



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού

Περιβάλλοντος

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Φυτιατρική και Περιβάλλον

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«Χαρακτηρισμός απομονώσεων του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Erwinia amylovora* και έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβακτηριακές ουσίες»

Μαρία Αδραμάνη

Βόλος, 2023

«Χαρακτηρισμός απομονώσεων του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Erwinia amylovora* και έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβακτηριακές ουσίες»

«Characterization of *Erwinia amylovora* isolates and evaluation of susceptibility to antibacterial agents»

Μαρία Αδραμάνη

Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

1. Βέλλιος Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων),
Φυτοπαθολογία – Προηγμένη Διαγνωστική
2. Σφουγγάρης Αθανάσιος, Καθηγητής, Διαχείριση Οικοσυστημάτων
και Βιοποικιλότητας
3. Λιολιοπούλου Φεβρωνία Dr., μέλος Ε.ΔΙ.Π., Φυτοπαθολογία

Copyright © ΑΔΡΑΜΑΝΗ ΜΑΡΙΑ, 2023.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ' ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η δημιουργία της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής αλλά και του πειραματικού μέρους που περιλαμβάνει δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την πολύτιμη συμβολή του κυρίου Βέλλιου Ευάγγελου Επίκουρου Καθηγητή Φυτοπαθολογίας και Σύγχρονων Μεθόδων Διαγνωστικής και της κυρίας Λιολιοπούλου Φεβρωνίας μέλος Ε.ΔΙ.Π., αξιότιμα στελέχη του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα λοιπόν, να τους εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες για την αρωγή και την υποστήριξη που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια της επιστημονικής έρευνας. Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Σφουγγάρη Αθανάσιο Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στέλεχος του εργαστηρίου Διαχείρισης Οικοσυστημάτων και Βιοποικιλότητας, για την προσφορά του στα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία της έρευνας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εταιρεία Bayer, για την προσφορά του σκευάσματος χαλκού που χρησιμοποιήθηκε. Τέλος, θα ήθελα να δώσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα άτομα που πίστεψαν σε εμένα και με υποστήριξαν από την πρώτη στιγμή αυτής μου της προσπάθειας.

Σας ευχαριστώ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το βακτήριο *Erwinia amylovora* προσβάλλει τις καλλιέργειες των μηλοειδών και προκαλεί την ασθένεια γνωστή ως βακτηριακό κάψιμο. Το *Erwinia amylovora* συχνά παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε ενώσεις χαλκού. Με αφορμή την ανθεκτικότητα του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε πειραματική έρευνα για την εύρεση νέων τρόπων αντιμετώπισής του. Η διεξαγωγή της έρευνας περιλάμβανε στάδια όπως η απομόνωση και οι μέθοδοι ταυτοποίησης του παθογόνου από ασθενή φυτικά δείγματα. Οι μέθοδοι ταυτοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η χρώση Gram, η αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού και η μοριακή ταυτοποίηση με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Επίσης, μέρος της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσε ο έλεγχος της ανθεκτικότητας του βακτηρίου στο υδροξείδιο του χαλκού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η έρευνα επεκτάθηκε πειραματικά στην εύρεση νέων αντιβακτηριακών ουσιών και ειδικότερα στον προσδιορισμό της ανασταλτικής δράσης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων. Τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Δενδρολίβανο, Δάφνη, Ευκάλυπτος, Ρίγανη, Φασκόμηλο, Γαρύφαλλο, Άνηθος και Μαντζουράνα. Τα αιθέρια έλαια εμφάνισαν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, ενώ ο χαλκός έδειξε να μην το επηρεάζει.

Λέξεις κλειδιά: *Erwinia amylovora*, Gram αρνητικό βακτήριο, χαλκός, αιθέρια έλαια.

SUMMARY

The bacterium *Erwinia amylovora* affects apple crops and causes the disease known as fire blight. *Erwinia amylovora* often shows resistance to copper compounds. Due to the resistance of the bacterium, experimental research was carried out to find new ways of its treatment. This research included stages such as the isolation and identification methods of the pathogen from symptomatic plant samples. The identification methods that were used were the Gram- staining method, the tobacco hypersensitivity reaction method and the molecular identification by polymerase chain reaction method (PCR). In addition, part of the experimental procedure was the test of bacterium resistance to copper hydroxide in different concentrations. The research was continued to discover new antibacterial substances and in particular to determine the inhibitory action of eight different essential oils. The essential oils that were used were Rosemary, Laurel, Eucalyptus, Oregano, Sage, Clove, Dill and Marjoram. The essential oils shown inhibitory action against the growth of *Erwinia amylovora*, while the action of copper was shown not to affect it.

Key words: *Erwinia amylovora*, Gram negative bacterium, copper, essential oils.

«Εγώ, η Μαρία Αδραμάνη, είμαι ο συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ' ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε., ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.»

«Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα Μαρία Αδραμάνη».

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 <i>Erwinia amylovora</i> : Γενικά στοιχεία για το βακτήριο.....	1
1.2 Ασθένεια που προκαλείται από το βακτήριο <i>Erwinia amylovora</i> σε φυτά ξενιστές: Βακτηριακό κάψιμο.....	1
1.3 Τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i>	2
1.4 Αντιμετώπιση της ασθένειας βακτηριακό κάψιμο.....	7
1.4.1 Σύγχρονοι τρόποι αντιμετώπισης του βακτηριακού καψίματος	7
1.4.2 Χρήση αιθέριων ελαίων για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος	10
1.4.3 Αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος από βακτήρια του γένους <i>Bacillus</i> : Μία βιολογική προσέγγιση	14
1.4.4 Χρήση αιθέριων ελαίων σε μη φυτοπαθογόνα βακτήρια.....	15
1.5 Σκοπός της έρευνας.....	17
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
2.1 Απομόνωση του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> από φυτικά δείγματα	18
2.2 Θρεπτικά υποστρώματα για την καλλιέργεια βακτηρίων <i>Erwinia amylovora</i> ..	20
2.2.1 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος NSA 1,5%.....	20
2.2.2 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος NSA 1,7%.....	21
2.2.3 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Mueller Hinton Agar (MHA)	21

2.2.4 Παρασκευή υγρού θρεπτικού υλικού NS Broth	22
2.3 Τεχνικές για την καλλιέργεια των βακτηρίων <i>Erwinia amylovora</i>	22
2.3.1 Διαδικασία γραμμωτής διασποράς βακτηρίων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Streaking).....	22
2.3.2 Παρασκευή υγρής καλλιέργειας βακτηρίων <i>Erwinia amylovora</i>	23
2.4 Χαρακτηρισμός απομονώσεων του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i>	24
2.4.1 Διαδικασία Χρώσης Gram του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i>	24
2.4.2 Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού	25
2.4.3 Μοριακή ταυτοποίηση του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i>	26
2.4.3.1 Ρυθμιστικό διάλυμα για την εξαγωγή DNA του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> (DNA Extraction)	26
2.4.3.2 Διαδικασία εξαγωγής DNA σύμφωνα με τους (Llop et al., 1999).....	26
2.4.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας.....	27
2.4.3.4 Διαδικασία PCR σύμφωνα με τους Taylor et al., (2001)	28
2.4.3.5 Ηλεκτροφόρηση	29
2.5 Έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> σε αντιμικροβιακές ουσίες	31
2.5.1 Προσδιορισμός της επιθυμητής αραίωσης βακτηρίων με βάση τα Mc Farland Standards	31
2.5.2 Έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> στον χαλκό.....	32
2.5.3 Έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> σε αιθέρια έλαια	33

2.5.3.1 Πείραμα με αιθέρια έλαια Ευκαλύπτου και Δάφνης – Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με χρήση δισκίων διηθητικού χαρτιού.....	33
2.5.3.2 Σύγκριση θρεπτικών υλικών για τον έλεγχο ευαισθησίας του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> σε αιθέρια έλαια Δάφνης	35
2.5.3.3 Έλεγχος ευαισθησίας στις θετικές απομονώσεις <i>Erwinia amylovora</i> σε οκτώ αιθέρια έλαια	36
2.6 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	37
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
3.1 Απομόνωση του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> από φυτικά δείγματα	38
3.2 Μέθοδοι ταυτοποίησης του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i>	39
3.2.1 Χρώση Gram	40
3.2.2 Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού	42
3.2.3 PCR με εξειδικευμένους εκκινητές για <i>Erwinia amylovora</i>	46
3.3 Έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> σε αντιβακτηριακές ουσίες	48
3.3.1 Έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> σε χαλκό.....	48
3.3.2 Έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> σε αιθέρια έλαια	49
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	90
4.1 Η επίδραση του χαλκού στο βακτήριο <i>Erwinia amylovora</i>	90
4.2 Η επίδραση των αιθέριων ελαίων στο βακτήριο <i>Erwinia amylovora</i>	92
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	99

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Χημική σχηματική απεικόνιση των κύριων ενώσεων που περιέχονται στα αιθέρια έλαια (βασισμένο στο Chizzola, 2013).....	11
Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας γραμμωτής διασποράς των βακτηρίων (streaking) σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.	23
Εικόνα 3. Απεικόνιση της αντικειμενοφόρου πλάκας και των τριών διαλυμάτων με την σειρά που χρησιμοποιούνται για την χρώση Gram.	25
Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση αριστερά τρυβλίου χωρίς βακτηρικές απομονώσεις και δεξιά τρυβλίου χωρισμένου σε 4 μέρη και σε κάθε μέρος διαφορετική βακτηριακή απομόνωση όπου Β συμβολισμός βακτηρίου.....	33
Εικόνα 5. Σκεύασμα χαλκού Copperfield 20WG (20% w/w) της Bayer.	33
Εικόνα 6. Αποτέλεσμα της χρώσης Gram του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> της απομόνωσης με κωδικό 52γ- κ (κόκκινο χρώμα) αριστερά και αποτέλεσμα της χρώσης Gram ενός θετικού Gram βακτηρίου μάρτυρα (μπλε- βιολετί χρώμα) δεξιά.....	40
Εικόνα 7. Φύλλο καπνού <i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>xanthi</i> μετά από 24 ώρες από τον εμβολιασμό με αιώρημα βακτηριακών κυττάρων που είναι εμφανής αντίδραση υπερευαισθησίας. Το νερό (H ₂ O) και η απομόνωση 26 που προφανώς δεν ανήκει στο είδος <i>Erwinia amylovora</i> δεν έδωσαν νεκρωτικές κηλίδες, ενώ οι απομονώσεις 23 και 24 έδωσαν νεκρωτικές κηλίδες στα σημεία που έγινε έγχυση.	43
Εικόνα 8. Επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 100 μL αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό NSA (NSA 1,5%). Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης.	56
Εικόνα 9. Επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 200 μL αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό NSA (NSA 1,5%). Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β	

παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης. 57

Εικόνα 10. Επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 100 μ L αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό NSA1,7%. Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης. 57

Εικόνα 11. Επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 200 μ L αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό NSA1,7%. Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης. 58

Εικόνα 12. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 100 μ L αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό ΜΗΑ. Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης. 58

Εικόνα 13. Επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 200 μ L αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό ΜΗΑ. Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης. 59

Εικόνα 14. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 100 μ L αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό King's B. Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης. 59

Εικόνα 15. Επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 200 μ L αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό King's B. Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β παρουσιάζεται η

ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης.	60
Εικόνα 16. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Άνηθου στην εικόνα Α στην απομόνωση 32 και στη Β στην απομόνωση 37 του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i>	86
Εικόνα 17. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Γαρύφαλλου στην εικόνα Α στην απομόνωση 39 και στη Β στην απομόνωση 64 του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> ...	86
Εικόνα 18. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης στην εικόνα Α στην απομόνωση 28 και στη Β στην απομόνωση 38 του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i>	87
Εικόνα 19. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Δενδρολίβανου στην εικόνα Α στην απομόνωση 22 και στη Β στην απομόνωση 24 του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> ...	87
Εικόνα 20. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Ευκαλύπτου στην εικόνα Α στην απομόνωση 23 και στη Β στην απομόνωση 27 του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> ...	88
Εικόνα 21. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Μαντζουράνας στην εικόνα Α στην απομόνωση 55 και στη Β στην απομόνωση 34 του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> ...	88
Εικόνα 22. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Ρίγανης στην εικόνα Α στην απομόνωση 52γ-κ και στη Β στην απομόνωση 24 του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i>	89
Εικόνα 23. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Φασκόμηλου στην εικόνα Α στην απομόνωση 37 και στη Β στην απομόνωση 55 του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> ...	89
Εικόνα 24. Στην εικόνα Α ο μάρτυρας της απομόνωσης 34 και στη Β ο μάρτυρας της απομόνωσης 38 του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i>	90

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Αντιοξειδωτικό ρυθμιστικό διάλυμα (Antioxidant maceration buffer) (EPPO, 2013).	3
Πίνακας 2. Phosphate buffered saline 10 mM, pH 7.2 (PBS) (EPPO, 2013).	4
Πίνακας 3. Ο συνολικός αριθμός απομονώσεων που πραγματοποιήθηκαν από τις συλλογές φυτικών δειγμάτων.	19
Πίνακας 4. Οι αραιώσεις των υγρών καλλιιεργειών του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> της απομόνωσης με κωδικό 23 που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης 0,5 Mc Farland.	31
Πίνακας 5. Ο συνολικός αριθμός απομονώσεων που πραγματοποιήθηκαν από τις συλλογές φυτικών δειγμάτων.	38
Πίνακας 6. Αποτελέσματα της χρώσης Gram σε απομονώσεις του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας και σε απομονώσεις που πραγματοποιήθηκαν από τις συλλογές φυτικών δειγμάτων. Παρουσιάζεται το χρώμα της κάθε βακτηριακής αποικίας.	40
Πίνακας 7. Αποτελέσματα της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού <i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>xanthi</i> σε απομονώσεις του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας και σε απομονώσεις που πραγματοποιήθηκαν από τις συλλογές φυτικών δειγμάτων. Όπου «+» παρουσία νεκρωτικής κηλίδας στο φύλλο καπνού και όπου «-» απουσία νεκρωτικής κηλίδας στο φύλλο καπνού. Παρουσιάζεται το χρώμα της κάθε βακτηριακής αποικίας.	44
Πίνακας 8. Αποτελέσματα της PCR ανάλυσης σε απομονώσεις του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας και σε απομονώσεις που πραγματοποιήθηκαν από τις συλλογές φυτικών δειγμάτων.	46
Πίνακας 9. Συγκεντρωτικός πίνακας των απομονώσεων που ταυτοποιήθηκαν θετικά για το βακτήριο <i>Erwinia amylovora</i> στην ανάλυση PCR. Όπου «-» αρνητικό κατά Gram βακτήριο, «+» παρουσία νεκρωτικής κηλίδας στην αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού <i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>xanthi</i> και θετικό στην ανάλυση PCR. Παρουσιάζεται το χρώμα της βακτηριακής αποικίας και η υφή της.	47

Πίνακας 10. Αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας στις 16 απομονώσεις του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού.	48
Πίνακας 11. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 23 (πυκνό βακτηριακό αιώρημα) παρουσία αιθέριων ελαίων Δάφνης και Ευκαλύπτου.	50
Πίνακας 12. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 23 (πυκνό βακτηριακό αιώρημα) για αιθέρια έλαια Δάφνης και Ευκαλύπτου. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.	50
Πίνακας 13. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 23 (αραιό βακτηριακό αιώρημα) παρουσία αιθέριων ελαίων Δάφνης και Ευκαλύπτου.	51
Πίνακας 14. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 23 (αραιό βακτηριακό αιώρημα) για αιθέρια έλαια Δάφνης και Ευκαλύπτου. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.	52
Πίνακας 15. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 22 (αραιό βακτηριακό αιώρημα) παρουσία αιθέριων ελαίων Δάφνης σε τέσσερα διαφορετικά στερεά θρεπτικά υλικά σε τρυβλία που έγινε επίστρωση 100 μL βακτηρίου και 200 μL βακτηρίου με αραιώση 1:100 σε 24h.	53
Πίνακας 16. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 22 (αραιό βακτηριακό αιώρημα) για αιθέρια έλαια Δάφνης σε τέσσερα διαφορετικά στερεά θρεπτικά υλικά σε τρυβλία που έγινε επίστρωση 100 μL βακτηρίου και 200 μL βακτηρίου με αραιώση 1:100 σε 24h. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.	54
Πίνακας 17. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 22 (αραιό βακτηριακό αιώρημα) παρουσία αιθέριων ελαίων Δάφνης σε τέσσερα διαφορετικά στερεά θρεπτικά υλικά σε	

τρυβλία που έγινε επίστρωση 100 μ L βακτηρίου και 200 μ L βακτηρίου με αραιώση 1:100 σε 48h. 55

Πίνακας 18. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 22 (αραιό βακτηριακό αιώρημα) για αιθέρια έλαια Δάφνης σε τέσσερα διαφορετικά στερεά θρεπτικά υλικά σε τρυβλία που έγινε επίστρωση 100 μ L βακτηρίου και 200 μ L βακτηρίου με αραιώση 1:100 σε 48h. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό. 55

Πίνακας 19. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 22 παρουσία αιθέριων ελαίων. .61

Πίνακας 20. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 22 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό. 62

Πίνακας 21. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 23 παρουσία αιθέριων ελαίων. .63

Πίνακας 22. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 23 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό. 63

Πίνακας 23. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 24 παρουσία αιθέριων ελαίων. .64

Πίνακας 24. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 24 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό. 65

Πίνακας 25. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 27 παρουσία αιθέριων ελαίων. .66

Πίνακας 26. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 27 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό. 66

Πίνακας 27. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 28 παρουσία αιθέριων ελαίων. .67	67
Πίνακας 28. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 28 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό. 68	68
Πίνακας 29. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 29 παρουσία αιθέριων ελαίων. .69	69
Πίνακας 30. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 29 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό. 69	69
Πίνακας 31. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 32 παρουσία αιθέριων ελαίων. .70	70
Πίνακας 32. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 32 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό. 71	71
Πίνακας 33. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 33 παρουσία αιθέριων ελαίων. .72	72
Πίνακας 34. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 33 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό. 72	72
Πίνακας 35. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 34 παρουσία αιθέριων ελαίων. .73	73
Πίνακας 36. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 34 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό. 74	74
Πίνακας 37. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 37 παρουσία αιθέριων ελαίων. .75	75

Πίνακας 38. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 37 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.	75
Πίνακας 39. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 38 παρουσία αιθέριων ελαίων. .	76
Πίνακας 40. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 38 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.	77
Πίνακας 41. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 39 παρουσία αιθέριων ελαίων. .	78
Πίνακας 42. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 39 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.	78
Πίνακας 43. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 52γ-κ παρουσία αιθέριων ελαίων.	79
Πίνακας 44. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 52γ-κ παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.	80
Πίνακας 45. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 55 παρουσία αιθέριων ελαίων. .	81
Πίνακας 46. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 55 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.	81
Πίνακας 47. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 64 παρουσία αιθέριων ελαίων. .	82

Πίνακας 48. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 64 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό. 83

Πίνακας 49. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 73 παρουσία αιθέριων ελαίων. . 84

Πίνακας 50. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 73 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό. 84

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1. Αποτελέσματα επίδρασης αιθέριων ελαίων Δάφνης και Ευκαλύπτου σε θρεπτικό υλικό NSA 1,5% σε πυκνό βακτηριακό αιώρημα της απομόνωσης με κωδικό 23.	50
Γράφημα 2. Αποτελέσματα επίδρασης αιθέριων ελαίων Δάφνης και Ευκαλύπτου σε θρεπτικό υλικό NSA 1,5% σε αραιό βακτηριακό αιώρημα της απομόνωσης με κωδικό 23 (αραίωση 1:10 σύμφωνα με τα Mc Farland Standards).	51
Γράφημα 3. Αποτελέσματα επίδρασης αιθέριων ελαίων Δάφνης σε τέσσερα διαφορετικά στερεά θρεπτικά υλικά σε τρυβλία που έγινε επίστρωση 100 μ L βακτηρίου και 200 μ L βακτηρίου με αρραίωση 1:100 σε 24h. Όπου NSA (NSA 1,5%), NSA 1,7 (NSA 1,7%), MHA (Mueller Hinton Agar) και KB (King's B).	53
Γράφημα 4. Αποτελέσματα επίδρασης αιθέριων ελαίων Δάφνης σε τέσσερα διαφορετικά στερεά θρεπτικά υλικά σε τρυβλία που έγινε επίστρωση 100 μ L βακτηρίου και 200 μ L βακτηρίου με αρραίωση 1:100 σε 48h. Όπου NSA (NSA 1,5%), NSA 1,7 (NSA 1,7%), MHA (Mueller Hinton Agar) και KB (King's B).	54
Γράφημα 5. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 22 μετά από 48 ώρες.	61
Γράφημα 6. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 23 μετά από 48 ώρες.....	62
Γράφημα 7. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 24 μετά από 48 ώρες.	64
Γράφημα 8. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 27 μετά από 48 ώρες.	65
Γράφημα 9. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 28 μετά από 48 ώρες.	67
Γράφημα 10. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 29 μετά από 48 ώρες.	68

Γράφημα 11. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 32 μετά από 48 ώρες.	70
Γράφημα 12. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 33 μετά από 48 ώρες.	71
Γράφημα 13. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 34 μετά από 48 ώρες.	73
Γράφημα 14. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 37 μετά από 48 ώρες.	74
Γράφημα 15. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 38 μετά από 48 ώρες.	76
Γράφημα 16. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 39 μετά από 48 ώρες.	77
Γράφημα 17. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 52γ-κ μετά από 48 ώρες.	79
Γράφημα 18. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 55 μετά από 48 ώρες.	80
Γράφημα 19. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 64 μετά από 48 ώρες.	82
Γράφημα 20. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 73 μετά από 48 ώρες.	83
Γράφημα 21. Αποτελεσματικότητα των οκτώ αιθέριων ελαίων στις 16 απομονώσεις του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i>	85

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 *Erwinia amylovora*: Γενικά στοιχεία για το βακτήριο

Το παθογόνο *Erwinia amylovora* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και στο γένος *Erwinia* (Pique et al., 2015). Η είσοδος του βακτηρίου στο ξενιστή μπορεί να γίνει από τα τραυματισμένα φύλλα ή από τα στόματα των φύλλων. Με την είσοδό του στο φυτό κινείται μέσα στα αγγεία του ξυλώματος και φτάνει σε όλα τα μέρη του φυτού. Σε νεαρά φύλλα εισέρχεται με περισσότερη δυσκολία, καθώς τα στόματα δεν έχουν αναπτυχθεί ακόμα. Μετά την είσοδο στα φύλλα με την μετακίνηση στα αγγεία του ξυλώματος το βακτήριο φτάνει στους βλαστούς και από τους βλαστούς φτάνει μέχρι και την ρίζα μέσα σε 2 εβδομάδες περίπου. Η βροχή αποτελεί σημαντική παράμετρο στην επιδημιολογία του παθογόνου, καθώς τα βακτήρια διασπείρονται με το νερό της βροχής σε πολλές περιοχές (Thomson, 2000). Η μολυσματικότητα του βακτηρίου ευνοείται από διάφορους παράγοντες όπως η ύπαρξη εξωπολυσακχαριτών (για παράδειγμα Amylonoran και Levan) οι οποίοι είναι διεγέρτες υπεύθυνοι για την μείωση της άμυνας του φυτού έναντι του παθογόνου, διότι δημιουργούνται διαταραχές στο αγγειακό σύστημα των φυτών. Επίσης, οι εξωπολυσακχαρίτες αναφέρεται ότι βοηθούν τα βακτήρια να επιβιώσουν σε συνθήκες έλλειψης νερού, συστήματος έκκρισης τύπου III (T3SS) και συγκεκριμένα μέσω ινιδίων (pili) που αποτελεί το πιο σημαντικό στοιχείο του συστήματος τύπου III (Pique et al., 2015). Ειδικότερα, μεταφέρονται πρωτεΐνες από το βακτηριακό κύτταρο μέσω του παραπάνω συστήματος και κάποιες από αυτές είναι οι Hrc και Hrp, οι οποίες κωδικοποιούνται από συντηρημένα γονίδια φυτοπαθογόνων βακτηρίων στην περίπτωση των Hrc και από γονίδια αμολυσματικότητας και παθογένειας στην περίπτωση των Hrp (Pique et al., 2015). Ακόμα, η σορβιτόλη και η σακχαρόζη αποτελούν πηγές άνθρακα για το βακτήριο και ευνοούν την παρουσία του στα φυτά ξενιστές (Sobiczewski et al., 2017).

