



Ελληνική Δημοκρατία
Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό
Ίδρυμα Ηπείρου

Γενική Φυτοπαθολογία Εργαστήριο

Ενότητα 11: Φυτοπαθολογική βακτηριολογία

Δρ Δήμητρα Ζωάκη-Μαλισιόβα
Καθηγήτρια Εντομολογίας



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Τμήμα: Τεχνολόγων Γεωπόνων

Τίτλος Μαθήματος: Γενική Φυτοπαθολογία Εργαστήριο

Ενότητα 11: Φυτοπαθολογική βακτηριολογία

Όνομα Καθηγητή: Δρ Δήμητρα Ζωάκη-Μαλισιόβα

Βαθμίδα Καθηγητή: Καθηγήτρια

Άρτα, 2015



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.





Χρηματοδότηση

- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «**Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση**» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο ΤΕΙ Ηπείρου**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Φυτοπαθολογική βακτηριολογία

Σκοποί ενότητας

- Διάκριση των φυτοπαθογόνων ειδών, που ανήκουν στα βακτήρια.
- Χειρισμός βακτηρίων στο εργαστήριο.

Περιεχόμενα ενότητας

- Βακτήρια.
- Χρώση βακτηρίων.
- Φυτοπαθογόνα βακτήρια.
 - Διαίρεση Gracilicutes (Gram-)
 - Διαίρεση Firmicutes (Gram+)
- Διάγνωση φυτοπαθογόνων βακτηρίων.



Βακτήρια



Βακτήρια (1)

- **Βακτήρια:** Στερούνται πυρηνικής μεμβράνης (προκαρυωτικοί οργανισμοί)
- **Ευκαρυωτικοί (ΜΕ πυρηνική μεμβράνη):** πρωτόζωα, φύκη, μυξομύκητες, μύκητες
- **Στην ομάδα των βακτηρίων ανήκουν και οι:**
 - **Ρικέτσιες & Χλαμύδια** (με υποχρεωτικό ενδοκυτταρικό τρόπο διαβίωσης)
 - **Σπειροχαίτες** (με χαρακτηριστική κυτταρική κατασκευή)
 - **Μυκοπλάσματα** (στερούμενα καθορισμένου κυτταρικού τοιχώματος)



Βακτήρια (2)

- **Μονοκύτταροι μικροσκοπικοί οργανισμοί**
- **Αναπαράγονται με εγκάρσια διαίρεση (διχοτόμηση - σχιζομύκητες)**
- Συχνά αναφέρονται και ως μικρόβια
- Βακτηριακό κύτταρο: **προκαρυωτικό**
- Κατά τη διαίρεσή του δεν γίνεται μίτωση
- Δεν έχει μιτοχόνδρια, ορατό ενδοπλασματικό δίκτυο και σωμάτια Golgi

βακτηρία = ραβδί, μαγκούρα



Φυτοπαθογόνα βακτήρια ανώτερων φυτών

Παλαιά (γέννη)

- *Agrobacterium*
- *Corynebacterium*
- *Erwinia*
- *Pseudomonas*
- *Streptomyces*
- *Xanthomonas*

ΣΗΜΕΡΑ (γέννη)

- *Agrobacterium*
- *Corynebacterium*
- *Erwinia*
- *Pseudomonas*
- *Streptomyces*
- *Xanthomonas*
- *Acidovorax*
- *Bacillus*
- *Clavibacter*

ΣΗΜΕΡΑ (γέννη)

- *Clostridium*
- *Curtobacterium*
- *Gluconobacter*
- *Pantoea*
- *Ralstonia*
- *Rathayibacter*
- *Rhodococcus*
- *Xyllela*
- *Xylophilus*



Που βρίσκονται τα βακτήρια?

- Στο νερό, στο έδαφος, στον αέρα, στις τροφές, στα φυτά, στον άνθρωπο, στα ζώα, κ.ά.
- Μεγάλος αριθμός βακτηρίων υπάρχει σε αποσυντιθέμενες οργανικές ουσίες
- 1 g εδάφους: $>2 \times 10^9$ βακτήρια
- 1 σταγόνα γάλακτος: $\sim 100 \times 10^6$ βακτήρια



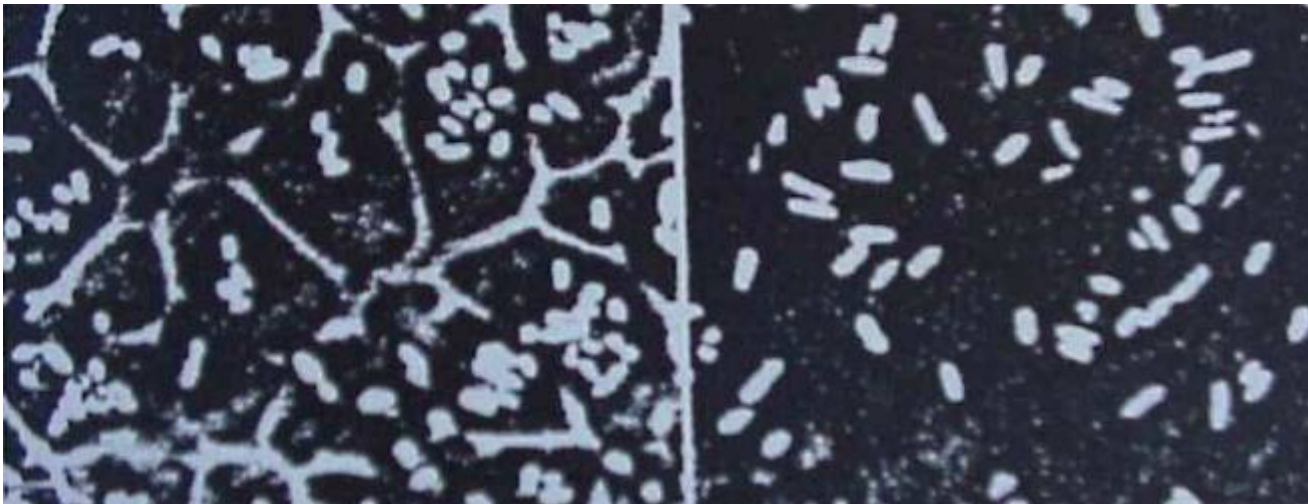
Ρόλος των βακτηρίων

- Τα περισσότερα είδη ασκούν ωφέλιμη δράση
 - Σαπρόφυτα
 - Ζυμώσεις (γαλακτοβιομηχανία)
 - Παραγωγή αντιβιοτικών (στρεπτομυκίνη)
 - Αζωτοβακτήρια (*Rhizobium*)
- Λίγα είδη ανθρωποπαθογόνα & ζωοπαθογόνα (λοιμώξεις)
- Μερικά είδη (~200) είναι φυτοπαθογόνα (βακτηριώσεις)!



Τα όπλα των βακτηρίων (ωφέλιμων & επιβλαβών)

- Αναπαραγωγική ικανότητα
- Ικανότητα παραγωγής ενζύμων & τοξινών



**Βακτηριακά
κύτταρα στο
μικροσκόπιο**

Σχήμα βακτηριακών κυττάρων

- Σφαιρικό (κόκκοι, στρεπτόκοκκοι, σταφυλόκοκκοι)
- Ραβδοειδές (βάκιλλοι)
- Σπειροειδές (δονάκια, σπειρίλλια)

