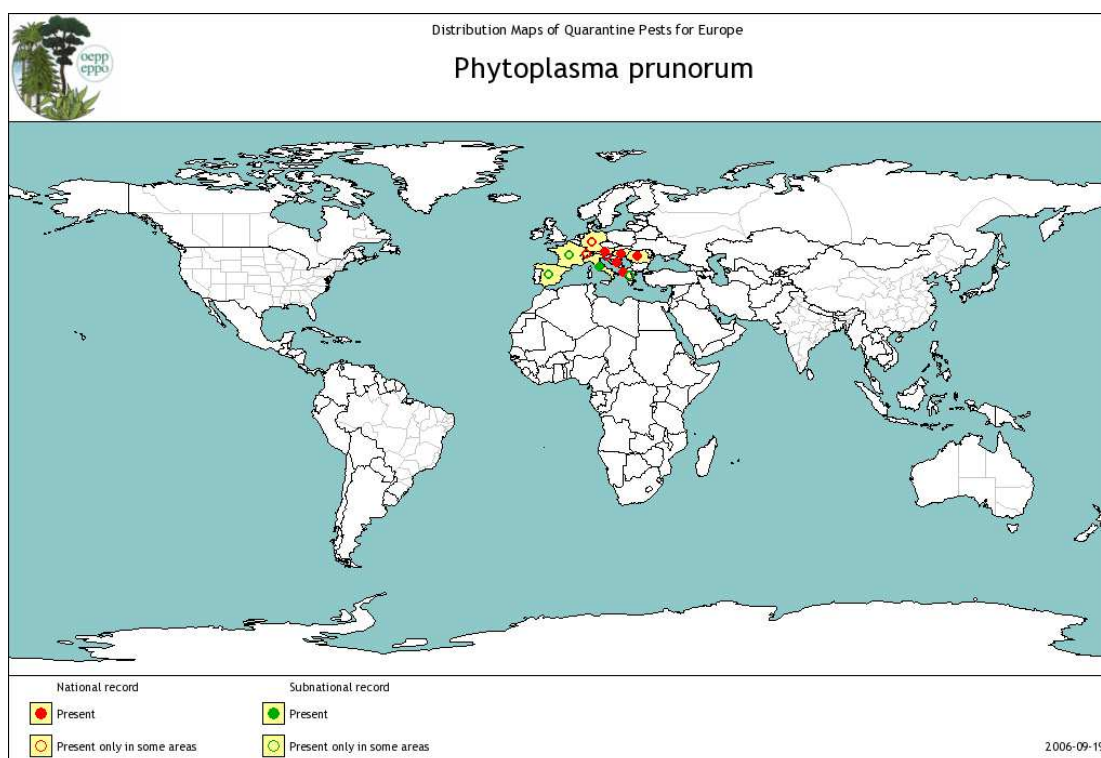
### 1.6.1 Εύρος ξενιστών και συμπτώματα

Η ασθένεια των πυρηνοκάρπων, που σήμερα ονομάζεται Ευρωπαϊκός Ίκτερος των Πυρηνοκάρπων (European Stone Fruit Yellows- ESFY) παρατηρήθηκε αρχικά το 1924 σε βερικοκιές της Γαλλίας και έπειτα σε δαμασκηνιές της Ιταλίας (Jaraush *et al.*, 2000a). Λόγω της πληθώρας των συμπτωμάτων και των ξενιστών, της αποδόθηκαν αρχικά διάφορες ονομασίες όπως ‘χλωρωτικό καρούλιασμα των φύλλων της βερικοκιάς’ (apricot chlorotic leaf roll- ACLR) (Morvan, 1977), ‘λεπτονέκρωση της δαμασκηνιάς’ (plum leptonecrosis- PLN) (Giunchedi *et al.*, 1978), ‘ίκτερος της ροδακινιάς’ (Poggi Pollini *et al.*, 1993), ‘ροζέτα της ροδακινιάς’ (Marccone *et al.*, 1995), καθώς και ‘παρακμή της αμυγδαλιάς, της κερασιάς και της δαμασκηνιάς’ (Dosba *et al.*, 1991). Μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί σε πολλές χώρες της Μεσογειακής ζώνης και των Βαλκανίων και πιο συγκεκριμένα στις Αλβανία, Αυστρία, Βουλγαρία, Τσεχία, Αγγλία, Γαλλία, Γερμανία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ιταλία, Ρουμανία, Σλοβενία, Ισπανία, Ελβετία και Τουρκία (Carraro and Osler, 2009). Στην Ελλάδα τα συμπτώματα της ασθένειας περιγράφηκαν αρχικά σε δενδροκομεία ροδακινιάς και βερικοκιάς στη Μακεδονία, το 1970 (Agrios, 1971) καθώς και αργότερα από τους Ρούμπο Ι. και Τσιαλή Δ. (Tsialis and Rumbos, 1980).

Στο εύρος των ξενιστών συμπεριλαμβάνονται όλα τα φυτά τους γένους *Prunus*, αλλά μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσιάζουν τα είδη *P. armeniaca* (βερικοκιά) και *P. salicina* (ιαπωνικές ποικιλίες δαμασκηνιάς) (Lorenz *et al.*, 1994). Οι ευρωπαϊκές ποικιλίες της δαμασκηνιάς (*P. domestica*) είναι γενικά ανθεκτικές στην ασθένεια, κατά τον Carraro *et al.* (1998a), αλλά σύμφωνα με τον Jarausch *et al.* (2000b) μερικές ποικιλίες εμφανίζουν ήπια συμπτώματα και χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας. Ωστόσο, η κερασιά (*P. avium*) και διάφορα συγγενή της είδη (*P. mahaleb*, *P. padus*, *P. spinosa*, *P. tomentosa*, *P. cerasifera*) παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στον Ευρωπαϊκό Ίκτερο των Πυρηνοκάρπων (Carraro *et al.*, 2002; Jarausch *et al.*, 1999), ενώ σε καλλιέργειες ροδακινιάς έχει αναφερθεί ότι η ασθένεια δεν είναι και τόσο διαδεδομένη (Poggi Pollini *et al.*, 2001). Επιπλέον, το παθογόνο αίτιο έχει ανιχνευθεί με μοριακές τεχνικές στα φυτά *Fraxinus excelsior*, *Rosa canina*, *Celtis australis*, *Corylus avellana* (Jarausch *et al.*, 1998).

Τα συμπτώματα του Ευρωπαϊκού Ίκτερου των Πυρηνοκάρπων όπως αναφέρονται από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φυτοπροστασίας (EPPO/CABI, 1997) μπορούν να εντοπιστούν καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Τα συνηθέστερα αυτών είναι η πρόωμη έκπτυξη των βλαστοφόρων οφθαλμών (προγενέστερη της έκπτυξης των ανθέων) (εικόνα 1.5 α), χλώρωση και καρούλιασμα των φύλλων (Εικόνα 1.5 γ), πρόωμη καρπόπτωση, αυξημένη ευαισθησία στον παγετό, μεταχρωματισμός του καμβίου (Εικόνα 1.5 β), νεκρώσεις του φλοιού, βοθρίωση του κορμού και των χονδρών ριζών και απότομη ή αργή νέκρωση του φυτού, εξαρτώμενη από τις επικρατούσες καιρικές συνθήκες.

Εξαιτίας της εμφανούς οικονομικής συνέπειας από τα παραπάνω συμπτώματα ο Ευρωπαϊκός Ίκτερος των Πυρηνοκάρπων έχει καταγραφεί ως παθογόνο καραντίνας και βρίσκεται στο νούμερο 142 της Α2 λίστας του EPPO (EPPO/CABI, 1997).



**Εικόνα 1.4.** Εξάπλωση του φυτοπλάσματος '*Ca. P. prunorum*' σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φυτοπροστασίας. Στην Ελλάδα φαίνεται ότι έχει περιορισμένη διάδοση. (πηγή: EPPO/CABI, 1997).



(α)



(β)



(γ)



(δ)

**Εικόνα 1.5 (α)** Πρώιμη έκπτυξη των βλαστοφόρων οφθαλμών σε δέντρο αμυγδαλιάς. Το σύμπτωμα εντοπίζεται εδώ σε ένα μόνο βραχίονα στην αριστερή πλευρά του δέντρου που φέρει τα νεαρά φύλλα (Πηγή: EPPO gallery, <http://photos.eppo.org/index.php/image/829-phy16-01>),

**(β)** Καστανός μεταχρωματισμός και νέκρωση του καμβίου σε βλαστό Πυρηνόκαρπου (Πηγή: EPPO gallery, <http://photos.eppo.org/index.php/image/830-phy16-02>),

**(γ)** Χαρακτηριστικό σύμπτωμα χλώρωσης και καρουλιάσματος των φύλλων σε βλαστό βερικοκιάς (Πηγή: EPPO gallery, <http://photos.eppo.org/index.php/image/831-phy16-03>),

**(δ)** Αρσενικό (πάνω) και θηλυκό (κάτω) άτομο του εντόμου *Cacopsylla pruni*, φορέα της ασθένειας του Ευρωπαϊκού Ικτέρου των Πυρηνοκάρπων (Πηγή: [www.padil.gov.au/viewPest.aspx?id=617](http://www.padil.gov.au/viewPest.aspx?id=617)).

### 1.6.2 Το παθογόνο αίτιο

Το παθογόνο αίτιο της ασθένειας ESFY είναι το φυτόπλάσμα με προσωρινό όνομα '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' (Seemuller and Schneider, 2004) που κατά τους Seemuller *et al.* (1998) ανήκει στην ομάδα X και συγκεκριμένα στην X –B υπο-ομάδα κατά τους Lee *et al.* (2000). Στην παραπάνω ομάδα ανήκουν και τα φυτοπλάσματα της βλαστομανίας της μηλιάς (*Ca. P. mali*, υπο-ομάδα X-A) και της παρακμής της αχλαδιάς (*Ca. P. pyri*, υπο-ομάδα X-C). Τα τρία φυτοπλάσματα διαφέρουν μεταξύ τους σε ποσοστό μικρότερο του 2,5% στην αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA (Seemuller and Schneider, 2004). Η απομόνωση ESFY-G1 αποτελεί απομόνωση αναφοράς του ESFY, της οποίας το γένωμα είναι 630 kbp σε μέγεθος (Firrao *et al.*, 2005).

Η σύγκριση της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου του φυτοπλάσματος, που προκαλεί την ασθένεια ESFY, με αυτές άλλων φυτοπλάσμάτων που ανήκουν στην 16S-X ομάδα, έδειξε ότι υπάρχουν περιοχές του γονιδίου που είναι χαρακτηριστικές για το συγκεκριμένο φυτόπλάσμα, απουσιάζουν από τους άλλους προκαρυωτικούς οργανισμούς και το διαχωρίζουν από τα άλλα φυτοπλάσματα της ίδιας ομάδας. Πιο συγκεκριμένα οι περιοχές αυτές είναι η 159-180 με αλληλουχία 5'-TGAAGTTTTGAGGCATCTCGAA-3' και η 1393-1409 με αλληλουχία 5'-AATACCCGAAACCAGTA-3' (Seemuller and Schneider, 2004).

Τέλος, στο γονιδίωμα του παθογόνου υπάρχουν δύο ριβοσωμικά RNA οπερόνια τα οποία δεν συνδέονται μεταξύ τους (Marccone and Seemuller, 2001) και κατά τους Seemuller και Schneider (2004) το 16S rRNA γονίδιο αποτελείται από 1521 νουκλεοτίδια, ενώ η ITS1 περιοχή μεταξύ του 16S και 23S από 210.

Η μετάδοση του '*Ca. P. prunorum*' μπορεί να γίνει μέσω του εντόμου φορέα *Cacopsylla pruni* Scopoli ή μέσω του εμβολιασμού (Carraro *et al.*, 2001, Carraro *et al.*, 2004).

Όσον αφορά το έντομο *Cacopsylla pruni* Scopoli (Εικόνα 1.4 δ), αναφέρεται μέχρι στιγμής ως ο μοναδικός φορέας του '*Ca. P. prunorum*' και έχει εντοπιστεί στην Ιταλία (Carraro *et al.*, 1998b), στη Γαλλία (Jarausch *et al.*, 2001), στην Ισπανία (Lavina *et al.*, 2004), στην Ελβετία (Ramel *et al.*, 2001), στη Τσεχία (Fialova *et al.*, 2004) και στη Βοσνία- Ερζεγοβίνη (Delic *et al.*, 2005).

Βέβαια σε πρόσφατη έρευνα αναφέρθηκε η ύπαρξη φυτοπλασματικού DNA του είδους '*Ca. P. prunorum*' σε 3 ενήλικα άτομα *C. peregrina* και 2 ενήλικα άτομα *C. affinis* σε οπωρώνες της ΒΑ Ιταλίας. (Tedeschi *et al.*, 2009).

Σχετικά με την επιδημιολογία της ασθένειας αναφέρεται ότι σε νέους οπωρώνες τα πρώτα 4-5 χρόνια μόλις το 1-3% των δέντρων ασθενούν και είναι δύσκολο να εντοπιστούν. Με την πάροδο του χρόνου η ετήσια αύξηση της προσβολής έχει υπολογισθεί ότι κυμαίνεται μεταξύ 1-20%. Πολλές αναφορές υπάρχουν, επίσης, για απώλειες δέντρων σε ποσοστό 60% έπειτα από 10-15 χρόνια. Τέλος, οι νέες προσβολές εντοπίζονται σε γειτονικά δέντρα ή κατά μήκος του ορίου του οπωρώνα (Seemuller and Foster, 1995).



## **II. Υλικά & Μέθοδοι**

### **2.1 Φυτικό Υλικό**

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με κριτήριο την πρόωρη έκπτυξη βλαστοφόρων οφθαλμών την αρχή της άνοιξης (Μάρτιος) του 2009 σε καλλιέργειες πυρηνοκάρπων (Εικόνες 2.1.1- 2.1.4). Συνολικά, συλλέχθηκαν δείγματα από 70 δέντρα και πιο συγκεκριμένα από 22 δέντρα αμυγδαλιάς (*Prunus amygdalus*), 40 δέντρα δαμασκηνιάς (*Prunus salicina* και αδιευκρίνιστου είδους), 6 δέντρα βερικοκιάς (*Prunus armeniaca*) και 2 δέντρα ροδακινιάς (*Prunus persica*). Τα δείγματα δαμασκηνιάς που συλλέχθηκαν στους νομούς Ημαθίας και Πέλλας και ένα μέρος των δειγμάτων από τη Μαγνησία συγκαταλέγονται στις Ιαπωνικές ποικιλίες δαμασκηνιάς (*Prunus salicina*), ενώ για τα υπόλοιπα δείγματα που προέρχονται από τους νομούς Μαγνησίας και Καρδίτσας δεν είναι απόλυτα γνωστή η ποικιλία τους. Η δειγματοληψία έλαβε χώρα σε διάφορες περιοχές της Ελλάδος και το κάθε δείγμα περιλάμβανε τουλάχιστον δύο ετήσιους βλαστούς με συμπτώματα (Πίνακας 2.1.1). Μετά την απομόνωση του ηθμού των βλαστών, ακολουθούσε η αποθήκευσή τους στους -80<sup>0</sup> C, έως ότου γινόταν η μετέπειτα επεξεργασία του.