1.2 Ασθένεια που προκαλείται από το βακτήριο *Erwinia amylovora* σε φυτά

ξενιστές: Βακτηριακό κάψιμο

Το βακτήριο *Erwinia amylovora* είναι υπεύθυνο για την πρόκληση της ασθένειας γνωστή ως πυρκαγιά ή βακτηριακό κάψιμο που προκαλείται σε πολλά είδη φυτών της οικογένειας *Rosaceae*. Κύριοι ξενιστές του αποτελούν τα μηλοειδή όπως μηλιά και

αχλαδιά (Pique et al., 2015). Σύμφωνα με τον Van der Zwet, η ασθένεια πήρε το όνομά της από τα συμπτώματα που προκαλεί στους ξενιστές της, δηλαδή στα φύλλα, στους κλάδους και στα άνθη που φαίνονται σαν να έχουν καεί από φωτιά (Santander et al., 2011). Η μετακίνηση του βακτηρίου από τους βλαστούς μπορεί να φτάσει στο υποκείμενο του δέντρου και να προκληθεί ολοκληρωτική νέκρωση του φυτού ξενιστή (Tancos et al., 2016). Κατά την χειμερινή περίοδο το βακτήριο διαχειμάζει σε έλκη που είχε δημιουργήσει σε κλάδους ή σε μολυσμένους φυτικούς ιστούς, ώστε να εκδηλωθεί ξανά την άνοιξη. Το γεγονός ότι το βακτήριο μπορεί να διαχειμάσει σε έλκη δείχνει πως έχει τη δυνατότητα να επιβιώνει ως νεκρότροφο. Επίσης, σε άλλες έρευνες φαίνεται να διαχειμάζει και ως ενδόφυτο, καθώς μπορεί να υπάρχει σε φυτά ξενιστές χωρίς να εκφράζει συμπτωματολογία, για παράδειγμα έχει βρεθεί να επιβιώνει σε πλευρικούς βλαστούς οι οποίοι είναι υγιείς και προήλθαν από αδρανείς οφθαλμούς (Sobiczewski et al., 2017).

1.3 Τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του βακτηρίου *Erwinia amylovora*

Το βακτήριο *Erwinia amylovora* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο και για την ταυτοποίησή του απαιτούνται δύο τουλάχιστον αναλύσεις, οι οποίες σχετίζονται με διαφορετικά χαρακτηριστικά του παθογόνου, για παράδειγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί συνδυασμός βιοχημικών, ορολογικών ή μοριακών αναλύσεων και ένα τεστ παθογένειας αν κριθεί απαραίτητο (EPPO, 2013).

Διαδικασία δειγματοληψίας

Το φυτικό υλικό αφού συλλεχθεί μπορεί να αποθηκευτεί στους 4- 8 °C για δύο εβδομάδες μέχρι να υποστεί την κατάλληλη επεξεργασία για την απομόνωση του βακτηρίου. Η απομόνωση χρειάζεται αντιοξειδωτικό ρυθμιστικό διάλυμα (Πίνακας 1) ή εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και αποστειρωμένο νερό. Κόβονται 0,1 g βλαστών, ανθέων, φύλλων, στελεχών και καρπών και τοποθετούνται σε πλαστικά σακουλάκια. Σε κάθε σακουλάκι προστίθενται 4,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος και παραμένουν για τουλάχιστον 5 min. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ομογενοποίηση του ρυθμιστικού διαλύματος και του φυτικού υλικού που υπάρχουν μέσα στην σακούλα (EPPO, 2013). Τα δείγματα αφού ομογενοποιηθούν μπαίνουν σε πάγο για λίγα λεπτά και μετά διαχωρίζονται σε τρεις αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf ως εξής: 2 ml του δείγματος για ανάλυση, 1 ml του δείγματος για αποθήκευση στους -20

°C για επόμενη ανάλυση ή επιβεβαίωση και 1 ml του δείγματος για αποθήκευση μαζί με 30% glycerol στους -80 °C (EPPO, 2013).

Πίνακας 1. Αντιοξειδωτικό ρυθμιστικό διάλυμα (Antioxidant maceration buffer) (EPPO, 2013).

Polyvinylpyrrolidone (PVP-10)	20.0 g
Mannitol	10.0 g
Ascorbic acid	1.76 g
Reduced glutathion	3.0 g
PBS 10 mm pH 7.2	1 L

Διαδικασία εμπλουτισμού και απομόνωσης

Ο εμπλουτισμός είναι μία διαδικασία η οποία χρησιμοποιείται για να εξασφαλίσει τον πολλαπλασιασμό του αρχικού πληθυσμού του βακτηρίου *Erwinia amylovora*. Ο εμπλουτισμός θα πρέπει να πραγματοποιείται πριν από την απομόνωση με σκοπό να εξασφαλιστεί μεγάλος αριθμός κυττάρων *Erwinia amylovora* ακόμα και για δείγματα τα οποία ήταν συμπτωματικά. Η παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιεί δύο υγρά θρεπτικά υλικά όπως το King's B και το CCT. Το King's B δεν περιέχει άγαρ, ενώ το CCT περιέχει θρεπτικό ζωμό αντί για θρεπτικό άγαρ. Το δείγμα εμποτίζεται στους σωλήνες οι οποίοι περιέχουν ένα από τα δύο υγρά θρεπτικά υλικά και μένουν στους 25 °C για 48-72 ώρες, ώστε να αναπτυχθούν τα βακτήρια (ISPM 27, 2016). Τα προϊόντα του εμπλουτισμού και οι αραιώσεις (1:10 και 1:100) παρασκευάζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Πίνακας 2) και ακολουθεί η διαδικασία γραμμωτής διασποράς (streaking), δηλαδή επιστρώνονται σε πλάκες CCT με τριπλές λωρίδες για να σχηματιστούν μεμονωμένες αποικίες του βακτηρίου. Η επώαση των πλακών γίνεται στους 25 °C για 72-96 ώρες και ακολουθεί ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση των βακτηρίων. Κατά τον εμπλουτισμό προτιμάται η χρήση του μέσου CCT για επίστρωση και αραιώση καθώς είναι ημι-εκλεκτικό μέσο και στην διαδικασία του εμπλουτισμού μπορεί να παρουσιαστούν και άλλα βακτήρια εκτός του *Erwinia amylovora* (ISPM 27, 2016).

Πίνακας 2. Phosphate buffered saline 10 mM, pH 7.2 (PBS) (EPPO, 2013).

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na₂HPO₄ 12H₂O	2.9 g
KH₂PO₄	0.2 g
Distilled water to	1 L

Διαδικασία εξαγωγής του DNA του βακτηρίου *Erwinia amylovora* (DNA Extraction)

Τα πρωτόκολλα που ακολουθούνται για την εξαγωγή DNA από φυτικά δείγματα είναι δύο. Το ένα είναι των Llop et al. (1999) και το επόμενο είναι των Taylor et al. (2001). Σύμφωνα με τους Llop et al. (1999) όπως αναφέρεται στο EPPO, 2013 η εξαγωγή DNA πραγματοποιείται με τη χρήση 1 ml από τα προϊόντα της απομόνωσης από τα φυτικά δείγματα που αναφέρθηκαν στην διαδικασία της δειγματοληψίας και/ ή 1 ml από τα προϊόντα που παράχθηκαν κατά τον εμπλουτισμό και την απομόνωση. Τα προϊόντα φυγοκεντρώνονται στα 10.000 g για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα τοποθετείται σε 500 μ L ρυθμιστικού διαλύματος. Πραγματοποιείται ανακίνηση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 4.000 g για 5 min. Λαμβάνονται 450 μ L από το υπερκείμενο και προστίθεται ο ίδιος όγκος ισοπροπανόλης και το φιαλίδιο μένει ανάποδα για 30 min έως και 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 5 min και το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται και το υπόλοιπο προϊόν στεγνώνει. Σε περίπτωση που υπάρχει κάποιο πράσινο ή καφέ ίζημα απορρίπτεται με προσοχή έτσι ώστε να δημιουργηθεί ένα καθαρότερο DNA. Το ίζημα μπορεί να τοποθετηθεί σε 200 μ L νερό και να χρησιμοποιηθεί σε PCR ανάλυση ή να αποθηκευθεί στους -20 °C (EPPO, 2013). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Taylor et al. (2001) όπως αναφέρεται στο EPPO, 2013 για την εξαγωγή DNA γίνεται προσθήκη 200 μ L από τα προϊόντα της απομόνωσης από τα φυτικά δείγματα που αναφέρθηκαν στην διαδικασία της δειγματοληψίας και/ ή από τα προϊόντα που παράχθηκαν κατά τον εμπλουτισμό και την απομόνωση σε 500 μ L ρυθμιστικού διαλύματος για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το εναιώρημα που θα παραχθεί μπορεί να χρησιμοποιηθεί για PCR ανάλυση ή να αποθηκευτεί στους -20 °C (EPPO, 2013).

Διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την ταυτοποίηση του βακτηρίου *Erwinia amylovora*

Τα πρωτόκολλα και οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση PCR για το βακτήριο *Erwinia amylovora* είναι αρκετά. Όμως τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι με εκκινητές που αποτελούνται από αλληλουχίες pEA29 και αυτά που οι εκκινητές τους στοχεύουν σε μοναδικές χρωμοσωμικές αλληλουχίες. Αν το αποτέλεσμα της PCR ανάλυσης είναι αρνητικό με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιεί εκκινητές pEA29 και θετικό με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιεί χρωμοσωμικές αλληλουχίες τότε η ανάλυση PCR μπορεί να θεωρηθεί θετική για το βακτήριο *Erwinia amylovora* (ISPM 27, 2016).

Το πρωτόκολλο της PCR ανάλυσης σύμφωνα με τους Taylor et al. (2001) περιλαμβάνει εκκινητές οι οποίοι αποτελούν στοχευμένες χρωμοσωμικές αλληλουχίες:

G1-F: 5'-CCT GCA TAA ATC ACC GCT GAC AGC TCA ATG-3'

G2-R: 5'-GCT ACC ACT GAT CGC TCG AAT CAA ATC GGC-3'

Το δείγμα που παράχθηκε κατά την εξαγωγή DNA χρησιμοποιείται για την ανάλυση και συγκεκριμένα 5 μ L του δείγματος τοποθετούνται σε 45 μ L μίγματος PCR. Στη συνέχεια ακολουθούν οι εξής κύκλοι:

- 95 °C για 3 min
- 40 κύκλοι στους
 - ✓ 94 °C για 30 sec
 - ✓ 60 °C για 30 sec
 - ✓ 72 °C για 1 min
- Τελικό στάδιο στους 72 °C για 5 min και πτώση θερμοκρασίας στους 15 °C

Το μέγεθος του αμπλικονίου αναμένεται να είναι 187 bp (ISPM 27, 2016).

Το πρωτόκολλο της PCR ανάλυσης σύμφωνα με τους Llor et al. (2000) περιλαμβάνει δύο σετ εκκινητών. Τα δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών απαιτούν διαφορετικές θερμοκρασίες και έτσι πραγματοποιούνται δύο διαδοχικές αναλύσεις PCR. Οι εξωτερικοί εκκινητές βασίζονται σε αλληλουχίες πλασμιδίου pEA29 και είναι οι εξής:

AJ75-F: 5'-CGT ATT CAC GGC TTC GCA GAT-3'

AJ76-R: 5'-ACC CGC CAG GAT AGT CGC ATA-3' (ISPM 27, 2016).

Οι εσωτερικοί εκκινητές είναι οι εξής:

PEANT1-F: 5'-TAT CCC TAA AAA CCT CAG TGC-3'

PEANT2-R: 5'-GCA ACC TTG TGC CCT TTA-3'

Το δείγμα που παράχθηκε κατά την εξαγωγή DNA χρησιμοποιείται για την ανάλυση και συγκεκριμένα 2 µL του δείγματος τοποθετούνται σε 48 µL μίγματος PCR. Στη συνέχεια ακολουθούν οι εξής κύκλοι:

Πρώτο στάδιο PCR:

- 94 °C για 4 min
- 25 κύκλοι στους 94 °C για 60 sec
- 72 °C για 90 sec

Δεύτερο στάδιο PCR:

- 94 °C για 4 min
- 40 κύκλοι
- ✓ 94 °C για 60 sec
- ✓ 56 °C για 60 sec
- ✓ 72 °C για 60 sec
- Τελικό στάδιο στους 72 °C για 10 min

Το μέγεθος του αμπλικονίου αναμένεται να είναι 391 bp, αν και μπορεί να υπάρξουν διαφοροποιήσεις στο μέγεθος (ISPM 27, 2016).

Τεστ Παθογένειας για την ταυτοποίηση του βακτηρίου *Erwinia amylovora*

Η δοκιμή παθογένειας πραγματοποιείται είτε σε ολόκληρους καρπούς είτε σε φέτες καρπών που προέρχονται από ευαίσθητες ποικιλίες μηλοειδών. Εισάγονται 10 µL από το εναιώρημα της αποικίας που έχει συγκέντρωση 10⁹ CFU/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Η επώαση πραγματοποιείται σε υγρό θάλαμο με θερμοκρασία 25 °C για 3 έως 7 ημέρες (EPPO, 2013). Το τεστ είναι θετικό σε καρπούς οι οποίοι παρουσιάζουν ερυθρό χρωματισμό γύρω από το σημείο που έγινε η εισαγωγή των βακτηρίων. Η δοκιμή

παθογένειας σε ολόκληρο το φυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί επίσης με τη χρήση ευαίσθητων ποικιλιών φυτών. Ειδικότερα, με ψαλίδι που έχει βυθιστεί σε εναιώρημα αποικίας που έχει συγκέντρωση 10^9 CFU/ml και βρίσκεται σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, κόβεται ένα νεαρό φύλλο από νεαρό βλαστό. Τα φυτά μπορούν να παραμείνουν σε θερμοκρασία 20- 25 °C, σχετική υγρασία 80- 100%, 16 ώρες φως για 3- 7 έως και 15 ημέρες. Κατά την παρατήρηση για μόλυνση από το βακτήριο *Erwinia amylovora* πρέπει να υπάρχουν συμπτώματα όπως μάρανση, αποχρωματισμός και νεκρώσεις ιστών (EPPO, 2013).

1.4 Αντιμετώπιση της ασθένειας βακτηριακό κάψιμο

1.4.1 Σύγχρονοι τρόποι αντιμετώπισης του βακτηριακού καψίματος

Χρήση ρυθμιστών ανάπτυξης και καλλιεργητικά μέτρα για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος

Η προσβολή του ξενιστή από *Erwinia amylovora* όταν εξαπλωθεί στα άνθη και τους βλαστούς μπορεί να προχωρήσει και στο υποκείμενο των δέντρων και να προκαλέσει ολοκληρωτική νέκρωση. Η αντιμετώπιση του βακτηρίου μπορεί να πραγματοποιηθεί με την χρήση κάποιου ρυθμιστή ανάπτυξης όπως το prohexadione- calcium, καθώς μπορεί να δημιουργήσει παχύτερα κυτταρικά τοιχώματα στα παρεγχυματικά κύτταρα και να μην υπάρχει ικανότητα παραγωγής πρωτεϊνών από το σύστημα έκκρισης τύπου III (T3SS) (Tancos et al., 2016). Με αυτό τον τρόπο δεν παράγονται πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την μολυσματικότητα του βακτηρίου. Με την χρήση ενός ρυθμιστή ανάπτυξης μπορεί να μειωθεί η ανάπτυξη νεαρών βλαστών που αποτελούν νέο ιστό περισσότερο ευαίσθητο στο βακτήριο. Ένα ακόμα μέτρο που προτείνεται είναι η αφαίρεση όλων των προσβεβλημένων κλάδων από το βακτήριο με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιηθεί η μετακίνηση του βακτηρίου και στα υπόλοιπα φυτικά μέρη (Tancos et al., 2016).

Χρήση αντιβιοτικών στην αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος

Η αντιμετώπιση του βακτηρίου μπορεί να πραγματοποιηθεί με αμυνογλυκοσιδικά αντιβιοτικά όπως είναι η στρεπτομυκίνη και η κασουγκαμυκίνη (Tancos et al., 2016). Τα αντιβιοτικά όπως η στρεπτομυκίνη έχουν μικρή συστηματική δράση και για αυτό το λόγο πρέπει να χορηγούνται νωρίς, δηλαδή προσφέρουν καλύτερο έλεγχο όταν το

βακτήριο δεν έχει φτάσει στο εσωτερικό του δέντρου και είναι δύσκολο να ελεγχτεί η εξάπλωσή του. Η στρεπτομυκίνη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε πληγές που μπορεί να υπάρχουν στο φυτό ξενιστή και να λειτουργούν ως σημεία εισόδου των βακτηρίων (Tancos et al., 2016). Παρόλα αυτά η εκτεταμένη χρήση της στρεπτομυκίνης μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας του παθογόνου. Η ανθεκτικότητα στην στρεπτομυκίνη πρώτη φορά παρατηρήθηκε στην Καλιφόρνια το 1971 (Förster et al., 2015). Η αντοχή του βακτηρίου *Erwinia amylovora* στην στρεπτομυκίνη μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις που γίνονται σε χρωμοσωμικά γονίδια ή στην παρουσία κάποιου πλασμιδίου. Παρατηρήθηκε ότι το κύριο αίτιο της ανθεκτικότητας του βακτηρίου στην στρεπτομυκίνη ήταν η παρουσία πλασμιδίου. Συγκεκριμένα, φάνηκε ότι δύο συνδεδεμένα γονίδια τα *strA* και *strB* είναι υπεύθυνα για την τροποποίηση της στρεπτομυκίνης σε μη τοξική ουσία για το φυτοπαθογόνο βακτήριο και τα γονίδια αυτά βρέθηκαν σε τρία πλασμίδια (*pEA29*, *pEA34*, *pEA8.7*) (Förster et al., 2015). Το πλασμίδιο *pEA29* αποτελεί το πλέον σύνηθες αίτιο για την εμφάνιση ανθεκτικότητας στην στρεπτομυκίνη. Σε περιοχές της Καλιφόρνιας που εφαρμόστηκαν συνδυαστικά στρεπτομυκίνη και οξυτετρακυκλίνη δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Η αποφυγή της δημιουργίας αντοχής στα αντιβιοτικά θα μπορούσε να προβλεφθεί με την χρήση συνδυασμών με χαλκό ή με οξυτετρακυκλίνη ή με κασουγκαμυκίνη, καθώς θα πρέπει να περιοριστούν και οι εφαρμογές των αντιβιοτικών ανά έτος σε μία με δύο (Förster et al., 2015). Η χρήση των αντιβιοτικών έχει απαγορευτεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση, με ελάχιστες εξαιρέσεις.

Χρήση χαλκού στην αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος

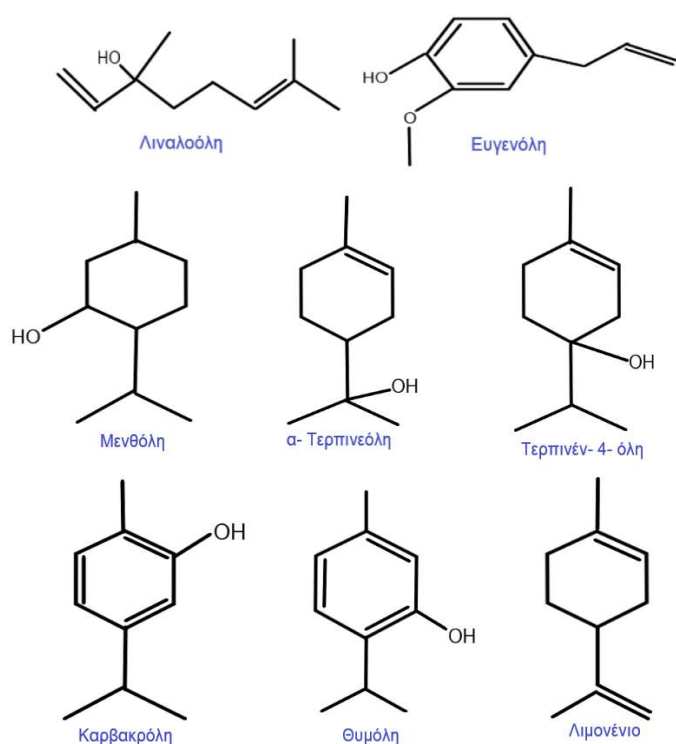
Η εφαρμογή του χαλκού για την προστασία των καλλιεργειών από πολλούς φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς όπως είναι οι μύκητες και τα βακτήρια έχει ξεκινήσει από το 1882. Η χημική σύσταση του χαλκού αποτελείται από ελεύθερα δισθενή ιόντα τα οποία μπορεί να διαλύονται δύσκολα και έτσι να απαιτούνται μεγαλύτερες ποσότητες του προκειμένου η δράση του να είναι αποτελεσματική (Gkanatsiou et al., 2019). Σύμφωνα με το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων τα σκευάσματα που προτείνονται για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος είναι κατά κύριο λόγο οι ενώσεις του χαλκού όπως το υδροξείδιο του χαλκού και ο οξυχλωριούχος χαλκός (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2023). Το υδροξείδιο του χαλκού $\text{Cu}(\text{OH})_2$ και ο οξυχλωριούχος χαλκός $\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuCl}_2$ είναι μορφές χαλκού που αν χρησιμοποιηθούν σε ανώτερες από τις

προβλεπόμενες συγκεντρώσεις δεν παρουσιάζουν κίνδυνο φυτοτοξικότητας (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2017). Τα δεδομένα για τον τρόπο δράσης των ενώσεων του χαλκού είναι περιορισμένα. Τα ιόντα Cu^{+2} απελευθερώνονται κατά τον ψεκασμό και συσσωρεύονται στο εσωτερικό των κυττάρων των παθογόνων όπως για παράδειγμα των μυκήτων. Η τοξικότητα δύναται να είναι αποτέλεσμα της μετουσίωσης πρωτεϊνών εξαιτίας της αντίδρασης του κατιόντος με σουλφυδρυλικές ομάδες (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2017). Ως συνέπειες της τοξικότητας του χαλκού κατά των μυκήτων μπορεί να είναι η παρεμβολή στο σύστημα του πυροσταφυλικού οξέος και καταστροφή της ημιπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2017). Οι ενώσεις χαλκού μπορούν να προκαλέσουν τοξικότητα και στα φυτά, καθώς σε περιόδους με συχνές βροχοπτώσεις τα ιόντα του μετάλλου (Cu^{+2}) εισέρχονται στο εσωτερικό των φυτικών μερών (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2017). Οι ενώσεις του χαλκού βρίσκουν εφαρμογή και στην αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος, παρόλο που πολλά βακτήρια καταφέρνουν να επιβιώνουν παρουσία του χαλκού. Ειδικότερα για το βακτήριο *Erwinia amylovora* δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα που να εξηγούν την επίδραση των ενώσεων του χαλκού στο βακτήριο (Ordax et al., 2006). Βακτήρια που έχουν απομονωθεί είναι ανεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού (ανθεκτικά ή μετρίως ανεκτικά) στο χαλκό και έτσι απαιτείται η εύρεση νέων τεχνικών εφαρμογής του χαλκού, οι οποίες να δρουν ικανοποιητικά έναντι των βακτηρίων. Μία μέθοδος που ερευνάται για την αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων με χαλκό είναι η ανάπτυξη των νανοσωματιδίων χαλκού (Gkanatsiou et al., 2019). Τα νανοσωματίδια του χαλκού διαθέτουν κάποια πλεονεκτήματα όπως το πολύ μικρό μέγεθός τους (<100 nm), η μεγάλη ενεργή επιφάνεια συγκριτικά με την εφαρμογή του χαλκού με την παραδοσιακή μέθοδο του ψεκασμού, η επίτευξη χαμηλότερων δόσεων χαλκού και η αυξημένη διαλυτότητα που παρουσιάζουν συγκριτικά με άλλα σκευάσματα χαλκού. Βέβαια, ο μηχανισμός δράσης τους δεν είναι πολύ γνωστός (Gkanatsiou et al., 2019). Φαίνεται να πραγματοποιείται μεταφορά ηλεκτρονίων που οδηγεί σε μία αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων χαλκού και των βακτηρίων προκαλώντας την καταστροφή μεμβράνης του βακτηρίου, την απουσία της λειτουργίας των κυτταρικών ενζύμων και τελικά τον θάνατο του βακτηριακού στελέχους. Στη συγκεκριμένη έρευνα η δράση νανοσωματιδίων χαλκού μελετήθηκε σε τρία είδη βακτηρίων: *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*. Η δράση των νανοσωματιδίων συγκρίθηκε με τη δράση του σκευάσματος Kocide 2000 35 WG, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί σε καλλιέργειες. Βρέθηκε ότι ήταν ισχυρά για όλα τα είδη βακτηρίων

in vitro με μικρότερη τιμή MIC για το *Erwinia amylovora* (< 3 μm/ml) σε σύγκριση με το Kocide (Gkanatsiou et al., 2019).