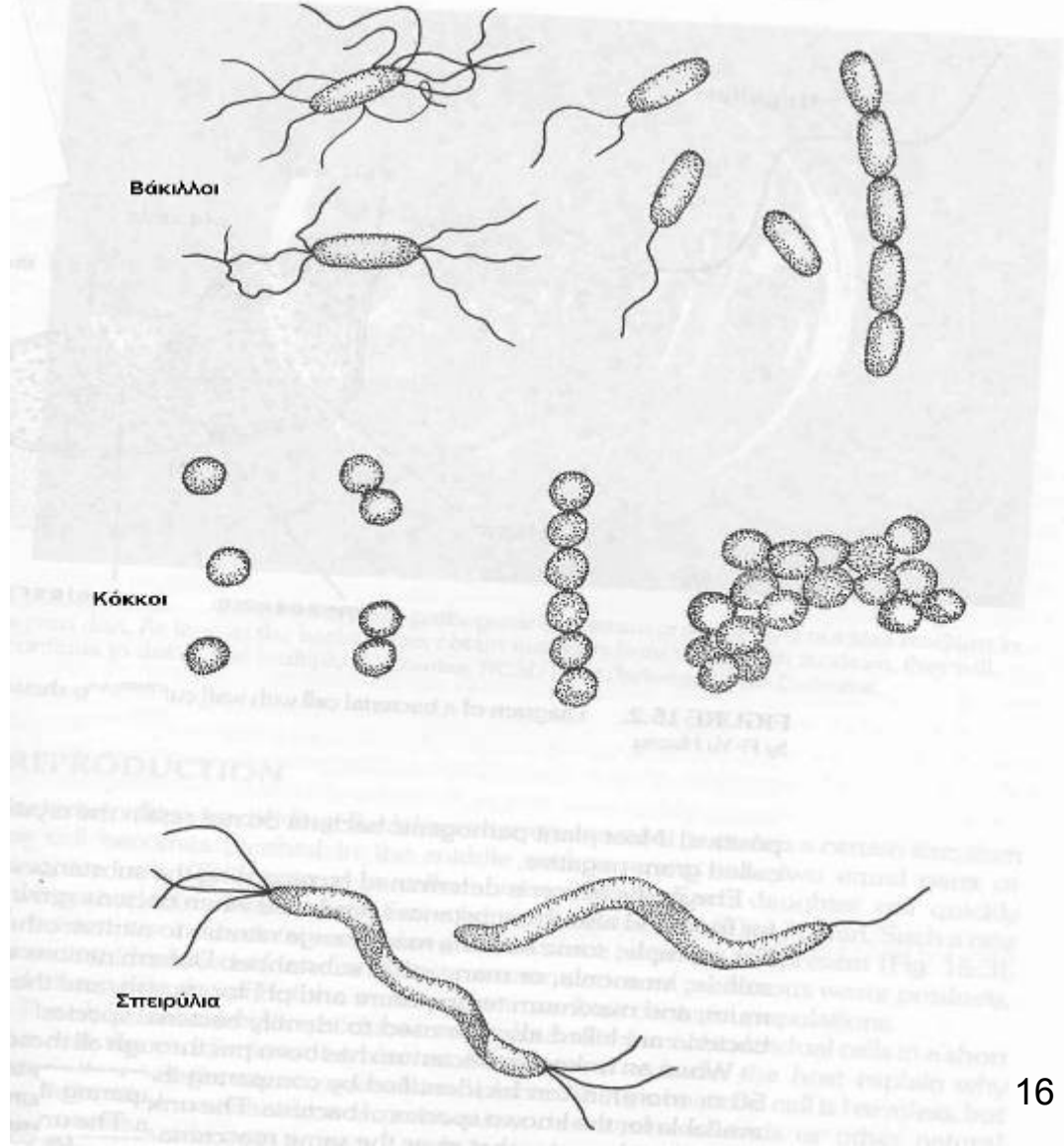
- Όλα τα φυτοπαθογόνα βακτήρια είναι ραβδοειδή



Βάκιλλοι

Κόκκοι

Σπειρίλλια





Μέγεθος βακτηριακών κυττάρων

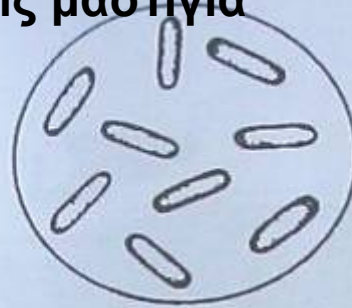
- Οι μικρότεροι γνωστοί οργανισμοί
- **Μέσες διαστάσεις:** σφαιρικά 0,5-1 μm
ραβδοειδή 2-3 x 0,5 μm
- Σε επιφάνεια 1 cm^2 συνυπάρχουν 100×10^6 βάκιλλοι μέσου μεγέθους 2 x 0,5 μm



Μαστίγια (βλεφαρίδες)

- Λεπτότετες ίνες πρωτοπλασματικής προέλευσης πάχους 10-20 nm και μήκους 3-12 μm
- Όργανα αυτόνομης κίνησης
 - **μονότριχα** ή **αμφίτριχα**
 - **λοφότριχα** (*Pseudomonas*)
 - **αμφιλοφότριχα**
 - **περίτριχα** (*Erwinia* και *Agrobacterium*)

Χωρίς μαστίγια



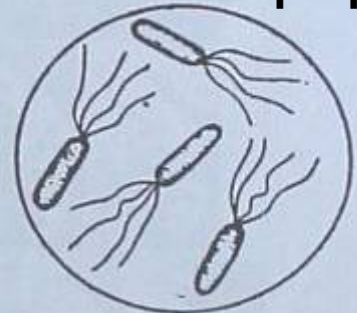
Μονότριχα



Αμφίτριχα



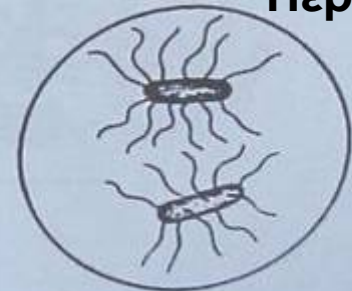
Λοφότριχα



Αμφιλοφότριχα



Περίτριχα





Χρώση βακτηρίων

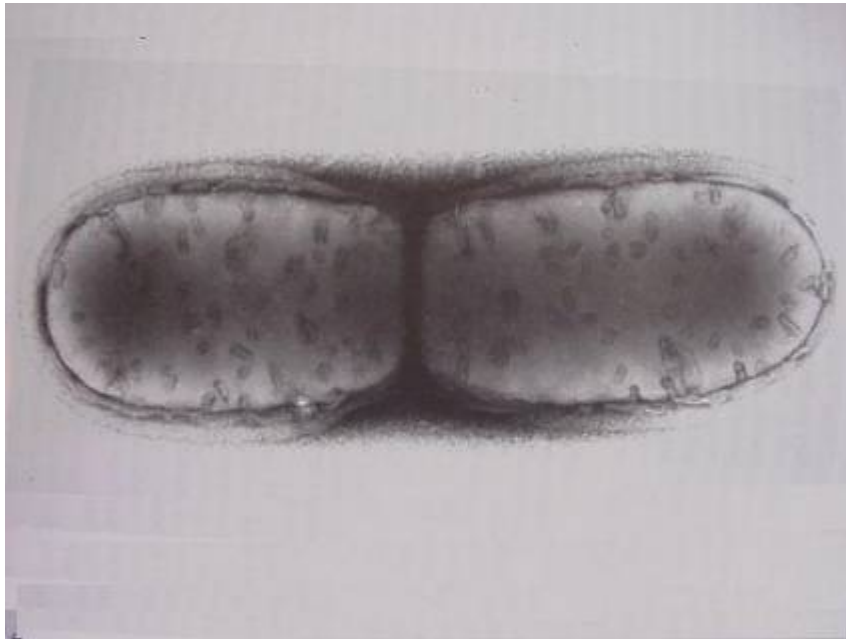


Αναπαραγωγή των βακτηρίων

- **Αγενώς με απλή διχοτόμηση** (πυρηνική ουσία & κυτταρόπλασμα χωρίζονται σε δύο ίσα μέρη)
- Πολλά βακτήρια αναπαράγονται κάθε 20-30 min
- Θεωρητικά, σε ένα 24ωρο πληθυσμός απογόνων της τάξεως 10 τρισεκατομμύρια
- Ανάσχεση των βακτηριακών πληθυσμών λόγω: Α) έλλειψης ή εξάντλησης του υποστρώματος; Β) ανταγωνισμού; Γ) παραγωγής τοξινών από τα ίδια τα βακτήρια; Δ) μεταβολές pH