**Πίνακας 2.1.1.** Αριθμός και είδος δειγμάτων που συλλέχθηκαν από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές

Είδος φυτού	Αριθμός δειγμάτων			Νομός
	ΣΥΝΟΛΟ	Με συμπτώματα	Χωρίς συμπτώματα	
<b>δαμασκηνιά</b> ( <i>Prunus salicina</i> )	35	15	1	Ημαθίας
		10	1	Πέλλας
		8	-	Μαγνησίας
<b>δαμασκηνιά</b> (αδιευκρίνιστο είδος)	5	3	1	Μαγνησίας
		1	-	Καρδίτσας
<b>βερικοκιά</b> ( <i>Prunus armeniaca</i> )	6	1	1	Μαγνησίας
		2	-	Κορινθίας
		2	-	Ηλείας
<b>αμυγδαλιά</b> ( <i>Prunus amygdalus</i> )	22	8	2	Μαγνησίας
		7	1	Κορινθίας
		4	-	Λαρίσης
<b>ροδακινιά</b> ( <i>Prunus persica</i> )	2	2	-	Μαγνησίας
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>70</b>	<b>64</b>	<b>6</b>	



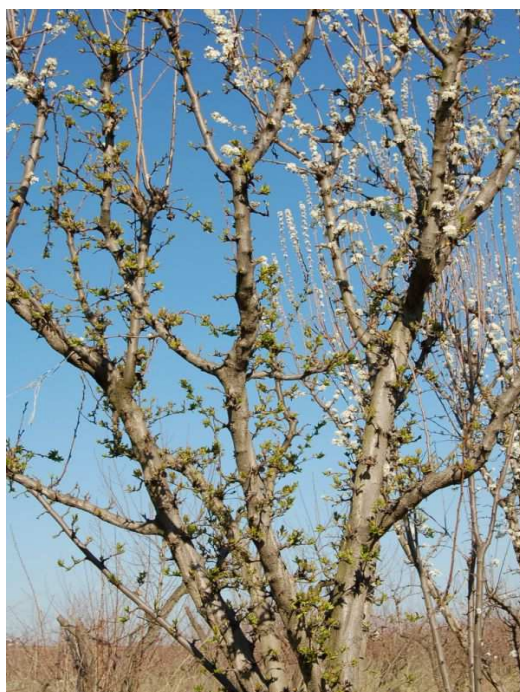
**Εικόνα 2.1.1** Δέντρο δαμασκηιάς με εμφανή το σύμπτωμα της πρώιμης έκπτυξης των φυλλοφόρων οφθαλμών (αριστερά), σε σύγκριση με δέντρο που έχει φυσιολογική έκπτυξη των ανθοφόρων οφθαλμών (δεξιά).



**Εικόνα 2.1.2** Οπωρώνας με δαμασκηινές απ' όπου πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία την εποχή της έκπτυξης των ανθοφόρων οφθαλμών πυρηνοκάρπων, όπου στο κέντρο μπορεί να διακριθεί δέντρο με το σύμπτωμα της πρώιμης έκπτυξης των φυλλοφόρων οφθαλμών.



**Εικόνα 2.1.3** Βλαστός δαμασκηιάς που φέρει πρώιμη έκπτυξη φύλλων, πριν τη φυσιολογική έκπτυξη των ανθέων.



**Εικόνα 2.1.4.** Δέντρο δαμασκηιάς με εμφανές το σύμπτωμα της πρώιμης έκπτυξης των φύλλων σε ένα τμήμα του, ενώ το υπόλοιπο ανθοφορεί φυσιολογικά.

## 2.2 Απομόνωση ολικού DNA από πυρηνόκαρπα

Η απομόνωση του DNA από τον ηθμό των προσβεβλημένων φυτών έγινε βάσει το πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους Maixner et al. (1995).

Πέντε ml ρυθμιστικού διαλύματος TEXDir (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 8.0, 100 mM TrisHCl, pH 8.0, 2% PVP 25) προστέθηκαν στο δείγμα (ξύσματα ηθμού βάρους 1 g) μέσα σε σακουλάκια τύπου ELISA (BIOREBA, Switzerland), και ακολούθησε ομογενοποίησή τους με τη βοήθεια ομογενοποιητή χειρός (BIOREBA). Έπειτα, 2 ml από το χυμό που προέκυψε μεταφέρθηκαν σε σωλήνα τύπου Eppendorf® χωρητικότητας 2 ml και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 4 λεπτά (2200 g). Στη συνέχεια, 1 ml της υγρής φάσης επώαστηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 65 °C για 30- 60 min. Ακολούθησε καθαρισμός του δείγματος με τη χρήση μίγματος χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης -CIA- (24:1) [96% (v/v) chloroform, 4% (v/v) isoamylalcohol], ως εξής: προστέθηκαν 1 ml μίγματος CIA και ακολούθησε καλή ανάδευση ώστε το μίγμα να πάρει μορφή γαλακτώματος. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκέντρηθηκε στα 19000 g για 5 min και παραλήφθηκε η υδατική φάση (περίπου 800 μl). Στην υδατική φάση προστέθηκε κρύα ισοπροπανόλη (640 μl) όπου ακολούθησε γρήγορη ανάδευση (vortex) και το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min, ώστε να πραγματοποιηθεί η συμπύκνωση του DNA. Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 19000 g για 15 min και σε θερμοκρασία 4 °C, έγινε απόρριψη της υπερκείμενης υδατικής φάσης και το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% αιθανόλη (EtOH) (προσθήκη 500 μl EtOH 70%, φυγοκέντρωση στα 19000g για 10 min σε θερμοκρασία 4 °C και απομάκρυνση της αιθανόλης). Κατόπιν σύντομης παραμονής σε θερμοκρασία δωματίου για να εξατμιστεί πλήρως η EtOH, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού (sdiH<sub>2</sub>O) και αποθηκεύτηκε στους -20 °C.





**Εικόνα 2.2.1.** Ομογενοποιητής χειρός και σακουλάκια τύπου ELISA (ΒΙΟΡΕΒΑ) που χρησιμοποιήθηκαν στην ομογενοποίηση του φυτικού ιστού κατά την απομόνωση του DNA βάσει του πρωτοκόλλου Maichner (Πηγή: <http://www.bioreba.ch/?idpage=2&CatID=2&ProduktID=114.01>).

## **2.3 Ανίχνευση φυτοπλάσμάτων με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)**

### **2.3.1 Επιλογή της προς ενίσχυση περιοχής**

Όπως ήδη αναφερθήκαμε στην εισαγωγή, το οπερόνιο των ριβοσωμικών γονιδίων 5'-16S-ITS1- 23S- ITS2- 5S-3' και κυρίως το 16S rRNA γονίδιο είναι η περιοχή του γονιδιώματος που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση και το διαχωρισμό των φυτοπλάσμάτων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

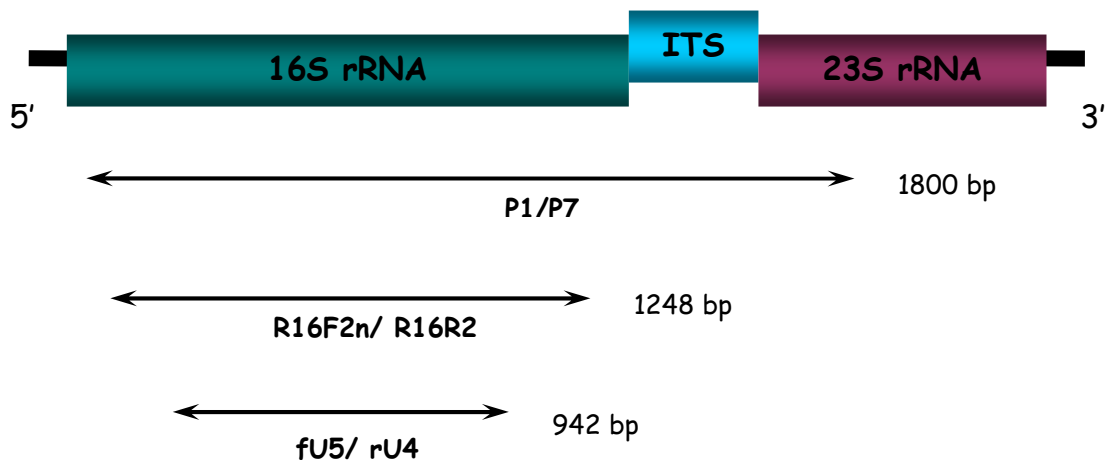
### **2.3.2 Επιλογή εκκινητών**

Η επιλογή των εκκινητών έγινε βάση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας για την ανίχνευση των φυτοπλάσμάτων με PCR. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ζεύγη εκκινητών: P1/P7, R16F2n/R16R2, fU5/rU4 και ECA1/ECA2 (Πίνακας 2.2.1). Από το πρώτο ζεύγος των εκκινητών, ο P1 υβριδίζει στην αρχή του 16S rRNA γονιδίου και ο P7 στην αρχή του 23S rRNA γονιδίου. Το τμήμα του DNA που ενισχύεται με τη χρήση του συγκεκριμένου ζεύγους είναι 1800 bp και περιλαμβάνει σχεδόν όλο το 16S rRNA γονίδιο, την ITS1 περιοχή και ένα μικρό τμήμα του 23S rRNA. Τα δύο επόμενα ζεύγη (R16F2n/R16R2 και fU5/rU4), που μαζί με το P1/P7 αποτελούν τους γενικευμένους εκκινητές, υβριδίζουν στο 16S rRNA γονίδιο και ενισχύουν ένα μεγάλο μέρος αυτού, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.2.2. Το ζεύγος ECA1/ECA2 είναι εξειδικευμένοι εκκινητές για την ανίχνευση του ESFY. Σχεδιάστηκαν από τους Jarausch, *et al.* (2000) μετά από αλληλούχιση ενός τμήματος 1800 bp του γονιδιώματος, που περιλαμβάνει ένα υποθετικό γονίδιο νιτρορεδοουκτάσης, μια μη εκφραζόμενη περιοχή και μέρος ενός ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF, open reading frame) με άγνωστη λειτουργία. Οι ECA1, ECA2 υβριδίζουν εντός της περιοχής αυτής και ενισχύουν ένα μικρό τμήμα αυτής, 237 ζευγών βάσεων, όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 2.2.3.

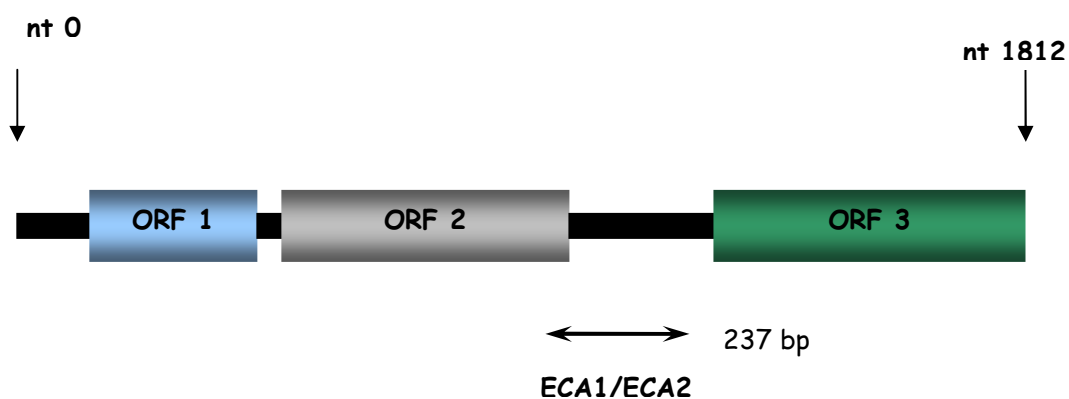
**Πίνακας 2.2.1.** Τα ζεύγη των εκκινητών (ίδιο χρώμα) που χρησιμοποιήθηκαν στην ενίσχυση τμημάτων του DNA των φυτοπλάσμάτων, η αλληλουχία τους, η θερμοκρασία υβριδισμού (Tm) του κάθε εκκινητή και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR για κάθε ζεύγος.

Εκκινητές	Στόχος	Αλληλουχία (5'- 3')	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος	Αναφορά
<b>P1</b>	16S rRNA-ITS-	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	57	1800 bp	Deng and Hiruki, 1991; Smart et al., 1996
<b>P7</b>	23SrRNA (μερικώς)	CGTCCTTCATCGGCTCTT	47		
<b>R16F2n</b>	16S rRNA	GAAACGACTGCTAAGACTGG	59	1248 bp	Gundersen <i>et al.</i> , 1996; Lee <i>et al.</i> , 1993b
<b>R16R2</b>		TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	68		
<b>rU4</b>	16S rRNA	GAAGTCGAGTTGCAGATTC	55	942 bp	Ahrens and Seemuller, 1992
<b>fU5</b>		CGGCAATGGAGGAACT	47		
<b>ECA1</b>	μη ριβοσωμική περιοχή	AATAATCAAGAACAAGAAGT	49	237 bp	Jaraush <i>et al.</i> , 2000a
<b>ECA2</b>		GTTTATAAAAAATTAATGACTC	45		





**Εικόνα 2.2.2.** Απεικόνιση της θέσης των εκκινήτων στο οπερόνιο των ριβοσωμικών γονιδίων των φυτοπλάσμάτων καθώς και το μήκος των προϊόντων της κάθε αντίδρασης PCR.



**Εικόνα 2.2.3.** Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής του γονιδιώματος που αλληλουχήθηκε από τους Jarausch et al. (2000) του φυτοπλάσματος που προκαλεί την ασθένεια 'σκούπα της μάγισσας' της μηλιάς (16Sr X-A), των θέσεων που υβριδίζουν οι εκκινήτες ECA1, ECA2, καθώς και του μήκους των προϊόντων της PCR. Τα χρωματιστά πλαίσια υποδηλώνουν τρία θεωρητικά ORF (ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης). (Προσαρμογή από: Jarausch *et al.* 2000a).

### 2.3.3 Συνθήκες Αντίδρασης

Εκτός των δειγμάτων που προαναφέρθηκαν σε κάθε αντίδραση συμπεριλαμβάνονταν ένας θετικός μάρτυρας (το πρώτο δείγμα που έδωσε θετική αντίδραση), καθώς και ένα υγιές φυτό και ένα δείγμα χωρίς DNA ως αρνητικοί μάρτυρες. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνίσκους PCR 0.2 ml (Greiner bio-one) και ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50  $\mu$ l. Τα αντιδρώντα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 5  $\mu$ l 10x PCR buffer (Standard *Taq* Reaction Buffer, New England Biolabs, NEB), 5  $\mu$ l 2mM dNTPs (Invitrogen), 1  $\mu$ l 20pmol/  $\mu$ l από κάθε εκκινητή, 0,5  $\mu$ l *Taq* πολυμεράση (5,000 units/ml), (M0273S, NEB), 1  $\mu$ l DNA και 36.5  $\mu$ l αποινισμένου- αποστειρωμένου νερού. Στη συνέχεια, οι μικροσωληνίσκοι τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή (Mastercycle Eppendorf) όπου και επωάστηκαν σύμφωνα με τα παρακάτω στάδια αντίδρασης :

- Για το ζεύγος των **P1/P7** εκκινητών οι συνθήκες θέρμανσης/ψύξης της αντίδρασης ήταν οι εξής:

**Στάδιο I. Αρχική αποδιάταξη του DNA:** επώαση του μίγματος της αντίδρασης στους 94 °C για 2 min.

**Στάδιο II. Μετουσίωση του DNA:** επώαση του μίγματος αντίδρασης στους 94 °C για 10sec.

**Στάδιο III. Υβριδισμός των εκκινητών:** επώαση στους 50 °C για 20 sec και ακολουθεί δεύτερη επώαση στους 60°C για 20 sec.