1.4.2 Χρήση αιθέριων ελαίων για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος

Τα αιθέρια έλαια αποτελούν σύνθετα μίγματα πτητικών ουσιών, οι οποίες απομονώνονται από τους φυτικούς ιστούς με τις μεθόδους υδροαπόσταξης ή απόσταξης με υδρατμό. Τα αιθέρια έλαια περιέχουν κυρίως μονοτερπένια και σεσκιτερπένια, ενώ μπορεί να υπάρχουν και ουσίες όπως εστέρες, λακτόνες, φαινυλοπροπανοειδή, καθώς και μονοτερπενικές γλυκοσίδες σε μερικά φυτά (Chizzola, 2013). Τα αιθέρια έλαια είναι λιπόφιλες ενώσεις με έντονο αρωματικό χαρακτήρα και συχνά συναντώνται στο φυτό σε ελαιοκύτταρα, αδενικούς πόρους και αδενικές τρίχες. Είναι πιθανό να συνυπάρχουν με ρητίνες και κόμμεα. Μερικές οικογένειες φυτών τα οποία είναι πλούσια σε αιθέρια έλαια είναι οι *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Pinaceae* και *Rutaceae* (Chizzola, 2013). Οι τεχνικές απόσταξης των αιθέριων ελαίων καθώς και η εποχή, το κλίμα και η περίοδος συγκομιδής των φυτών μπορούν να μεταβάλλουν την χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων (Baydar et al., 2004). Τα αιθέρια έλαια διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και φαίνεται ότι έχουν τη δυνατότητα να δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη πολλών φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Η δράση τους στα βακτηριακά κύτταρα επικεντρώνεται στην αποδιάταξη του κυτταρικού τοιχώματος, στην δυσλειτουργία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και των πρωτεϊνών της (Chizzola, 2013). Τελικά, το βακτηριακό κύτταρο οδηγείται σε διαρροή του περιεχομένου του, το κυτταρόπλασμα πήζει και η κινητικότητα των πρωτονίων μειώνεται. Περισσότερο ευπαθή στα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται τα Gram θετικά βακτήρια από ότι τα Gram αρνητικά. Κάποια συστατικά των αιθέριων ελαίων που βρέθηκε να έχουν ευρεία αντιβακτηριακή δράση είναι η θυμόλη, η καρβακρόλη, η α-τερπινεόλη, η τερπινεν-4-όλη, η ευγενόλη και η λιναλοόλη (Chizzola, 2013). Η χημική δομή των πιο κοινών συστατικών των αιθέριων ελαίων παρουσιάζεται παρακάτω στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Χημική σχηματική απεικόνιση των κύριων ενώσεων που περιέχονται στα αιθέρια έλαια (βασισμένο στο Chizzola, 2013).

Τα αιθέρια έλαια μπορούν να δράσουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη φυτοπαθογόνων βακτηρίων και για αυτό τον λόγο έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες με τη χρήση πολλών αιθέρια ελαίων από διάφορα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά ενάντια σε βακτήρια όπως το *Erwinia amylovora*, το *Pseudomonas syringae* και το *Xanthomonas campestris*, τα οποία συχνά προσβάλλουν πολλές καλλιέργειες (Carezzano et al., 2017) (Ciocarlan et al., 2021).

Έρευνες που έχουν γίνει για την αξιολόγηση της αντιβακτηριακής δράσης των αιθέρια ελαίων ακολουθούν παρακάτω.

Χρήση αιθέριου ελαίου Λεβάντας (Lavandula angustifolia) στην αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από βακτήρια:

Το *Lavandula angustifolia* ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*, είναι ένας αειθαλής θάμνος με πολυετή διάρκεια ζωής. Το αιθέριο ελαίο της αποτελείται από τερπενικές ενώσεις (για παράδειγμα μονοτερπένια) και αλειφατικές ενώσεις (για παράδειγμα υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, κετόνες, εστέρες). Οι κύριες χημικές ενώσεις που απαντώνται στο έλαιο της λεβάντας είναι ο οξικός λιναλυλεστέρας και η λιναλοόλη (Ciocarlan et al., 2021). Επίσης υπάρχουν περιορισμένα επιστημονικά δεδομένα για την επίδραση του αιθέριου ελαίου λεβάντας στα βακτήρια *Erwinia amylovora* και *Erwinia carotovora*. Στην έρευνα των Ciocarlan et al. του 2021 για την αντιβακτηριακή δράση του αιθέριου ελαίου λεβάντας χρησιμοποιήθηκε φυτικό υλικό λεβάντας από την Μολδαβία για την παραγωγή εκχυλίσματος αιθέριου ελαίου, αλλά εξετάστηκε και η δράση των υποπροϊόντων όπως υπολείμματα νερού και στερεών αποβλήτων λεβάντας. Το αιθέριο έλαιο λεβάντας έδειξε ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση MBC για τα βακτήρια *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens* και *Xanthomonas campestris*

300 µg/ml, ενώ για το *Erwinia amylovora* 150 µg/ml. Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε *in vitro* καλλιέργειες βακτηρίων όπου χρησιμοποιήθηκε μέθοδος διάχυσης αιθέριων ελαίων με δίσκο (Ciocarlan et al., 2021).

Χρήση αιθέριου ελαίου Κινέζικης Κανέλας (Cinnamomum cassia) και Γαρύφαλλου (Syzygium aromaticum) στην αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από βακτήρια:

Τα αιθέρια έλαια της κινέζικης κανέλας και του γαρίφαλου εφαρμόστηκαν για την καταπολέμηση του βακτηρίου *Erwinia amylovora*. Σε πείραμα των Doukkali et al. που πραγματοποιήθηκε στο Μαρόκο, το αιθέριο έλαιο της κινέζικης κανέλας περιείχε σε μεγαλύτερο ποσοστό ε- κινναμαλδεΐδη και σε μικρότερη ποσότητα α- κοπαένιο και ευγενόλη. Το αιθέριο έλαιο του γαρίφαλου βρέθηκε ότι περιείχε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ευγενόλη και ακολουθούσαν σε μικρότερες συγκεντρώσεις β-καρυοφυλλένιο (Doukkali et al., 2021). Η εισαγωγή των αιθέριων ελαίων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένων χάρτινων δίσκων σε τρυβλία που αναπτύσσονταν βακτήρια *Erwinia amylovora* δημιουργήσαν ζώνες αναστολής και συγκεκριμένα από το έλαιο του *Cinnamomum cassia* εμφανίστηκε διάμετρος ζώνης αναστολής 37,7 mm περίπου, ενώ η εφαρμογή του αιθέριου ελαίου *Syzygium aromaticum* εμφάνισε ζώνη αναστολής 15 mm περίπου. Όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση των αιθέριων ελαίων τόσο πιο έντονη γίνεται η ζώνη αναστολής (Doukkali et al., 2021). Στην ίδια μελέτη παρουσιάστηκε και η χρήση των νανοσωματιδίων των αιθέριων ελαίων *Cinnamomum cassia* και *Syzygium aromaticum*. Τα νανοσωματίδια των αιθέριων ελαίων κατασκευάστηκαν από δύο μέρη πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) 6000 (100 g σε κάθε μέρος), τα οποία θερμάνθηκαν στους 65 °C και αναδεύτηκαν σε μαγνητικό δοχείο. Την τήξη διαδέχθηκε η ανάμειξη 5 ml και 7,5 ml αιθέριων ελαίων κινέζικης κανέλας ή γαρύφαλλου ξεχωριστά με PEG. Ακολούθησε ανάδευση του μίγματος για 30 λεπτά και ψύξη του στους 4 °C για δύο ώρες με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν τα νανοσωματίδια των αιθέριων ελαίων. Η σύνθλιψη τους και το κοσκίνισμά τους πραγματοποιήθηκε στους 0 °C και τοποθετήθηκαν σε σάκους πολυαιθυλενίου (Doukkali et al., 2021). Οι ξηραντήρες με θερμοκρασία 27 ± 2 °C χρησιμοποιήθηκαν ως μέσο συντήρησής τους. Τα νανοσωματίδια συγκριτικά με τα αιθέρια έλαια παρουσιάζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα και φαίνεται να έχουν καλύτερη απόδοση στην αντιμετώπιση των βακτηρίων, επειδή δημιουργούν αποτελεσματικότερη επίδραση των αιθέριων ελαίων με την μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων (Doukkali et al., 2021).

Χρήση του αιθέριου ελαίου Νεραντζιάς (Citrus aurantium) στην αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από βακτήρια:

Τα εσπεριδοειδή ανήκουν στην οικογένεια *Rutaceae* και αποτελούν σημαντική πηγή αιθέριων ελαίων. Τα αιθέρια έλαιά τους βρίσκονται σε διάφορα μέρη του φυτού όμως με υψηλότερες συγκεντρώσεις στη φλούδα. Το κύριο συστατικό των αιθέριων ελαίων που βρέθηκε σε φλούδα νεραντζιού είναι το λιμονένιο, και ακολουθούν σε μικρότερες συγκεντρώσεις το β- μυρσένιο, η λιναλοόλη, το α- πινένιο και το β- πινένιο (Okla et al., 2019). Το πείραμα των Okla et al. πραγματοποιήθηκε στην Αίγυπτο. Τα διαφορετικά μέρη από τα οποία απομονώθηκε το αιθέριο έλαιο του *Citrus aurantium* παρουσιάζουν αρκετές διαφορές στην σύστασή τους. Τα πράσινα φύλλα και τα κλαδιά που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή αιθέριου ελαίου με βάση την ανάλυσή τους βρέθηκε να περιέχουν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις 4- τερπινεόλη και D- λιμονένιο. Τα μικρά κλαδιά καθώς και ο φλοιός και το ξύλο των κλαδιών βρέθηκε να περιέχουν κυρίως το D- λιμονένιο (Okla et al., 2019). Η αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων εξετάστηκε από το εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τμήμα Αγροτικής Βοτανικής, Σχολή Γεωργίας στο Πανεπιστήμιο της Αλεξάνδρειας στην Αίγυπτο. Το αιθέριο έλαιο που εξήχθη από τα πράσινα φύλλα και τα κλαδιά εμφάνισαν μεγαλύτερες ζώνες αναστολής στο βακτήριο *Erwinia amylovora*, οι οποίες κυμάνθηκαν από 12,66 mm έως 17,33 mm ανάλογα με την ποσότητα του αιθέριου ελαίου που χρησιμοποιήθηκε και η οποία ήταν 5, 10, 15, 20 και 25 μL σε αποστειρωμένους δίσκους διηθητικού χαρτιού. Παρατηρήθηκε ότι η διάμετρος της ζώνης αναστολής αυξάνεται με την αύξηση της ποσότητας του αιθέριου ελαίου (Okla et al., 2019).

Χρήση του αιθέριου ελαίου Κρίταμου (Crithmum maritimum) και Άγριου καρότου (Daucus carota subsp. gummifer) στην αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από βακτήρια:

Το κρίταμο και το άγριο καρότο ανήκουν στην οικογένεια *Apiaceae* και αυτοφύονται σε βραχώδεις περιοχές. Αποτελούν την πηγή πολλών δευτερογενών μεταβολιτών και συγκεκριμένα το κρίταμο περιέχει αιθέρια έλαια πλούσια σε διλλαπιόλη και γ- τερπινένιο ή λιμονένιο και γ- τερπινένιο ή μεθυλαιθέρα θυμόλης και γ- τερπινένιο ανάλογα με τον τόπο προέλευσής του. Το άγριο καρότο περιέχει σε μεγαλύτερα ποσοστά μονοτερπένια και ειδικότερα οξικό γερανυλεστέρα και πινένια (Sanchez-Hernandez et al., 2021). Σύμφωνα με το πείραμα των Sanchez- Hernandez et al. που

πραγματοποιήθηκε στην Ισπανία εξετάστηκε η ανασταλτική δράση που μπορούν να έχουν τα αιθέρια έλαια τους σε βακτήρια όπως το *Erwinia amylovora* και το *Xylophilus ampelinus*. Δημιουργήθηκαν βακτηριακά εναιωρήματα σε πλάκες PDA στις οποίες προηγουμένως είχαν προστεθεί βιοενεργά συστατικά (εκχυλίσματα καθώς και προϊόντα των εκχυλισμάτων όπως η απιόλη στην περίπτωση του κρίταμου και ο οξικός γερανυλεστέρας στην περίπτωση του άγριου καρότου) σε συγκεντρώσεις 62,5 έως 1500 $\mu\text{L}/\text{ml}$. Βρέθηκε ότι η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων για τα δύο βακτήρια δεν διέφερε και ήταν λίγο μεγαλύτερη αυτή του εκχυλίσματος κρίταμου στο *Xylophilus ampelinus* (Sanchez- Hernandez et al., 2021). Η ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των δύο βακτηρίων φάνηκε στη συγκέντρωση 1500 $\mu\text{L}/\text{ml}$ και στην περίπτωση των εκχυλισμάτων αλλά και στην περίπτωση κάποιων προϊόντων των εκχυλισμάτων. Συνεπώς, όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση εκχυλίσματος ή προϊόντων του εκχυλίσματος τόσο μεγαλύτερη και η αντιβακτηριακή τους δράση (Sanchez- Hernandez et al., 2021).

1.4.3 Αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος από βακτήρια του γένους

***Bacillus*: Μία βιολογική προσέγγιση**

Σε πρόσφατες μελέτες εξετάζεται και η αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος από βακτήρια *Bacillus velezensis* OEE1 προσφέροντας μία περισσότερο βιολογική προσέγγιση. Σύμφωνα με τους Medhioub et al. το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus velezensis* OEE1 χρησιμοποιήθηκε σε φύλλα, κλαδιά και καρπούς προσβεβλημένους από *Erwinia amylovora* ως θεραπευτικό και προστατευτικό για να αξιολογηθεί η δράση του ενάντια στα συμπτώματα που προκαλεί η ασθένεια. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τη δραστηριότητα που παρέχει το εμπορικό σκεύασμα του οξειδίου του χαλκού Cu_2O και με τη δράση που παρέχει ακόμα ένα βακτηριακό στέλεχος ενάντια της ασθένειας το *Bacillus subtilis* Y1336. Προέκυψε ότι η θεραπευτική εφαρμογή του στελέχους *Bacillus velezensis* OEE1 σε φύλλα μηλιάς μείωσε τα συμπτώματα της ασθένειας σε ποσοστό περίπου 50% και το ίδιο αποτέλεσμα υπήρχε με την χρήση *Bacillus subtilis* Y1336 και με οξείδιο του χαλκού Cu_2O (Medhioub et al., 2022). Σε μολύνσεις κλαδιών το στέλεχος *Bacillus velezensis* OEE1 μείωσε αρκετά την προσβολή των αγγείων, το στέλεχος *Bacillus subtilis* Y1336 παρείχε αξιόλογη μείωση στα συμπτώματα σε κλαδιά. Τα αποτελέσματα των δύο βακτηριακών στελεχών και η χρήση του οξειδίου του χαλκού Cu_2O δεν διέφεραν αρκετά. Σε ανώριμους καρπούς η εφαρμογή του οξειδίου του χαλκού Cu_2O έδειξε ότι υπήρχε μικρή μείωση στα

συμπτώματα της ασθένειας συγκριτικά με το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus subtilis* Y1336 που έδειξε καλύτερα αποτελέσματα. Η χρήση του *Bacillus velezensis* OEE1 έδειξε πολύ πιο εμφανή μείωση στο δείκτη μόλυνσης (Medhioub et al., 2022).

1.4.4 Χρήση αιθέριων ελαίων σε μη φυτοπαθογόνα βακτήρια

Τα αιθέρια έλαια αρωματικών φυτών έχουν δοκιμαστεί ως προς την ανασταλτική δράση που εμφανίζουν σε βακτήρια που δεν αποτελούν απειλή για την φυτική παραγωγή είτε αυτά είναι Gram θετικά είτε αυτά είναι Gram αρνητικά. Η μαντζουράνα ανήκει στο γένος *Origanum* και συγκεκριμένα στο είδος *Origanum majorana*. Το αιθέριο έλαιό της μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη βακτηρίων. Τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου μαντζουράνας είναι η 1,8- κινεόλη, το α- πινένιο και το λιμονένιο (Elshafie et al., 2022). Στη μελέτη των Busatta et al. του 2008 αξιολογήθηκαν οι αντιβακτηριακές δράσεις του αιθέριου ελαίου μαντζουράνας σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια όπως το *Escherichia coli* και το *Salmonella choleraensius*, αλλά και σε θετικά κατά Gram βακτήρια όπως το *Staphylococcus aureus* και το *Streptococcus mutans*. Το αιθέριο έλαιο χορηγήθηκε με τη βοήθεια χάρτινων δίσκων διαμέτρου 7 mm, οι οποίοι περιείχαν ο κάθε ένας 5 μ L από το αιθέριο έλαιο μαντζουράνας. Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton Agar (MHA) με πυκνότητα βακτηριακού αιωρήματος 10^8 CFU/ml και οι ζώνες αναστολής μετρήθηκαν μετά από 24 ώρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα Gram αρνητικά βακτήρια φάνηκε να είναι περισσότερο ευαίσθητα στο αιθέριο έλαιο μαντζουράνας (Busatta et al., 2008). Στην οικογένεια *Lamiaceae* υπάρχουν φυτά γνωστά για τα αιθέρια έλαιά τους και αυτά είναι η ρίγανη, το θυμάρι και το φασκόμηλο. Η ρίγανη ανήκει στο γένος *Origanum* και στο είδος *Origanum vulgare*. Τα κύρια συστατικά του ελαίου της είναι η καρβακρόλη και η θυμόλη ακολουθούμενες από γ- τερπινένιο και π- κιμένιο. Το φασκόμηλο ανήκει στο γένος *Salvia* και στο είδος *Salvia officinalis*. Τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου φασκόμηλου είναι 1,8- κινεόλη, α- θυονγίονη και καμφορά (Fournomiti et al., 2015). Το θυμάρι ανήκει στο γένος *Thymus* και στο είδος *Thymus vulgaris*. Το αιθέριο έλαιό του αποτελείται από θυμόλη, π- κιμένιο, γ- τερπινένιο, λιναλοόλη, καρβακρόλη και β- καρνοφυλλένιο (Proto et al., 2022). Τα αιθέρια έλαια των παραπάνω φυτών εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και συγκεκριμένα στη μελέτη των Fournomiti et al. του 2015 αξιολογήθηκε η επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης, φασκόμηλου και θυμαριού στην ανάπτυξη του βακτηρίου *Escherichia coli*, όπου χρησιμοποιήθηκε

ως θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των βακτηρίων το Mueller Hinton Agar (MHA) και τοποθετήθηκαν σε κάθε υπόστρωμα 100 μ L του βακτηρίου αραιωμένου σύμφωνα με το πρότυπο διάλυμα 0,5 Mc Farland. Τα αιθέρια έλαια από κάθε αρωματικό φυτό προστέθηκαν σε ειδική υποδομή του θρεπτικού υποστρώματος όπου είχαν επιστρωθεί τα βακτήρια. Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν στους 37 °C για 16 ώρες και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι λιγότερο δραστικό ήταν το αιθέριο έλαιο του φασκόμηλου (Fournomiti et al., 2015). Το δενδρολίβανο είναι ένα αρωματικό φυτό που ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*, στο γένος *Rosmarinus* και στο είδος *Rosmarinus officinalis*. Το αιθέριο έλαιό αποτελείται από 1,8- κινεόλη, καμφορά, α -πινένιο και β -πινένιο (Doukkali et al., 2018). Οι Walid et al. σε μελέτη το 2022 αξιολόγησαν τα αιθέρια έλαια του δενδρολίβανου ως προς την αντιβακτηριακή τους δράση σε βακτήρια όπως το *Salmonella enterica* και το *Escherichia coli*. Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton Agar (MHA) και το αιθέριο έλαιο εμποτίστηκε σε χάρτινους δίσκους διαμέτρου 6 mm και σε ποσότητα 10 μ L. Παρατηρήθηκε αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων δενδρολίβανου στα παραπάνω βακτήρια (Walid et al, 2022). Μερικά φυτά πλούσια σε αιθέρια έλαια είναι αυτά του γένους *Eucalyptus* της οικογένειας *Myrtaceae*. Τα κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων τους είναι η πιπεριτόνη, το α -φελλανδρένιο, π -κιμένιο και η τερπινεν-4-όλη (Gilles et al., 2010). Οι Gilles et al. το 2010 δοκίμασαν την ανασταλτική δράση των αιθέριων ελαίων του ευκαλύπτου σε Gram θετικά βακτήρια όπως το *Staphylococcus aureus* και σε Gram αρνητικά βακτήρια όπως το *Escherichia coli*. Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε Mueller Hinton Agar (MHA) και τα αιθέρια έλαια του ευκαλύπτου εφαρμόστηκαν με την μέθοδο διάχυσης μέσω δίσκων. Παρατηρήθηκε ότι το *Staphylococcus aureus* ήταν το πιο ευαίσθητο στο αιθέριο έλαιο από ότι το βακτήριο *Escherichia coli* (Gilles et al., 2010). Η δάφνη είναι αρωματικό φυτό της οικογένειας *Lauraceae*, ανήκει στο γένος *Laurus* και στο είδος *Laurus nobilis*. Το αιθέριο έλαιό της περιέχει σε μεγαλύτερη ποσότητα 1,8-κινεόλη. Στην οικογένεια *Umbelliferae* κατατάσσεται ο άνηθος και συγκεκριμένα στο γένος *Anethum* και το είδος *Anethum graveolens*. Ο άνηθος είναι ένα αρωματικό φυτό του οποίου τα αιθέρια έλαια περιέχουν κυρίως *carvone*, α -φελλανδρένιο, λιμονένιο και μυριστικίνη. Το φυτό τζίντζερ ανήκει στην οικογένεια *Zingiberaceae*, στο γένος *Zingiber* και το είδος *Zingiber officinale*. Τα αιθέρια έλαια του φυτού περιέχουν κυρίως καμφένιο, β -φελλενδρένιο και 1,8-κινεόλη (Snuossi et al., 2016). Οι Snuossi et al. το 2016 μελέτησαν την ανασταλτική δράση των αιθέριων ελαίων δάφνης, άνηθου και τζίντζερ σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια όπως

Klebsiella ornithinolytica και θετικά κατά Gram βακτήρια όπως *Staphylococcus* spp. και *Enterobacter cloacae*. Τα βακτήρια επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton Agar (MHA) και τα αιθέρια έλαια των αρωματικών φυτών εμποτίστηκαν σε χάρτινους δίσκους διαμέτρου 6 mm σε ποσότητα 10 mg αιθέριου ελαίου σε κάθε δίσκο. Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε στους 37 °C και παρατηρήθηκε στις 18- 24 ώρες. Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι το αιθέριο έλαιο δάφνης είχε την μεγαλύτερη ανασταλτική δράση σε όλα τα είδη βακτηρίων που εξετάστηκαν συγκριτικά με την δράση των αιθέριων ελαίων του άνηθου και του τζίντζερ (Snuossi et al., 2016).