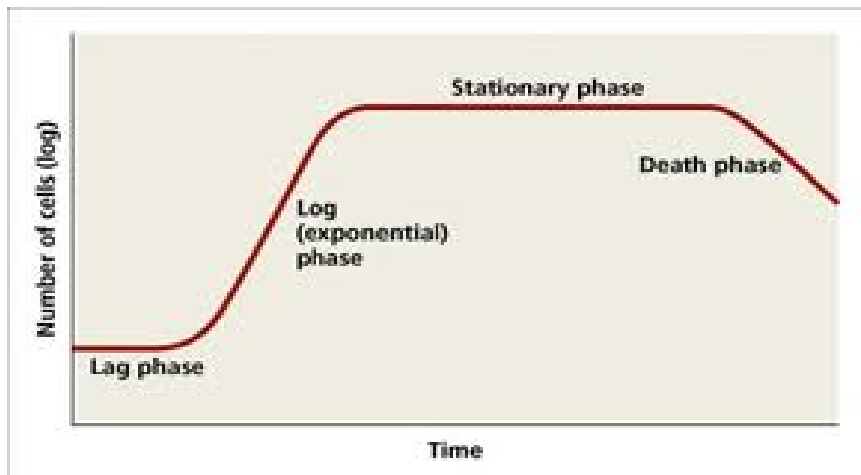
Αναπαραγωγή των βακτηρίων



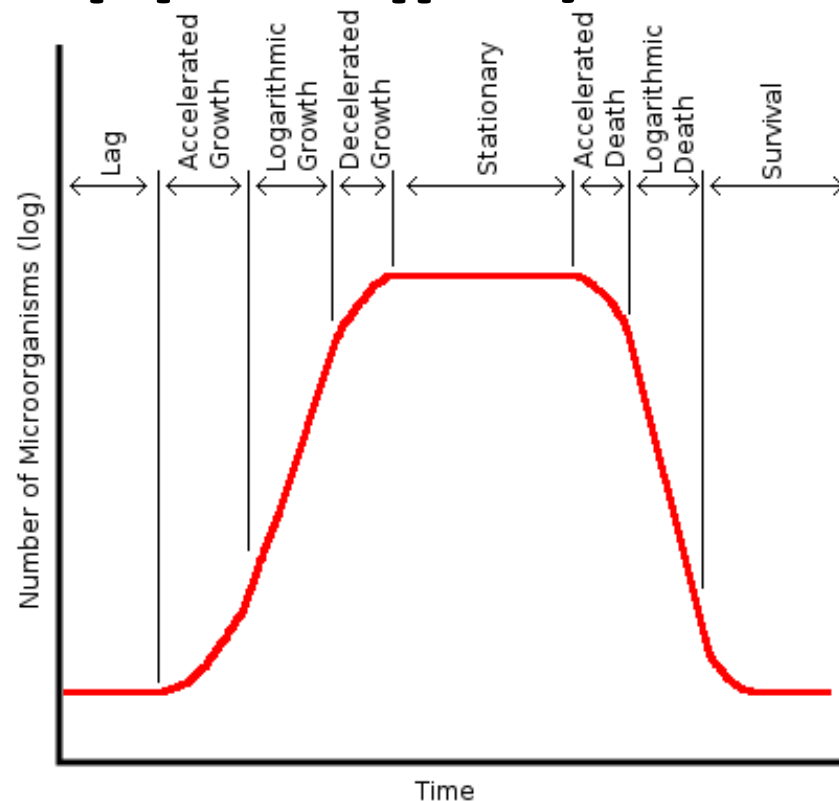
Αγενώς με απλή διχοτόμηση βακτηριακών κυττάρων



Αύξηση βακτηρίων σε κλειστά συστήματα (π.χ. εργαστήριο)



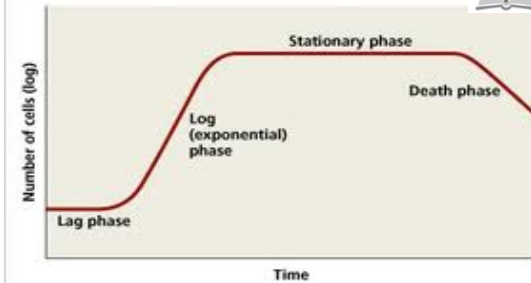
- **X_t**: μέγεθος πληθυσμού μετά από μία περίοδο αύξησης t
- **X₀**: αρχικό μέγεθος πληθυσμού
- **td**: ο χρόνος w συμπλήρωσης μίας γενιάς που οδηγεί σε διπλασιασμό του μεγέθους του πληθυσμού



$$X_t = X_0 \times 2^{rt/d}$$



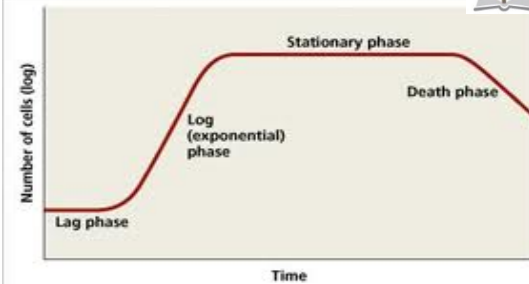
Φάσεις ανάπτυξης βακτηρίων στο εργαστήριο



- **Καλλιέργεια βακτηρίου με περιορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα**
 - **Λανθάνουσα φάση:** χρονική περίοδος προσαρμογής του πληθυσμού στις νέες συνθήκες (δεν παρατηρείται μετρήσιμη αύξηση του μεγέθους)
 - **Φάση επιτάχυνσης:** χρονική περίοδος, που ο ρυθμός αύξησης του πληθυσμού σταδιακά αυξάνεται
 - **Φάση εξισορροπημένης ανάπτυξης ή Εκθετική φάση:** χρονική περίοδος που ο ρυθμός αύξησης έχει φθάσει σε μία μέγιστη τιμή για το σύστημα



Φάσεις ανάπτυξης βακτηρίων στο εργαστήριο

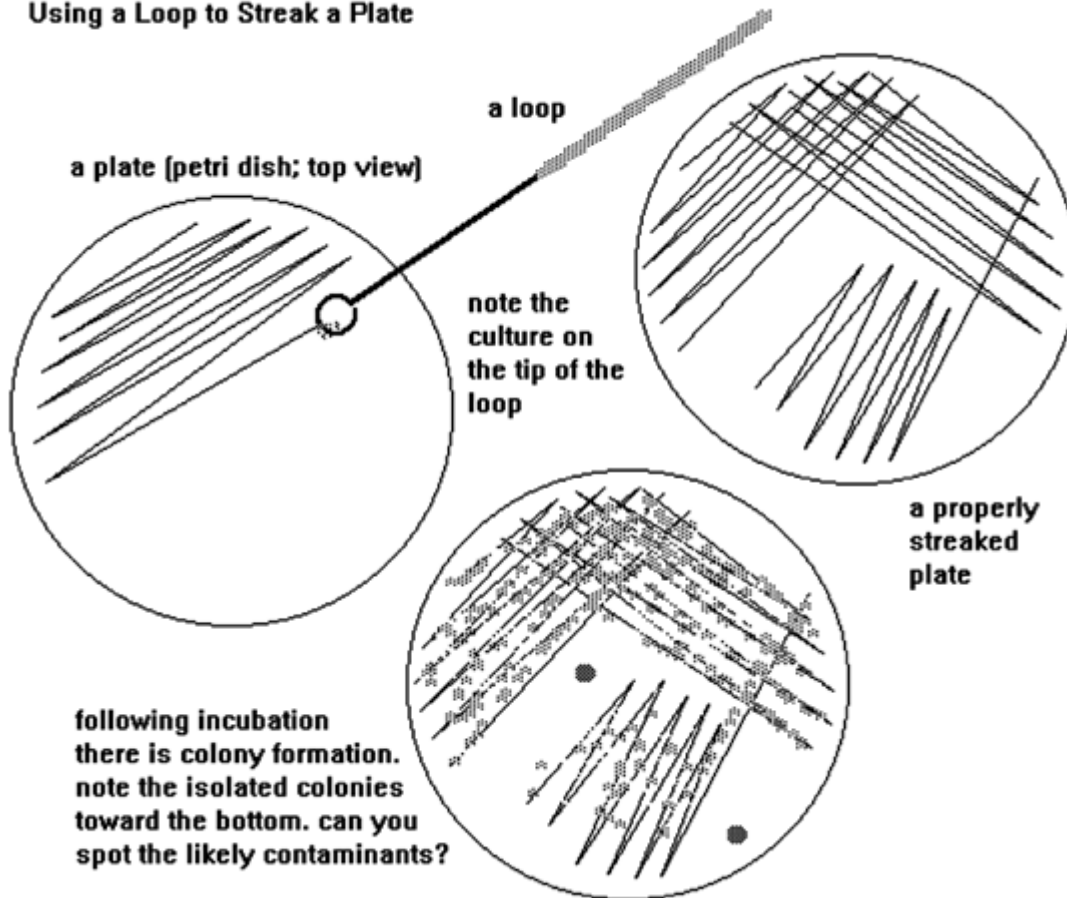


- Καλλιέργεια βακτηρίου με περιορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα
 - **Φάση επιβράδυνσης:** χρονική περίοδος που ο ρυθμός αύξησης του πληθυσμού σταδιακά μειώνεται, έως ότου η αύξηση σταματήσει
 - **Φάση στασιμότητας:** χρονική περίοδος που ο πληθυσμός έχει φθάσει στο μέγιστο επίπεδο και παραμένει μεταβολά ενεργό (μπορεί να συνεχίσει την αύξηση αν δημιουργηθούν νέες ευνοϊκές συνθήκες αύξησης)
 - **Φάση θανάτου:** χρονική περίοδος που η βιωσιμότητα ελαττώνεται και ο θάνατος του μικροβιακού πληθυσμού ακολουθεί το εκθετικό πρότυπο, όπως και η αύξηση



Γραμμωτή διασπορά (streaking) βακτηρίων σε τρυβλία Petri με αποστειρωμένο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Using a Loop to Streak a Plate



Κάθε φορά που αλλάζουν οι παράλληλες γραμμές, ο μικροβιολογικός κρίκος αποστειρώνεται



Γραμμωτή διασπορά (streaking) βακτηρίων σε τρυβλία Petri με αποστειρωμένο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Κάθε φορά που αλλάζουν οι παράλληλες γραμμές, ο μικροβιολογικός κρίκος αποστειρώνεται



Φυσικοχημική φύση των ουσιών χρώσης των βακτηριακών κυττάρων

- Άλατα με ένα από τα δύο ιόντα τους έγχρωμο (π.χ. μπλε του μεθυλενίου είναι το άλας χλωριούχο μπλε του μεθυλενίου, το οποίο διασπάται μέσα στο νερό και δίνει το θετικά φορτισμένο ιόν μπλε του μεθυλενίου που είναι χρωματισμένο μπλε και το αρνητικά φορτισμένο ιόν χλωρίου, που είναι άχρωμο)
- Εάν το έγχρωμο συστατικό της χρωστικής βρίσκεται στο θετικά φορτισμένο ιόν (χρωμοφόρο), τότε η χρωστική λέγεται **βασική χρωστική** (μπλε του μεθυλενίου, σαφρανίνη, κρυσταλλικό ιώδες, κ.ά.)
- Εάν το χρωμοφόρο βρίσκεται στο αρνητικά φορτισμένο ιόν, τότε η χρωστική λέγεται **όξινη** (nigrosin, congo red, σινική μελάνη, κ.ά.)