**Στάδιο IV. Πολυμερισμός των νέων μορίων DNA:** επώαση στους 72 °C για 2min.

*Τα στάδια II, III, IV επαναλαμβάνονται 25 φορές.*

- Για το ζεύγος **R16F2n/R16R2** οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

**Στάδιο I.** Επώαση του μίγματος της αντίδρασης στους 94 °C για 2 min.

**Στάδιο II.** Επώαση του μίγματος αντίδρασης στους 94 °C για 10sec.

**Στάδιο III.** Επώαση στους 53 °C για 20 sec

**Στάδιο IV.** Επώαση στους 72 °C για 3 min

*Τα στάδια II, III, IV επαναλαμβάνονται 25 φορές*

- Για το ζεύγος **fU5/rU4** οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

**Στάδιο I.** Επώαση του μίγματος της αντίδρασης στους 95 °C για 1 min.

**Στάδιο II.** Επώαση του μίγματος αντίδρασης στους 95 °C για 15 sec

**Στάδιο III.** Επώαση στους 55 °C για 20 sec

**Στάδιο IV.** Επώαση στους 72 °C για 45 sec

Τα στάδια II, III, IV επαναλαμβάνονται 40 φορές και η αντίδραση ολοκληρώθηκε με μια τελευταία επώαση στους 72 °C για 4 min, για τη συμπλήρωση τυχόν ημιτελών αλυσίδων.

➤ Για το ζεύγος **ECA1/ECA2** οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

**Στάδιο I.** Επώαση του μίγματος της αντίδρασης στους 95 °C για 1 min.

**Στάδιο II.** Επώαση του μίγματος αντίδρασης στους 95 °C για 15 sec

**Στάδιο III.** Επώαση στους 55 °C για 20 sec

**Στάδιο IV.** Επώαση στους 72 °C για 30 sec

Τα στάδια II, III, IV επαναλαμβάνονται 40 φορές και η αντίδραση ολοκληρώθηκε με μια τελευταία επώαση στους 72 °C για 4 min, για τη συμπλήρωση τυχόν ημιτελών αλυσίδων.

### 2.3.4 Οριζόντια ηλεκτροφόρηση

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης 1,05% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE (5,4 g Tris base, 2,75 g βορικού οξέος, 0,5 EDTA pH 8,0) με τη χρήση συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (horizontal electrophoresis mini unit, Sigma- Aldrich). Πέντε μl του προϊόντος της αντίδρασης της PCR αναμείχθηκαν με 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης πήγματος (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 15% Ficoll Type 400, Pharmacia σε dH<sub>2</sub>O) και τοποθετήθηκαν στα βοηθία της πηκτής. Ως δείκτης μοριακού βάρους τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε 1 kb DNA ladder (NEB, New England Biolabs) σε ποσότητα 7 μl. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 100 V και διήρκησε 40 min. Έπειτα, με το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εμβαπτίστηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθυδίου (Sigma) (1,6 μg/ml) σε 1xTBE για 40 min και ακολούθησε εβάπτιση σε sdH<sub>2</sub>O για 30 min. Τέλος, για να γίνει ορατή η θέση του DNA, ακολούθησε απεικόνιση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (312 nm) και φωτογράφιση της πηκτής. Το μέγεθος των τμημάτων του DNA καθοριζόταν με βάση τον δείκτη μοριακού βάρους.

## 2.4 Ταυτοποίηση φυτοπλάσμάτων με τη μέθοδο Πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP)

Τα προϊόντα της PCR R16F2n/R16R2 εξετάστηκαν με τη μέθοδο πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP). Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.2. και επιλέχτηκαν βάση βιβλιογραφίας.

Η αντίδραση της πέψης του προϊόντος της PCR πραγματοποιήθηκε σε σωλήνες Eppendorf 1,5 ml και σε συνολικό όγκο 20 μl για κάθε αντίδραση. Κάθε σωλήνας περιείχε: 2 μl ρυθμιστικό διάλυμα εξειδικευμένο για κάθε ένζυμο (1x NEBuffer, NEB), 0.5 μl ένζυμο περιορισμού (NEB), 7.5 μL milipore H<sub>2</sub>O και 10 μL προϊόν PCR R16F2n/R16R2. Για τα ένζυμα TaqI, MseI ήταν απαραίτητη η προσθήκη 0.2μl βοείου αλβουμίνης (100x BSA, bovine serum albumin, NEB) ως σταθεροποιητή του ενζύμου κατά τη διαδικασία της πέψης, οπότε και ο όγκος του νερού μειώθηκε στα 7.3 μl για τα δύο αυτά ένζυμα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία κατάλληλη για την πέψη του κάθε ενζύμου (Πίνακας 2.2.3 ) και για διάρκεια 48h.

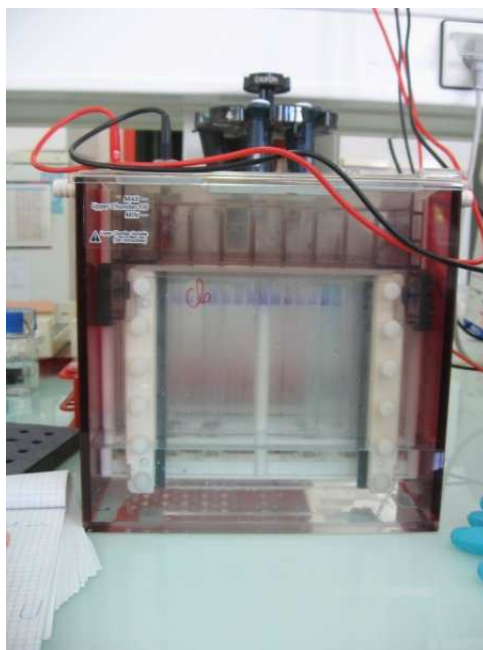
**Πίνακας 2.2.2.** Ενζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη των προϊόντων της PCR R16F2n/R16R2, η αλληλουχία νουκλεοτιδίων που αναγνωρίζουν αυτά, το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για το κάθε ένζυμο και η θερμοκρασία στην οποία έγινε η επώαση της αντίδρασης.

Ένζυμο	Σημείο αναγνώρισης/κοπής	Ρυθμιστικό διάλυμα (NEB)	Θερμοκρασία επώασης
<i>TaqI</i> (NEB)	5' ...T/CGA...3' 3' ...AGC/T...5'	3	65°C
<i>RsaI</i> (NEB)	5' ...GT/AC...3' 3' ...CA/TG...5'	1	37°C
<i>MseI</i> (NEB)	5' ...T/TAA...3' 3' ...AAT/T...5'	2	37°C
<i>HinfI</i> (NEB)	5' ...G/ANTC...3' 3' ...CTNA/G...5'	2	37°C

όπου N= A ή Tα ή C ή G

### 2.4.1 Κάθετη ηλεκτροφόρηση

Η ανάλυση των φραγμάτων των RFLPs έγινε με κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυκαμίδης 5% (PAGE) (8.3 ml ακρυλαμίδα: bis 30%, 10 ml 5x TBE, 17.5  $\mu$ L TEMED, 350  $\mu$ L 10% AMPS και 31.35 ml di-H<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα ml). Σε κάθε δείγμα (20.0  $\mu$ l από τον προϊόν της πέψης) προστέθηκαν 3.0  $\mu$ l 10x ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης πηγματος και ως δείκτες μοριακού βάρους των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκαν 25  $\mu$ l φX174RFI DNA Hae III (NEB) και 10  $\mu$ l Low Molecular Weight (NEB). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε μέσα σε διάλυμα 1x TBE για 2 hr και σε τάση 60V. Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή πολυακρυλαμίδης εμβαπτίστηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθυδίου (1,6  $\mu$ g/ml) σε 1x TBE για 1 hr και ακολούθησε έκπλυση αυτής σε di-H<sub>2</sub>O για 30 min. Τέλος, όπως και στην οριζόντια ηλεκτροφόρηση, οι θέσεις του DNA έγιναν ορατές με τοποθέτηση της πηκτής σε τράπεζα φθορισμού και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία 312 nm.



**Εικόνα 2.2.4.** Κάθετη ηλεκτοφόρηση. Με το μπλέ χρώμα (ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης) διακρίνονται τα δείγματα στα πηγαδάκια του πηγματος.

## 2.5 Αλληλούχιση της περιοχής 16S rRNA- ITS1- 23S rRNA του γονιδιώματος φυτοπλάσμάτων

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων του DNA πραγματοποιήθηκε για τα προϊόντα της PCR P1/P7 τεσσάρων δειγμάτων από δαμασκηνιά και ενός από βερικοκιά (Πίνακας 2.2.3)

**Πίνακας 2.2.3.** Τα δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση του γενώματος τους και η γεωγραφική περιοχή από την οποία προέρχονται.

αρ. δείγματος	ξενιστής	περιοχή
9842	δαμασκηνιά	Ν. Μαγνησίας
9947	βερικοκιά	Ν. Κορινθίας
0034	δαμασκηνιά	Ν. Ημαθίας
0090	δαμασκηνιά	Ν. Πέλλας
E353	δαμασκηνιά	Ν. Καρδίτσας

Η αντίδραση της αλληλούχισης εκτελέστηκε από την ιδιωτική εταιρεία 'Κέντρο Γενετικών Ερευνών & Αναλύσεων Α.Ε. BioGenomica' με τη μέθοδο των διδεοξύ- αναλόγων του Sanger. Τα δείγματα που στάλθηκαν προς αλληλούχιση ήταν μη καθαρισμένο προϊόν της PCR P1/P7 και για την αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκαν 2 µL των εκκινητών P1, P7 συγκέντρωσης 10 pmol/µL.

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα BioEdit v7.0.9 (διαθέσιμο στην ιστοσελίδα <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) και στη συνέχεια συγκρίθηκαν με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων του NCBI (National Center for Biotechnology Information), με εφαρμογή του αλγορίθμου BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), αλλά και μέσω του BioEdit.

## **2.6 *In silico* πέψη με περιοριστικά ένζυμα και αναπαράσταση σε εικονικό πήγμα**

Για τα δείγματα στα οποία έγινε αλληλούχιση μέρους του γενώματος τους (Πίνακας 2.2.2) ακολούθησε *in silico* RFLP της αλληλουχίας των προϊόντων της PCR (R16F2n/R16R2) με το πρόγραμμα εικονικής αναπαράστασης σε πήγμα *iPhyClassifier* που έχει αναπτυχθεί από τους Wei, *et al.* (2007) και η ιστοσελίδα προσφέρεται μέσω του USDA (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>).

Σε κάθε αλληλουχία DNA έγινε ανάλυση με 17 περιοριστικά ένζυμα -AluI, BamHI, BfaI, BstUI (ThaI), DraI, EcoRI, HaeIII, HhaI, HinfI, HpaI, HpaII, KpnI, Sau3AI (MboI), MseI, RsaI, SspI και TaqI- τα οποία χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό και την κατάταξη των φυτοπλάσμάτων σε ομάδες και είδη (Lee, *et al.*, 1998). Έπειτα, ένα εικονικό πήγμα αγαρόζης 3.0% αναπαράστησε την παραπάνω διαδικασία και έγινε σύγκριση με τα αποτελέσματα των RFLPs που πήραμε *in vitro* (Πίνακας 2.2.3)

Η αναλυτική αυτή εικόνα με το πρότυπο πήγμα της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για την ανάλυση και σύγκριση των αποτελεσμάτων των RFLP στα επεξεργασμένα δείγματα μετά τη χρήση πέντε περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 2.2.3).

### **III. Αποτελέσματα**

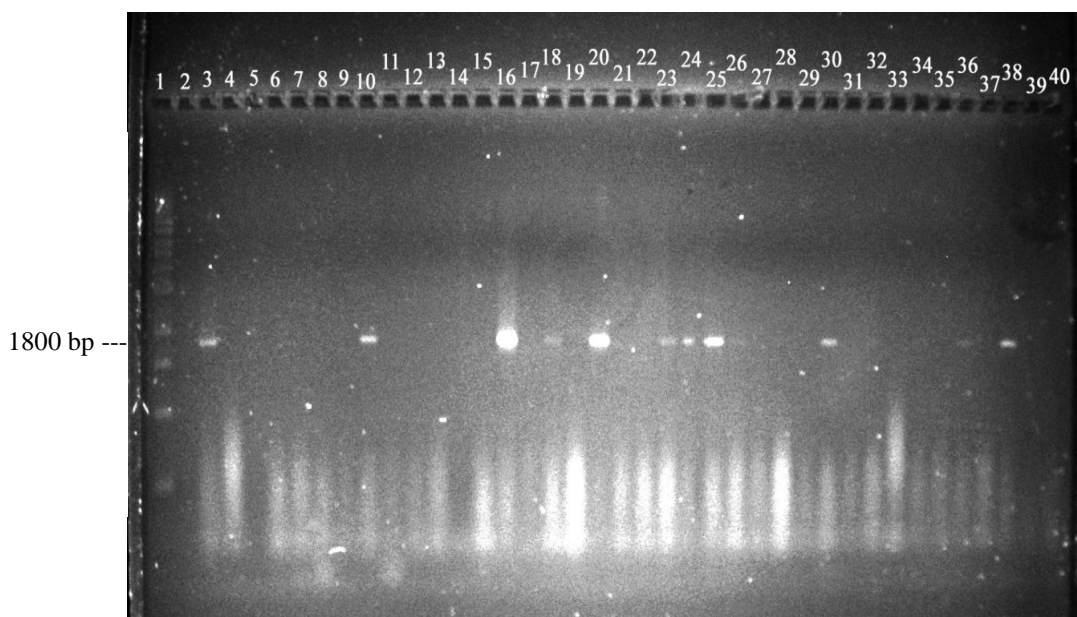


### 3.1 Ανίχνευση φυτοπλάσμάτων σε πυρηνόκαρπα

Φυτοπλασματικό DNA ανιχνεύτηκε σε δείγματα Πυρηνοκάρπων με PCR χρησιμοποιώντας το ζεύγος των γενικευμένων εκκινητών P1/P7, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.2.3. Από τα 70 δείγματα που εξετάστηκαν στα 28 διαπιστώθηκε η παρουσία φυτοπλάσματος (Πίνακας 3.1), όπου το προϊόν όλων των αντιδράσεων είχε το αναμενόμενο μέγεθος των 1800 bp (όπως φαίνεται στην πηκτή αγαρόζης μετά από οριζόντια ηλεκτροφόρηση - Εικόνα 3.1).