1.5 Σκοπός της έρευνας

Τα βακτήρια που αναγνωρίστηκαν ότι ανήκουν στο είδος *Erwinia amylovora* στη συνέχεια ελέγχθηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε αντιβακτηριακές ουσίες όπως είναι ο χαλκός και τα αιθέρια έλαια. Οι βακτηριακές απομονώσεις αξιολογήθηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού και σε οκτώ διαφορετικά αιθέρια έλαια που προέρχονταν από άνηθο, γαρύφαλλο, δάφνη, δενδρολίβανο, ευκάλυπτο, μαντζουράνα, ρίγανη και φασκόμηλο.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απομόνωση του βακτηρίου *Erwinia amylovora* από φυτικά δείγματα

Η απομόνωση του βακτηρίου έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται σε δημοσίευση του EPPO (EPPO, 2013). Τα φυτικά δείγματα με τα πιο εμφανή και φρέσκα συμπτώματα και όπου ήταν δυνατό με εξιδρώσεις επιλέχθηκαν για την απομόνωση του βακτηρίου. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι εξιδρώσεις χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά για την απομόνωση. Τα εξωτερικά κλαδιά και φύλλα του βλαστού κόπηκαν για να μην υπάρχουν εξογκώματα. Πραγματοποιήθηκε εξωτερική απολύμανση του βλαστού με χαρτί εμποτισμένο με αιθανόλη 93°. Με αποστειρωμένο νυστέρι υπό ασηπτικές συνθήκες απομακρύνθηκε μία λεπτή φλούδα του φλοιού από τον ασθενή βλαστό. Η κοπή ήταν συνεχής από το υγιές προς το ασθενές τμήμα του βλαστού. Κάθε φορά που ολοκληρωνόταν μία κοπή το νυστέρι καιγόταν στη φλόγα. Σχηματίζοντας γωνία 30° εκατέρωθεν κόπηκαν μικρά κομμάτια του βλαστού στο όριο υγιούς και ασθενούς ιστού. Αν το δείγμα ήταν φύλλα τότε κόβονταν μικρά κομμάτια στο όριο υγιούς και νεκρωμένου ιστού. Σε φιαλίδιο τύπου Eppendorf όγκου 1,5 ml τοποθετήθηκαν 0,01 g βλαστού (5 κομματάκια) ή αν το δείγμα ήταν από φύλλο τότε 0,01 g φύλλου (4-5 κομματάκια φύλλου 0,5 mm x 0,5 mm). Ακολούθησε η προσθήκη 450 µL αποστειρωμένου νερού σε κάθε φιαλίδιο τύπου Eppendorf, παραμονή για 5 min και στη συνέχεια ομογενοποίηση του περιεχομένου τους. Μετά την ομογενοποίηση τα φιαλίδια Eppendorf με τα φυτικά δείγματα τοποθετήθηκαν για λίγα λεπτά στον πάγο (5 min). Μετά από τα 5 min πραγματοποιήθηκε μία επαναιώρηση. Τα φιαλίδια με τα φυτικά δείγματα καθώς και τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό NSA τοποθετήθηκαν στο θάλαμο στρωτής ροής αέρα για να γίνει η επίστρωση των βακτηρίων (plating). Λήφθηκαν 100 µL διαλύματος από κάθε φιαλίδιο και επιστρώθηκαν σε καθαρά τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό NSA. Τα τρυβλία που έγινε η επίστρωση μπήκαν στον επωαστικό θάλαμο στους 25 °C και παρατηρήθηκε η ανάπτυξη του βακτηρίου την επόμενη μέρα, δηλαδή σε 24 ώρες. Σε μερικές απομονώσεις που έγιναν από φύλλα χρησιμοποιήθηκε υποχλωριώδες Na 1% για 3 min και ξέπλυμα με αποστειρωμένο νερό για 30 sec, ώστε να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη σαπροφυτικών μικροοργανισμών.

Πίνακας 3. Ο συνολικός αριθμός απομονώσεων που πραγματοποιήθηκαν από τις συλλογές φυτικών δειγμάτων.

Κωδικός απομόνωσης	Υποχλωριώδες Να 1%	Φυτικό υλικό
51α	Όχι	Φύλλο
51β	Όχι	Φύλλο
52α	Όχι	Φύλλο
52β	Όχι	Φύλλο
52γ-κ	Όχι	Φύλλο
53	Όχι	Αχλαδάκι
54	Όχι	Φύλλο
55	Όχι	Φύλλο
56	Όχι	Φύλλο
57	Όχι	Φύλλο
58	Όχι	Βλαστός
59	Όχι	Αχλαδάκι
60	Όχι	Φύλλο
61	Όχι	Φύλλο
62	Όχι	Φύλλο
63	Όχι	Βλαστός
64	Όχι	Βλαστός
65 α	Ναι	Φύλλο
65β	Όχι	Φύλλο
66 α	Ναι	Φύλλο
66β	Όχι	Φύλλο
67 α	Ναι	Φύλλο
67β	Όχι	Φύλλο
68 α	Ναι	Φύλλο
68β	Όχι	Φύλλο
69 α	Ναι	Φύλλο
69β	Όχι	Φύλλο

70 α	Ναι	Φύλλο
70β	Όχι	Φύλλο
71β	Όχι	Φύλλο
71α	Ναι	Φύλλο
73	Όχι	Βλαστός

Οι απομονώσεις με κωδικούς 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 37, 38 και 39 ήταν απομονώσεις που υπήρχαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας και χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

2.2 Θρεπτικά υποστρώματα για την καλλιέργεια βακτηρίων *Erwinia amylovora*

2.2.1 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος NSA 1,5%

Το θρεπτικό υλικό NSA για την ανάπτυξη των βακτηρίων αποτελούνταν από δύο υλικά, Nutrient Agar και σουκρόζη 5%. Στο εργαστήριο για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα σκευάσματα LAB M Nutrient Agar Amersham, pH= 7,3 ± 0,2 του οποίου η σύσταση ήταν Peptone 5.0 g/L, Beef Extract 3.0 g/L, Sodium Chloride 8.0 g/L, Agar No2 12.0 g/L. Επίσης, Agar (SIGMA με κωδικό 05040) και σουκρόζη (D(+)) Saccharose της ROTH). Οι αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε υλικό ήταν 28 g Nutrient Agar, 3 g Agar και 50 g σουκρόζη για τη δημιουργία 1000 ml θρεπτικού υλικού. Σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκε το ογκομετρημένο νερό και οι απαιτούμενες ποσότητες των υλικών με πρώτη την ποσότητα του Nutrient Agar. Στη συνέχεια η κωνική φιάλη ανακινήθηκε και αφέθηκε για 10 min. Ακολούθησε η απαιτούμενη ποσότητα Agar και η σουκρόζη. Η κωνική φιάλη πωματίστηκε και το περιεχόμενό της αναδεύτηκε για 10-15 min με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Η κωνική φιάλη με το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε για 15 min στους 121 °C και πίεση 1,2 atm. Με το τέλος της αποστείρωσης μεταφέρθηκε στον θάλαμο νηματικής ροής αέρα και το υλικό τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένα γυάλινα τρυβλία διαμέτρου 90mm. Όλα τα τρυβλία είχαν παρόμοια ποσότητα υλικού συνήθως περίπου 12 ml. Παρέμειναν στο θάλαμο για να στερεοποιηθούν και μετά τοποθετήθηκαν στο ψυγείο όπου και διατηρήθηκαν μέχρι ένα μήνα.

2.2.2 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος NSA 1,7%

Το θρεπτικό υλικό NSA για την ανάπτυξη των βακτηρίων αποτελούνταν από δύο υλικά, Nutrient Agar και σουκρόζη 5%. Στο εργαστήριο για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα σκευάσματα LAB M Nutrient Agar Amersham, pH= $7,3 \pm 0,2$ του οποίου η σύσταση ήταν Peptone 5.0 g/L, Beef Extract 3.0 g/L, Sodium Chloride 8.0 g/L, Agar No2 12.0 g/L. Επίσης, Agar (SIGMA με κωδικό 05040) και σουκρόζη (D(+)) Saccharose της ROTH). Οι αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε υλικό ήταν 28 g Nutrient Agar, 5 g Agar και 50 g σουκρόζη για τη δημιουργία 1000 ml θρεπτικού υλικού. Σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκε το ογκομετρημένο νερό και οι απαιτούμενες ποσότητες των υλικών με πρώτη την ποσότητα του Nutrient Agar. Στη συνέχεια η κωνική φιάλη ανακινήθηκε και αφέθηκε για 10 min. Ακολούθησε η απαιτούμενη ποσότητα Agar και η σουκρόζη. Η κωνική φιάλη πωματίστηκε και το περιεχόμενό της αναδεύτηκε για 10-15 min με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Η κωνική φιάλη με το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε για 15 min στους 121 °C και πίεση 1,2 atm. Με το τέλος της αποστείρωσης μεταφέρθηκε στον θάλαμο νηματικής ροής αέρα και το υλικό τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένα γυάλινα τρυβλία διαμέτρου 90mm. Όλα τα τρυβλία είχαν παρόμοια ποσότητα υλικού συνήθως περίπου 12 ή 24 ml. Παρέμειναν στο θάλαμο για να στερεοποιηθούν και μετά τοποθετήθηκαν στο ψυγείο όπου και διατηρήθηκαν μέχρι ένα μήνα.

2.2.3 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος Mueller Hinton Agar (MHA)

Το θρεπτικό υλικό Mueller Hinton Agar (MHA) για την ανάπτυξη των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν εκχύλισμα βοδινού (OXOID LP0029 LAB- LEMCO POWDER), Agar (SIGMA με κωδικό 05040), άμυλο πατάτας (Starch from Potato) και πεπτόνη καζεΐνης (Casein Peptone for microbiology της εταιρείας PanReac AppliChem ITW Reagents). Η δημιουργία 1000 ml θρεπτικού υλικού απαιτούσε 2 g εκχύλισμα βοοειδούς, 17 g Agar, 17,50 g πεπτόνη καζεΐνης και 1,75 g άμυλο πατάτας. Σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν το ογκομετρημένο νερό και οι απαιτούμενες ποσότητες των υλικών. Στη συνέχεια η κωνική φιάλη ανακινήθηκε και τοποθετήθηκε για βρασμό. Κατά τη διάρκεια που η κωνική φιάλη ζεσταινόταν γινόταν ανακίνησή της κάθε 10 sec. Μετά τον βρασμό το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης ογκομετρούνταν και όταν χρειάζονταν περισσότερα ml, προσθέτονταν απεσταγμένο νερό μέχρι τον επιθυμητό

όγκο. Η κωνική φιάλη πωματίστηκε και αποστειρώθηκε με το υλικό για 15 min στους 121 °C και πίεση 1,2 atm. Με το τέλος της αποστείρωσης η κωνική φιάλη με το υλικό μεταφέρθηκε στον θάλαμο νηματικής ροής αέρα και το υλικό τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένα γυάλινα τρυβλία διαμέτρου 90mm. Όλα τα τρυβλία έπρεπε να είχαν παρόμοια ποσότητα υλικού συνήθως περίπου 24 ml. Παρέμειναν στο θάλαμο για να στερεοποιηθούν και μετά τοποθετήθηκαν στο ψυγείο όπου διατηρήθηκαν μέχρι ένα μήνα.

2.2.4 Παρασκευή υγρού θρεπτικού υλικού NS Broth

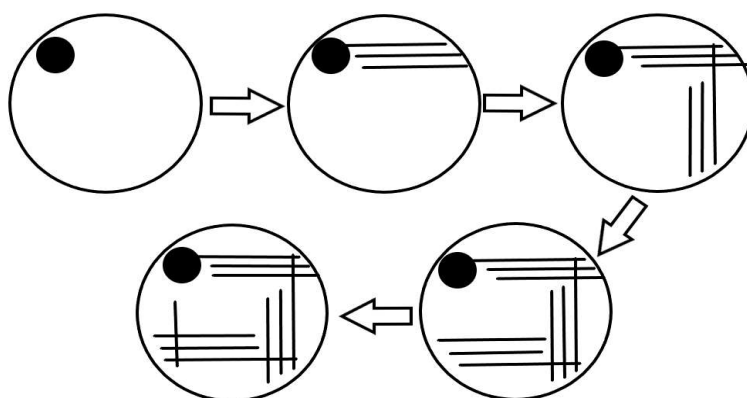
Το υγρό θρεπτικό υλικό NS Broth για την καλλιέργεια των βακτηρίων αποτελούνταν από τρία υλικά, το εκχύλισμα βοδινού (OXOID LP0029 LAB- LEMCO POWDER), η πεπτόνη (OXOID LD0037B BACTERIOLOGICAL PEPTONE) και η σακχαρόζη (5% Sucrose 50g/L, D(+) Saccharose της ROTH). Τα 1000 ml θρεπτικού υλικού χρειάστηκαν 3 g εκχύλισμα βοδινού, 5 g πεπτόνης και 50 g σακχαρόζης. Σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκε το ογκομετρημένο νερό και οι απαιτούμενες ποσότητες των υλικών με πρώτη την απαιτούμενη ποσότητα πεπτόνης και στη συνέχεια του εκχυλίσματος βοδινού. Το διάλυμα έβρασε και μετά τον βρασμό τοποθετήθηκε η απαιτούμενη ποσότητα σακχαρόζης. Ακολούθησε ανάδευση της κωνικής φιάλης, ώστε να διαλυθεί. Το διάλυμα ογκομετρήθηκε ξανά και προστέθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Το υγρό θρεπτικό υλικό NS Broth τοποθετήθηκε σε γυάλινα φιαλίδια τύπου Mc Cartney (Universal), όγκου 25 ml. Σε κάθε μπουκαλάκι περιέχονταν 10 ml υλικού, έκλεισαν με καπάκια και αποστειρώθηκαν στους 121 °C και πίεση 1,2 atm για 15 min. Μετά την αποστείρωση τα γυάλινα μπουκαλάκια με το υγρό θρεπτικό υλικό NS Broth φυλάχθηκαν σε συνθήκες δωματίου (25 °C).

2.3 Τεχνικές για την καλλιέργεια των βακτηρίων *Erwinia amylovora*

2.3.1 Διαδικασία γραμμωτής διασποράς βακτηρίων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Streaking)

Στον θάλαμο νηματικής ροής αέρα (Laminar Air Flow) τοποθετήθηκαν τα τρυβλία με το θρεπτικό υλικό NSA 1,5%. Επίσης, τοποθετήθηκαν τρυβλία που περιείχαν το βακτήριο *Erwinia amylovora*. Με ασηπτικές συνθήκες, από το τρυβλίο με το βακτήριο λήφθηκε μία αποικία με την βοήθεια του βακτηριολογικού κρίκου, η οποία τοποθετήθηκε στο καθαρό τρυβλίο με το θρεπτικό υλικό και δημιουργήθηκε ένας

κύκλος. Ο βακτηριολογικός κρίκος αποστειρώθηκε ξανά, κρύωσε σε μία άκρη στο τρυβλίο με το θρεπτικό υλικό και δημιουργήθηκαν 3 παράλληλες γραμμές όπου η μία ξεκινούσε από τον κύκλο. Ο βακτηριολογικός κρίκος κάηκε στην φλόγα, κρύωσε σε μία άκρη στο τρυβλίο με το θρεπτικό υλικό και δημιουργήθηκαν 3 παράλληλες γραμμές όπου η μία περνούσε από τις τρεις προηγούμενες. Στη συνέχεια, επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία, δηλαδή ο βακτηριολογικός κρίκος αποστειρώθηκε στην φλόγα, κρύωσε σε μία άκρη στο τρυβλίο με το θρεπτικό υλικό και δημιουργήθηκαν 3 παράλληλες γραμμές όπου η μία περνούσε από τις τρεις προηγούμενες. Επίσης, ο βακτηριολογικός κρίκος κάηκε στην φλόγα, κρύωσε σε μία άκρη στο τρυβλίο με το θρεπτικό υλικό και δημιουργήθηκε μία τελευταία γραμμή η οποία πέρασε από τις τρεις προηγούμενες. Τα τρυβλία όπου έγινε η γραμμωτή διασπορά (streaking) μπήκαν σε θάλαμο των 25 °C για να αναπτυχθούν τα βακτήρια. Οι παρατηρήσεις για την ανάπτυξη του βακτηρίου με τη μέθοδο γραμμωτής διασποράς (streaking) λήφθηκαν σε 24 ώρες.



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας γραμμωτής διασποράς των βακτηρίων (streaking) σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

2.3.2 Παρασκευή υγρής καλλιέργειας βακτηρίων *Erwinia amylovora*

Στον θάλαμο νηματικής ροής αέρα (Laminar Air Flow) τοποθετήθηκαν τα γυάλινα φιαλίδια τύπου Mc Cartney με το υγρό θρεπτικό υλικό NS Broth και τα τρυβλία με τα βακτήρια που είχε γίνει γραμμωτή διασπορά (streaking). Ο βακτηριολογικός κρίκος αποστειρώθηκε στη φλόγα, κρύωσε καλά και λήφθηκε μία αποικία βακτηρίου από το τρυβλίο υπό ασηπτικές συνθήκες. Το φιαλίδιο με το υγρό θρεπτικό υλικό NS Broth κάηκε στο στόμιό του στην φλόγα. Ο κρίκος με το βακτήριο μπήκε μέσα στο υγρό

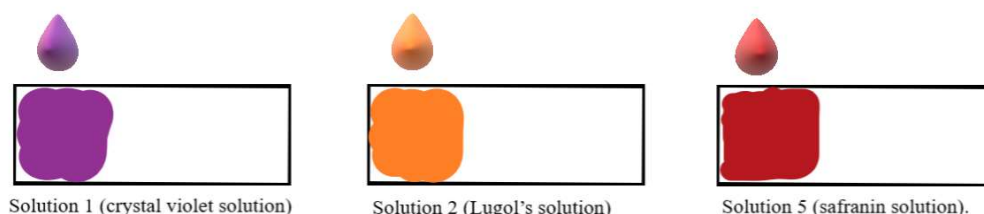
υλικό για 10 sec. Στη συνέχεια, ο κρίκος στράγγισε στο τοίχωμα του φιαλιδίου και αποστειρώθηκε. Το στόμιο του φιαλιδίου κάηκε και έκλεισε καλά με το καπάκι του. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε για κάθε δείγμα ξεχωριστά και μετά τα φιαλίδια μπήκαν σε επωαστικό αναδευτήρα για 24 ώρες, στους 25 °C και 150 rpm.

2.4 Χαρακτηρισμός απομονώσεων του βακτηρίου *Erwinia amylovora*

2.4.1 Διαδικασία Χρώσης Gram του βακτηρίου *Erwinia amylovora*

Τα τρυβλία με φρέσκοις αποικίες, που είχε γίνει γραμμωτή διασπορά (streaking) πριν λίγες μέρες, τοποθετήθηκαν στο θάλαμο νηματικής ροής. Στην άκρη της αντικειμενοφόρου πλάκας αφέθηκαν 15 μL αποστειρωμένο νερό. Ο βακτηριολογικός κρίκος αποστειρώθηκε και λήφθηκε μία μεμονωμένη αποικία του βακτηρίου. Η αποικία τοποθετήθηκε με τον κρίκο στην σταγόνα νερού πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα μέχρι να θολώσει η σταγόνα. Η αντικειμενοφόρος πλάκα κρατήθηκε πάνω από την κίτρινη φλόγα και σιγά σιγά το νερό εξατμίστηκε. Πάντα υπήρχε και ένας μάρτυρας, δηλαδή ένα μίγμα βακτηρίων Gram θετικών που αποτελούνταν από βακτήρια του γένους *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* και *Streptococcus* για να γίνει η σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Στη συνέχεια συγκεντρώθηκαν όλες οι αντικειμενοφόροι για την χρώση Gram. Σε γυάλινα μπουκαλάκια τοποθετήθηκαν τα διαλύματα: solution 1 (Crystal violet solution), solution 2 (Lugol's solution), μίγμα αιθανόλης και ακετόνης σε αναλογία 4/1 και solution 5 (Safranin solution) (Merck, Cat. No. 1.11885). Σε διαφορετικό γυάλινο μπουκαλάκι τοποθετήθηκε αποστειρωμένο νερό. Στην αντικειμενοφόρο στην πλευρά που υπήρχε το βακτήριο έπεσαν σταγόνες από το solution 1 (Crystal violet solution) για 1 min και μετά ξεπλύθηκε με το solution 2 (Lugol's solution). Το solution 2 (Lugol's solution) παρέμεινε στην αντικειμενοφόρο πλάκα για 1 min και ύστερα ξεπλύθηκε με αποστειρωμένο νερό για 5 sec. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε τρυβλίο με αιθανόλη για 20- 60 sec μέχρι η περιοχή με το βακτήριο να εμφανίζεται με απόχρωση γκριζο-μπλε. Η αντικειμενοφόρος ξεπλύθηκε με αποστειρωμένο νερό για 5 sec. Στη συνέχεια στην πλευρά που υπήρχε το βακτήριο με το πέρασμα των 5 sec έπεσε το solution 5 (Safranin solution), αφέθηκε να δράσει για 1 min και ξεπλύθηκε με αποστειρωμένο νερό για 5 sec. Στην αντικειμενοφόρο αφού στέγνωσε αναγράφηκε ξανά ο κωδικός του δείγματος που αφορά και στην συνέχεια έγινε παρατήρηση στο

μικροσκόπιο. Όσα δείγματα απέκτησαν μπλε- βιολετί χρώμα ήταν θετικά Gram και όσα δείγματα απέκτησαν ροζ- κόκκινο χρώμα ήταν αρνητικά Gram.



Εικόνα 3. Απεικόνιση της αντικειμενοφόρου πλάκας και των τριών διαλυμάτων με την σειρά που χρησιμοποιούνται για την χρώση Gram.

2.4.2 Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού

Τα τρυβλία με φρέσκοιες αποικίες, που είχε γίνει γραμμωτή διασπορά (streaking) πριν λίγες μέρες, τοποθετήθηκαν στο θάλαμο νηματικής ροής. Επίσης, τοποθετήθηκαν φιαλίδια τύπου Mc Carteney με υγρό θρεπτικό υλικό NS Broth για να δημιουργηθεί υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου με την διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω στην παράγραφο «2.3.2 Παρασκευή υγρής καλλιέργειας βακτηρίων *Erwinia amylovora*». Λήφθηκαν 750 μL από κάθε φιαλίδιο τύπου Mc Carteney με υγρή καλλιέργεια και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια τύπου Eppendorf χωρητικότητας 2 ml. Τα φιαλίδια τύπου Eppendorf μπήκαν για 10 min στη φυγόκεντρο σε $5.100 \times g$ (rcf). Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα παρέμεινε και προστέθηκαν 750 μL αποστειρωμένο νερό και έγινε επαναιώρηση του ιζήματος και προστέθηκαν επιπλέον 750 μL αποστειρωμένο νερό μέσα στα φιαλίδια. Σε φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*) πραγματοποιήθηκε δοκιμή υπερευαισθησίας. Συγκεκριμένα, το βακτηριακό αιώρημα που είχε προκύψει μεταφέρθηκε σε σύριγγα τύπου ινσουλίνης 1 ml και στη συνέχεια έγινε έγχυση του αιωρήματος στο πίσω μέρος ανεπτυγμένου φύλλου καπνού σε συγκεκριμένη προσημειωμένη θέση (EPPO, 2013). Σε κάθε δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν δύο αρνητικοί μάρτυρες, νερό (αντί για αιώρημα βακτηριακών κυττάρων) και αιώρημα βακτηριακών κυττάρων από απομόνωση που σε προκαταρκτικό πείραμα δεν είχε δώσει αντίδραση υπερευαισθησίας, στη συγκεκριμένη περίπτωση απομόνωση 26. Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αιώρημα βακτηριακών κυττάρων από απομόνωση που σε προκαταρκτικό πείραμα είχε δώσει αντίδραση υπερευαισθησίας, στη συγκεκριμένη περίπτωση απομόνωση 23. Ως θετική αντίδραση θεωρείται η νέκρωση της περιοχής που είχε γίνει η έγχυση αιωρήματος βακτηριακών κυττάρων. Αρνητική αντίδραση θεωρείται εάν η περιοχή που έγινε έγχυση δε διαφέρει από υγιείς περιοχές του φύλλου. Μετά από ένα εικοσιτετράωρο παρατηρήθηκαν τα πρώτα αποτελέσματα

και σημειώθηκαν οι θετικές και αρνητικές περιοχές όπου έγινε εισαγωγή των βακτηρίων.