Φυσικοχημική φύση των ουσιών χρώσης των βακτηριακών κυττάρων

- Όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται σε ένα θρεπτικό υλικό με pH σχεδόν ουδέτερο, το κυττόπλασμα τους λόγω της χημικής του σύστασης έχει ένα ασθενές αρνητικό φορτίο
- **Βασική χρωστική:** το θετικά φορτισμένο τμήμα της (το χρωματισμένο) ενώνεται με το αρνητικά φορτισμένο κυττόπλασμα του βακτηριακού κυττάρου και το κύτταρο υφίσταται **άμεση χρώση (ή θετική χρώση)**
- **Όξινη χρωστική:** το έγχρωμο τμήμα της (αρνητικό ιόν) δε θα ενωθεί με το, επίσης, αρνητικά φορτισμένο κυττόπλασμα, αλλά δημιουργεί έγχρωμο απόθεμα γύρω από τα κύτταρα αφήνοντας το κύτταρο άχρωμο; Τα κύτταρα έτσι καθίστανται ορατά έμμεσα (**έμμεση ή αρνητική χρώση**)
- Η έμμεση χρώση οδηγεί σε πιο ακριβή εικόνα για το σχήμα, το μέγεθος και τη διευθέτηση των κυττάρων



Απλή χρώση βακτηριακών κυττάρων

- Στηρίζεται στη διαφορετική σύσταση των κυττάρων σε σχέση με τη σύσταση του υλικού που τα περιβάλλει (π.χ. θρεπτικό υλικό), με αποτέλεσμα τη διαφορετική χρώση κυττάρου-περιβάλλοντος
- Η διαδικασία της λαμβάνει χώρα μετά την προσήλωση των κυττάρων στην αντικειμενοφόρο πλάκα

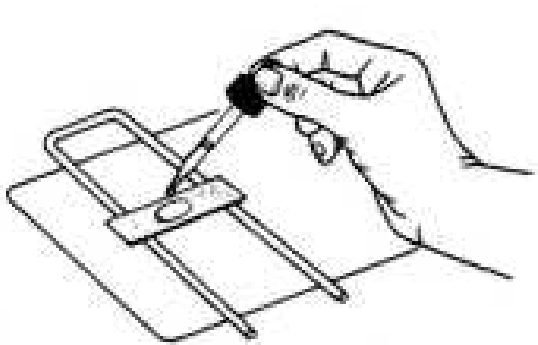


Στάδια απλής χρώσης των βακτηριακών κυττάρων

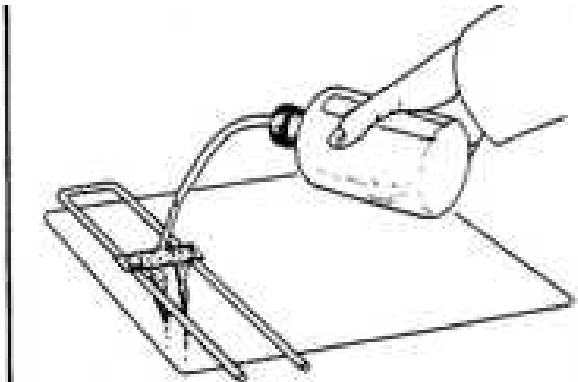
1. Η αντικειμενοφόρος πλάκα με το προσηλωμένο παρασκεύασμα τοποθετείται πάνω από δισκάκι, ώστε να συγκεντρώνεται η περίσσεια του διαλύματος της χρωστικής που δε συγκρατείται από το παρασκεύασμα
2. Το παρασκεύασμα καλύπτεται με το διάλυμα της χρωστικής, το οποίο παραμένει για 30 δευτερόλεπτα
3. Ακολουθεί έκπλυση της περίσσειας της χρωστικής με νερό με τη βοήθεια υδροβολέα
4. Το εναπομένον νερό απομακρύνεται από την αντικειμενοφόρο με απορροφητικό χαρτί προσέχοντας να μην απομακρυνθεί και το παρασκεύασμα



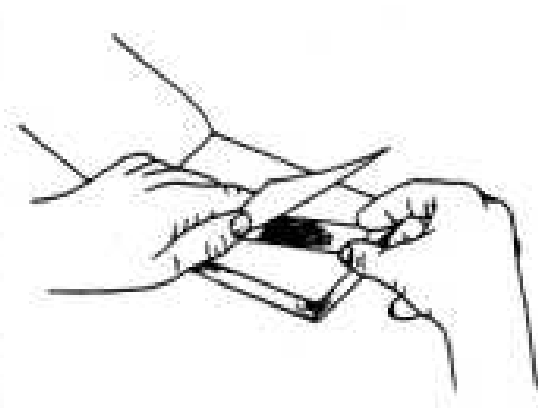
Στάδια διαδικασίας απλής χρώσης των βακτηριακών κυττάρων



1



2



3

- Ακολουθεί μικροσκοπική παρατήρηση
- Αν χρήση της μπλε του μεθυλενίου, τα κύτταρα βάφονται μπλε
- Αν χρήση της σαφρανίνης, τα κύτταρα βάφονται κόκκινα



Διαφορική χρώση των βακτηριακών κυττάρων

- Η χημική σύσταση και η φυσική κατάσταση των μικροβιακών κυττάρων διαφέρει ανάμεσα στις διάφορες κατηγορίες μ/ον και έτσι αντιδρούν διαφορετικά στην εφαρμογή διαφόρων χρωστικών
- Χρήση διαφορικών χρώσεων για τη διαφοροποίηση διαφορετικών τύπων κυττάρων ή για την παρατήρηση συγκεκριμένων κυτταρικών δομών
- Διαφορική χρώση πιο σύνθετη και περιλαμβάνει την εφαρμογή ενός συνδυασμού χρωστικών με διαφορετικές ιδιότητες
- Η **χρώση Gram** είναι η πιο χρήσιμη μέθοδος διαφορικής χρώσης βακτηρίων



Χρώση Gram

- Όλα τα βακτήρια χωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες: τα θετικά κατά Gram (Gram+) και τα αρνητικά κατά Gram (Gram-)
- Το αποτέλεσμα της χρώσης Gram για ένα άγνωστο βακτήριο αποτελεί βασικό κριτήριο για την ταυτοποίησή του και την ένταξή του σε μια ταξινομική ομάδα
- Τα Gram+ και τα Gram- βακτήρια αντιδρούν διαφορετικά σε διάφορους φυσικοχημικούς παράγοντες και αυτή η διαφορά οφείλεται στη διαφορετική σύσταση του κυτταρικού τους τοιχώματος



Χρώση Gram

- **Gram+:** φέρουν χονδρό κυτταρικό τοίχωμα, που αποτελείται κυρίως από ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης
- **Gram-:** το κυτταρικό τους τοίχωμα φέρει εξωτερική μεμβράνη, που καλύπτει ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης. Η εξωτερική αυτή μεμβράνη αποτελείται κυρίως από λιπίδια
- Η παραπάνω διαφορά στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος οδηγεί σε διαφορετικό χρωματισμό των κυττάρων, όταν σε αυτά εφαρμοστεί η χρώση Gram



4 διαλύματα χρώσης Gram

- **Χρώση Gram απαιτεί 4 διαλύματα:** αρχική χρωστική, στερεωτική χρωστική, παράγοντας αποχρωματισμού και χρωστική αντίθεση
- **Αρχική χρωστική:** είναι μια βασική χρωστική, το **κρυσταλλικό ιώδες**, που χρωματίζει όλα τα βακτήρια (Gram+ & Gram-) μπλε
- **Στερεωτική χρωστική:** είναι μια ουσία που αυξάνει τη συγγένεια ανάμεσα στα κύτταρα και την αρχική χρωστική, ήτοι συμβάλλει στη συγκράτησή της (τα κύτταρα βάφονται πιο έντονα και απομακρύνεται πολύ πιο δύσκολα η αρχική χρωστική). Στη χρώση Gram χρησιμοποιείται ως στερεωτική το **ιώδιο**, όπου μετά την εφαρμογή όλα τα βακτηριακά κύτταρα (Gram+ & Gram-) εξακολουθούν να είναι βαμμένα μπλε