Τα παραπάνω 28 δείγματα, που έδωσαν θετική αντίδραση PCR P1/P7, εξετάστηκαν εκ νέου με τα ζεύγη των γενικευμένων εκκινητών R16F2n/R16R2, U4/U5 καθώς και με το ζεύγος των εξειδικευμένων εκκινητών ECA1/ECA2. Από τα 28 δείγματα που εξετάστηκαν και τα 28 έδωσαν θετική αντίδραση με τους εκκινητές U4/U5, ενώ 26 από τα 28 δείγματα έδωσαν θετική αντίδραση με τους εκκινητές R16F2n/R16R2 και τέλος κανένα δείγμα δεν έδωσε προϊόν με τους εκκινητές ECA1/ECA2. Η αδυναμία των δύο δειγμάτων να δώσουν θετική αντίδραση PCR με τους εκκινητές R16F2n/R16R2, ενώ έδωσαν θετικό αποτέλεσμα με τα άλλα δύο ζεύγη εκκινητών, μπορεί να οφείλεται σε σημειακή μετάλλαξη στην περιοχή όπου υβριδίζει κάποιος από τους δύο εκκινητές ή στη χαμηλή συγκέντρωση του φυτοπλασματικού DNA στο φυτό. Η εξειδικευμένη PCR με το ζεύγος των ECA1/ECA2 δεν έδωσε προϊόν πιθανώς λόγω σημειακής μετάλλαξης στην περιοχή υβριδισμού των εκκινητών.

Επιπλέον, τυχαία επιλεγμένα δείγματα που είχαν δώσει αρνητική αντίδραση PCR P1/P7 ελέγχθηκαν εκ νέου με το ζεύγος εκκινητών U4/U5. Οι αντιδράσεις και σ' αυτή την περίπτωση ήταν αρνητικές.



**Εικόνα 3.1** Ηλεκτροφόρημα προϊόντων PCR με χρήση των εκκινητών P1/P7 σε πηκτή αγαρόζης (1,05% σε TBE 1x). 1: Ladder 1 Kb (10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1.5, 1, 0,5), 2: αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA, 3: θετικός μάρτυρας, 4: αρνητικός μάρτυρας από υγιές φυτό δαμασκηιάς, 5: αρνητικός μάρτυρας από υγιές φυτό βερικοκιάς, 6-40: Δείγματα. Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντων PCR: 1800 bp.

Σημειώνεται ότι τα δείγματα 6-9, 11-14 προέρχονται από δέντρα αμυγδαλιάς, τα 10 και 15 από δέντρο βερικοκιάς ενώ τα υπόλοιπα 16-40 από δαμασκηιά.

### 3.2 Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP)

Για την ταυτοποίηση του φυτοπλάσματος (ή των φυτοπλάσμάτων) που ανιχνεύτηκαν στα 26 δείγματα πυρηνοκάρπων έγινε RFLP ανάλυση στα προϊόντα της PCR R16F2n/R16R2 με τα ένζυμα περιορισμού *TaqI*, *MseI*, *HinfI* και *RsaI*. Όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν έδωσαν παρόμοια εικόνα RFLP.

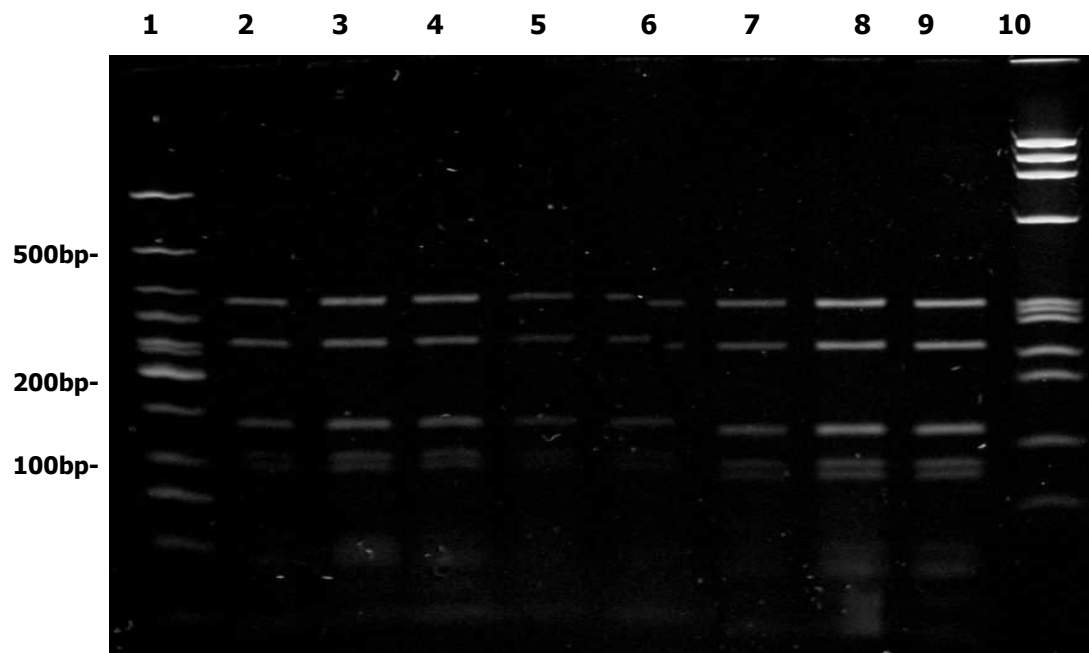
Ο πολυμορφισμός των τμημάτων περιορισμού που προέκυψε για όλα τα ένζυμα που εξετάστηκαν ήταν όμοιος με την εικόνα που δίνει το φυτόπλασμα το οποίο προκαλεί τον Ευρωπαϊκό Ίκτερο των Πυρηνοκάρπων (*Ca. P. prunorum*, ομάδα 16Sr X-B) (Lee *et al.*, 1998). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στις εικόνες 3.2- 3.5.

Το φυτόπλασμα *Ca. P. prunorum* που προκαλεί την ασθένεια Ευρωπαϊκός Ίκτερος των Πυρηνοκάρπων, ταυτοποιήθηκε μετά από PCR- RFLP ανάλυση σε δείγματα δαμασκηνιάς και βερικοκιάς, ενώ δεν ανιχνεύτηκε στην αμυγδαλιά και στη ροδακινιά. Φυτόπλασμα ανίχνευτηκε στο 57,5% σε σύνολο των δειγμάτων δαμασκηνιάς και στο 50% των δειγμάτων βερικοκιάς. Τα ποσοστά ασθενών δέντρων ανά ξενιστή και ανά νομό παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1

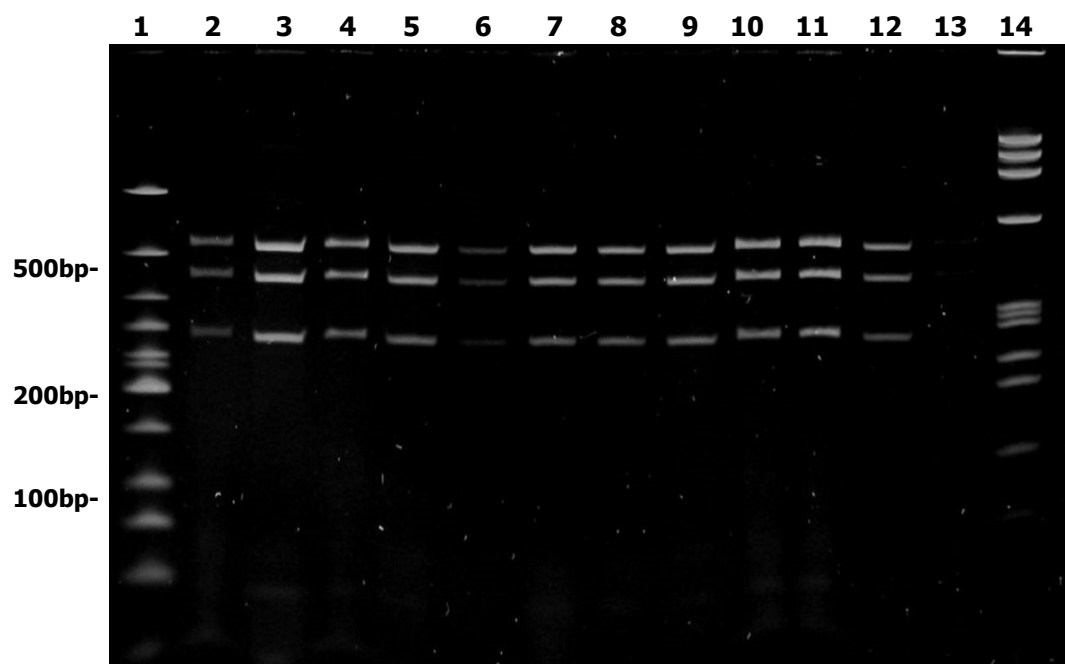
Το φυτόπλασμα *Ca. P. prunorum* ανιχνεύτηκε και σε βερικοκιά του Ν. Μαγνησίας και είναι το μόνο από τα 4 δείγματα χωρίς συμπτώματα που συλλέχθηκαν και στο οποίο ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη του φυτοπλάσματος.

**Πίνακας 3.1** Φυτά στα οποία ανιχνεύτηκε φυτόπλασμα στο σύνολο των δειγμάτων.

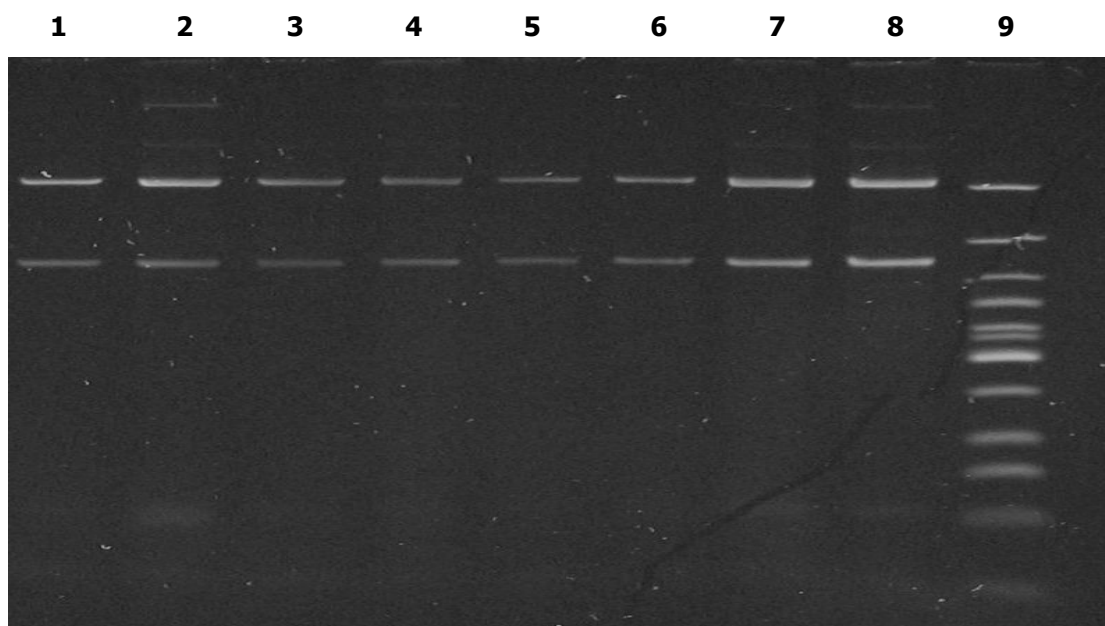
Περιοχή	Ξενιστές	% ασθενών δέντρων
<b>N. Μαγνησίας</b>	δαμασκηνιά ( <i>P. salicina</i> )	8/8 (100%)
	δαμασκηνιά (αδιευκρίνιστο είδος)	3/4 (75%)
	αμυγδαλιά ( <i>P. amygdalus</i> )	0/10 (0%)
	ροδακινιά ( <i>P. persica</i> )	0/2 (0%)
	βερικοκιά ( <i>P. armeniaca</i> )	2/2 (100%)
<b>N. Κορινθίας</b>	αμυγδαλιά ( <i>P. amygdalus</i> )	0/8 (0%)
	βερικοκιά ( <i>P. armeniaca</i> )	1/2 (50%)
<b>N. Ημαθίας</b>	δαμασκηνιά ( <i>P. salicina</i> )	8/16 (50%)
<b>N. Πέλλας</b>	δαμασκηνιά ( <i>P. salicina</i> )	5/11 (45,45%)
<b>N. Λαρίσης</b>	αμυγδαλιά ( <i>P. amygdalus</i> )	0/4 (0%)
<b>N. Καρδίτσας</b>	δαμασκηνιά (αδιευκρίνιστο είδος)	1/1 (100%)
<b>N. Ηλείας</b>	βερικοκιά ( <i>P. armeniaca</i> )	0/2 (0%)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>		37,14%



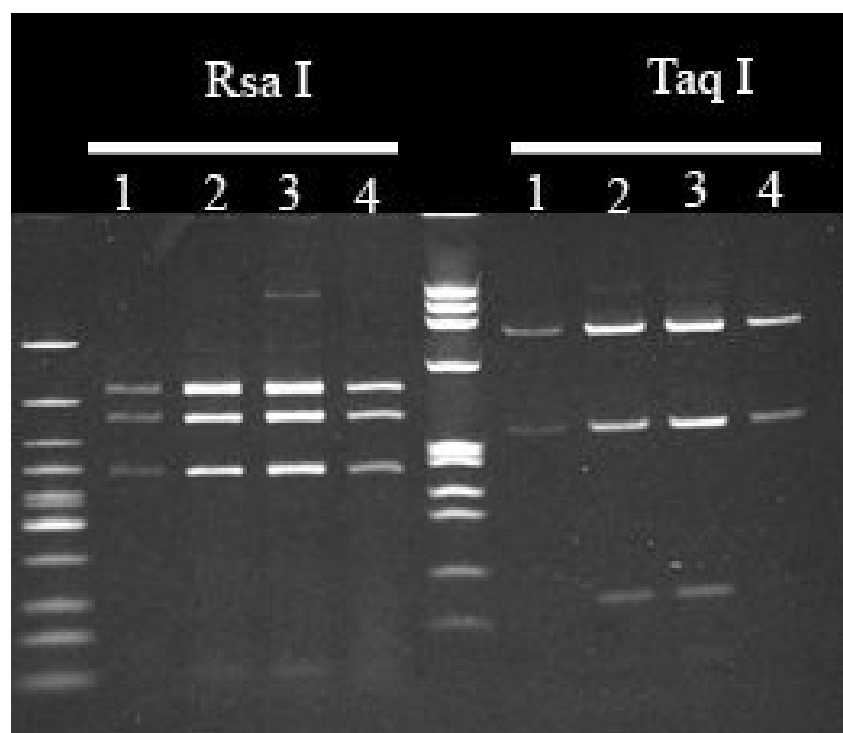
**Εικόνα 3.2.** RFLP ανάλυση των προϊόντων της PCR R16F2n/R16R2 στα οποία έγινε πέψη με το ένζυμο *MseI*. 1: Low Molecular Weight Ladder, 2-9: δείγματα, 10: φX174RFI DNA *Hae III* digest Ladder (NEB).



**Εικόνα 3.3.** RFLP ανάλυση των προϊόντων της PCR F2n/R2 στα οποία έγινε πέψη με το ένζυμο *RsaI*. 1: Low Molecular Weight Ladder, 2-13 δείγματα, 14: φX174RFI DNA *Hae III* digest Ladder.