2.4.3 Μοριακή ταυτοποίηση του βακτηρίου *Erwinia amylovora*

2.4.3.1 Ρυθμιστικό διάλυμα για την εξαγωγή DNA του βακτηρίου *Erwinia amylovora* (DNA Extraction)

Τα υλικά για τη δημιουργία ρυθμιστικού διαλύματος για την εξαγωγή του DNA του βακτηρίου ήταν σύμφωνα με τους (Llop et al., 1999):

Ρυθμιστικό διάλυμα Llop

5 M NaCl: Διάλυση 292,2 g NaCl σε 800 ml νερό. Προσθήκη νερού μέχρι ο όγκος να γίνει 1 λίτρο. Διαχωρίζεται σε πολλά μέρη (κομμάτια) και αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο (Sambrook et al., 1989).

10% SDS: Διάλυση 100 g από electrophoresis grade SDS σε 900 ml νερό. Ζέσταμα στους 68 °C για να βοηθηθεί η διάλυση. Προσθήκη λίγων σταγόνων HCl για να γίνει το pH 7,2. Διαχωρίζεται σε πολλά μέρη (κομμάτια) (Sambrook et al., 1989).

1 M Tris- HCl: Διάλυση 121,1 g από Tris βάση σε 800 ml νερό.

Προσθήκη HCl για pH= 7,4 -> 70 ml HCl

pH= 7,6 -> 60 ml HCl

pH= 8 -> 42 ml HCl (Sambrook et al., 1989).

0,5 M EDTA: Προσθήκη 186,1 g disodium ethylenediaminetetra acetate x 2 H₂O σε 800 ml νερό. Έντονη ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα. Προσθήκη 20 g NaOH (pellet) για να γίνει το pH= 8. Διαχωρίζεται σε μέρη (κομμάτια) και αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο (Sambrook et al., 1989).

2% PVP- 15

Το ρυθμιστικό διάλυμα φυλάχθηκε σε μπουκαλάκι σε συνθήκες δωματίου.

2.4.3.2 Διαδικασία εξαγωγής DNA σύμφωνα με τους (Llop et al., 1999)

Σε φιαλίδια τύπου Eppendorf χωρητικότητας 2 ml μεταφέρθηκαν 1,5 ml από την υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων ηλικίας 24 ωρών. Τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν στα

17.100 x g (rcf) για 5 min. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης αποβλήθηκε το υπερκείμενο υγρό και παρέμεινε το ίζημα. Στη συνέχεια προστέθηκαν 500 μ L ρυθμιστικού διαλύματος Llor (Llor et al., 1999). Το ίζημα επαναιωρήθηκε και επώαστηκε για 1 ώρα στους 25 °C και 150 rpm με συνεχή ανάδευση. Με το πέρασμα της 1 ώρας στον επωαστικό αναδευτήρα οι σωλήνες μπήκαν για φυγοκέντρωση στα 5.100 x g (rcf) για 5 min. Μετά από τη φυγοκέντρωση λήφθηκαν από κάθε δείγμα 400 μ L από το υπερκείμενο υγρό και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια τύπου Eppendorf χωρητικότητας των 1,5 ml. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 400 μ L ισοπροπανόλης σε κάθε ένα Eppendorf και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 13.100 x g (rcf) για 10 min. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης αποβλήθηκε όλο το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα που έμεινε στα φιαλίδια στέγνωσε για περίπου 30 min. Όταν τα ιζήματα στέγνωσαν, προστέθηκαν 100 μ L υπερκάθαρο νερό που είχε υποστεί επεξεργασία με DEPC και έγινε επαναιώρηση του ιζήματος. Το διάλυμα αποθηκεύτηκε στους -20 °C (Llor et al., 1999).

2.4.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA έγινε με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας ενός υδατικού διαλύματος DNA που πραγματοποιήθηκε με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Είναι γνωστό ότι η μέγιστη απορρόφηση του DNA παρατηρείται στα 260 nm, ενώ στα 280 nm είναι το μέγιστο απορρόφησης πρωτεϊνών και στα 230 nm το μέγιστο απορρόφησης αλάτων. Στο φασματοφωτόμετρο μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων DNA στα 260, 280 και 230 nm (Safeena et al., 2021). Η καθαρότητα του DNA υπολογίστηκε από τον λόγο OD_{260}/OD_{280} . Αν ο λόγος των απορροφήσεων είναι πάνω στο εύρος 1,8- 2 τότε το δείγμα αποτελείται από καθαρό DNA, αν ο λόγος των απορροφήσεων είναι μεγαλύτερος από 2 ή μικρότερος από 1,8 σημαίνει ότι το δείγμα DNA έχει μικρή καθαρότητα (Olson & Morrow, 2012). Πριν την μέτρηση των δειγμάτων DNA στο φασματοφωτόμετρο πραγματοποιήθηκε μέτρηση με νερό ώστε να γίνει σωστή ρύθμιση της συσκευής. Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: τα φιαλίδια τύπου Eppendorf με το DNA ξεπάγωσαν και τοποθετήθηκαν σε πάγο. Πραγματοποιήθηκε μία επαναιώρηση και μετά τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο για 1- 2 sec (short spin). Σε καινούρια φιαλίδια Eppendorf τοποθετήθηκαν 95 μ L αποστειρωμένο νερό και 5 μ L από το DNA. Σε ένα καινούριο φιαλίδιο Eppendorf

μπήκαν 100 μL αποστειρωμένο νερό, ώστε να ρυθμιστεί η μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο. Στη συνέχεια, όλα τα δείγματα αναλύθηκαν στο φασματοφωτόμετρο ένα ένα και σημειώθηκαν οι μετρήσεις. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω για τον υπολογισμό της καθαρότητας του DNA χρησιμοποιήθηκε ο λόγος των τιμών 260/280 που προκύπτουν από την μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο. Κάθε δείγμα με το τέλος της μέτρησης τοποθετήθηκε ξανά στο αντίστοιχο φιαλίδιο Eppendorf και μπήκε στην κατάψυξη για επόμενη μέτρηση αν χρειαστεί.

2.4.3.4 Διαδικασία PCR σύμφωνα με τους Taylor et al., (2001)

Η μοριακή ταυτοποίηση των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Taylor et al., (2001). Τα φιαλίδια Eppendorf με το DNA extraction τοποθετήθηκαν στον πάγο. Σε φιαλίδια Eppendorf χωρητικότητας 1,5 ml τοποθετήθηκε μία ποσότητα υπερκάθολου νερού που έχει υποστεί επεξεργασία με DEPC και μία ποσότητα από το DNA extraction. Οι ποσότητες διέφεραν σε κάθε δείγμα, διότι ανάλογα με τις τιμές που προέκυψαν από την μέτρηση OD προσδιορίστηκε διαφορετική αραιώση για κάθε δείγμα ώστε να προκύψει όσο το δυνατόν καλύτερο αποτέλεσμα στην PCR. Τα φιαλίδια με το αραιωμένο DNA τοποθετήθηκαν στον πάγο. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκε το Reaction Volume (25 μL) που αποτελούνταν από 2x Taq MM, Primer F, Primer R και υπερκάθαρο νερό που έχει υποστεί επεξεργασία με DEPC. Οι αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία του Reaction Volume είναι:

- 2x Taq MM 12,5 μL x (αριθμός δειγμάτων και αρνητικός μάρτυρας)
- Primer F 1 μL x (αριθμός δειγμάτων και αρνητικός μάρτυρας)
- Primer R 1 μL x (αριθμός δειγμάτων και αρνητικός μάρτυρας)
- DEPC treated water 8,5 μL x (αριθμός δειγμάτων και αρνητικός μάρτυρας)

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για την PCR ανάλυση ήταν:

Primer F: 5'-CCT GCA TAA ATC ACC GCT GAC AGC TCA ATG-3'

Primer R: 5'-GCT ACC ACT GAT CGC TCG AAT CAA ATC GGC-3' (Taylor et al., 2001).

Σε φιαλίδια Eppendorf που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ανάλυση και είχαν μικρότερο όγκο τοποθετήθηκαν 23 μL Reaction Volume και 2 μL από το αραιωμένο DNA που βρισκόταν στον πάγο. Εκτός από τα δείγματα στο τέλος σε ένα φιαλίδιο

Erppendorf για PCR μπήκαν 23 μL Reaction Volume και 2 μL υπερκάθαρου νερού που έχει υποστεί επεξεργασία με DEPC (αρνητικός μάρτυρας). Τα φιαλίδια Erppendorf της PCR ανάλυσης βρίσκονταν στον πάγο μέχρι να μπουν στον θερμοκυκλοποιητή και να ξεκινήσει η διαδικασία της PCR. Τα δείγματα και ο αρνητικός μάρτυρας μπήκαν στον θερμοκυκλοποιητή και ακολούθησαν οι εξής κύκλοι για την PCR:

- 3 min στους 95 °C
- 40 κύκλοι των
 - ✓ 30 sec στους 94 °C
 - ✓ 30 sec στους 60 °C
 - ✓ 1 min στους 72 °C
- 5 min στους 72 °C
- Ακολούθησε πτώση θερμοκρασίας στους 15 °C (Taylor et al., 2001).

Με το τέλος της διαδικασίας τα φιαλίδια Erppendorf της PCR τοποθετήθηκαν στον πάγο και μετά στην κατάψυξη.

Στη συνέχεια, τα δείγματα βγήκαν από την κατάψυξη, ξεπάγωσαν και τοποθετήθηκαν στον πάγο για να πραγματοποιηθεί λήψη ποσότητας για ηλεκτροφόρηση. Συγκεκριμένα λήφθηκαν 5 μL από κάθε Erppendorf της PCR και μπήκαν σε νέα φιαλίδια (Erppendorf), τα οποία περιείχαν το κάθε ένα 2 μL loading buffer type 3. Τα φιαλίδια της PCR ξαναμπήκαν στην κατάψυξη. Τα νέα φιαλίδια με το loading buffer type 3 οδηγήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση.

2.4.3.5 Ηλεκτροφόρηση

Για ηλεκτροφόρηση διαλύματος νουκλεϊκών οξέων είτε προϊόντων PCR χρησιμοποιείται είτε πηκτή αгарόζης είτε πηκτή πολυακριλαμίδης (Sambrook et al., 1989). Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε πηκτή αгарόζης. Στην αρχή συναρμολογήθηκε ο δίσκος που θα τοποθετούνταν το gel για την ηλεκτροφόρηση. Η αгарόζη που χρησιμοποιήθηκε ήταν: Agarose 500 g (Cat: AG02 της Fast Gene, Genetics NIPPON Genetics EUROPE GmbH). Σε ζυγαριά ακριβείας ζυγίστηκε 1,7% αгарόζη ανάλογα με τη ποσότητα του gel που θα χρησιμοποιούνταν για την ηλεκτροφόρηση. Το σύστημα της ηλεκτροφόρησης ήταν Model SHU6, Max vols: 300V, της Sigma– Aldrich. Το gel τοποθετήθηκε στο σύστημα ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε το διάλυμα 1x TBE λίγο πιο ψηλά από τις θέσεις υποδοχής και κάτω από

το Max Fill. Τα χτενάκια αφαιρέθηκαν προσεκτικά και στις θέσεις υποδοχής που σχηματίστηκαν τοποθετήθηκαν 7 μL από τα δείγματα που είχαν αραιωθεί στο loading buffer type 3. Στην πρώτη θέση μπήκαν 8 μL από το ladder (ο Marker που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο LMW Molecular Weight Ladder, NEB). Ακόμα ένας Marker που μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ήταν ob X 174 DNA – Hae III Digest, NEB. Στη συνέχεια, στις επόμενες θέσεις υποδοχής μπήκαν τα δείγματα της PCR που είχαν αραιωθεί στο loading buffer type 3. Στην τελευταία θέση μπήκε το δείγμα με το νερό αφήνοντας μία κενή θέση πριν από αυτό. Τα ηλεκτρόδια της συσκευής τοποθετήθηκαν στις θήρες ανάλογα με το χρώμα (κόκκινο- μαύρο). Το σύστημα ενεργοποιήθηκε στα 120 Volt και ξεκίνησε η διαδικασία ηλεκτροφόρησης. Με την ολοκλήρωσή της το προϊόν της ηλεκτροφόρησης βάφτηκε με 15 μL βρωμιούχο αιθίδιο στα 100 ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο είχε συγκέντρωση 10 mg/ml σε νερό και διατηρούνταν στο ψυγείο. Κατά τη βαφή χρησιμοποιήθηκε το ίδιο 1x TBE του συστήματος της ηλεκτροφόρησης. Οι αλληλουχίες παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια UV ακτινοβολίας. Αναλυτικά η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση ήταν σύμφωνα με τους Sambrook, et al., 1989:

Loading buffer Type 3:

- 0,25% bromophenol blue
- 0,25% xylene cyanol FF
- 30% glycerol in water
- Αποθήκευση του buffer στο ψυγείο στους 4 °C

Tris- borate (TBE):

5x 54 g Tris base

27,5 g boric acid

20 ml 0,5 EDTA (pH= 8)

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το 1x TBE και η σύστασή του ήταν:

Σε 1000 ml διαλύματος Tris base 10,8 g, boric acid 5,6 g και EDTA 4 ml ή 0,93 g.

2.5 Έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora* σε αντιμικροβιακές ουσίες

2.5.1 Προσδιορισμός της επιθυμητής αραιώσης βακτηρίων με βάση τα Mc Farland Standards

Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της επίδρασης των αντιβακτηριακών ουσιών στα βακτήρια απαιτούσαν και τον προσδιορισμό κάθε φορά παρόμοιας συγκέντρωσης βακτηριακών κυττάρων. Η επίτευξη της παρόμοιας συγκέντρωσης των βακτηριακών κυττάρων σε μία υγρή βακτηριακή καλλιέργεια μπορούσε να γίνει με τον προσδιορισμό της θολότητας κάποιων πρότυπων διαλυμάτων όπως είναι τα πρότυπα διαλύματα Mc Farland (Ouedrhiri et al., 2016, Fournomiti et al., 2015). Έτσι μειώθηκε η πιθανότητα λάθους σε κάποια δοκιμή. Στο πείραμα για τον προσδιορισμό της επιθυμητής αραιώσης χρειάστηκε η υγρή βακτηριακή καλλιέργεια για να είναι περίπου ίση με 0.5 Mc Farland, δηλαδή μία συγκέντρωση που αναφέρθηκε και σε βιβλιογραφία σχετική με βακτήρια στα οποία μελετήθηκε η επίδραση αντιμικροβιακών ουσιών όπως τα αιθέρια έλαια (Ouedrhiri et al., 2016, Fournomiti et al., 2015). Σε υγρή καλλιέργεια βακτηρίου *Erwinia amylovora* (απομόνωση με κωδικό 23) πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω αραιώσεις:

Πίνακας 4. Οι αραιώσεις των υγρών καλλιεργειών του βακτηρίου *Erwinia amylovora* της απομόνωσης με κωδικό 23 που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης 0,5 Mc Farland.

	Υγρό Θρεπτικό Υλικό NS Broth (ml)	Υγρή Καλλιέργεια Βακτηρίου <i>Erwinia</i> <i>amylovora</i> Απομόνωση 23 (ml)
Σωλήνας 1	4,75	0,25
Σωλήνας 2	4,50	0,5
Σωλήνας 3	4	1
Σωλήνας 4	4,50	0,7

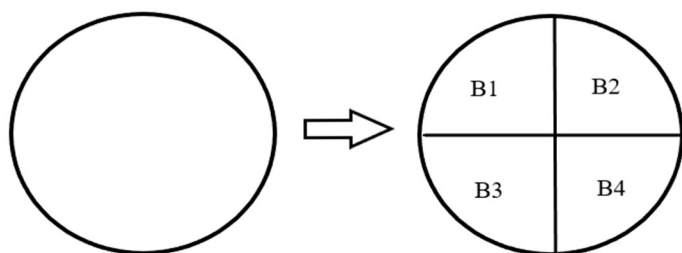
Οι σωλήνες συγκρίθηκαν με τις συγκεντρώσεις της φωτογραφίας των πρότυπων διαλυμάτων Mc Farland και συγκρίνοντας τη θολότητα των διαλυμάτων της φωτογραφίας τα συμπεράσματα που προέκυψαν ήταν ότι ο σωλήνας 3 ήταν περίπου στη συγκέντρωση 1.0 Mc Farland, οι σωλήνες 2 και 4 ήταν περίπου στη συγκέντρωση 0.5 Mc Farland και ο σωλήνας 1 ήταν περίπου σε συγκέντρωση μικρότερη των 0.5 Mc

Farland. Ακολούθησε μέτρηση OD στο φασματοφωτόμετρο. Συγκεκριμένα, έγινε μέτρηση στα 660, 625, 620 και 600 nm αρχικά σε υγρό θρεπτικό υλικό NS Broth για να μηδενίσει το φασματοφωτόμετρο. Ακολούθησαν μετρήσεις στα ίδια μήκη κύματος για κάθε έναν από τους τέσσερις σωλήνες και επίσης έγινε μέτρηση και σε υγρό θρεπτικό υλικό King's B με δεδομένα αναφοράς το NS Broth αλλά και χωρίς δεδομένο αναφοράς το NS Broth.

2.5.2 Έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora* στον χαλκό

Ο έλεγχος της ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora* στον χαλκό πραγματοποιήθηκε με το σκεύασμα χαλκού: Copperfield 20 WG (Μεταλλικός χαλκός: 20 % w/w (σε μορφή υδροξειδίου του χαλκού) και Βοηθητικές ουσίες: 65,10 % w/w, Τύπος σκευάσματος: Βρέξιμοι Κόκκοι (WG)) της Bayer. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0 M, 0,1 M, 0,5 M, 1 M και 1,5 M. Πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητοι υπολογισμοί και κατασκευάστηκε ένα διάλυμα χαλκού που περιείχε τις παραπάνω συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, το διάλυμα του χαλκού αποτελούνταν από 12 ml αποστειρωμένο νερό και 0,0121 g σκόνη από το σκεύασμα του χαλκού. Σε κάθε τρυβλίο ελέγχθηκαν ως προς την ευαισθησία τους στο χαλκό 4 απομονώσεις του βακτηρίου και χρειάστηκαν 3 επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση χαλκού. Το στερεό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα είναι το NSA 1,5%. Το θρεπτικό υλικό έγινε σύμφωνα με την διαδικασία που αναφέρθηκε στην παράγραφο «2.2.1 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος NSA 1,5%». Δημιουργήθηκαν 5 κωνικές φιάλες με θρεπτικό υλικό, δηλαδή μία για κάθε συγκέντρωση χαλκού. Στον θάλαμο νηματικής ροής αέρα (Laminar Air Flow) τοποθετήθηκαν τα αποστειρωμένα τρυβλία. Οι κωνικές φιάλες με το θρεπτικό υλικό βγήκαν διαδοχικά από την αποστείρωση και προστέθηκε η απαιτούμενη ποσότητα διαλύματος χαλκού ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση χαλκού. Στο συγκεκριμένο πείραμα κάθε κωνική φιάλη αποτελούνταν από 144 ml θρεπτικό υλικό NSA 1,5%. Έτσι, υπολογίστηκαν οι εξής ποσότητες διαλύματος χαλκού για την κάθε συγκέντρωση: 0,1 M (72 μ L), 0,5 M (360 μ L), 1 M (720 μ L) και 1,5 M (1080 μ L). Με την προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας χαλκού σε κάθε κωνική φιάλη έγινε μία ανάδευση και μετά επίστρωση στα τρυβλία με πάχος θρεπτικού υλικού 12 ml. Τα τρυβλία παρέμειναν στον θάλαμο λίγα λεπτά μέχρι να στερεοποιηθούν. Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό NS Broth σύμφωνα με την διαδικασία που

περιγράφηκε στο κομμάτι «2.3.2 Παρασκευή υγρής καλλιέργειας βακτηρίων *Erwinia amylovora*». Στη συνέχεια σε φιαλίδια τύπου Mc Cartney με υγρό θρεπτικό υλικό NS Broth έγινε αραιώση της βακτηριακής καλλιέργειας σε αναλογία 1:10 σύμφωνα με το πρότυπο διάλυμα 0,5 Mc Farland. Πραγματοποιήθηκε γραμμωτή διασπορά 10 μ L κάθε αραιωμένης υγρής βακτηριακής καλλιέργειας (Águila-Clares et al., 2018). Το κάθε τρυβλίο χωρίστηκε σε 4 μέρη και σε κάθε μέρος ελέγχθηκε μία βακτηριακή απομόνωση. Σε ένα τρυβλίο εξετάστηκαν 4 διαφορετικές βακτηριακές απομονώσεις. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στο θάλαμο των 25 °C για να αναπτυχθούν τα βακτήρια και παρατηρήθηκαν την επόμενη μέρα.



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση αριστερά τρυβλίου χωρίς βακτηριακές απομονώσεις και δεξιά τρυβλίου χωρισμένου σε 4 μέρη και σε κάθε μέρος διαφορετική βακτηριακή απομόνωση όπου B συμβολισμός βακτηρίου.



Εικόνα 5. Σκεύασμα χαλκού Copperfield 20WG (20% w/w) της Bayer.

2.5.3 Έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora* σε αιθέρια έλαια

2.5.3.1 Πείραμα με αιθέρια έλαια Ευκαλύπτου και Δάφνης – Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με χρήση δισκίων διηθητικού χαρτιού.

Τα τρυβλία με το θρεπτικό υλικό NSA 1,5% με πάχος 12 ml τοποθετήθηκαν στο θάλαμο. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε υγρή βακτηριακή καλλιέργεια 24 ωρών που είχε αναπτυχθεί σε θρεπτικό υλικό NS Broth. Στο συγκεκριμένο πείραμα η καλλιέργεια του

βακτηρίου προέρχονταν από την απομόνωση με κωδικό 23 και δημιουργήθηκε σύμφωνα με την διαδικασία που περιεγράφηκε στην παράγραφο «2.3.2 Παρασκευή υγρής καλλιέργειας βακτηρίων *Erwinia amylovora*». Ακόμα, σε τρία αποστειρωμένα τρυβλία τοποθετήθηκαν 6 αποστειρωμένα διηθητικά χαρτάκια, σε κάθε ένα με διάμετρο 6 mm. Το ένα τρυβλίο περιείχε χαρτάκια χωρίς αιθέριο έλαιο και τα άλλα δύο τρυβλία περιείχαν χαρτάκια εμποτισμένα με 5 μ L αιθέριου ελαίου Δάφνης και Ευκαλύπτου αντίστοιχα. Σύμφωνα με το πρότυπο διάλυμα 0,5 Mc Farland επιλέχθηκε να γίνει αραιώση 1:10 της υγρής καλλιέργειας του βακτηρίου. Σε ένα φιαλίδιο τύπου Eppendorf πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:10 σε θρεπτικό υλικό NS Broth, δηλαδή 150 μ L από υγρή καλλιέργεια βακτηρίου και 1350 μ L από καθαρό θρεπτικό υλικό NS Broth. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε και υγρή καλλιέργεια βακτηρίου χωρίς αραιώση 1:10 για να συγκριθούν τα αποτελέσματα. Έτσι, σε κάθε τρυβλίο έγινε επίστρωση (plating) με 200 μ L. Πάντα δημιουργούνταν τρία τρυβλία μάρτυρες για κάθε καλλιέργεια βακτηρίου, δηλαδή τρία τρυβλία με 200 μ L καλλιέργειας βακτηρίου το κάθε ένα από την υγρή καλλιέργεια και τρία τρυβλία με 200 μ L καλλιέργειας βακτηρίου το κάθε ένα από την αραιωμένη 1:10. Τοποθετήθηκαν διηθητικά χαρτιά που δεν ήταν εμποτισμένα με κάποιο αιθέριο έλαιο και συγκρίθηκαν με τα τρυβλία στα οποία μπήκαν χαρτάκια εμποτισμένα με αιθέριο έλαιο και μετρήθηκε η ζώνη αναστολής που σχηματίστηκε από την παρουσία των αιθέριων ελαίων. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν τρία τρυβλία με 200 μ L καλλιέργειας βακτηρίου το κάθε ένα από την υγρή καλλιέργεια και τρία τρυβλία με 200 μ L καλλιέργειας βακτηρίου το κάθε ένα από την αραιωμένη 1:10, στα οποία είχε τοποθετηθεί σε κάθε ένα από αυτά ένα χαρτάκι εμποτισμένο με αιθέριο έλαιο Ευκαλύπτου στο κέντρο. Ακόμα, δημιουργήθηκαν τρία τρυβλία με 200 μ L καλλιέργειας βακτηρίου το κάθε ένα από την υγρή καλλιέργεια και τρία τρυβλία με 200 μ L καλλιέργειας βακτηρίου το κάθε ένα από την αραιωμένη 1:10, στα οποία είχε τοποθετηθεί σε κάθε ένα από αυτά ένα χαρτάκι εμποτισμένο με αιθέριο έλαιο Δάφνης στο κέντρο. Κατά την τοποθέτηση των χάρτινων δίσκων έπρεπε η λαβίδα να καίγεται στην φλόγα και να κρύνει καλά για την πρόληψη επιμολύνσεων. Ο χάρτινος δίσκος τοποθετούνταν πάντα στο κέντρο του τρυβλίου που είχε γίνει η επίστρωση του βακτηρίου. Τα τρυβλία έμπαιναν στον θάλαμο των 25 °C και παρατηρούνταν την επόμενη μέρα, δηλαδή σε 24 ώρες. Κατά την παρατήρηση μετρούνταν η διάμετρος της ζώνης αναστολής που δημιουργούνταν γύρω από το χάρτινο δίσκο που είχε εμποτιστεί με τα αιθέρια έλαια. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση με κωδικό 23, η οποία αντιστοιχούσε στο βακτήριο *Erwinia amylovora*.