4 διαλύματα χρώσης Gram

- **Παράγοντας αποχρωματισμού:** είναι η **αιθανόλη 95%**, η οποία «ξεβάφει» τα βαμμένα κύτταρα
- **Χρώση με τη χρωστική αντίθεσης:** είναι μια βασική χρωστική (η **σαφρανίνη**) με διαφορετικό χρώμα από την αρχική χρωστική. Ο ρόλος της χρωστικής αντίθεσης είναι να χρωματίσει με διαφορετικό χρώμα τα κύτταρα που είχαν αποχρωματιστεί στο προηγούμενο στάδιο
- Η σαφρανίνη «βάφει» τα **Gram- κύτταρα κόκκινα** (είχαν αποχρωματιστεί με την αιθανόλη), ενώ δε βάφει τα **Gram+** κύτταρα τα οποία **παραμένουν μπλε**



Ερμηνεία χρώσης Gram

- Το στάδιο αποχρωματισμού με την αιθανόλη είναι και το βασικό στάδιο διαχωρισμού των Gram θετικών από τα Gram αρνητικά κύτταρα
- Εάν τα βακτηριακά κύτταρα του παρασκευάσματος είναι αρνητικά κατά Gram, τότε κατά το στάδιο έκπλυσης με αιθανόλη, αποχρωματίζονται. Αυτό συμβαίνει διότι τα λιπίδια της κυτοπλασματικής τους μεμβράνης διαλύονται με την αιθανόλη, με αποτέλεσμα να αυξάνει η περατότητα της μεμβράνης και να απομακρύνεται το μπλε σύμπλοκο κρυσταλλικού ιώδους-ιωδίου
- Τα θετικά κατά Gram κύτταρα δεν φέρουν εξωτερική μεμβράνη με λιπίδια και η έκπλυση με αιθανόλη δεν τα αποχρωματίζει. Επιπλέον, η αιθανόλη μειώνει το μέγεθος των πόρων της πεπτιδογλυκάνης και έτσι παγιδεύεται ακόμα καλύτερα το μπλε σύμπλοκο κρυσταλλικού ιώδους-ιωδίου. Έτσι, τα θετικά κατά Gram κύτταρα παραμένουν μπλε μετά την έκπλυση με αιθανόλη



Χρώση Gram

Στάδια	Διαδικασία	Αποτέλεσμα	
		Gram +	Gram -
Αρχική χρώση	Κρυσταλλικό ιώδες για 30 sec	μπλε	μπλε
Στερεωτική χρωστική	Ιώδιο για 30 sec	μπλε	μπλε
Παράγοντας αποχρωματισμού	95% αιθανόλη για 10-20 sec	μπλε	άχρωμα
Χρωστική αντίθεση	Σαφρανίνη για 20-30 sec	μπλε	κόκκινα

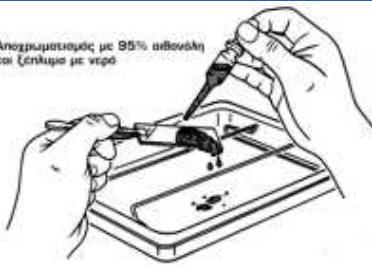
Ακολουθεί μικροσκοπική παρατήρηση



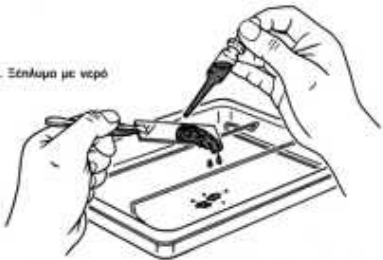
1. Χρώση με κρυσταλλικό ιώδες για 30 sec



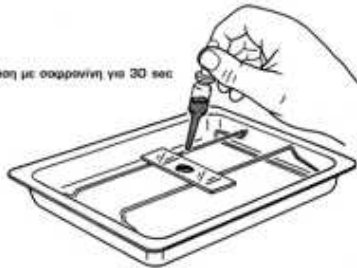
5. Αποχρωματισμός με 95% αιθανόλη και ξέπλυμα με νερό



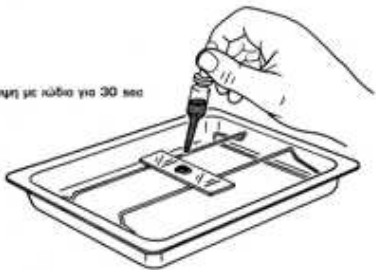
2. Ξέπλυμα με νερό



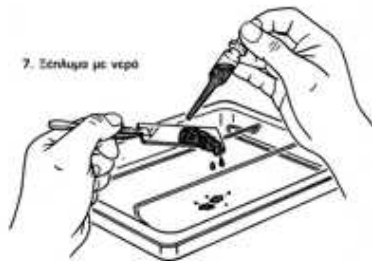
6. Χρώση με σαρδανική για 30 sec



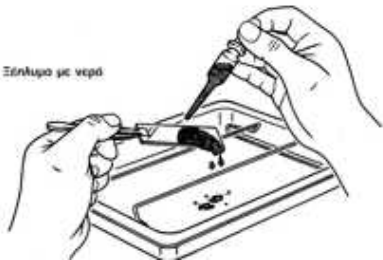
3. Κάλυψη με καπάκι για 30 sec



7. Ξέπλυμα με νερό



4. Ξέπλυμα με νερό



8. Ξέπλυμα με απορρυπαντικό χεριών



Διαδικασία χρώσης Gram σε βακτηριακό παρασκεύασμα



Φυτοπαθογόνα βακτήρια



Κοινά χαρακτηριστικά φυτοπαθογόνων βακτηρίων

- Σχήμα ραβδοειδές, διαστάσεων $0,5-1 \times 0,6-3,5 \mu\text{m}$
- Δεν παράγουν ενδοσπόρια
- Είναι αερόβια (πολύ λίγα προαιρετικά αναερόβια)
- Είναι προαιρετικά παράσιτα
- Είναι μεσόφιλα (optimum $20-30^{\circ}\text{C}$)

Ταξινομικοί χαρακτήρες βακτηρίων

- **Τεχνητές καλλιέργειες:** εμφάνιση, χρώμα, σχήμα
- **Μορφολογία κυττάρου:** σχήμα, μέγεθος, αριθμός και θέση μαστιγίων
- **Φυσιολογικοί & Βιοχημικοί χαρακτήρες:** pH, χρώση κατά Gram, θερμοκρασία, ικανότητα ζύμωσης, αντοχή σε οξέα



Ταξινόμηση φυτοπαθογόνων βακτηρίων

- Τα 1500 περίπου είδη βακτηρίων αποτελούσαν παλαιότερα την Κλάση Schizomycetes των φυτών με 10 Τάξεις
- **Σήμερα:** Βασίλειο Prokaryotae
- **Φυτοπαθογόνα στις Τάξεις του Βασιλείου Prokaryotae**
 - Pseudomonadales
 - Eubacteriales
 - Actinomycetales



Κυριότερα φυτοπαθογόνα βακτήρια

Διαίρεση: GRACILICUTES (Gram-)

Κλάση: Proteobacteria

Οικογένεια: Pseudomonadaceae

Γένη: *Pseudomonas*,
Xanthomonas, *Rhizobacter*

Οικογένεια: Enterobacteriaceae

Γένος: *Erwinia*

Οικογένεια: Rhizobiaceae

Γένη: *Agrobacterium*, *Rhizobium*
(συμβιωτικό με ψυχανθή)

Οικογένεια: δεν έχει προσδιορισθεί)

Γένος: *Xyllela*

Διαίρεση: FIRMICUTES (Gram+)

Κλάση: Firmibacteria

Γένος: *Bacillus*

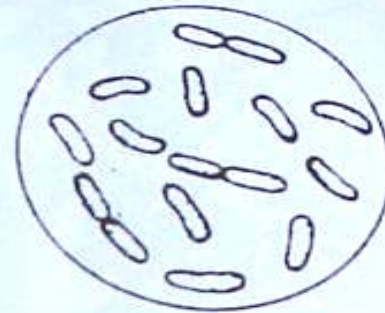
Κλάση: Thallobacteria

Γένη: *Clavibacter*, *Streptomyces*

Βασίλειο Prokaryotae

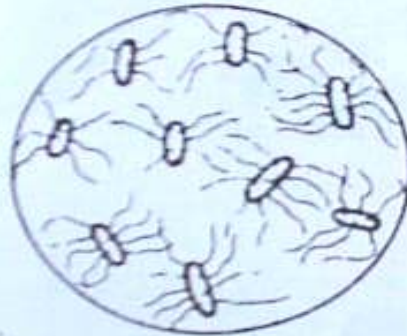


Agrobacterium



Clavibacter

Erwinia



Pseudomonas



Xanthomonas



Διαίρεση: GRACILICUTES (Gram-)