**Εικόνα 3.4.** RFLP ανάλυση των προϊόντων της PCR F2n/R2 στα οποία πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο *Hinf*I. 1-8: δείγματα, 9: Low Molecular Weight Ladder



**Εικόνα 3.5.** RFLP ανάλυση των προϊόντων της PCR F2n/R2 στα οποία πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο *Rsa*I και *Taq*I. 1-4: δείγματα.

### 3.3 Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας φυτοπλασματικού DNA.

Σε πέντε δείγματα έγινε αλληλούχιση του τμήματος του φυτοπλασματικού γονιδιώματος που ανιχνεύτηκε με τους εκκινητές P1/P7 (μέρος γονιδίου 16S rRNA-ITS1- μέρος γονιδίου 23S rRNA). Οι πέντε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες δε διέφεραν μεταξύ τους και έτσι επιλέχτηκε μία (9842) –ξενιστής: δαμασκηνιά, προέλευση: Ν. Μαγνησίας- για περαιτέρω ανάλυση (Εικόνα 3.6).

Η αλληλουχία αυτή συγκρίθηκε με όλες τις αλληλουχίες φυτοπλάσμάτων που έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων του NCBI/ Genbank και βρέθηκε ότι είναι πανομοιότυπη με αλληλουχίες αυτής της γονιδιοματικής περιοχής των απομονώσεων, ESFY-G2 και ESFY-215, με προέλευση Γερμανία και Ισπανία αντίστοιχα (ξενιστής *P. armeniaca* και στις δυο) (Πίνακας 3.3).

Επίσης με τις απομονώσεις PRUNE 143B, ESFY-422, ESFY- CCP2 υπάρχει πλήρης ταύτιση σε τμήμα του γονιδίου 16S rRNA, ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα για την υπόλοιπη γονιδιοματική περιοχή (ITS1- 23S rRNA) αυτών των απομονώσεων.

Τέλος, έχουν καταχωρηθεί αλληλουχίες στη βάση δεδομένων NCBI/ Genbank με μικρό μέγεθος (181-711 νουκλεοτίδια) που και αυτές ταυτίζονται πλήρως με τη γενωμική περιοχή 9842 (κωδ. EMBL: EF560638, EF560639, EF560643, EF560647, EU168783, U54988).

Επιπλέον, στον Πίνακα 3.2 φαίνεται η σύγκριση μεταξύ της αλληλουχίας 9842 και αλληλουχιών της ίδιας περιοχής γενώματος από συγγενικά φυτοπλάσματα ‘*Ca. P. pyri*’ (16Sr X-C) και ‘*Ca. P. mali*’ (16Sr X-A). Παρατηρούμε ότι η αλληλουχία 9842 με τις καταχωρημένες αλληλουχίες που προέρχονται από φυτοπλάσματα του είδους ‘*Ca. P. prunorum*’ έχουν ομοιότητα μεταξύ τους πάνω από 99.6%, ενώ με τα συγγενικά είδη έχει ομοιότητα μικρότερη του 99%, αλλά και μεγαλύτερη από 98%.

```

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      10      20      30      40      50      60
GTCGAACGGA AACTTTTAGT TTCAGTGGCG AACGGGTGAG TAACACGTAA GTAACCTGCC

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      70      80      90     100     110     120
TCTCAGACGA GGATAACAGT TGGAAACGAC TGCTAAGACT GGATATGAAG TTTTGAGGCA

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     130     140     150     160     170     180
TCTCGAAACT TTAAAAGAC CCGCAAGGGT ATGCTGAGAG ATGGGCTTGC GGCACATTAG

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     190     200     210     220     230     240
TTAGTTGGTA AGGTAATGGC TTACCAAGAC TATGATGTGT AGCTGGACTG AGAGGTTGAA

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     250     260     270     280     290     300
CGGCCACATT GGGACTGAGA TACGGCCCAA ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TAAGGAATTT

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     310     320     330     340     350     360
TCGGCAATGG AGGAAACTCT GACCGAGCAA CGCCGCGTGA ACGATGAAGT ATTTAGGTAC

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     370     380     390     400     410     420
GTAAAGTTCT TTTATTAAAG AAGAAAAAAT GATGGAAAAA TCATTCTGAC GGTATTTAAT

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     430     440     450     460     470     480
GAATAAGCCC CGGCTAACTA TGTGCCAGCA GCTGCGGTAA TACATGGGGG GCAAGCGTTA

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     490     500     510     520     530     540
TCCGGATTTA TTGGGCGTAA AGGGTGCGTA GGCGGTAAAA TAAGTCTATG GTATAAGTTC

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     550     560     570     580     590     600
AACGCTTAAC GTTGTGATGC TATAGAAACT GTTTGACTAG AGTTGGATAG AGGCAAGTGG

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     610     620     630     640     650     660
AATTCCATGT GTAGCGGTAA AATGCGTAAA TATATGGAGG AACACCAGTA GCGAAGGCGG

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     670     680     690     700     710     720
CTTGCTGGGT CTTAACTGAC GCTGAGGCAC GAAAGCGTGG GGAGCAAACA GGATTAGATA

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     730     740     750     760     770     780
CCCTGGTAGT CCACGCCGTA AACGATGAGT ACTAAGTGTT GGGTTAAACC AGTGCTGAAG

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     790     800     810     820     830     840
TTAACACATT AAGTACTCCG CCTGAGTAGT ACGTACGCAA GTATGAAACT TAAAGGAATT

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
     850     860     870     880     890     900
GACGGGACTC CGCACAAGCG GTGGATCATG TTGTTTAATT CGAAGATACA CGAAAAACCT

```



```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      910      920      930      940      950      960
TACCAGGTCT TGACATACTC TGCAAAGCTA TAGAAATATA GTGGAGGTTA TCAGGGATAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      970      980      990     1000     1010     1020
AGGTGGTGCA TGGTTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1030     1040     1050     1060     1070     1080
GCGCAACCCT TATCACTAGT TACCATCATT TAGTTGGGCA CTTTAGTGAG ACTGCCAATG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1090     1100     1110     1120     1130     1140
ATAAATTGGA GGAAGGTGGG GATTACGTCA AATCATCATG CCCCTTATGA CCTGGGCTAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1150     1160     1170     1180     1190     1200
AAACGTGATA CAATGGCTGT TACAAAGAGT AGCTGAAACG TGAGTTTTTA GCAAATCTCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1210     1220     1230     1240     1250     1260
AAAAAACAGT CTCAGTTCGG ATTGAAGTCT GCAACTCGAC TTCATGAAGT CGGAATCGCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1270     1280     1290     1300     1310     1320
AGTAATCGCG AATCAGCATG TCGTGGTGAA TACGTTCTCG GGGTTTGTA ACACGCCCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1330     1340     1350     1360     1370     1380
TCAAACCACG AAAGTTGACA ATACCCAAAA CCAGTAGCCT AACTTGCAAA AGAGGGAACT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1390     1400     1410     1420     1430     1440
GTCTAAGGTA GGGTTGATGA TTGGGGTTAA GTCGTAACAA GGTATCCCTA CCGGAAGGTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1450     1460     1470     1480     1490     1500
GGGATGGATC ACCTCCTTTC TAAGGAAAAAT ATCATCTTCA GTTGTGAAAG ACTTAAAAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1510     1520     1530     1540     1550     1560
AGTTTTTTTAT TTTTAAAGAT AAAAATCAAT AATGGCTTGG GCCTATAGCT CAGTTGGTTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1570     1580     1590     1600     1610     1620
GAGCACACGC CTGATAAGCG TGAGGTTCGAT GGTTCGAGTC CATTTAGGCC CACCAAAATA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|
     1630     1640     1650     1660     1670
TTTATTTTAA AAAACAAGC TCTTTGAAAA GTAGATAAAT TAAGGTTAGA AGAAT

```

**Εικόνα 3.6.** Νουκλεοτιδική αλληλουχία του δείγματος 9842 που περιλαμβάνει μέρος του γονιδίου 16S rRNA, την ITS1 περιοχή και μέρος γονιδίου 23S rRNA.

**Πίνακας 3.2.** Σύγκριση μεταξύ της αλληλουχίας 9842 και όλων των καταχωρημένων αλληλουχιών στη βάση δεδομένων NCBI/ Genbank που αφορούν το '*Ca. P. prunorum*' (το ποσοστό ομοιότητας αφορά τη κοινή περιοχή της αλληλουχίας).

Δείγμα ή απομόνωση	no. EMBL	Περιοχή γονιδιώματος	Αρ. βάσεων (bp)	Ξενιστής/φορέας	περιοχή	Αριθμός διαφορών σε επίπεδο βάσεων	Βαθμός ομοιότητας (%)
9842	-	16SrRNA-ITS1-23SrRNA (μερικώς)	1675	<i>P. salicina</i>	Ελλάδα	-	-
ALBERC421	AJ311020	16SrRNA (μερικώς)	763	<i>P. armeniaca</i>	Καταλονία/Ισπανία	4	99.76
ALBERC420	AJ311021	16SrRNA (μερικώς)	763	<i>P. armeniaca</i>	Καταλονία/Ισπανία	3	99.82
PRUNE380	AJ311022	16SrRNA (μερικώς)	756	<i>P. salicina</i>	Καταλονία/Ισπανία	2	99.88
PRUNE379	AJ311023	16SrRNA (μερικώς)	761	<i>P. salicina</i>	Καταλονία/Ισπανία	1	99.94
PRUNE378	AJ311024	16SrRNA (μερικώς)	762	<i>P. salicina</i>	Καταλονία/Ισπανία	2	99.88
PRUNE143B	AJ311025	16SrRNA (μερικώς)	718	<i>P. salicina</i>	Καταλονία/Ισπανία	-	100.00
ESFY-G1	AJ542544	16SrRNA-ITS1-23SrRNA (μερικώς)	1784	<i>P. persica</i>	Γερμανία	1	99.94
ESFY-G2	AJ542545	16SrRNA-ITS1-23SrRNA (μερικώς)	1784	<i>P. armeniaca</i>	Γερμανία	-	100.00
ESFY-215	AJ575105	16SrRNA-ITS1-23SrRNA (μερικώς)	1736	<i>P. armeniaca</i>	Ισπανία	-	100.00
ESFY-173	AJ575106	16SrRNA-ITS1-23SrRNA (μερικώς)	1736	<i>P. armeniaca</i>	Ισπανία	1	99.94
	AJ575107	16SrRNA-ITS1-23SrRNA (μερικώς)	1688	<i>P. armeniaca</i>	Ισπανία	2	99.88
ESFY-142	AJ575108	16SrRNA-ITS1-23SrRNA (μερικώς)	1556	<i>P. armeniaca</i>	Ισπανία	1	99.94

Δείγμα ή απομόνωση	no. EMBL	Περιοχή γονιδιώματος	Αριθμός βάσεων (bp)	Ξενιστής/φορέας	περιοχή	Αριθμός διαφορών σε επίπεδο βάσεων	Βαθμός ομοιότητας (%)
ESFY-422	AJ575109	16SrRNA (μερικώς)	1180	<i>P. armeniaca</i>	Ισπανία	-	100.00
ESFY-379	AJ575110	16SrRNA (μερικώς)	1183	<i>P. salicina</i>	Ισπανία	1	99.94
ESFY-377	AJ575111	16SrRNA (μερικώς)	1183	<i>P. salicina</i>	Ισπανία	1	99.94
ESFY-CCP2	AM404163	16SrRNA (μερικώς)	972	<i>Cacopsylla peregrina</i>	Ιταλία	-	100.00
ESFY-CCP1	AM404164	16SrRNA (μερικώς)	911	<i>Cacopsylla peregrina</i>	Ιταλία	8	
ESFY-CCA1	AM746983	16SrRNA (μερικώς)	990	<i>Cacopsylla affinis</i>	Ιταλία	6	99.64
ESFY-CCA2	AM746984	16SrRNA (μερικώς)	986	<i>Cacopsylla affinis</i>	Ιταλία	3	99.82
ESFY-3237	AM933140	16SrRNA (μερικώς)	1095	<i>P. amygdalus</i>	Καταλονία/ Ισπανία	-	100.00
ESFY-1112	AM933141	16SrRNA (μερικώς)	1159	<i>P. cerasifera</i>	Καταλονία/ Ισπανία	1	99.94
ESFY-2102	AM933142	16SrRNA-ITS1-23SrRNA (μερικώς)	1784	<i>P. salicina</i>	Καταλονία/ Ισπανία	6	99.64
	AY029540	16SrRNA-ITS1-23SrRNA (μερικώς)	1784			6	99.64
	EF560638	16SrRNA(μερικώς)-ITS1-23SrRNA (μερικώς)	234	<i>Cacopsylla pruni</i>	Γαλλία	-	100.00
	EF560639	16SrRNA(μερικώς)-ITS1-23SrRNA (μερικώς)	234	<i>Cacopsylla pruni</i>	Γαλλία	-	100.00
	EF560643	ITS1(μερικώς)-23SrRNA (μερικώς)	231	<i>P. marianna</i>	Γαλλία	-	100.00
	EF560647	ITS1-23SrRNA (μερικώς)	181	<i>P. domestica</i>	Γαλλία	-	100.00
	EU168783	16SrRNA(μερικώς)-ITS1-23SrRNA (μερικώς)	711			-	100.00
	U54988	ITS1	230	<i>P. persica</i>		-	100.00
	Y11933	16SrRNA-ITS1-23SrRNA (μερικώς)	1777	<i>P. armeniaca</i>	Τσεχία	2	99.88

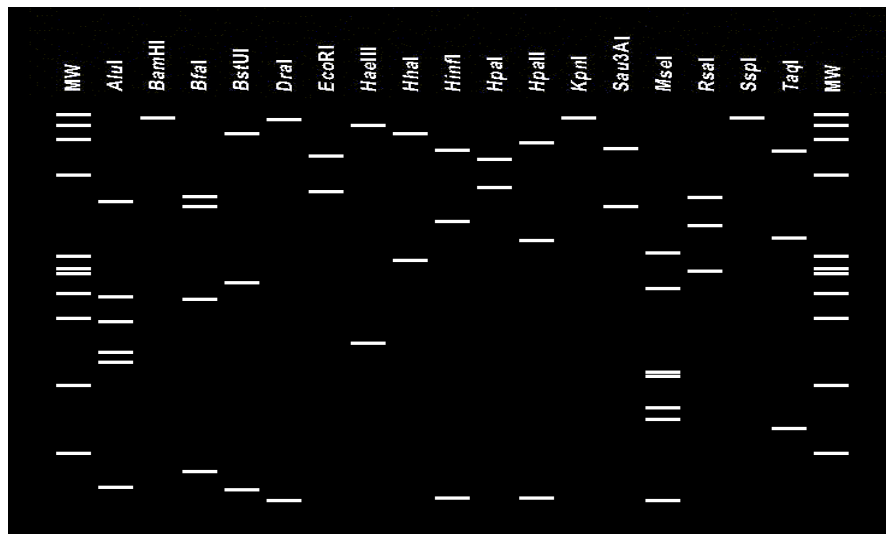
**Πίνακας 3.3.** Σύγκριση μεταξύ της αλληλουχίας 9842 και αλληλουχιών κατά χωρημένων στη βάση δεδομένων NCBI/Genbank που αφορούν τα '*Ca. P. mali*' και '*Ca. P. pyri*'.