2.5.3.2 Σύγκριση θρεπτικών υλικών για τον έλεγχο ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora* σε αιθέρια έλαια Δάφνης

Η εύρεση του κατάλληλου στερεού θρεπτικού υλικού για τον έλεγχο ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora* στα αιθέρια έλαια πραγματοποιήθηκε με την αξιολόγηση τεσσάρων θρεπτικών υλικών τα οποία ήταν το NSA 1,5%, το NSA 1,7%, το MHA και το King's B. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση με κωδικό 22 και αιθέριο έλαιο Δάφνης για την αξιολόγηση του καλύτερου στερεού θρεπτικού υλικού. Τα τρυβλία με NSA 1,5% και King's B είχαν πάχος 12 ml, ενώ τα τρυβλία με MHA και NSA 1,7% είχαν πάχος 24 ml. Τα τρυβλία με το θρεπτικό υλικό τοποθετήθηκαν στο θάλαμο. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε υγρή βακτηριακή καλλιέργεια 24 ωρών της απομόνωσης 22 που είχε αναπτυχθεί σε υγρό θρεπτικό υλικό NS Broth. Ακόμα, σε ένα αποστειρωμένο τρυβλίο τοποθετήθηκαν 24 αποστειρωμένα διηθητικά χαρτάκια με διάμετρο 6 mm, τα οποία δεν είχαν εμποτιστεί με αιθέριο έλαιο Δάφνης και σε άλλο αποστειρωμένο τρυβλίο τοποθετήθηκαν 24 αποστειρωμένα διηθητικά χαρτάκια με διάμετρο 6 mm, τα οποία είχαν εμποτιστεί το κάθε ένα με 5 μ L αιθέριο έλαιο Δάφνης. Η αραίωση της υγρής καλλιέργειας του βακτηρίου που πραγματοποιήθηκε ήταν 1:100. Σε κάθε στερεό θρεπτικό υλικό έγινε επίστρωση (plating) 100 μ L αραιωμένης βακτηριακής καλλιέργειας σε έξι τρυβλία από τα οποία τα τρία αποτελούσαν το μάρτυρα και τοποθετήθηκε χαρτάκι χωρίς αιθέριο έλαιο σε κάθε ένα από αυτά, ενώ στα υπόλοιπα τρία τοποθετήθηκε χαρτάκι εμποτισμένο με αιθέριο έλαιο Δάφνης. Επίσης, στα υπόλοιπα τρυβλία έγινε επίστρωση (plating) με 200 μ L αραιωμένης βακτηριακής καλλιέργειας. Σε κάθε στερεό θρεπτικό υλικό με επίστρωση 200 μ L αραιωμένης βακτηριακής καλλιέργειας υπήρχαν τρία τρυβλία μάρτυρες τα οποία περιείχαν χαρτάκια χωρίς αιθέριο έλαιο Δάφνης και τρία τρυβλία με χαρτάκια που ήταν εμποτισμένα με αιθέριο έλαιο Δάφνης. Πριν την τοποθέτηση των χάρτινων δίσκων στο κέντρο του τρυβλίου ήταν απαραίτητο να αποστειρώνεται η λαβίδα στην φλόγα, να κρυώνει καλά και μετά να τοποθετείται το χαρτάκι, για την πρόληψη επιμολύνσεων. Τα τρυβλία μπήκαν στον θάλαμο των 25 °C και παρατηρήθηκαν την επόμενη μέρα, δηλαδή σε 24 ώρες. Κατά την παρατήρηση μετρήθηκε η διάμετρος της ζώνης αναστολής που δημιουργήθηκε γύρω από το χάρτινο δίσκο που είχε εμποτιστεί με τα αιθέρια έλαια. Στο συγκεκριμένο πείραμα τα τρυβλία παρατηρήθηκαν και στις 48 ώρες και μετρήθηκε ξανά η διάμετρος της ζώνης

αναστολής που προέκυψε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης στο βακτήριο.

2.5.3.3 Έλεγχος ευαισθησίας στις θετικές απομονώσεις *Erwinia amylovora* σε οκτώ αιθέρια έλαια

Τα τρυβλία με το θεραπευτικό υλικό MHA ποσότητας 24 ml τοποθετήθηκαν στο θάλαμο. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε υγρή βακτηριακή καλλιέργεια 24 ωρών που είχε αναπτυχθεί σε θεραπευτικό υλικό NS Broth. Σε κάθε απομόνωση έγινε αραίωση 1:10 σύμφωνα με το πρότυπο διάλυμα 0.5 Mc Farland. Στη συνέχεια ετοιμάστηκαν οι χάρτινοι δίσκοι με διάμετρο 6 mm. Για κάθε απομόνωση χρειάστηκαν εννέα αποστειρωμένα τρυβλία με τρία αποστειρωμένα χαρτάκια το κάθε ένα. Κάθε τρυβλίο αντιστοιχούσε και σε ένα αιθέριο έλαιο και ένα τρυβλίο περιείχε τρεις χάρτινους δίσκους χωρίς αιθέριο έλαιο για να χρησιμοποιηθούν στους μάρτυρες. Σε κάθε χάρτινο δίσκο εμποτίστηκαν 5 μ L από το αιθέριο έλαιο. Πραγματοποιήθηκε επίστρωση (plating) 100 μ L από την αραιωμένη 1:10 βακτηριακή καλλιέργεια σε κάθε τρυβλίο. Με την αποστειρωμένη λαβίδα τοποθετήθηκε στο κέντρο του τρυβλίου χάρτινος δίσκος με διάμετρο 6 mm. Η λαβίδα καιγόταν κάθε φορά για την αποφυγή επιμολύνσεων. Δημιουργήθηκαν τρία τρυβλία που περιείχαν χαρτάκι το οποίο δεν είχε εμποτιστεί σε κάποιο αιθέριο έλαιο και αποτελούσαν τις τρεις επαναλήψεις του μάρτυρα. Στη συνέχεια, ακολούθησαν τρεις επαναλήψεις για κάθε αιθέριο έλαιο που δοκιμάστηκε, δηλαδή τρία τρυβλία με επίστρωση (plating) 100 μ L από την αραιωμένη 1:10 βακτηριακή καλλιέργεια σε κάθε τρυβλίο και στο κέντρο χαρτάκι με το ίδιο αιθέριο έλαιο. Τα τρυβλία μπήκαν στον θάλαμο των 25 °C και παρατηρήθηκαν σε 48 ώρες. Κατά την παρατήρηση έγινε σύγκριση με τα τρυβλία του μάρτυρα και μετρήθηκε η διάμετρος της ζώνης αναστολής που δημιουργήθηκε στα τρυβλία που περιείχαν το χάρτινο δίσκο, ο οποίος είχε εμποτιστεί με τα αιθέρια έλαια.

Σε κάθε απομόνωση η οποία ταυτοποιήθηκε ως θετική στο *Erwinia amylovora* μέσω των μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης (PCR) πραγματοποιήθηκε η παραπάνω διαδικασία και χρησιμοποιήθηκαν αιθέρια έλαια Άνηθου, Γαρύφαλλου, Δάφνης, Δενδρολίβανου, Ευκαλύπτου, Μαντζουράνας, Ρίγανης και Φασκόμηλου.

2.6 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στο Microsoft Excel. Χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (Anova Single Factor) των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της κάθε απομόνωσης παρουσία των αιθέριων ελαίων. Στην ανάλυση διακύμανσης όταν $F >$ κριτήριο F τότε αυτό σήμαινε ότι οι μέσοι όροι όλων ή κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους. Ο προσδιορισμός των μέσων όρων που διέφεραν πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey όπου συγκρίθηκε το q κάθε ζεύγους με το q critical που δίνεται από το Studentized Range q Table (<http://www.real-statistics.com/statistics-tables/studentized-range-q-table/>). Το q για κάθε ζεύγος υπολογίστηκε από τον τύπο $q = \text{Difference} / \text{Standard Error}$, όπου Difference είναι η απόλυτη τιμή των μέσων όρων των μεταχειρίσεων (ανά δύο) και το Standard Error (SE) δίνεται από τον τύπο $SE = \sqrt{(0,5 * MSw) * (1/n + 1/n)}$. Το MSw βρίσκεται στο πίνακα ανάλυσης της διακύμανσης που προκύπτει και αφορά την τιμή που δίνεται εντός των ομάδων και το n είναι ο αριθμός των επαναλήψεων της κάθε μεταχείρισης. Σε όσα ζεύγη ισχύει $q > q$ critical τότε διαφέρουν στατιστικώς μεταξύ τους.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση του βακτηρίου *Erwinia amylovora* από φυτικά δείγματα

Όλες οι απομονώσεις έγιναν σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομονώσεων σε μικρούς όγκους που περιγράφεται στο κεφάλαιο «2. Υλικά και Μέθοδοι». Ακολουθεί ο πίνακας με όλες τις απομονώσεις που πραγματοποιήθηκαν και από τις συλλογές φυτικών δειγμάτων.

Πίνακας 5. Ο συνολικός αριθμός απομονώσεων που πραγματοποιήθηκαν από τις συλλογές φυτικών δειγμάτων.

Κωδικός απομόνωσης	Ανάπτυξη
51α	Ναι
51β	Ναι
52α	Ναι
52β	Ναι
52γ-κ	Ναι
53	Ναι
54	Ναι
55	Ναι
56	Ναι
57	Ναι
58	Όχι
59	Ναι
60	Ναι
61	Όχι
62	Όχι

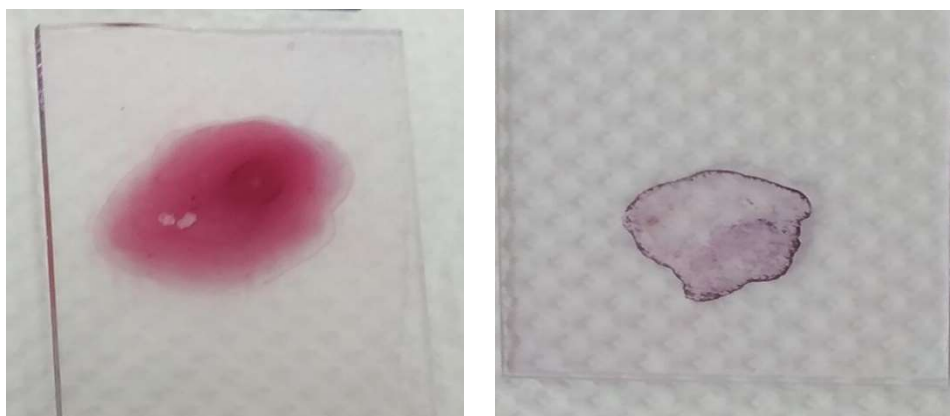
63	Ναι
64	Ναι
65 α	Ναι
65β	Ναι
66α	Ναι
66β	Ναι
67 α	Ναι
67β	Ναι
68 α	Ναι
68β	Ναι
69 α	Ναι
69β	Ναι
70 α	Ναι
70β	Ναι
71β	Ναι
72 α	Ναι
73	Ναι

3.2 Μέθοδοι ταυτοποίησης του βακτηρίου *Erwinia amylovora*

Οι μέθοδοι ταυτοποίησης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* χρησιμοποιήθηκαν σε απομονώσεις του βακτηρίου από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας και σε απομονώσεις που αναφέρονται στον Πίνακα 5.

3.2.1 Χρώση Gram

Η χρώση Gram πραγματοποιήθηκε σε όλες τις απομονώσεις όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «2. Υλικά και Μέθοδοι». Το παθογόνο *Erwinia amylovora* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και στο γένος *Erwinia* (Pique et al. 2015). Παρακάτω παρουσιάζονται φωτογραφίες από μία αρνητική Gram απομόνωση και έναν θετικό Gram μάρτυρα. Τα αποτελέσματα από τη χρώση Gram παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.



Εικόνα 6. Αποτέλεσμα της χρώσης Gram του βακτηρίου *Erwinia amylovora* της απομόνωσης με κωδικό 52γ- κ (κόκκινο χρώμα) αριστερά και αποτέλεσμα της χρώσης Gram ενός θετικού Gram βακτηρίου μάρτυρα (μπλε- βιολετί χρώμα) δεξιά.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα της χρώσης Gram σε απομονώσεις του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας και σε απομονώσεις που πραγματοποιήθηκαν από τις συλλογές φυτικών δειγμάτων. Παρουσιάζεται το χρώμα της κάθε βακτηριακής αποικίας.

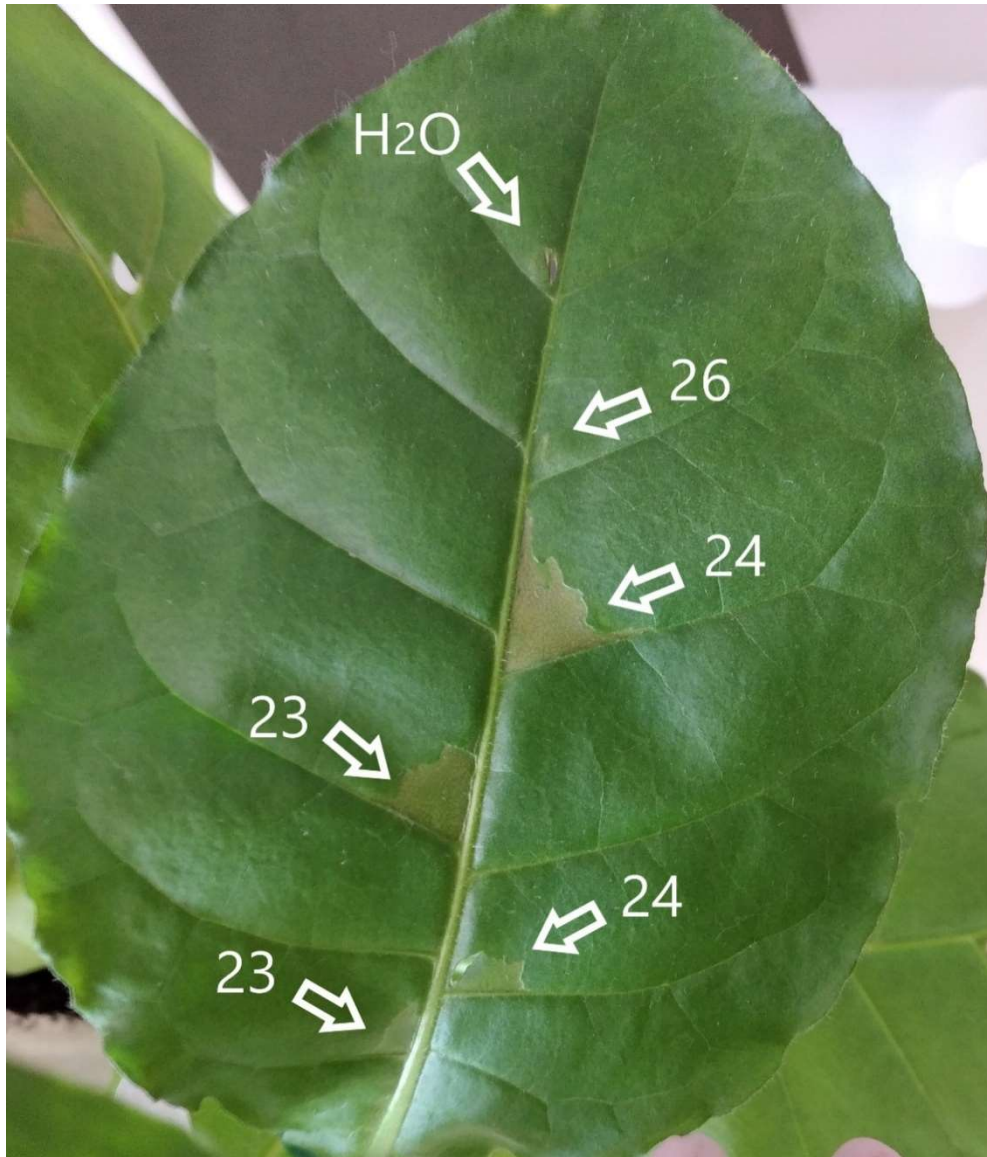
Κωδικός απομόνωσης	Χρώση Gram	Χρώμα αποικιών
22 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	Αρνητικό	Λευκή
23 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	Αρνητικό	Λευκή
24 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	Αρνητικό	Λευκή
26 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	Αρνητικό	Κίτρινη
27 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	Αρνητικό	Λευκή
28 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	Αρνητικό	Λευκή
29 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	Αρνητικό	Λευκή

31 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	Αρνητικό	Λευκή
32 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	Αρνητικό	Λευκή
33 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	Αρνητικό	Λευκή
34 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	Αρνητικό	Λευκή
37 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	Αρνητικό	Λευκή
38 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	Αρνητικό	Λευκή
39 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	Αρνητικό	Λευκή
52γ-κ	Αρνητικό	Λευκή
51α	Θετικό	Ροζ
51β	Θετικό	Ροζ
52α	Θετικό	Ροζ
52β	Θετικό	Ροζ
54	Αρνητικό	Κίτρινη
55	Αρνητικό	Λευκή
56	Αρνητικό	Κίτρινη
57	Θετικό	Λευκή
59	Θετικό	Κίτρινη
60	Αρνητικό	Κίτρινη
63	Αρνητικό	Λευκή
64	Αρνητικό	Λευκή
65β	Αρνητικό	Λευκή
68α	Αρνητικό	Κίτρινη

68β	Αρνητικό	Κίτρινη
69α	Αρνητικό	Κίτρινη
69β	Αρνητικό	Κίτρινη
70α	Αρνητικό	Κίτρινη
70β	Αρνητικό	Κίτρινη
71α	Θετικό	Λευκή
71β	Αρνητικό	Κίτρινη
73	Αρνητικό	Λευκή

3.2.2 Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού

Όλες οι συλλεχθέντες απομονώσεις δοκιμάστηκαν εάν προκαλούν αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά ποικιλίας *Xanthi*. Σύμφωνα με τον EPPO (2013) το βακτήριο *Erwinia amylovora* όταν εισαχθεί μέσα στον φυτικό ιστό των φυτών καπνού προκαλεί αντίδραση υπερευαισθησίας και τα φύλλα του καπνού στο σημείο που έχει εισχωρήσει το βακτήριο δημιουργούν εντός 24ώρου νεκρωτικές κηλίδες. Παρακάτω απεικονίζεται ένα φύλλο καπνού στο οποίο χορηγήθηκε το βακτήριο *Erwinia amylovora* (απομονώσεις με κωδικό 23, 24), μία απομόνωση η οποία ήταν ο αρνητικός μάρτυρας και δεν αντιστοιχούσε στο βακτήριο *Erwinia amylovora* (απομόνωση 26) οπότε δεν έδωσε νεκρωτική κηλίδα στο σημείο που χορηγήθηκε στο φύλλο καπνού. Επίσης, σε ένα σημείο του φύλλου τοποθετήθηκε νερό ως αρνητικός μάρτυρας. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.



Εικόνα 7. Φύλλο καπνού *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* μετά από 24 ώρες από τον εμβολιασμό με αιώρημα βακτηριακών κυττάρων που είναι εμφανής αντίδραση υπερευαισθησίας. Το νερό (H_2O) και η απομόνωση 26 που προφανώς δεν ανήκει στο είδος *Erwinia amylovora* δεν έδωσαν νεκρωτικές κηλίδες, ενώ οι απομονώσεις 23 και 24 έδωσαν νεκρωτικές κηλίδες στα σημεία που έγινε έγχυση.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* σε απομονώσεις του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας και σε απομονώσεις που πραγματοποιήθηκαν από τις συλλογές φυτικών δειγμάτων. Όπου «+» παρουσία νεκρωτικής κηλίδας στο φύλλο καπνού και όπου «-» απουσία νεκρωτικής κηλίδας στο φύλλο καπνού. Παρουσιάζεται το χρώμα της κάθε βακτηριακής αποικίας.

Κωδικός απομόνωσης	Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτό καπνού	Χρώμα αποικιών
22 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	+	Λευκή
23 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	+	Λευκή
24 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	+	Λευκή
26 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	-	Κίτρινη
27 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	+	Λευκή
28 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	+	Λευκή
29 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	+	Λευκή
31 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	+	Λευκή
32 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	+	Λευκή
33 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	+	Λευκή
34 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	+	Λευκή
37 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	+	Λευκή
38 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	+	Λευκή
39 (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)	+	Λευκή
52γ-κ	+	Λευκή
51α	-	Ροζ
51β	-	Ροζ

52 α	-	Ροζ
52β	-	Ροζ
53	-	Λευκή
54	-	Κίτρινη
55	+	Λευκή
56	-	Κίτρινη
57	+	Λευκή
58	+	Λευκή
59	-	Κίτρινη
60	-	Κίτρινη
61	+	Λευκή
62	-	Ροζ
63	-	Λευκή
64	+	Λευκή
65α	-	Κίτρινη
65β	-	Λευκή
66β	-	Κίτρινη
67α	-	Κίτρινη
67β	-	Λευκή
68 α	-	Κίτρινη
68β	-	Κίτρινη
69α	-	Κίτρινη

69β	-	Κίτρινη
70α	-	Κίτρινη
70β	-	Κίτρινη
71α	-	Λευκή
71β	-	Κίτρινη
73	+	Λευκή

3.2.3 PCR με εξειδικευμένους εκκινητές για *Erwinia amylovora*

Η επιλογή των απομονώσεων που έγινε η εξαγωγή DNA για έλεγχο με PCR και εκκινητές εξειδικευμένους για το είδος *Erwinia amylovora* πραγματοποιήθηκε κατόπιν της χρώσης Gram και της αντίδρασης υπερευαισθησίας στα φυτά καπνού. Τα βακτήρια που επιλέχθηκαν ήταν αρνητικά Gram και θετικά στην αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού, δηλαδή έδωσαν νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα του καπνού. Τα αποτελέσματα από την PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα της PCR ανάλυσης σε απομονώσεις του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας και σε απομονώσεις που πραγματοποιήθηκαν από τις συλλογές φυτικών δειγμάτων.

Κωδικός Απομόνωσης	Αποτελέσματα PCR
22	Θετικό
23	Θετικό
24	Θετικό
26	Αρνητικό
27	Θετικό
28	Θετικό
29	Θετικό
31	Αρνητικό
32	Θετικό

33	Θετικό
34	Θετικό
37	Θετικό
38	Θετικό
39	Θετικό
52 γ-κ	Θετικό
55	Θετικό
64	Θετικό
73	Θετικό

Πίνακας 9. Συγκεντρωτικός πίνακας των απομονώσεων που ταυτοποιήθηκαν θετικά για το βακτήριο *Erwinia amylovora* στην ανάλυση PCR. Όπου «-» αρνητικό κατά Gram βακτήριο, «+» παρουσία νεκρωτικής κηλίδας στην αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* και θετικό στην ανάλυση PCR. Παρουσιάζεται το χρώμα της βακτηριακής αποικίας και η υφή της.