Οικογένεια: Pseudomonadaceae

Γένη: *Pseudomonas*

Xanthomonas

Pseudomonas

- Περιλαμβάνει είδη λοφότριά με 1-7 μαστίγια
- Σχηματίζουν σε στερεό υπόστρωμα αποικίες λευκού χρώματος
- Αρνητικά κατά Gram
- Σε θρεπτικό υπόστρωμα με ζωμό κρέατος στερεοποιημένο με άγαρ, παράγουν πράσινη φθορίζουσα χρωστική (φθορεΐσίνη)





Σπουδαιότερα φυτοπαθογόνα είδη

- *Pseudomonas syringae* (βακτηρίωση οπωροφόρων)
- *P. syringae* pv. *savastanoi* (καρκίνωση ελιάς)
- *P. mors-prunorum* (βακτηριακό έλκος κερασιάς)
- *P. solanacearum* (αδροβακτηρίωση)
- *P. tabaci* (βακτηρίωση καπνού)
- *P. lachrymans* (γωνιώδης κηλίδωση αγγουριάς)



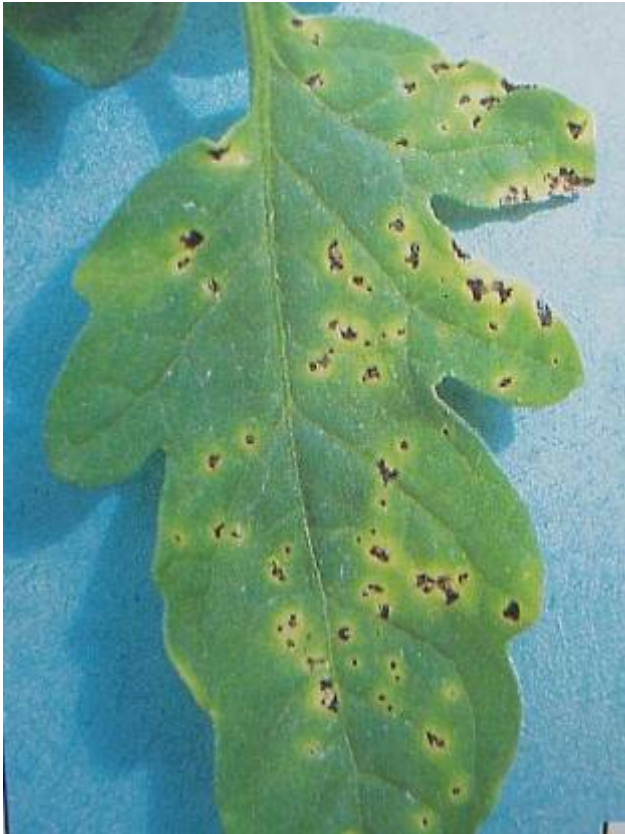
P. amygdali

Pseudomonas



P. solanacearum
Αδροβακτηρίωση

Pseudomonas



P. syringae pv *tomato*

Pseudomonas



P. syringae pv *lacrymans*

Pseudomonas



P. syringae pv *savastanoi*

P. syringae pv *syringae*

Xanthomonas

- Βακιλλόμορφα, μονότριχα
- Αρνητικά κατά Gram
- Οι **αποικίες** τους σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα είναι **κίτρινες** (Xantho-)
- Γλοιώδης υφή, όταν το υπόστρωμα είναι πλούσιο σε υδατάνθρακες





Σπουδαιότερα φυτοπαθογόνα είδη

- *Xanthomonas malvacearum* (γωνιώδης κηλίδωση βαμβακιού)
- *X. phaseoli* (βακτηρίωση φασολιών)
- *X. ampelina* (βακτηριακή νέκρωση/"τσιλίκ μαράζι του αμπελιού)

Xanthomonas



X. ampelina



X. malvacearum



Οικογένεια: **Enterobacteriaceae**

Συνήθως περίτριχα & Αρνητικά κατά Gram

Γένος *Erwinia*

- Αρνητικά κατά Gram
- Κύτταρα ραβδοειδή, με περίτριχα μαστίγια
- Προαιρετικά αναερόβια
- Αποικίες υπόλευκες ή υποκίτρινες
- Ορισμένα παράγουν πηκτινολυτικά ένζυμα και προκαλούν υγρές σήψεις





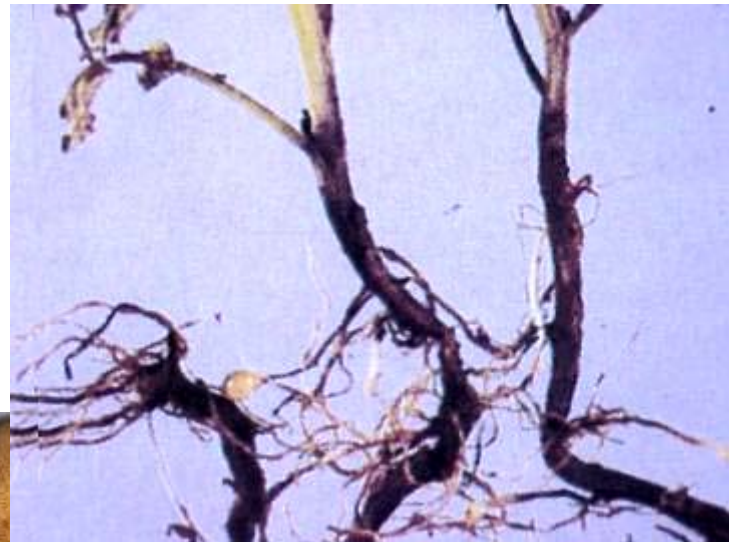
Σπουδαιότερα φυτοπαθογόνα είδη

- *Erwinia carotonora* (μαλακές σήψεις σε πατάτα, καρότο, μαρούλι, λάχανο, κ.ά.)
- *E. carotonora* pv *atroseptica* (μελάνωση του λαιμού της πατάτας)
- *E. amylopora* (βακτηριακό κάψιμο/fireblight των μηλοειδών)



Erwinia carotovora pv *atroseptica*

μελάνωση



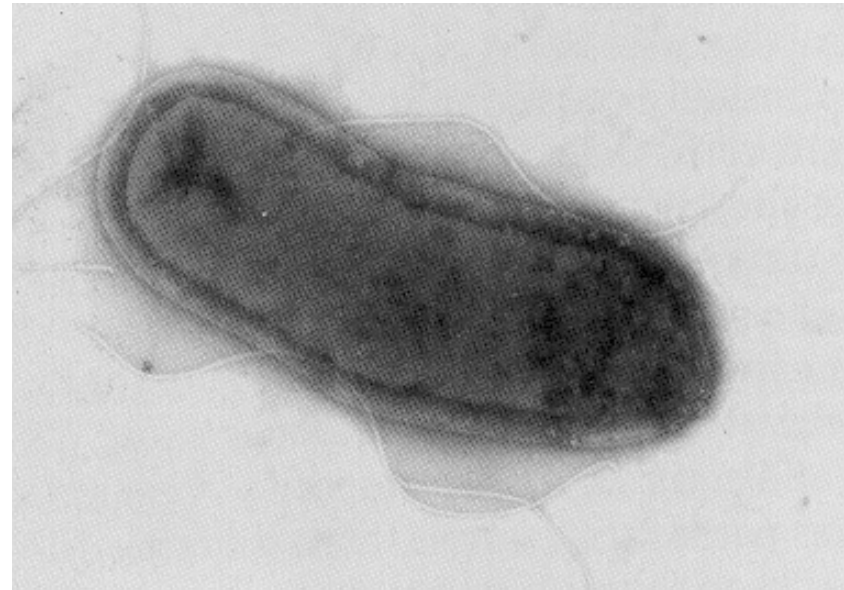
Erwinia amylovora βακτηριακό κάψιμο



Οικ. Rhizobiaceae

Γένος *Agrobacterium*

- Είδη με κύτταρα ραβδοειδή
- Λίγα (1-6) περίτριχα μαστίγια
- Αρνητικά κατά Gram
- Σχηματίζουν υπόλευκες αποικίες
- ***Agrobacterium tumefaciens***:
Βακτηριακός καρκίνος
οπωροφόρων, του αμπελιού κ.ά.