Δείγμα ή απομόνωση	φυτόπλασμα	ομοιότητα (%)	περιοχή γονιδιώματος	μήκος (bp)
<b>9842</b>	Ca. Phytoplasma prunorum	-	16S-ITS1-23S (μερικώς)	1675
<b>DQ011588</b>	Ca. Phytoplasma pyri	98.9	16S-ITS1-23S (μερικώς)	1784
<b>PD1</b>	Ca. Phytoplasma pyri	98.6	16S-ITS1-23S (μερικώς)	1785
<b>Y16392</b>	Pear Decline Phytoplasma	98.7	16S-ITS1-23S (μερικώς)	1673
<b>973PD</b>	Ca. Phytoplasma pyri	98.5	16S-ITS1-23S (μερικώς)	1784
<b>AT</b>	Ca. Phytoplasma mali	98.4	16S-ITS1-23S (μερικώς)	1784
<b>AT1/93</b>	Ca. Phytoplasma mali	98.4	16S-ITS1-23S (μερικώς)	1784
<b>EF392656</b>	Ca. Phytoplasma mali	98.4	16S-ITS1-23S (μερικώς)	1784
<b>AP15</b>	Ca. Phytoplasma mali	98.3	16S-ITS1-23S (μερικώς)	1784
<b>T-3</b>	Ca. Phytoplasma mali	98.3	16S-ITS1-23S (μερικώς)	1784
<b>Y16394</b>	Peach yellow leafroll phytoplasma	98.3	16S-ITS1-23S (μερικώς)	1675

PD1 (EMBL accession no. AJ542543), 973PD (EMBL accession no. AJ964959), AT (EMBL accession no. X68375), AT1/93 (EMBL accession no. AJ542542), AP15 (EMBL accession no. AJ542541), T-3 (EMBL accession no. EF392654).

### 3.4 *In silico* RFLPs

Το εικονικό RFLP που βασίστηκε στην αλληλουχία των νουλεοτιδίων της περιοχής 16S rRNA (μερικώς) (προϊόν PCR R16F2n/R16R2) των πέντε δειγμάτων δε διέφερε από τα πραγματικά RFLPs που έγιναν στο εργαστήριο και ταυτίζονταν πλήρως με το είδος ‘*Ca. P. prunorum*’. Επομένως, επιβεβαιώνεται η υπόθεσή μας και με αυτόν τον τρόπο ότι τα δείγματα μας ήταν προσβεβλημένα από φυτοπλάσμα του είδους ‘*Ca. P. prunorum*’



**Εικόνα 3.7.** Προφίλ των 15 περιοριστικών ενζύμων του φυτοπλάσματος ‘*Ca. P. prunorum*’ σε εικονικό πήγμα αгарόζης, έπειτα από *in silico* ανάλυση.

## **IV. Συζήτηση- Συμπεράσματα**

### **4.1 Συζήτηση**

Ο Ευρωπαϊκός Ίκτερος των Πυρηνοκάρπων είναι μια φυτοπλασματική ασθένεια που προσβάλλει τουλάχιστον 18 είδη του γένους *Prunus* σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες (Jarausch *et al.*, 2000a) και αποτελεί μια από τις σοβαρότερες ασθένειες των πυρηνοκάρπων, κύρια αιτία της παρακμής και νέκρωσης των παραγωγικών δέντρων στην Ευρώπη. Στη Γαλλία, αποτελεί έναν από τους περιοριστικούς παράγοντες της καλλιέργειας της βερικοκιάς και της Ιαπωνικής δαμασκηνιάς (Lichou, 1999), ενώ περίπου 5% των δέντρων βερικοκιάς νεκρώνονται κάθε χρόνο (Desvignes *et al.*, 1999). Επίσης, σε έρευνες που έγιναν στην Ισπανία (Καταλωνία) αναφέρεται ότι ο μέσος όρος των νέων προσβεβλημένων δέντρων από την ασθένεια κυμαίνεται στο 2% περίπου κάθε έτος (Torres *et al.*, 2004).

Στην Ελλάδα τα συμπτώματα της ασθένειας αναφέρθηκαν αρχικά από τον Άγριο το 1971 και έπειτα περιγράφηκαν και από άλλους ερευνητές σε οπωρώνες της βόρειας και κεντρικής Ελλάδος (Agrios, 1971; Rumbos and Bosabalidis, 1985). Ως κύριο σύμπτωμα της ασθένειας αναφέρεται η πρόωμη έκπτυξη των φύλλων που στη χώρα μας παρατηρείται στα μέσα Φεβρουαρίου με αρχές Μαρτίου, περίοδος που πραγματοποιήθηκε και η δειγματοληψία της παρούσας εργασίας. Επίσης, η χλώρωση και το καρούλιασμα των φύλλων, η πρόωμη καρπόπτωση, ο μεταχρωματισμός του καμβίου και τελικώς η καχεξία των δέντρων είναι συμπτώματα που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Τη μεγαλύτερη ευαισθησία στην ασθένεια φαίνεται να παρουσιάζουν οι Ιαπωνικές ποικιλίες δαμασκηνιάς (*P. salicina*) και η βερικοκιά (*P. armeniaca*). Οι Ευρωπαϊκές ποικιλίες δαμασκηνιάς (*P. domestica*) είναι γενικά ανθεκτικές στην ασθένεια, αλλά μερικές ποικιλίες εμφανίζουν ήπια συμπτώματα και χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας. Αντιθέτως, η κερασιά (*P. avium*) και διάφορα συγγενή της είδη παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στον Ευρωπαϊκό Ίκτερο των Πυρηνοκάρπων, ενώ σε καλλιέργειες ροδακινιάς (*P. persica*) έχει αναφερθεί ότι η ασθένεια δεν είναι και τόσο διαδεδομένη.

Η μετάδοση της ασθένειας γίνεται μέσω του εμβολιασμού και μέσω του εντόμου- φορέα *Cacopsylla pruni*. Τελευταία αναφέρθηκε η ύπαρξη φυτοπλασματικού DNA και στα είδη *C. affinis* και *C. peregrina*. Αξίζει να αναφερθεί εδώ ότι τα παραπάνω είδη δεν έχουν καταγραφεί ως προς την ύπαρξη τους ακόμα στη χώρα μας, αλλά έχουν παρατηρηθεί σε γειτονικές χώρες όπως η Ιταλία. Τα είδη ψύλλας που έχουν αναφερθεί στην Ελλάδα είναι τα εξής: *C. melaneura*, *C. mali*, *C. pyri*, *C. pyricola* και *C. pyrisuga* που προσβάλλουν καλλιέργειες μηλοειδών.

Σύμφωνα με τον Thebaud *et al.* (2006), που μελέτησε μέσω ενός μοντέλου παλινδρόμησης τους παράγοντες που συσχετίζονται με την πρόκληση και τη διάδοση της ασθένειας σε οπωρώνες βερικοκιάς και Ιαπωνικής δαμασκηλιάς στη Γαλλία, η ηλικία των δέντρων, το είδος του ξενιστή, η πυκνότητα φύτευσης και το υποκείμενο είναι οι κύριοι παράγοντες που αιτιολογούν την εξάπλωση της ασθένειας σ' έναν οπωρώνα. Οι ιαπωνικές ποικιλίες δαμασκηλιάς ηλικίας 6-8 χρόνων αποτέλεσαν τον πιο σημαντικό παράγοντα του πειράματος στη ταχεία διάδοση της ασθένειας. Η διαφοροποίηση αυτή στα δύο είδη ξενιστών της έρευνας, ίσως έχει να κάνει με την προτίμηση του εντόμου φορέα *C. pruni*. Επίσης, διαφορές στην εξέλιξη της ασθένειας παρατηρήθηκαν και ανάμεσα σε διαφορετικές ποικιλίες, σε οπωρώνες με μικρότερη πυκνότητα φύτευσης συγκριτικά με αυτούς με μεγαλύτερη πυκνότητα καθώς και σε δέντρα που έφεραν υποκείμενο συγγενές με το υπερκείμενο-εμβόλιο.

Το φυτόπλασμα βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση στον ηθμό του φυτού, ενώ η παρουσία του στα διαφορετικά όργανα των δέντρων υπόκειται τόσο σε περιβαλλοντικές, όσο και σε εποχιακές διακυμάνσεις (Jarausch *et al.*, 1999).

Όσο αφορά την παρούσα μελέτη, η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε την εποχή της εμφάνισης των συμπτωμάτων της πρώιμης έκπτυξης των φύλλων. Συλλέχθηκαν δείγματα (ετήσιοι βλαστοί που έφεραν τα συμπτώματα) από διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Μακεδονία, Θεσσαλία, Πελοπόννησος) και από διάφορα είδη πυρηνοκάρπων (Ιαπωνικές και Ευρωπαϊκές ποικιλίες δαμασκηλιάς, βερικοκιάς, αμυγδαλιές, ροδακινιές). Μετά τη συλλογή των 70 δειγμάτων, ακολούθησε η απόσπαση του ηθμού των βλαστών και η απομόνωση του DNA.

Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των φυτοπλασμάτων η πιο ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδος είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμέρασης (PCR) που συγκαταλέγεται στις μοριακές διαγνωστικές μεθόδους. Η τάση που επικρατεί στην περιβαλλοντική μικροβιολογία είναι να χρησιμοποιούν το οπερόνιο των ριβοσωμικών γονιδίων για τη φυλογενετική ταξινόμηση των προκαρυωτικών μικροοργανισμών με μοριακές μεθόδους. Έτσι και για την ανίχνευση και κατάταξη των φυτοπλασμάτων με μοριακές μεθόδους (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης,-PCR-, πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού, -RFLP-, αλληλούχιση) χρησιμοποιείται αυτή η περιοχή (5'- 16S- ITS1- 23S- ITS2- 5S- 3') και ως επί το πλείστον το γονίδιο 16SrRNA. Η περιοχή αυτή είναι η πλέον αποδεκτή για διάγνωση και ταξινόμηση, διότι: α) είναι μια υψηλά συντηρημένη γενετικά περιοχή, που επιτρέπει το σχεδιασμό



εκκινητών PCR για ανίχνευση φυτοπλάσμάτων (γενικευμένοι εκκινητές) και για διαχωρισμό/ταξινόμησή τους σε ομάδες και είδη (εξειδικευμένοι εκκινητές) και β) επαναλαμβάνεται στο γονιδίωμα των φυτοπλάσμάτων (2 φορές), δηλαδή υπάρχουν δύο οπερόνια ριβοσωμικού γονιδίου.

Στην παρούσα εργασία, για τη διάγνωση, με χρήση PCR, πιθανών φυτοπλασματικών προσβολών στα δείγματα πυρηνοκάρπων επιλέχτηκε να γίνει ενίσχυση τμήματος του ριβοσωμικού γονιδίου. Στη διεθνή βιβλιογραφία για τη μοριακή ανίχνευση και ταξινόμηση των φυτοπλάσμάτων (και γενικά των προκαρυωτικών οργανισμών) χρησιμοποιούν προς ενίσχυση το 16S rRNA γονίδιο (Lee *et al.*, 1993b, Schneider *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1998; Seemuller *et al.*, 1998), ενώ τα τελευταία χρόνια διερευνάται και η δυνατότητα χρησιμοποίησης άλλων περιοχών, όπως τα γονίδια 23SrRNA, *rp*, *tuf*, *secA* και η διαγονιδιακή μη μεταγραφόμενη περιοχή μεταξύ 16S- 23SrRNA (ITS1). Η ανίχνευση στις διαφορετικές αυτές περιοχές, αποτελεί συμπληρωματικό εργαλείο στη διάγνωση και κατάταξη των φυτοπλάσμάτων (Gundersen *et al.*, 1994; Lee, *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2006; Martini *et al.*, 2007).

Επομένως, για την ανίχνευση φυτοπλασματικών προσβολών στα δείγματά μας πραγματοποιήθηκε, αρχικά, PCR με το ζεύγος των γενικευμένων εκκινητών P1/P7, απ' όπου και προέκυψαν προϊόντα με το αναμενόμενο μέγεθος (1800 bp). Τα 28 δείγματα που έδωσαν θετική αντίδραση PCR P1/P7 επεξεργάστηκαν εκ νέου με PCR και τα ζεύγη των γενικευμένων εκκινητών F2n/R2 και U4/U5 και το ζεύγος των εξειδικευμένων εκκινητών ECA1/ECA2. Και τα 28 δείγματα έδωσαν θετική αντίδραση PCR U4/U5 (μέγεθος προϊόντων 942 bp), ενώ τα 26 ήταν θετικά στη PCR R16F2n/R16R2 (1248 bp). Η διαφορά αυτή προφανώς οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση DNA στο τελικό προϊόν της PCR R16F2n/R16R2 και στην τελικώς μη ορατή αποτύπωση στη πηκτή αгарόζης. Όσο αφορά την εξειδικευμένη για το ESFY φυτόπλασμα PCR ECA1/ECA2, δεν πήραμε προϊόν. Το αποτέλεσμα αυτό δεν συμβαδίζει με τα υπόλοιπα αποτελέσματα της εργασίας, διότι με τη χρήση των μεθόδων των RFLP και της αλληλούχισης, αποδεικνύεται η παρουσία του φυτοπλάσματος ESFY στα δείγματα μας. Η αδυναμία να πάρουμε προϊόν σ' αυτή τη PCR ίσως να έχει να κάνει με τη μεγάλη εξειδίκευση των εκκινητών αυτών, καθώς και με το γεγονός ότι υβριδίζουν σε περιοχή του γονιδιώματος που περιλαμβάνει ένα υποθετικό γονίδιο νιτρορεδουκτάσης. Η συγκεκριμένη περιοχή είναι μη εκφραζόμενη

και αποτελεί μέρος ενός ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου (ORF) με άγνωστη λειτουργία, δηλαδή μια περιοχή που πιθανόν δεν παρουσιάζει γενετική σταθερότητα.

Με την παραπάνω διαδικασία (PCR) ανιχνεύτηκε η ύπαρξη φυτοπλάσματος στα δείγματα, αλλά για την ταυτοποίηση του φυτοπλάσματος (δηλαδή σε ποια ομάδα ή είδος ανήκει) εφαρμόστηκε η μέθοδος των RFLP και της αλληλούχισης. Οι παραπάνω μέθοδοι δεν είναι απαραίτητο και οι δύο να ακολουθούν τη διαδικασία της PCR, αλλά και η κάθε μία μόνη της με βάση το προϊόν της PCR, μπορούν να δώσουν αποτέλεσμα για την ταυτοποίηση των ειδών.

Όσον αφορά τα RFLP χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα περιοριστικά ένζυμα για να γίνει η πέψη των προϊόντων PCR R16F2n/R16R2. Οι ομάδες φυτοπλάσμάτων που προσβάλλουν πυρηνόκαρπα και ήταν πιθανόν να ανιχνευτούν στο πείραμα είναι οι: I (Aster yellows group), III (X disease group) και X (Apple proliferation group). Τα ένζυμα *MseI* και *RsaI* έχουν διαφορετικά προφίλ για καθεμιά από τις παραπάνω ομάδες και επομένως μπορούν να τις διαχωρίσουν. Το *HinfI* μπορεί να διαχωρίσει την I από τις III και X. Επίσης, με τα *RsaI* και *TaqI* γίνεται διάκριση των τριών φυτοπλάσμάτων που ανήκουν στην ομάδα X (AP, PD, ESFY). Το *RsaI* ξεχωρίζει το *Ca. Phytoplasma mali* από τα υπόλοιπα, ενώ το *TaqI* ξεχωρίζει και τα τρία είδη μεταξύ τους. Μετά από την εφαρμογή κάθετης ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και σύγκριση των προφίλ των ενζύμων με βάσεις δεδομένων του USDA, ταυτοποιήθηκε η παρουσία του *Ca. Phytoplasma prunorum* που ανήκει στην ομάδα X-B και προκαλεί την ασθένεια του Ευρωπαϊκού Ίκτερου των Πυρηνοκάρπων.