Κωδικός Απομόνωσης	Χρώση Gram	Χρώμα βακτηριακών αποικιών	Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού	PCR ανάλυση	Υφή βακτηριακής αποικίας
22	-	Λευκό	+	+	Mucoid
23	-	Λευκό	+	+	Mucoid
24	-	Λευκό	+	+	Mucoid
27	-	Λευκό	+	+	Mucoid
28	-	Λευκό	+	+	Mucoid
29	-	Λευκό	+	+	Mucoid
32	-	Λευκό	+	+	Mucoid
33	-	Λευκό	+	+	Mucoid
34	-	Λευκό	+	+	Mucoid
37	-	Λευκό	+	+	Mucoid

38	-	Λευκό	+	+	Mucoid
39	-	Λευκό	+	+	Mucoid
52 γ-κ	-	Λευκό	+	+	Mucoid
55	-	Λευκό	+	+	Mucoid
64	-	Λευκό	+	+	Mucoid
73	-	Λευκό	+	+	Mucoid

3.3 Έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora* σε αντιβακτηριακές ουσίες

3.3.1 Έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora* σε χαλκό

Ο έλεγχος της ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora* στον χαλκό πραγματοποιήθηκε με το σκεύασμα χαλκού: Copperfield 20 WG (Μεταλλικός χαλκός: 20 % w/w (σε μορφή υδροξειδίου του χαλκού) και Βοηθητικές ουσίες: 65,10 % w/w, Τύπος σκευάσματος: Βρέξιμοι Κόκκοι (WG)) της Bayer. Στο πείραμα χρησιμοποιούνται οι συγκεντρώσεις 0 M, 0,1 M, 0,5 M, 1 M και 1,5 M. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το NSA 1,5%, καθώς το βακτήριο αναπτυσσόταν ικανοποιητικά στο συγκεκριμένο υλικό. Τα αποτελέσματα προκύπτουν από την παρατήρηση της ανάπτυξης του βακτηρίου στις παραπάνω συγκεντρώσεις χαλκού. Συγκεκριμένα, για τις 16 θετικές απομονώσεις στο παθογόνο *Erwinia amylovora* τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα και στις 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού παρατηρήθηκε ανάπτυξη του βακτηρίου *Erwinia amylovora*.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας στις 16 απομονώσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora* σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού.

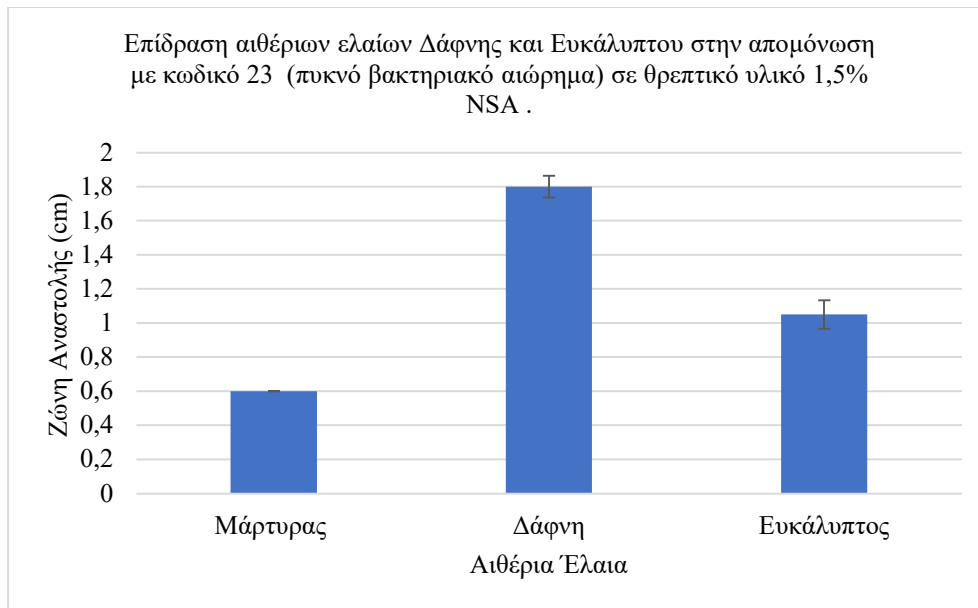
Κωδικός	0 M	0,1 M	0,5 M	1 M	1,5 M
Απομόνωσης					
22	+	+	+	+	+

23	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+
38	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+
52 γ-κ	+	+	+	+	+
55	+	+	+	+	+
64	+	+	+	+	+
73	+	+	+	+	+

3.3.2 Έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora* σε αιθέρια έλαια

Πείραμα με αιθέρια έλαια Ευκαλύπτου και Δάφνης

Η καλλιέργεια του βακτηρίου προέρχονταν από την απομόνωση με κωδικό 23. Σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό NSA 1,5% ποσότητας 12 ml έγινε επίστρωση 200 μL σε κάθε τρυβλίο από την υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου χωρίς να έχει προηγηθεί καμία αραίωση και έγιναν τρεις επαναλήψεις για την κάθε περίπτωση, δηλαδή δημιουργήθηκαν τρία τρυβλία μάρτυρες, τρία τρυβλία με αιθέριο έλαιο Δάφνης και τρία τρυβλία με αιθέριο έλαιο Ευκαλύπτου. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης δοκιμής παρουσιάζονται παρακάτω.



Γράφημα 1. Αποτελέσματα επίδρασης αιθέριων ελαίων Δάφνης και Ευκαλύπτου σε θρεπτικό υλικό NSA 1,5% σε πυκνό βακτηριακό αιώρημα της απομόνωσης με κωδικό 23.

Πίνακας 11. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 23 (πυκνό βακτηριακό αιώρημα) παρουσία αιθέριων ελαίων Δάφνης και Ευκαλύπτου.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	2,205	2	1,1025	661,5	9,2E-08	5,1432528
Μέσα στις ομάδες	0,01	6	0,001666667			
Σύνολο	2,215	8				

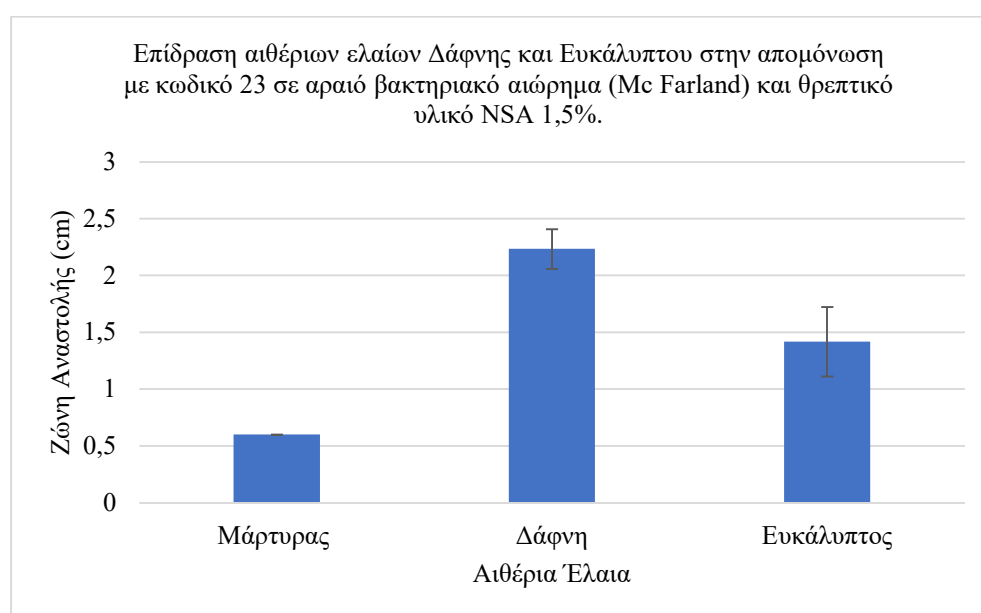
Άρα αφού από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι το $F > \text{κριτήριο } F$, τότε οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 12. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 23 (πυκνό βακτηριακό αιώρημα) για αιθήρια έλαια Δάφνης και Ευκαλύπτου. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{\text{critical}}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

q	Μάρτυρας	Δάφνη	Ευκάλυπτος
Μάρτυρας	x		
Δάφνη	62,35382908	x	
Ευκάλυπτος	23,3826859	38,97114317	x
q critical= 4,339			

Στην απομόνωση με κωδικό 23 σε πυκνό βακτηριακό αιώρημα παρατηρήθηκε ότι όλα τα ζεύγη διέφεραν στατιστικώς μεταξύ τους αφού το $q > q_{critical}$.

Στη συνέχεια, σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό NSA 1,5% ποσότητας 12 ml έγινε επίστρωση 200 μ L σε κάθε τρυβλίο από την υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου αφού είχε προηγηθεί αραιώση 1:10 σύμφωνα με τα πρότυπα διαλύματα 0,5 Mc Farland (Mc Farland Standards) και έγιναν τρεις επαναλήψεις για την κάθε περίπτωση, δηλαδή δημιουργήθηκαν τρία τρυβλία μάρτυρες, τρία τρυβλία με αιθέριο έλαιο Δάφνης και τρία τρυβλία με αιθέριο έλαιο Ευκαλύπτου. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης δοκιμής παρουσιάζονται παρακάτω.



Γράφημα 2. Αποτελέσματα επίδρασης αιθέριων ελαίων Δάφνης και Ευκαλύπτου σε θρεπτικό υλικό NSA 1,5% σε αραιό βακτηριακό αιώρημα της απομόνωσης με κωδικό 23 (αραιώση 1:10 σύμφωνα με τα Mc Farland Standards).

Πίνακας 13. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 23 (αραιό βακτηριακό αιώρημα) παρουσία αιθέριων ελαίων Δάφνης και Ευκαλύπτου.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	4,001666667	2	2,000833333	48,3422819	0,000199	5,143253
Μέσα στις ομάδες	0,248333333	6	0,041388889			
Σύνολο	4,25	8				

Άρα αφού από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι το $F >$ κριτήριο F , τότε οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 14. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 23 (αραίο βακτηριακό αιώρημα) για αιθέρια έλαια Δάφνης και Ευκαλύπτου. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

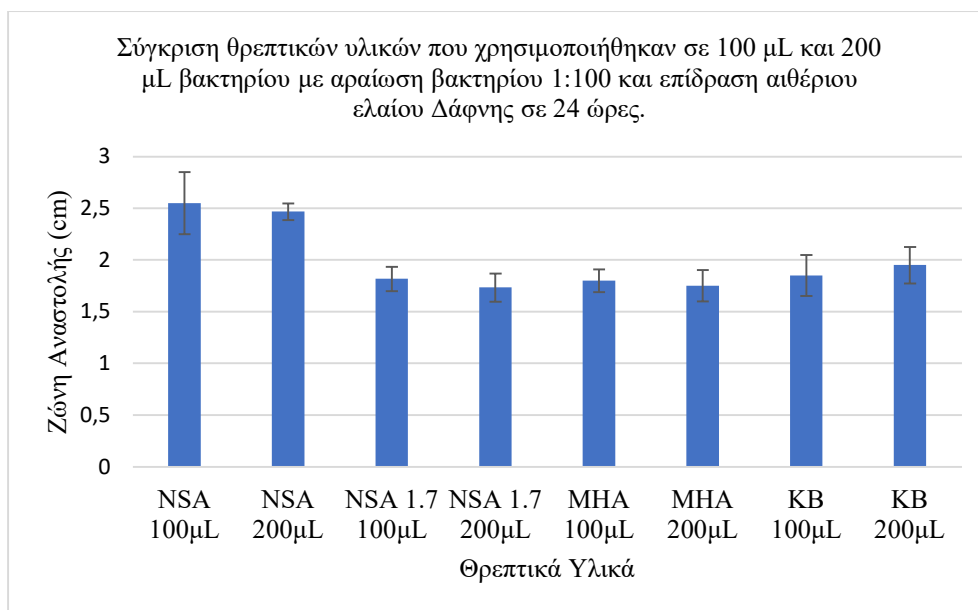
q	Μάρτυρας	Δάφνη	Ευκάλυπτος
Μάρτυρας	x		
Δάφνη	17,03096272	x	
Ευκάλυπτος	8,515481362	8,515481362	x
q critical= 4,339			

Στην απομόνωση με κωδικό 23 σε αραίο βακτηριακό αιώρημα παρατηρήθηκε ότι όλα τα ζεύγη διέφεραν στατιστικώς μεταξύ τους αφού το $q > q_{critical}$.

Σύμφωνα με τα γραφήματα 1 και 2 προκύπτει ότι το βακτήριο *Erwinia amylovora* παρουσιάζει ευαισθησία στα αιθέρια έλαια Δάφνης και Ευκαλύπτου με μεγαλύτερες ζώνες αναστολής να δημιουργούνται με τη δράση του αιθέριου ελαίου Δάφνης. Ακόμα παρατηρείται ότι μεγαλύτερες ζώνες αναστολής υπήρχαν στην 2^η περίπτωση όπου είχε πραγματοποιηθεί αραίωση 1:10 του βακτηρίου με βάση τα πρότυπα διαλύματα 0,5 Mc Farland. Ο σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να αναδείξει τις καλύτερες συνθήκες για την ανάπτυξη του βακτηρίου.

Σύγκριση θρεπτικών υλικών για τον έλεγχο ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora* σε αιθέρια έλαια Δάφνης

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση με κωδικό 22 και αιθέριο έλαιο Δάφνης για την αξιολόγηση του καλύτερου στερεού θρεπτικού υλικού. Τα τρυβλία με NSA 1,5% και King's B περιείχαν ποσότητα 12 ml, ενώ τα τρυβλία με MHA και NSA 1,7% περιείχαν ποσότητα 24 ml. Η αραίωση της υγρής καλλιέργειας του βακτηρίου που πραγματοποιήθηκε ήταν 1:100. Σε κάθε στερεό θρεπτικό υλικό έγινε επίστρωση (plating) 100 μ L αραιωμένης βακτηριακής καλλιέργειας σε έξι τρυβλία από τα οποία τα τρία αποτελούσαν το μάρτυρα και τοποθετήθηκε χαρτάκι χωρίς αιθέριο έλαιο σε κάθε ένα από αυτά, ενώ στα υπόλοιπα τρία τοποθετήθηκε χαρτάκι εμποτισμένο με αιθέριο έλαιο Δάφνης. Επίσης, με τον ίδιο τρόπο πραγματοποιήθηκε επίστρωση 200 μ L αραιωμένης 1:100 βακτηριακής καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε 24 και 48 ώρες. Ακολουθούν τα γραφήματα και οι πίνακες για τις 24 και τις 48 ώρες.



Γράφημα 3. Αποτελέσματα επίδρασης αιθέριων ελαίων Δάφνης σε τέσσερα διαφορετικά στερεά θρεπτικά υλικά σε τρυβλία που έγινε επίστρωση 100 μ L βακτηρίου και 200 μ L βακτηρίου με αραιώση 1:100 σε 24h. Όπου NSA (NSA 1,5%), NSA 1,7 (NSA 1,7%), MHA (Mueller Hinton Agar) και KB (King's B).

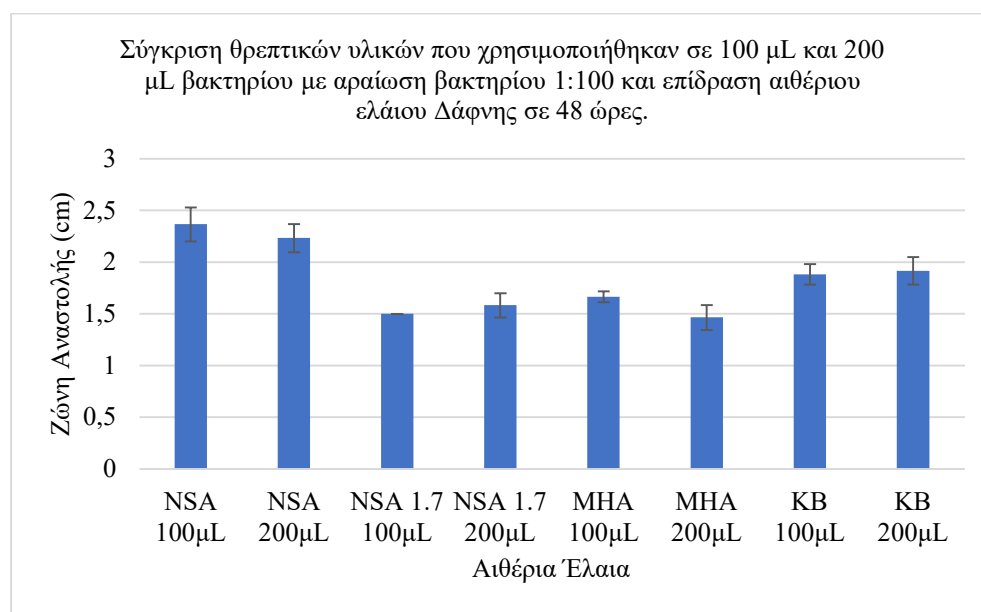
Πίνακας 15. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 22 (αραιό βακτηριακό αιώρημα) παρουσία αιθέριων ελαίων Δάφνης σε τέσσερα διαφορετικά στερεά θρεπτικά υλικά σε τρυβλία που έγινε επίστρωση 100 μ L βακτηρίου και 200 μ L βακτηρίου με αραιώση 1:100 σε 24h.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	2,254895833	7	0,322127976	14,31679894	8,2734E-06	2,6571966
Μέσα στις ομάδες	0,36	16	0,0225			
Σύνολο	2,614895833	23				

Άρα αφού από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι το $F > \text{κριτήριο } F$, τότε οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 16. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 22 (αραιό βακτηριακό αιώρημα) για αιθέρια έλαια Δάφνης σε τέσσερα διαφορετικά στερεά θρεπτικά υλικά σε τρυβλία που έγινε επίστρωση 100 μL βακτηρίου και 200 μL βακτηρίου με αραιώση 1:100 σε 24h. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{\text{critical}}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

q	NSA 100 μL	NSA 200 μL	NSA 1.7 100 μL	NSA 1.7 200 μL	MHA 100 μL	MHA 200 μL	KB 100 μL	KB 200 μL
NSA 100 μL	x							
NSA 200 μL	1,178511302	x						
NSA 1.7 100 μL	10,37089946	9,192388156	x					
NSA 1.7 200 μL	11,54941076	10,37089946	1,178511302	x				
MHA 100 μL	10,60660172	9,428090417	0,23570226	0,942809042	x			
MHA 200 μL	11,3137085	10,1351972	0,942809042	0,23570226	0,707106781	x		
KB 100 μL	9,899494938	8,720983636	0,471404521	1,649915823	0,707106781	1,414213563	x	
KB 200 μL	8,485281375	7,306770073	1,885618083	3,064129385	2,121320344	2,828427125	1,414213563	x
q critical= 4,896								



Γράφημα 4. Αποτελέσματα επίδρασης αιθέριων ελαίων Δάφνης σε τέσσερα διαφορετικά στερεά θρεπτικά υλικά σε τρυβλία που έγινε επίστρωση 100 μL βακτηρίου και 200 μL βακτηρίου με αραιώση 1:100 σε 48h. Όπου NSA (NSA 1,5%), NSA 1,7 (NSA 1,7%), MHA (Mueller Hinton Agar) και KB (King's B).

Πίνακας 17. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 22 (αραιό βακτηριακό αιώρημα) παρουσία αιθέριων ελαίων Δάφνης σε τέσσερα διαφορετικά στερεά θρεπτικά υλικά σε τρυβλία που έγινε επίστρωση 100 μ L βακτηρίου και 200 μ L βακτηρίου με αραιώση 1:100 σε 48h.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	2,368229167	7	0,338318452	29,79685452	5,00572E-08	2,6571966
Μέσα στις ομάδες	0,181666667	16	0,011354167			
Σύνολο	2,549895833	23				

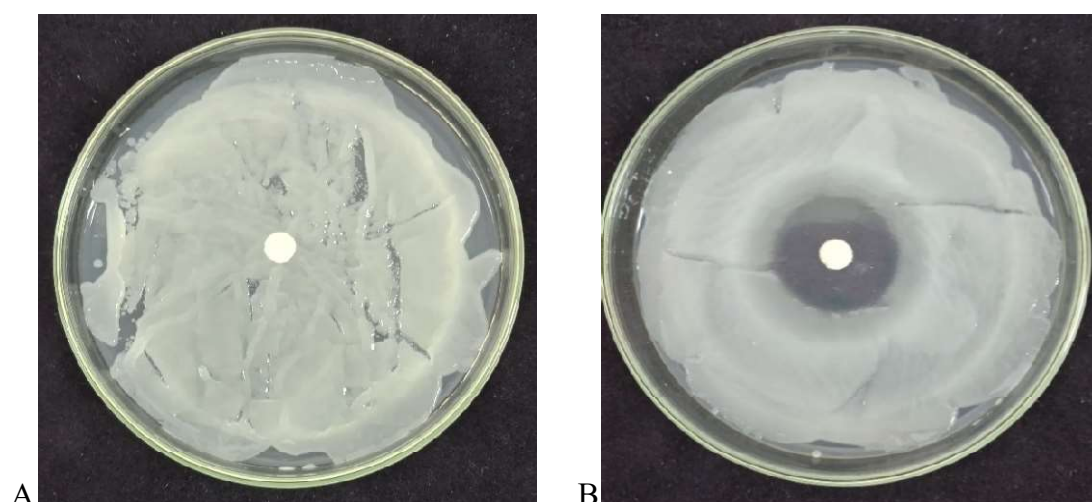
Άρα αφού από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι το $F > \text{κριτήριο } F$, τότε οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 18. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 22 (αραιό βακτηριακό αιώρημα) για αιθέρια έλαια Δάφνης σε τέσσερα διαφορετικά στερεά θρεπτικά υλικά σε τρυβλία που έγινε επίστρωση 100 μ L βακτηρίου και 200 μ L βακτηρίου με αραιώση 1:100 σε 48h. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{\text{critical}}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

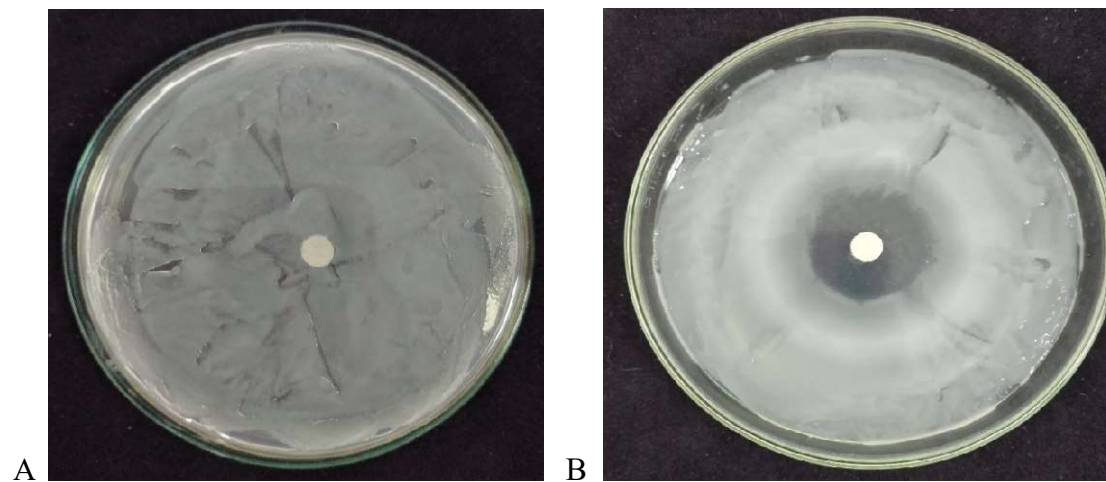
Q	NSA 100 μ L	NSA 200 μ L	NSA 1.7 100 μ L	NSA 1.7 200 μ L	MHA 100 μ L	MHA 200 μ L	KB 100 μ L	KB 200 μ L
NSA 100 μ L	x							
NSA 200 μ L	2,654406066	x						
NSA 1.7 100 μ L	17,25363943	14,59923336	x					
NSA 1.7 200 μ L	15,59463564	12,94022957	1,659003791	x				
MHA 100 μ L	13,93563184	11,28122578	3,318007582	1,659003791	x			
MHA 200 μ L	17,91724094	15,26283488	0,663601516	2,322605307	3,981609098	x		
KB 100 μ L	9,622221988	6,967815922	7,631417439	5,972413648	4,313409857	8,295018955	x	
KB 200 μ L	8,958620471	6,304214406	8,295018955	6,636015164	4,977011373	8,958620471	0,663601516	x
q critical= 4,684								

Περισσότερες στατιστικές διαφορές παρατηρήθηκαν μετά από τις 48 ώρες, διότι με βάση το κριτήριο Tukey περισσότερα ζεύγη έχουν $q > q_{\text{critical}}$ μετά από τις 48 ώρες συγκριτικά με την παρατήρηση μετά από 24 ώρες.