Agrobacterium tumefaciens

Καρκίνος των φυτών





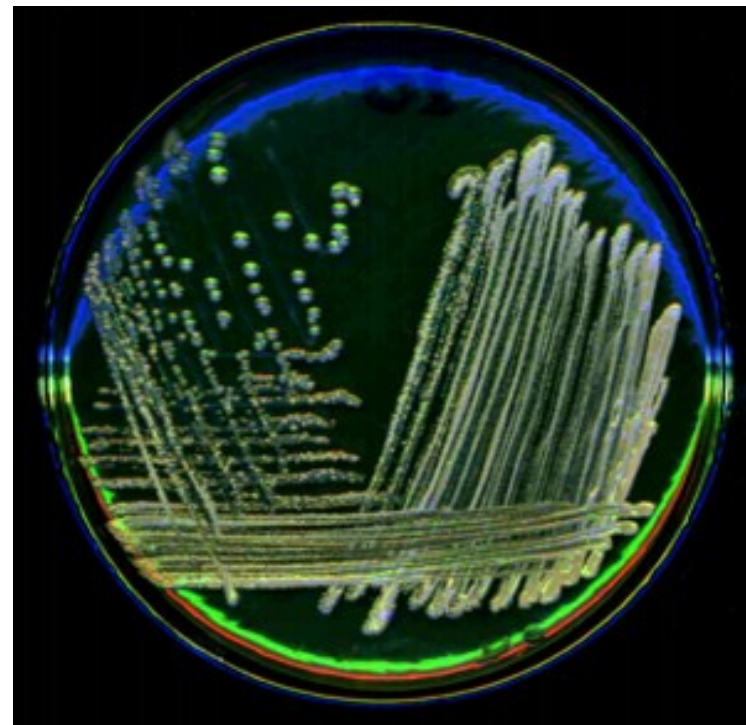
Διαίρεση: FIRMICUTES (Gram+)



Κλάση: Thallobacteria

Γένος *Clavibacter* (*Corynebacterium*)

- Είδη με κύτταρα ροπαλοειδή (κορυνοειδή), υπό διαφόρους σχηματισμούς (L, V, Y)
- Τα μόνα θετικά κατά Gram φυτοπαθόγωνα βακτήρια
- Άλλα είδη με μαστίγια και άλλα χωρίς
- Αποικίες υποκίτρινες έως πορτοκαλί





Σπουδαιότερα φυτοπαθογόνα είδη

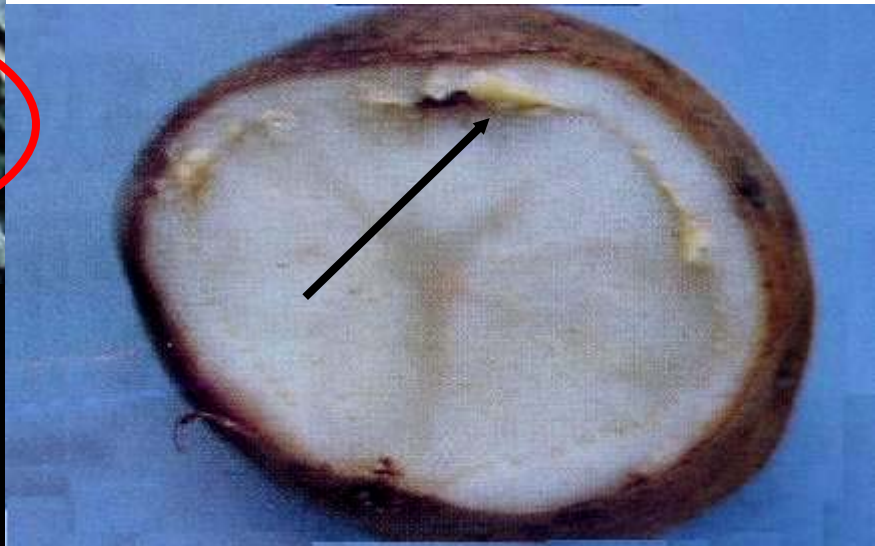
- *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
(κορυνοβακτηρίωση/βραδύς μααρασμός της τομάτας)
- *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicum*
(κορυνοβακτηρίωση/δακτυλιωτή σήψη της πατάτας)



***Clavibacter michiganensis*
subsp. *michiganensis***

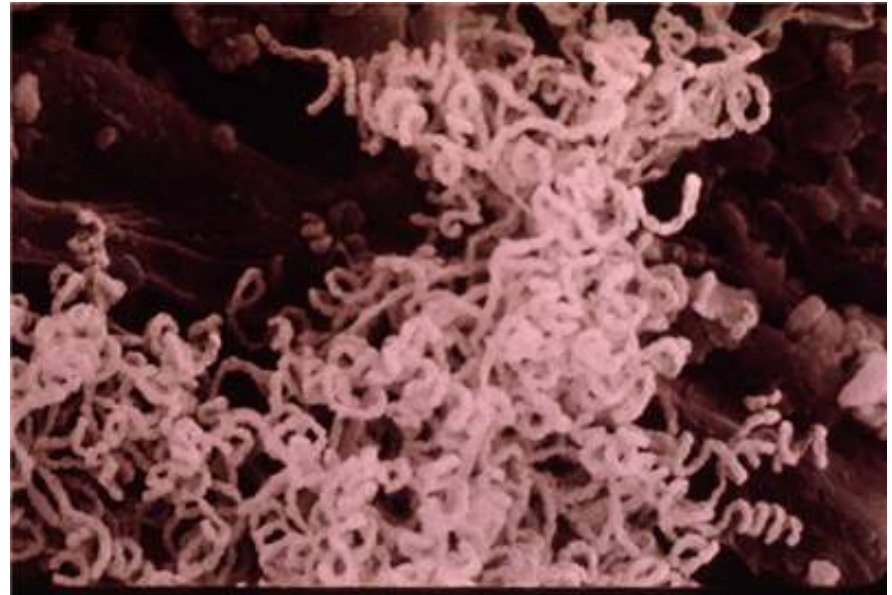


***Clavibacter michiganensis*
subsp. *sependonicum***



Streptomyces scabies

- Αρνητικό κατά Gram
- Προκαλεί την ακτινομύκωση της πατάτας
- Τα κύτταρά του είναι ραβδοειδή με τάση να παραμένουν ενωμένα και διακλαδιζόμενα σχηματίζοντας νημάτια όμοια με υφές μυκηλίου



Streptomyces scabies





Διάγνωση φυτοπαθογόνων βακτηρίων



Διάγνωση φυτοπαθογόνων βακτηρίων

- Παρατηρούμενη συμπτωματολογία (υπερπλασίες, νεκρωτικές κηλίδες, σήψεις)
- Απομόνωση παθογόνου από τον προσβεβλημένο ιστό
- Διενέργεια βιοχημικών, ορρολογικών, μοριακών και βιολογικών δοκιμών για την ταυτοποίηση του απομονωθέντος παθογόνου
 - **Βιοχημικές:** χρώσεις (π.χ. Gram) & αντιδράσεις (π.χ. καταλάσης)
 - **Βιολογικές δοκιμές:** αντίδραση υπερευαισθησίας και δοκιμή παθογένειας σε κατάλληλους ξενιστές
 - **Μοριακές:** PCR, RFLP κ.λπ.



Απομόνωση (1)

φυτοπαθογόνων βακτηρίων

- Για καθαρή καλλιέργεια, επιλογή φυτικών τμημάτων με αρχικά συμπτώματα (αποφυγή δευτερογενών σαπροφυτικών μικροοργανισμών)
- Υπό ασηπτικές συνθήκες, λεπτές τομές στις οριακές περιοχές μεταξύ υγιούς-προσβεβλημένου φυτικού ιστού
- Μεταφορά των τομών σε σταγόνα αποστειρωμένου ύδατος, για τη διάχυση των βακτηρίων από τον ιστό προς το νερό (βακτηριακό αιώρημα)