Όσον αφορά τη διαδικασία της αλληλούχισης, αυτή πραγματοποιήθηκε στον προϊόν PCR (P1/P7), δηλαδή περιλάμβανε το ριβοσωμικό γονίδιο 16S, την περιοχή μεταξύ των 16S-23S ριβοσωμικών γονιδίων και μέρος του 23S γονιδίου. Τα πέντε δείγματα στα οποία έγινε η αλληλούχιση, είχαν το ίδιο γονιδίωμα και λόγω του γεγονότος ότι όλα τα δείγματα έδωσαν το ίδιο RFLP προφίλ, συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχουν διαφορές σ' αυτή την περιοχή του γονιδιώματος όλων των δειγμάτων. Επιπλέον, ακολούθησε η σύγκριση των αλληλουχιών των δειγμάτων με τις αλληλουχίες που καταγράφονται στη βάση δεδομένων του NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Βάση αυτής, οι απομονώσεις μας παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας (>97,5% που είναι και το όριο για κατάταξη των φυτοπλάσμάτων στο ίδιο είδος) με τις διεθνείς απομονώσεις που κατατάσσονται στην X ομάδα. Λόγω της γνωστής γενετικής και βιολογικής συγγένειας των φυτοπλάσμάτων της X ομάδας (AP, PD, ESFY), ο διαχωρισμός τους μπορεί να γίνει

με βάση τους ξενιστές (Ahrens et al., 1993; Seemuller et al., 1998; Seemuller and Schnaider, 2004). Ο Ευρωπαϊκός 'Ικτερος των Πυρηνοκάρπων προσβάλλει όλα τα είδη *Prunus*, ενώ οι ασθένειες 'σκούπα της μάγισσας της μηλιάς' και 'παρακμή ή καχεξία της απιδιάς' έχουν ανιχνευτεί μόνο σε είδη *Malus* και *Pyrus* αντίστοιχα. Σύμφωνα με τους Jarausch et al. (2000a) το διαφορετικό εύρος των ξενιστών τους οφείλεται στα διαφορετικά έντομα- φορείς. Και επειδή η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε είδη *Prunus*, αναλόγως προκύπτει και η ταυτοποίηση του φυτοπλάσματος ESFY στα δείγματα μας.

## 4.2 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα λοιπόν, καταδεικνύουν την παρουσία του φυτοπλάσματος σε ποσοστό 57,5% και 50% των δειγμάτων δαμασκηνιάς και βερικοκιάς, παρά το ότι όλα σχεδόν παρουσίαζαν συμπτώματα. Αυτό πιθανώς οφείλεται στον μικρό αριθμό φυτοπλασματικών κυττάρων στους ιστούς- επομένως και μη ανιχνεύσιμους- που πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι η μετακίνηση των φυτοπλάσμάτων από τους παλαιούς στους ετήσιους βλαστούς παρεμποδίζεται από μορφολογικά στοιχεία του ηθμού και ότι η αποδόμηση του φλοιώματος των βλαστών αυτών περιορίζει τον αριθμό των φυτοπλάσμάτων. Επίσης, η εμφάνιση των συμπτωμάτων κατά τους χειμερινούς μήνες (όπου το φυτόπλασμα συνήθως μετακινείται στον ηθμό των ριζών των δέντρων) δικαιολογείται με την δραστηριότητα κάποιων απομεινάντων ηθμαγγειώδων δεσμίδων των παλαιών βλαστών κάτω από ήπιες κλιματικές συνθήκες (Jarausch et al., 1999). Με βάση τα παραπάνω, θεωρείται επιβεβλημένη η λήψη δειγμάτων από διαφορετικά σημεία της κόμης των δέντρων και από τις ρίζες αυτών κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών, αλλά και η επανάληψη της δειγματοληψίας κατά τακτά χρονικά διαστήματα.

Η ταυτοποίηση του ESFY στη χώρα μας στηρίχτηκε μέχρι τώρα στη μετάδοση με εμβολιασμό (Συργιαννίδης κ.α., 1978), στη χορήγηση υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης (Tsialis and Rumbos, 1980) και στην ηλεκτρονική μικροσκοπία (Rumbos and Bosalidis, 1985). Επομένως, η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη μελέτη που ανιχνεύεται η ασθένεια ESFY με μοριακές μεθόδους στην Ελλάδα. Επίσης, καταδεικνύονται δύο ευαίσθητες, αξιόπιστες και γρήγορες μέθοδοι για τη διάγνωση του ESFY που μπορούν να διευκολύνουν την επιδημιολογική μελέτη της ασθένειας στη χώρα μας, δεδομένου ότι μέχρι σήμερα ελάχιστα είναι γνωστά.

Τέλος, κρίνεται απαραίτητο να γίνουν εκτενέστερες δειγματοληψίες από διάφορα είδη *Prunus* (με συμπτώματα και όχι) και από περισσότερες περιοχές της Ελλάδας, ώστε να γίνει μια πλήρη καταγραφή εξάπλωσης της ασθένειας στον ελλαδικό χώρο και ανιχνευθεί η πηγή προέλευσης της μετάδοσης (πιθανός φορέας και ταυτοποίηση αυτού ή ασθενές πολλαπλασιαστικό υλικό) του φυτοπλάσματος στα πυρηνόκαρπα που καλλιεργούνται ή ευδοκιμούν στη χώρα μας..

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ/ ΠΙΝΑΚΩΝ**

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ		σελ.
ΕΙΚΟΝΕΣ		
<b>Εικόνα 1.1</b>	Κάθετη τομή σε ηθμό του φυτού αλεξανδρινού προσβεβλημένου από φυτόπλασμα. Πολυάριθμα φυτοπλασματικά κύτταρα διακρίνονται στα στοιχεία του ηθμού στην πάνω σειρά, ενώ το στοιχείο του ηθμού που βρίσκεται κάτω αριστερά είναι φανερά απαλλαγμένο από φυτοπλασματικά κύτταρα (ηλεκτρονική μικροσκοπία x6000).	9
<b>Εικόνα 1.2</b>	Σχηματική απεικόνιση της οργάνωσης των ριβοσωμικών γονιδίων στο γονιδίωμα των φυτοπλάσμάτων.	10
<b>Εικόνα 1.3</b>	Φυλογενετικό δέντρο του γένους ' <i>Candidatus Phytoplasma</i> ' βασισμένο στην ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου	15
<b>Εικόνα 1.4</b>	Εξάπλωση του φυτοπλάσματος ' <i>Ca. P. prunorum</i> ' σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φυτοπροστασίας. Στην Ελλάδα φαίνεται ότι έχει περιορισμένη διάδοση	22
<b>Εικόνα 1.5 (α)</b>	Πρώιμη έκπτυξη των βλαστοφόρων οφθαλμών σε δέντρο αμυγδαλιάς. Το σύμπτωμα εντοπίζεται εδώ σε ένα μόνο βραχίονα στην αριστερή πλευρά του δέντρου που φέρει τα νεαρά φύλλα	23
<b>Εικόνα 1.5 (β)</b>	Καστανός μεταχρωματισμός και νέκρωση του καμβίου σε βλαστό Πυρηγόκαρπου	23
<b>Εικόνα 1.5 (γ)</b>	Χαρακτηριστικό σύμπτωμα χλώρωσης και καρουλιάσματος των φύλλων σε βλαστό βερικοκιάς	23
<b>Εικόνα 1.5 (δ)</b>	Αρσενικό και θηλυκό άτομο του εντόμου <i>Cacopsylla pruni</i> , φορέα της ασθένειας του Ευρωπαϊκού Ικτέρου των Πυρηνοκάρπων	23
<b>Εικόνα 2.1.1</b>	Δέντρο δαμασκηλιάς με εμφανή το σύμπτωμα της πρώιμης έκπτυξης των φυλλοφόρων οφθαλμών (αριστερά), σε σύγκριση με δέντρο που έχει φυσιολογική έκπτυξη των ανθοφόρων οφθαλμών (δεξιά)	28
<b>Εικόνα 2.1.2</b>	Οπωρώνας με δαμασκηλιές απ' όπου πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία την εποχή της έκπτυξης των ανθοφόρων οφθαλμών πυρηνοκάρπων, όπου στο κέντρο μπορεί να διακριθεί δέντρο με το σύμπτωμα της πρώιμης έκπτυξης των φυλλοφόρων οφθαλμών	28
<b>Εικόνα 2.1.3</b>	Βλαστός δαμασκηλιάς που φέρει πρώιμη έκπτυξη φύλλων, πριν τη φυσιολογική έκπτυξη των ανθέων	29
<b>Εικόνα 2.1.4</b>	Δέντρο δαμασκηλιάς με εμφανές το σύμπτωμα της πρώιμης έκπτυξης των φύλλων σε ένα μέρος των βλαστών του, ενώ το υπόλοιπο ανθοφορεί φυσιολογικά	29
<b>Εικόνα 2.2.1</b>	Ομογενοποιητής χειρός και σακουλάκια τύπου ELISA (BIOREBA) που χρησιμοποιήθηκαν στην ομογενοποίηση του φυτικού ιστού κατά την απομόνωση του DNA βάση του πρωτοκόλλου Maixner	31
<b>Εικόνα 2.2.2</b>	Απεικόνιση της θέσης των εκκινητών στο οπερόνιο των ριβοσωμικών γονιδίων των φυτοπλάσμάτων καθώς και το μήκος των προϊόντων της κάθε αντίδρασης PCR	34
<b>Εικόνα 2.2.3</b>	Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής του γονιδιώματος που αλληλουχήθηκε από τους Jarausch et al. (2000) του φυτοπλάσματος που προκαλεί την ασθένεια 'σκούπα της μάγισσας' της μηλιάς (16Sr X-A), των θέσεων που υβριδίζουν οι εκκινητές ECA1, ECA2, καθώς και του μήκους των προϊόντων της PCR. Τα χρωματιστά πλαίσια υποδηλώνουν τρία θεωρητικά ORF (ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης)	34
<b>Εικόνα 2.2.4</b>	Κάθετης ηλεκτοφόρηση. Με το μπλέ χρώμα (ρυθμιστικό διάλυμα	38

	φόρτωσης) διακρίνονται τα δείγματα στα πηγαδάκια του πηγματος	
<b>Εικόνα 3.1</b>	Ηλεκτροφόρημα προϊόντων PCR με χρήση των εκκινητών P1/P7 σε πηκτή αгарόζης	43
<b>Εικόνα 3.2</b>	RFLP ανάλυση των προϊόντων της PCR R16F2n/R16R2 στα οποία έγινε πέψη με το ένζυμο <i>MseI</i> .	46
<b>Εικόνα 3.3</b>	RFLP ανάλυση των προϊόντων της PCR F2n/R2 στα οποία έγινε πέψη με το ένζυμο <i>RsaI</i> .	46
<b>Εικόνα 3.4</b>	RFLP ανάλυση των προϊόντων της PCR F2n/R2 στα οποία πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο	47
<b>Εικόνα 3.5</b>	RFLP ανάλυση των προϊόντων της PCR F2n/R2 στα οποία πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο <i>RsaI</i> και <i>TaqI</i>	47
<b>Εικόνα 3.6</b>	Νουκλεοτιδική αλληλουχία του δείγματος 9842 που περιλαμβάνει μέρος του γονιδίου 16S rRNA, την ITS1 περιοχή και μέρος γονιδίου 23S rRNA	50
<b>Εικόνα 3.7</b>	Προφίλ των 15 περιοριστικών ενζύμων του φυτοπλάσματος 'Ca. P. prunorum' σε εικονικό πηγμα agarόζης, έπειτα από <i>in silico</i> ανάλυση	54
<b>ΠΙΝΑΚΕΣ</b>		
<b>Πίνακας 1.1</b>	Κατάταξη των φυτοπλάσμάτων σε 15 ομάδες που περιλαμβάνουν συνολικά 20 είδη, βάση της Bertaccini A.	16
<b>Πίνακας 2.1.1</b>	Αριθμός και είδος δειγμάτων που συλλέχθηκαν από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές	27
<b>Πίνακας 2.2.1</b>	Τα ζεύγη των εκκινητών (ίδιο χρώμα) που χρησιμοποιήθηκαν στην ενίσχυση τμημάτων του DNA των φυτοπλάσμάτων, η αλληλουχία τους, η θερμοκρασία υβριδισμού (Tm) του κάθε εκκινητή και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR για κάθε ζεύγος	33
<b>Πίνακας 2.2.2</b>	Ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη των προϊόντων της PCR R16F2n/R16R2, η αλληλουχία νουκλεοτιδίων που αναγνωρίζουν αυτά, το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για το κάθε ένζυμο και η θερμοκρασία στην οποία έγινε η επώαση της αντίδρασης	37
<b>Πίνακας 2.2.3</b>	Τα δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση του γενώματος τους και η γεωγραφική περιοχή από την οποία προέρχονται	39
<b>Πίνακας 3.1</b>	Φυτά στα οποία ανιχνεύτηκε φυτόπλασμα στο σύνολο των δειγμάτων	45
<b>Πίνακας 3.2</b>	Σύγκριση μεταξύ της αλληλουχίας 9842 και όλων των καταχωρημένων αλληλουχιών στη βάση δεδομένων NCBI/Genbank που αφορούν το 'Ca. P. prunorum'	51
<b>Πίνακας 3.3</b>	Σύγκριση μεταξύ της αλληλουχίας 9842 και αλληλουχιών κατά χωρημένων στη βάση δεδομένων NCBI/Genbank που αφορούν τα 'Ca. P. mali' και 'Ca. P. pyri'	53

## **V. Βιβλιογραφία**

### **5.1 Διεθνής Βιβλιογραφία**

- Ahrens U., Seemüller E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* **82**:828-832.
- Ahrens U., Lorenz, K., Seemüller E. 1993. Genetic diversity among mycoplasma-like organisms associated with stone fruit diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**: 686-691.
- Agrios, G. 1971. Premature foliation, cambial zone discoloration and stem pitting of peach and apricot in Greece. *Plant Disease Report* **55**: 1049-1053.
- Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S., Radek A. J., Shevchenko D., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J., Hogenhout S., 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* **188**: 3682- 3696.
- Bertaccini A., 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* **12**: 673-689.
- Carraro L., Loi N., Ermacora P., Osler R., 1998a. High tolerance of European plum varieties to plum leptonecrosis. *European Journal of Plant Pathology*, **104**: 141- 145.
- Carraro L., Osler, R., Loi N., Ermacora P., Reffati E., 1998b. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *Journal of Plant Pathology* **80**: 233- 239
- Carraro L., Ferrini F., Ermacora P., Loi N., 2002. Role of wild *Prunus* species in the epidemiology of European stone fruit yellows. *Plant Pathology*, **51**: 513- 517.
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P., 2001. Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant pathology* **80**: 233- 239.
- Carraro L., Ferrini F., Ermacora P., Loi, N., 2004. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma to *Prunus* species by using vector and graft transmission. *Acta Horticulturae*, **657**: 449- 453.
- Carraro L., Osler R. European stone fruit yellows: a destructive disease in the Mediterranean basin, <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/b45/03001782.pdf> [Access date: 30/10/2009]
- Davis R., Lee I.M., 1993. Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* **83**:1008-11
- Delic D., Martini M., Ermacora P., Carraro L., Myrta, A., 2005. First report of fruit tree phytoplasmas and their psyllid vectors in Bosnia and Herzegovina. *Journal of Plant Pathology*, **87**: 149- 150.
- Deng S, Hiruki C., 1991. Genetic relatedness between two non-culturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* **81**:1475- 79.
- Desvignes J., Cornaggia D., Grasseau N. 1999. Diseases due to phytoplasmas. In *Virus diseases of fruit trees*, CTIFL, Centre imprim., 116-139.
- Doi Y.M., Teranaka M., Yora K., Asuyama H., 1967. Mycoplasma or PTL-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf,



- potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches'-broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **33**: 259- 266.
- Dosba F., Lansac M., Mazy K., Garnier M. and Eyquard J.P., 1991. Incidence of different diseases associated with mycoplasma-like organisms in different species of *Prunus*. *Acta Horticulturae*, **283**: 331-20.
- EPPO/CABI, 1997. *Quarantine pests for Europe*. 2<sup>nd</sup> edition. CABI International, Wallingford, UK.
- Fialova R., Navratil M., Valova P., Lauterer P., Kocourek F., Poncarova- Vorackova Z., 2004. Epidemiology of European stone fruit yellows phytoplasma in the Czech republic. *Acta Horticulturae* **657**:483- 487.
- Firrao G, Gobbi E, Locci R., 1993. Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* **83**:602-7.
- Firrao G., Gibb K., and Streten C., 2005. Short taxonomic guide to the genus '*Candidatus Phytoplasma*'. *Journal of Plant Pathology* **87**: 249- 263.
- Giunchedi L., Marani F., Credi R., 1978. Mycoplasma-like bodies associated with plum decline (leptoncrosis). *Phytopathologia Mediterranea*, **17**: 205- 209.
- Goodwin P.H., Xue B.G., Kuske C.R., Sears MK., 1994. Amplification of plasmid DNA to detect plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *Annual Applied Biology* **124**: 27-36
- Gundersen D.E., Lee I.M. Schff D.A., Harisson N., Chang C.J., Davis R. Kingsbury, D.T., 1994. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X- disease and related phytoplasmas). *International Journal of Systemic Bacteriology* **46**: 64- 75.
- Harrison NA., 1996. PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. *Plant Disease* **80**: 263-69
- Harrison N.A., Richardson P.A., Kramer J.B., Tsai J.H, 1994. Detection of the mycoplasma-like organism associated with lethal yellowing disease of palms in Florida by polymerase chain reaction. *Plant Pathology* **43**: 998-1008
- Hodgetts J., Boonham N., Mumford R., Harrison N., Dickinson M., 2008. Phytoplasmas phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of '*Canidatus Phytoplasma*'. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* **58**: 1826- 1837.
- Hogenhout S., Oshima K., Ammar E.D., Kakizawa S., Kindom H., Namba S., 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* **9**: 403- 423.
- Jarausch W., Saillard C., Dosba F., Bovy J.M., 1994. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Applied Environmental Microbiology* **60**: 2916-23.
- Jarausch W., Jarausch-Wehrheim B., Danet J.L., Broquaire J.M., Dosda E., Saillard C., Garnier M., 1998. Detection and indentification of European stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 209-217.

- Jarausch W., Lansac M., Dosba F., 1999. Seasonal colonization pattern of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma in different Prunus species detected by specific PCR. *Journal of Phytopathology* **147**: 47-54.
- Jarausch W., Saillard C., Broquaire J.M., Garnier M., Dosda, F., 2000a. PCR-RFLP and sequence analysis of non-ribosomal fragment for genetic characterization of European stone fruit yellows phytoplasmas infecting various Prunus species. *Molecular and Cellular Probes*, **14**: 171-179.
- Jarausch W., Eyquard J.P., Lansac M., and Dosba F., 2000b. Susceptibility and tolerance of new french Prunus domestica cultivars to European stone fruit yellows phytoplasmas. *Journal of Phytopathology* **148**: 489- 493.
- Jarausch W., Danet J.L., Labonne G., Dosba F., Broquaire J.M., Saillard C., Garnier, M., 2001. Mapping of the spread of apricot chlorotic leaf roll (ACLR) in southern Europe and implication of Cacopsylla pruni as a vector of European stone fruit yellows (ESFY) phytoplasmas. *Plant Pathology*, **50**: 782- 790.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team- Phytoplasma taxonomy group, 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall- less, non- helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**: 1243- 1255.
- Kison H., Schneider B., Seemuller E., 1994. Restriction fragment length polymorphisms within the apple proliferation mycoplasma-like organism. *Journal of Phytopathology* **141**: 395-401.
- Ko H., Lin C., 1994. Development and application of cloned DNA probes for a mycoplasma-like organism associated with sweetpotato witches'- broom. *Phytopathology* **84**: 463- 73.
- Kuske C., Kirkpatrick B., 1992. Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma-like organisms and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *International Journal of Systemic bacteriology*, **42**: 226-33.
- Landi F., Pradini A., Paltimieri S., Mori N., Bertaccini A., 2007. Detection of different types of phytoplasmas in stone fruit orchards in northern Italy. *Bulletin of Insectology* **60**: 163-164.
- Lavina A., Sabate J., Garcia- Chapa M., Batlle A., Torres E., 2004. Occurrence and epidemiology of European stone fruit yellows phytoplasma in Spain. *Acta Horticulturae*, **657**: 489- 494.
- Lee I.M., Bertaccini A., Vibio M., Gundersen D.E., 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* **85**:728-35.
- Lee I.M., Davis R.E., Chen T.A., Chiykowski L.N., Fletcher J., 1992. A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. *Phytopathology* **82**:977-86.
- Lee I.M., Davis R.E., Sinclair W.A., DeWitt N.D., Conti M., 1993a. Genetic relatedness of mycoplasma-like organisms detected in Ulmus spp. in USA and Italy by means of DNA probes and polymerase chain reactions. *Phytopathology* **83**:829-33.
- Lee I.M., Hammond R.W., Davis R.E., Gundersen D.E., 1993b. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, **83**: 834-42.

- Lee I.M., Gundersen D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16SrRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systemic Bacteriology*, **48**: 1153-69.
- Lee I.M., Davis R.E., Dawn E., 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, **54**: 221- 55.
- Lee I.M., Zhao Y., Bottner K., 2006. SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellow phytoplasma group. *Molecular Cell Probes* **20**: 87-91.
- Lichou J., 1999. Main reasons for the decline of apricot. *Klosterneuburger Mitteilungen* **49**: 209-210.
- Liefting L., Andersen M., Beever R., Gardner R., Foster L., 1996. Sequence heterogeity in the two 16S rRNA genes of Phormium yellow leaf phytoplasma. *Applied Environmental Microbiology*, **62**: 3133-39.
- Lim P., Sears B., 1989. 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology*, **171**: 5901-6.
- Lorenz K.H., Dosba F., Poggi Pollini C., Llacer G., and Seemuller E., 1994. Phytoplasma diseases of Prunus species in Europe are caused by genetically similar organisms. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* **101**: 241- 250.
- Lorenz K.H., Schneider B., Ahrens U., Seemuller E., 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* **85**: 771-76.
- Maixner M., Ahrens U., Seemuller E., 1995. Detection of the German grapevine yellows MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procerure. *European Journal of Plant Pathology*, **101**: 241-250.
- Maniloff J., 1996. The minimal cell genome. In: On being the right size. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.93, 1004-1006
- Martini M., Lee I.M., Bottner K., Zhao Y., Botti S., Bertacini A., Harrison N., Carrao L., Marcone C., Khan A., Osler R., 2007. Ribosomal protein gene- based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, **57**: 2037- 2051.
- Marcone C., Ragozzino A., Seemuller E., 1996. Association of phytoplasmas with the decline of European hazel in southern Italy. *Plant Pathology* **45**: 857- 863.
- Marcone C., Neimark H., Ragozzino A., Lauer U. and Seemuller E., 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Bacteriology*, **89**: 805- 810.
- Marcone C., Seemuller E., 2001. A chromosome map of the European stone fruit yellows phytoplasma. *Microbiology*, **147**: 1213-1221.
- Mehle N., Brizn J., Boben J., Hren M., Petrovic N., Gruden K., Dreo T., Zezlina I., Selja G., 2007. First report of 'Candidatus Phytoplasma mali' in Prunus avium, P. armeniaca and P. domestica. *New Disease reports*
- Morvan G. (1977). Apricot chlorotic leaf roll. *EPPO Bulletin* **7**: 37-55.

- Musetti R., Favali M.A., 2004. Microscopy techniques applied to the study of phytoplasma diseases: Traditional and innovative methods. In *Current Issues on Multidisciplinary Microscopy Research and Education*. <<http://www.formatex.org/microscopy2/papers/72-80.pdf>>. [Access date: 27/09/2009].
- Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung H.Y., Wei W., Suzuki S., Arashida R., Nakata D., Miyata S., Ugaki M., Namba S., 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant- pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, **36**: 27- 29.
- Paltinieri S., Martini M., Stefani E., Pondrelli M., Bertaccini A., Fideghelli C., 2001. Phytoplasma infection in peach and Cherry in Italy. ISHS Acta Horticulturae 550: XVIII International Symposium on Virus and Virus- like diseases of temperate Fruit Crops- Top Fruit Diseases
- Poggi Pollini C., Giunchedi L., Gambin E., 1993. Presence of mycoplasma- like organisms in peach trees in Northern Central Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, **32**: 188- 192
- Poggi Pollini C., Bissani R., Giunchedi L., 2001. Occurrence of European stone fruit yellows phytoplasmas infection in peach orchards in Northern- Central Italy. *Journal of Phytopathology* **149**: 725- 730.
- Ramel M.E., Gugerli P., Bourquin L., de Mayer J., Sshaub L., 2001. Caracterisation de l' enrroulement chlorotique de l' abricotier et detection du phytoplasmas ESFY en Suisse romande. *Revue suisse de viticulture, arboriculture, horticulture*, **33**: 279- 286.
- Rumbos I., Bosabalidis A., 1985. Mycoplasma-like organisme associated with decline plum trees in Greece. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **92**:47-54.
- Schaff D.A., Lee I.M., Davis R.E., 1992. Sensitive detection and identification of mycoplasmalike organisms by polymerase chain reactions. *Biochemical and Biophysical Research Community*, **186**:1503-9.
- Schneider B., Seemuller E., 1994. Presence of two sets of ribosomal genes in Phytopathogenic Mollicutes. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3409-3412.
- Schneider B., Ahrens U., Kirkpatrick B.C., Seemuller E., 1993. Classification pf plant- pathogenic mycoplasma- like organisms using restriction- site analysis of PCR- amplified 16S rRNA. *Journal of General Microbiology*, **139**: 519- 527.
- Schneider B., Seemiiller E., Smart C.D., Kirkpatrick BC., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasmalike organisms or phytoplasmas. In *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology*, ed. R Razin, JG Tully, 1:369-80. San Diego, CA: Academnic
- Seemuller E., Foster J., 1995. European Stone Fruit Yellows. In: *Compendium of Stone Fruit Diseases*. APS Press, 59-60.
- Seemuller E., Marcone, C., Lauer,U., Ragozzino, A. Goschl, M., 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* **80**: 3-26.
- Seemuller E. Schneider B., 2004. 'Candidatus Phytoplasma mall', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Canidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**: 1217- 1226.

- Smart C.D., Schneider B., Blomquist C.L., Guerra L.J., Harrison N.A., 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of 16S-23S rRNA spacer region. *Applied Environmental Microbiology*, **62**: 2988-33.
- Stryer L. *Biochemistry*. Fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York
- Tedeschi R., Lauter P., Bruzeti L., Tota F., Alma A., 2009. Composition, abundance and phytoplasma infection in the hawthorn psyllid fauna of northwestern Italy. *European Journal of Plant Pathology*, **123**: 301-310.
- Thebaud G., Sauvion N., Chadoeuf J., Durifis A., Labonne G., 2006. Identifying risk factors for European Stone Fruit Yellows from a survey. *Phytopathology*, 96: 890-899
- Torres E., Martin M., Paltinieri S., Vila A., Masalles R., Bertaccini A., 2004. Spreading of ESFY phytoplasmas in stone fruit in Catalonia (Spain). *Journal of Phytopathology* **152**: 432-437.
- Tsialis D., Rumbos I., 1980. New observations of Peach Decline diseases in Greece and its etiology. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **15**: 279- 283.
- Valiunas D., Jomantiene R., Davis R.E., 2009. Establishment of a new phytoplasma subgroup, 16SRI-Q, to accommodate a previously undescribed phytoplasma found in diseased cherry in Lithuania. *Journal of Plant Pathology*, 91: 71- 75
- Verdin E., Salar P., Danet J., Gelie J., Garnier M., Choueiri E., Jreijiri F. Zammar S., 2004. Proc. XIX International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases, Acta Hortorticularae, **657**, ISHS 2004.
- Wei W., Davis R.E., Lee I.M., Zhao Y., 2007. Computer- simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**: 1855- 1876.
- Weintraub P.G., Beanland L., 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51: 91-111.
- Whitcomb R.F. Tully E.D., 1989. *The mycoplasmas*, vol. V. San Diego: academic Press, Inc.

## 5.2. Ελληνική Βιβλιογραφία

- Συργιαννίδης Γ., Μάινου Α., Μουχτούρη- Στυλιανίδου Ε., 1978. Εμφάνισης ασθένειας επί Ιαπωνικών ποικιλιών δαμασκηneas εν Ελλάδι ομοιάζουσας προς τοιαύτην chlorotic leaf roll: μετάδοσις ταυτης δι' εμβολιασμού. *Γεωργική Έρευνα II*: 208-217.

Locality (English)	Host plant	Lat.	Lon.
Ηλείας, Ileia (province)	Prunus armeniaca	37.704510	21.570679
Ημαθίας, Imathia (province)	Prunus salicina	40.605959	22.143012
Καρδίτσας, Karditsa	unspecified species	39.364030	21.921406
Κορινθίας, Corinthia (province)	Prunus armeniaca	37.995589	22.523481
Κορινθίας, Corinthia (province)	Prunus amygdalus	37.995589	22.523481
Λαρίσης, Larissa	Prunus amygdalus	37.854787	23.772123
Μαγνησίας, Magnesia (prefectur	Prunus salicina	39.268619	22.762884
Μαγνησίας, Magnesia (prefectur	unspecified species	39.268619	22.762884
Μαγνησίας, Magnesia (prefectur	Prunus armeniaca	39.268619	22.762884
Μαγνησίας, Magnesia (prefectur	Prunus amygdalus	39.268619	22.762884
Μαγνησίας, Magnesia (prefectur	Prunus persica	39.268619	22.762884
Πέλλας, Pella	Prunus salicina	40.914804	22.143022