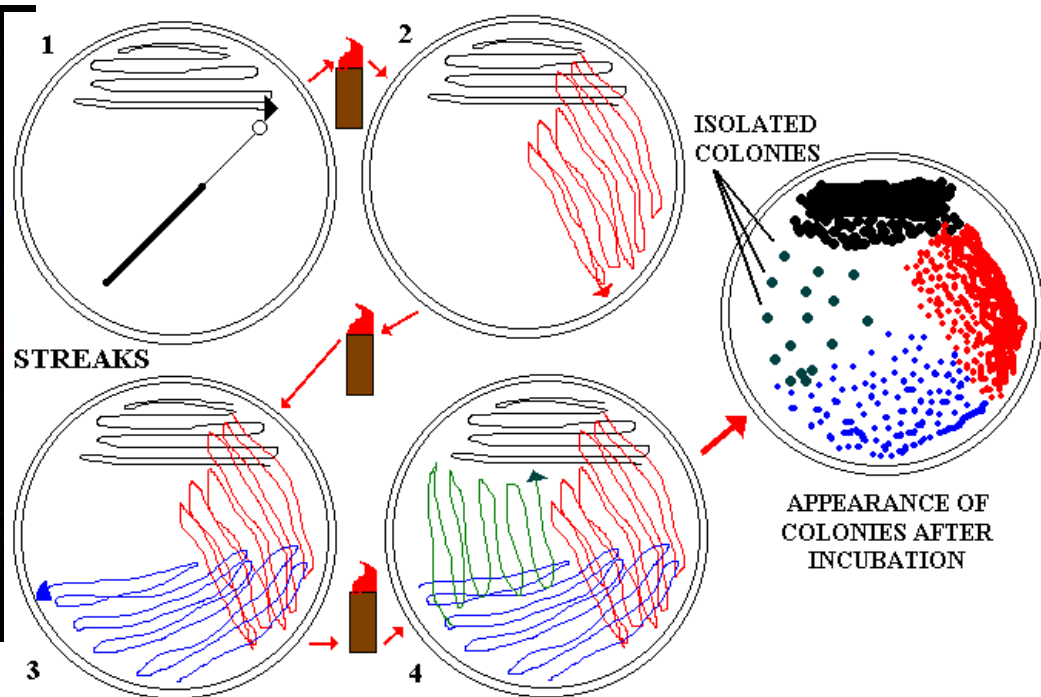
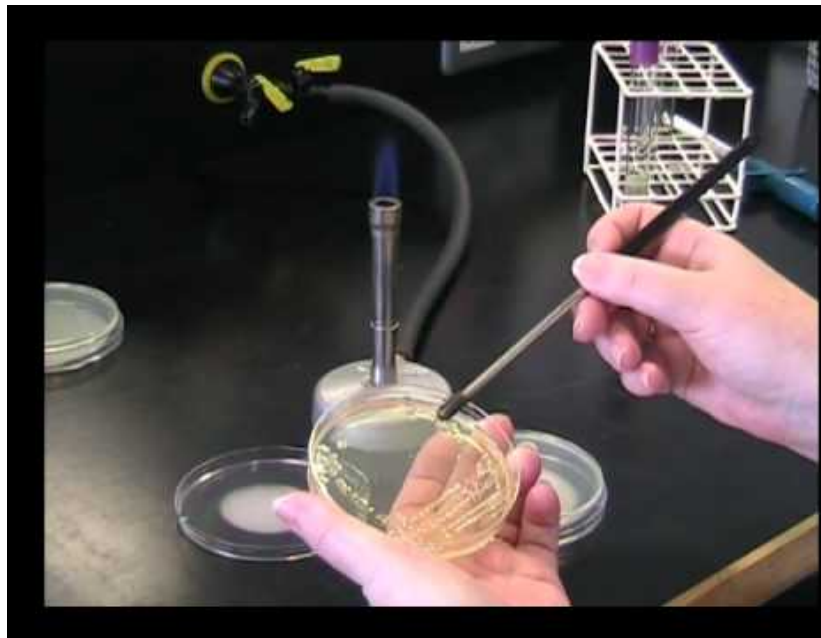
Απομόνωση (2)

φυτοπαθογόνων βακτηρίων

- Με μικροβιολογικό κρίκο, μεταφορά ασηπτικά μικρής ποσότητας βακτηριακού αιωρήματος και επίστρωση σε τρυβλίο με κατάλληλο στερεό αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα
- Επώαση για 24-72 ώρες στους $\sim 28^{\circ}\text{C}$
- Μεταφορά μεμονωμένων αποικιών σε νέο τρυβλίο (καθαρή καλλιέργεια) για προσδιορισμό του γένους και περαιτέρω έρευνα



Απομόνωση αποικιών βακτηρίων





Αντίδραση υπερευαισθησίας (1)

- Μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και εκδηλώνεται ως ακραία έκφραση αντοχής των φυτών σε προσβολές
- Καθίσταται ορατή με την ταχεία νέκρωση κυττάρων του ξενιστή, ως επακόλουθο της επιχειρούμενης μόλυνσης
- Η ταχεία τοπική νέκρωση των φυτικών κυττάρων (λόγω απώλειας της επιλεκτικής διαπερατότητας του συστήματος των βιομεμβρανών τους και επακόλουθης αφυδάτωσής τους) και παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων (π.χ. φυτοαλεξινών) που συσσωρεύονται στα σημεία εισόδου του παθογόνου στο φυτό, (παρ)εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου και την επέκτασή του στο φυτό

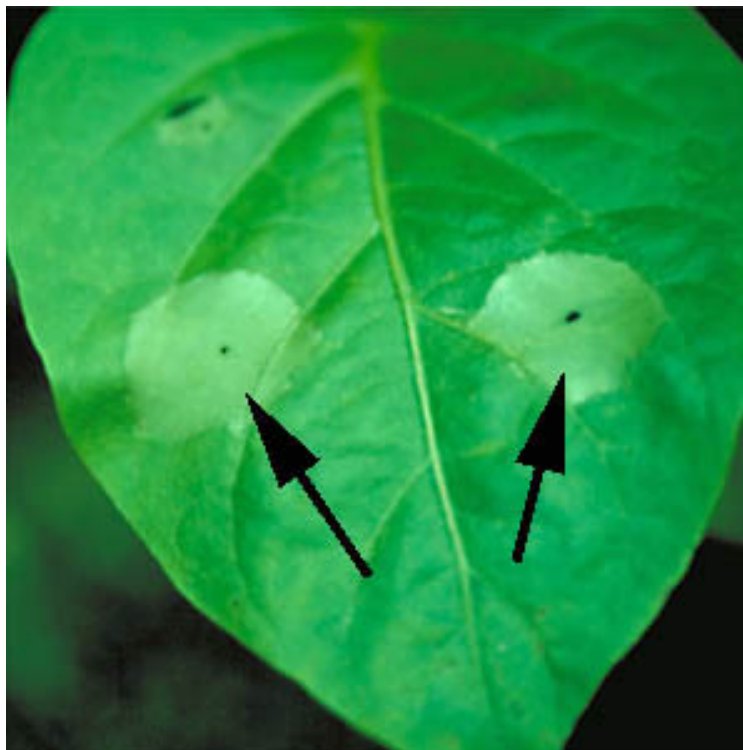


Αντίδραση υπερευαισθησίας (2)

- Επαγωγή της αντίδραση σε ένα μη-ξενιστή αποτελεί μία ταχεία μέθοδο εκτίμησης της φυτοπαθογόνου ικανότητας βακτηριακών στελεχών
- Στους (ευπαθείς) ξενιστές, το παθογόνο έχει αναπτύξει μηχανισμούς που του επιτρέπουν να παρακάμπτει την εν λόγω αντίδραση, να εγκαθίσταται και να προκαλεί τα συμπτώματα της ασθένειας
- Υπεύθυνα γονίδια για την επαγωγή αυτών των αμυντικών για τα ανθεκτικά φυτά αντιδράσεων, αλλά και για την πρόκληση ασθενειών στα ευπαθή, θεωρούνται τα *hrr*, που έχουν ανιχνευθεί σε πολλά φυτοπαθογόνα βακτήρια και που κωδικοποιούν συστατικά ενός εξειδικευμένου συστήματος έκκρισης πρωτεϊνών



Αντίδραση υπερευαισθησίας



Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλο πιπεριάς (μαύρα βέλη) σημαίνοντας την παρουσία γόνου ανθεκτικότητας. Τα βακτηριακά κύτταρα είχαν διηθηθεί στον ιστό του φύλλου μέσω σύριγγας χωρίς τη βελόνα (δεξιά)



Βιβλιογραφία

- Ανώνυμος, 2009. Εργαστηριακές σημειώσεις Φυτοπαθολογίας. Εκδόσεις Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 45 σελ.
- Ζωάκη-Μαλισιόβα Δ., 1995. Εργαστήρια Φυτοπροστασίας Ι. Εκδόσεις ΤΕΙ Ηπείρου, 93 σελ.
- Ζωάκη-Μαλισιόβα Δ., 1998. Μαθήματα Φυτοπροστασίας Ι. Διδακτικές σημειώσεις, Εκδόσεις ΤΕΙ Ηπείρου, 121 σελ.
- Ηλιόπουλος Α.Γ., 2004. Γενική Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Έμβρυο, 296 σελ.
- Τζάμος Ε.Κ., 2007. Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλης, 557 σελ.



Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Τεχνολογικό Ίδρυμα Ηπείρου. Δρ Δήμητρα Ζωάκη
Μαλισιόβα.

Γενική Φυτοπαθολογία Εργαστήριο. Φυτοπαθολογική
βακτηριολογία.

Έκδοση: 1.0. Άρτα, 2015. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:
<<http://eclass.teiep.gr/courses/TEXG101/>>

Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά Δημιουργού-Μη Εμπορική Χρήση-Όχι Παράγωγα Έργα 4.0 Διεθνές [1] ή μεταγενέστερη. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, Διαγράμματα κ.λπ., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.

[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.el>



Τέλος Ενότητας

Επεξεργασία: Δρ Αντωνόπουλος Δημήτριος

Γεωπόνος-Φυτικής Παραγωγής ΓΠΑ

Γεωπόνος-Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας ΓΠΑ

ΕΠΠΑΙΚ ΑΣΠΑΙΤΕ

ΜΔΕ (MPhil) Φυτοπροστασίας ΓΠΑ

ΜΔΕ (MSc) Ασφάλειας Τροφίμων WUR

ΔΔ (PhD) Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ

Μετα-ΔΔ (Post-Doc) Φυτοπαθολογίας NCSU USA

Μετα-ΔΔ (Post-Doc) Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ-ΙΚΥ

Άρτα, 2015



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
Πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