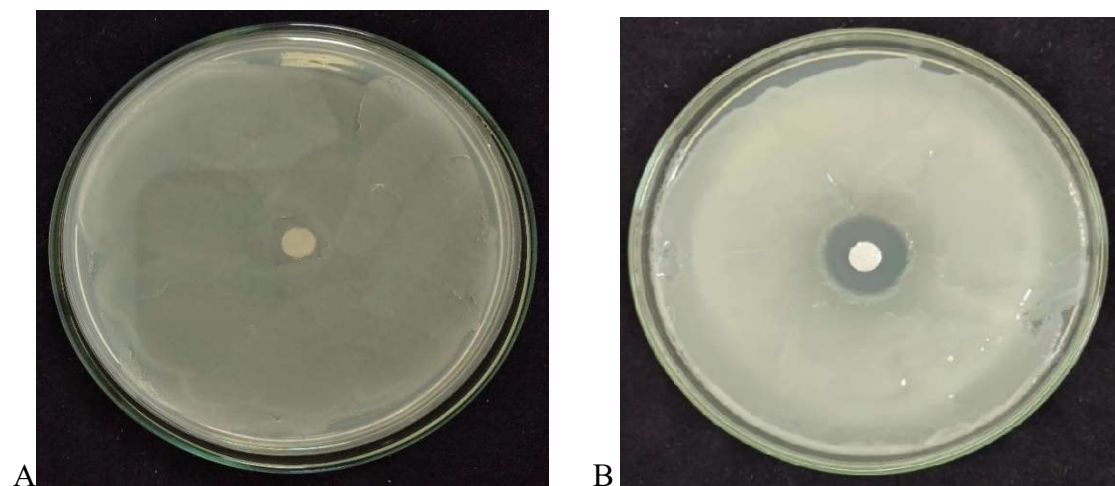
Η σύγκριση των στερεών θρεπτικών υλικών ήταν πολύ σημαντική για τη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, διότι έπρεπε να αξιολογηθεί το καλύτερο θρεπτικό υλικό τόσο για την ανάπτυξη του βακτηρίου όσο και για τον έλεγχο της ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora* στα αιθέρια έλαια που θα δοκιμαστούν σε επόμενα πειράματα. Με βάση τις παρατηρήσεις σε 24 και σε 48 ώρες καταλληλότερο στερεό θρεπτικό υλικό για τη συνέχεια των πειραμάτων κρίθηκε το Mueller Hinton Agar (MHA) με αραιώση βακτηρίου στα 100 μL . Τα αποτελέσματά του δεν διέφεραν σημαντικά από τις 24 έως τις 48 ώρες όπως φαίνεται και στα Γραφήματα 3 και 4, καθώς και μετά από οπτική παρατήρηση το βακτήριο αναπτύχθηκε καλύτερα στο MHA από ότι στα υπόλοιπα στερεά θρεπτικά υλικά. Ακολουθούν φωτογραφίες από τα τέσσερα υλικά που δοκιμάστηκαν στην απομόνωση με κωδικό 22, η οποία έχει ταυτοποιηθεί με την διαδικασία της PCR ότι είναι το βακτήριο *Erwinia amylovora*.



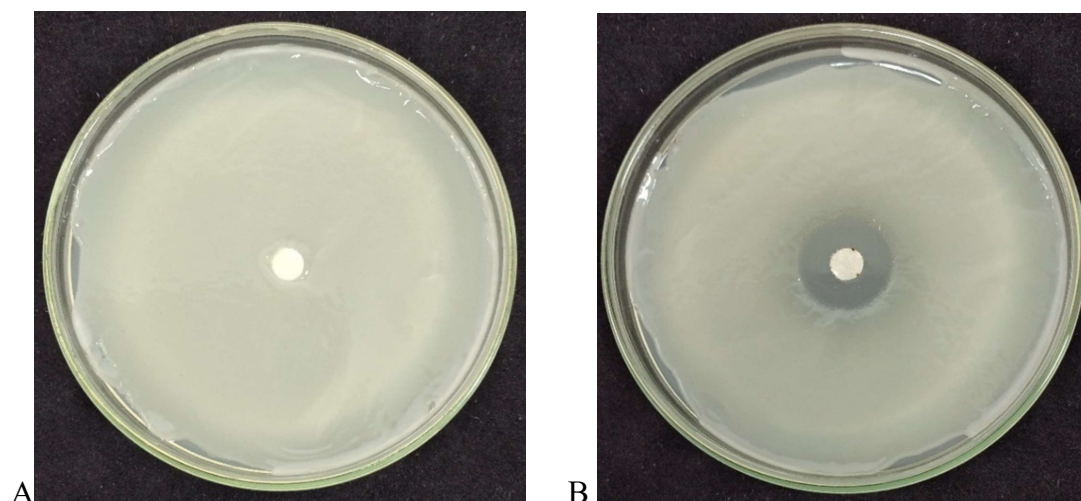
Εικόνα 8. Επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 100 μL αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό NSA (NSA 1,5%). Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης.



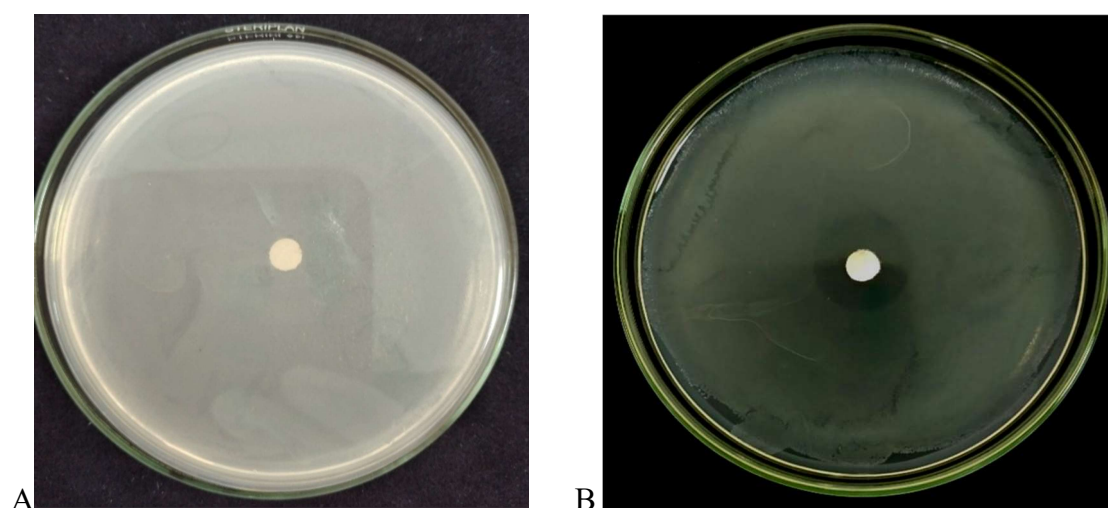
Εικόνα 9. Επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 200 μ L αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό NSA (NSA 1,5%). Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης.



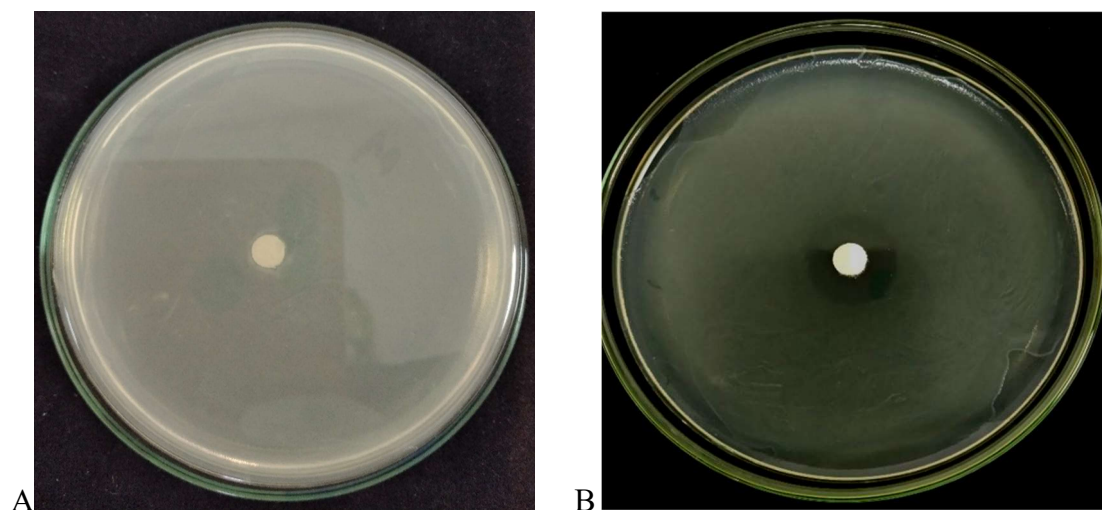
Εικόνα 10. Επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 100 μ L αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό NSA1,7%. Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης.



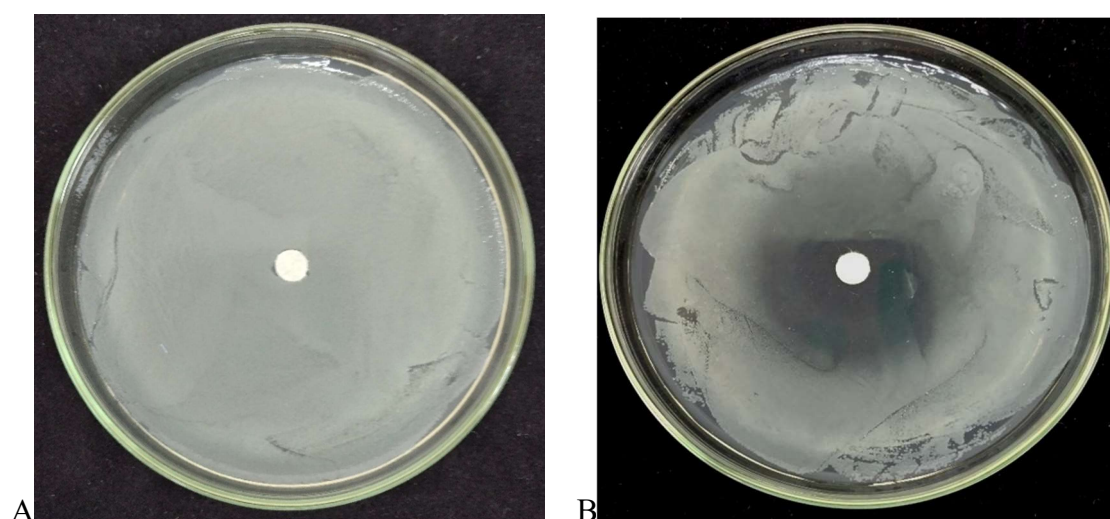
Εικόνα 11. Επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 200 μ L αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό NSA1,7%. Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης.



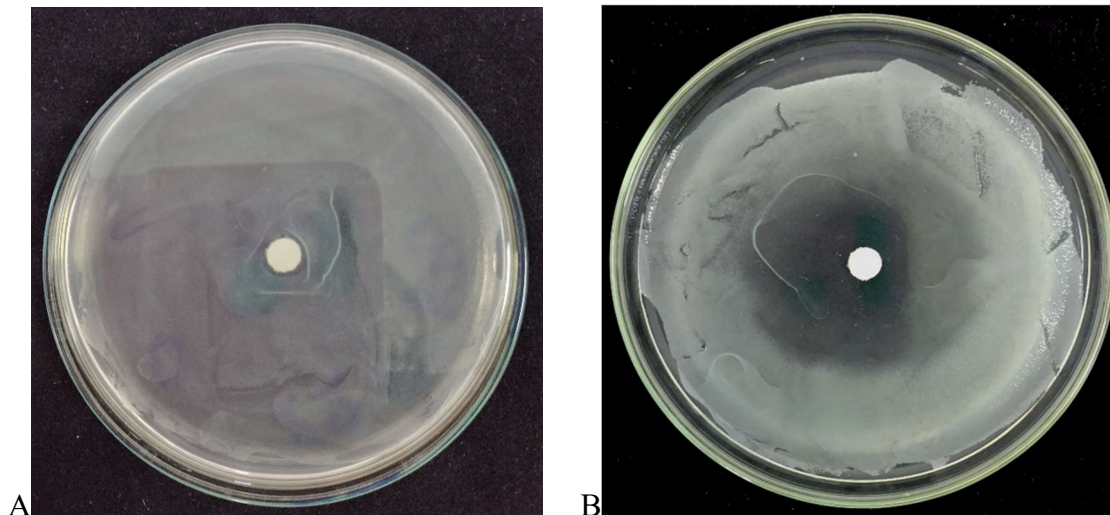
Εικόνα 12. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 100 μ L αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό MHA. Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης.



Εικόνα 13. Επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 200 μ L αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό ΜΗΑ. Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης.



Εικόνα 14. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 100 μ L αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό King's B. Στην εικόνα Α παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη Β παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης.

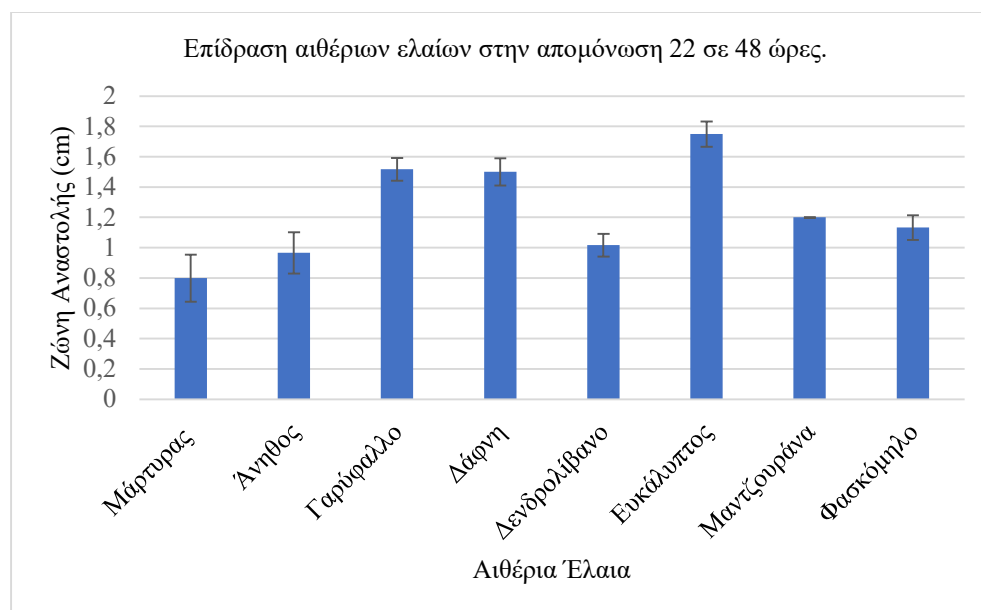


Εικόνα 15. Επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης σε 200 μ L αραιωμένου 1:100 βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υλικό King's B. Στην εικόνα A παρουσιάζεται ο μάρτυρας, δηλαδή το τρυβλίο χωρίς την επίδραση αιθέριου ελαίου Δάφνης και στη B παρουσιάζεται η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από την επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης.

Έλεγχος ευαισθησίας στις θετικές απομονώσεις *Erwinia amylovora* σε οκτώ αιθέρια έλαια.

Οι 16 βακτηριακές απομονώσεις που ταυτοποιήθηκαν θετικές στο βακτήριο *Erwinia amylovora* δοκιμάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε οκτώ διαφορετικά αιθέρια έλαια η κάθε μία. Τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Δενδρολίβανο, Δάφνη, Ευκάλυπτος, Ρίγανη, Φασκόμηλο, Γαρύφαλλο, Άνηθος και Μαντζουράνα. Ακολουθούν πίνακες και γραφήματα για την κάθε απομόνωση ξεχωριστά, καθώς και φωτογραφίες που απεικονίζουν τη δράση του κάθε αιθέριου ελαίου στο βακτήριο *Erwinia amylovora*.

Απομόνωση με κωδικό 22:



Γράφημα 5. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 22 μετά από 48 ώρες.

Στη συγκεκριμένη απομόνωση τα αιθέρια έλαια ρίγανης έδωσαν μη μετρήσιμα αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε πολύ μικρή ανάπτυξη βακτηρίου και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που ήταν σχεδόν διαυγές και στις τρεις επαναλήψεις της κάθε απομόνωσης. Μικρές μεμονωμένες αποικίες παρατηρήθηκαν σποραδικά γύρω από τον χάρτινο δίσκο που περιείχε το αιθέριο έλαιο.

Πίνακας 19. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 22 παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ							
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F	
Μεταξύ ομάδων	2,205729167	7	0,315104167	47,265625	1,63955E-09	2,6571966	
Μέσα στις ομάδες	0,106666667	16	0,006666667				
Σύνολο	2,312395833	23					

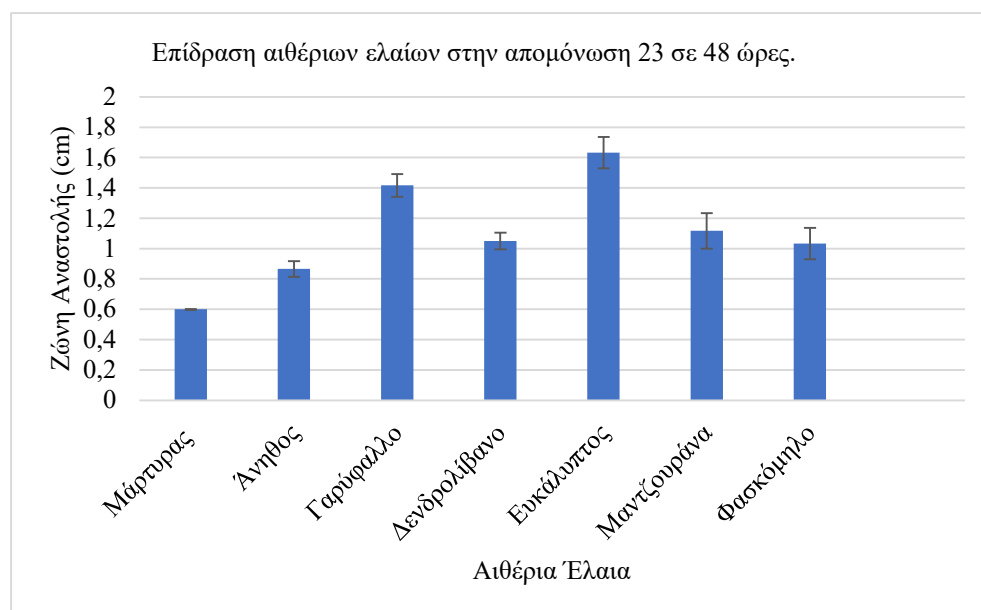
Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 20. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 22 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{\text{critical}}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

q	Μάρτυρας	Ανηθος	Γαρύφαλλο	Δάφνη	Δενδρολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x							
Ανηθος	4,330127019	x						
Γαρύφαλλο	18,61954618	14,28941916	x					
Δάφνη	18,18653348	13,85640646	0,433012702	x				
Δενδρολίβανο	5,629165125	1,299038106	12,99038106	12,55736836	x			
Ευκάλυπτος	24,68172401	20,35159699	6,062177827	6,495190529	19,05255889	x		
Μαντζουράνα	10,39230485	6,062177827	8,227241337	7,794228635	4,763139721	14,28941916	x	
Φασκόμηλο	8,660254039	4,330127019	9,959292145	9,526279443	3,031088914	16,02146997	1,732050808	x
q critical= 4,896								

Παρατηρήθηκε ότι στην απομόνωση με κωδικό 22 αρκετά ζεύγη διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 23:



Γράφημα 6. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 23 μετά από 48 ώρες.

Στη συγκεκριμένη απομόνωση τα αιθέρια έλαια δάφνης και ρίγανης έδωσαν μη μετρήσιμα αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε πολύ μικρή ανάπτυξη βακτηρίου και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που ήταν σχεδόν διαυγές και στις τρεις επαναλήψεις της κάθε απομόνωσης. Μικρές μεμονωμένες αποικίες παρατηρήθηκαν σποραδικά γύρω από τον χάρτινο δίσκο που περιείχε το αιθέριο έλαιο.

Πίνακας 21. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 23 παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	2,089047619	6	0,348174603	71,33333333	1,08852E-09	2,847725996
Μέσα στις ομάδες	0,068333333	14	0,004880952			
Σύνολο	2,157380952	20				

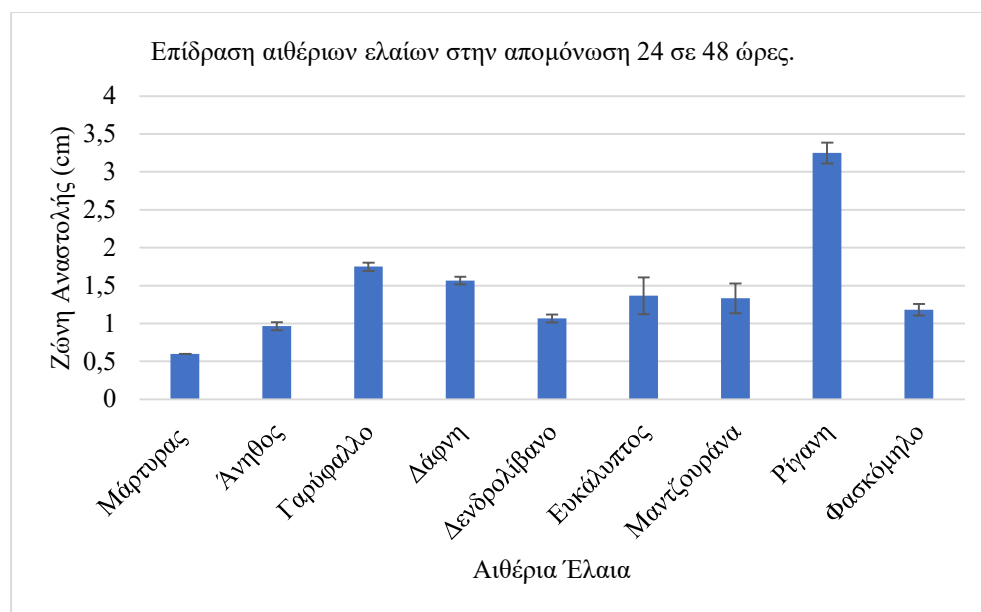
Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 22. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 23 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{\text{critical}}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Q	Μάρτυρας	Άνηθος	Γαρύφαλλο	Δενδρολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x						
Άνηθος	8,096973238	x					
Γαρύφαλλο	24,79698054	16,7000073	x				
Δενδρολίβανο	13,66364234	5,566669101	11,1333382	x			
Ευκάλυπτος	31,3757713	23,27879806	6,578790756	17,71212896	x		
Μαντζουράνα	15,68788565	7,590912411	9,109094893	2,02424331	15,68788565	x	
Φασκόμηλο	13,15758151	5,060608274	11,63939903	0,506060827	18,21818979	2,530304137	x
$q_{\text{critical}} = 4,829$							

Παρατηρήθηκε ότι στην απομόνωση με κωδικό 23 αρκετά ζεύγη διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 24:



Γράφημα 7. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 24 μετά από 48 ώρες.

Πίνακας 23. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 24 παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	13,61462963	8	1,701828704	153,1645833	5,90954E-15	2,510157895
Μέσα στις ομάδες	0,2	18	0,011111111			
Σύνολο	13,81462963	26				

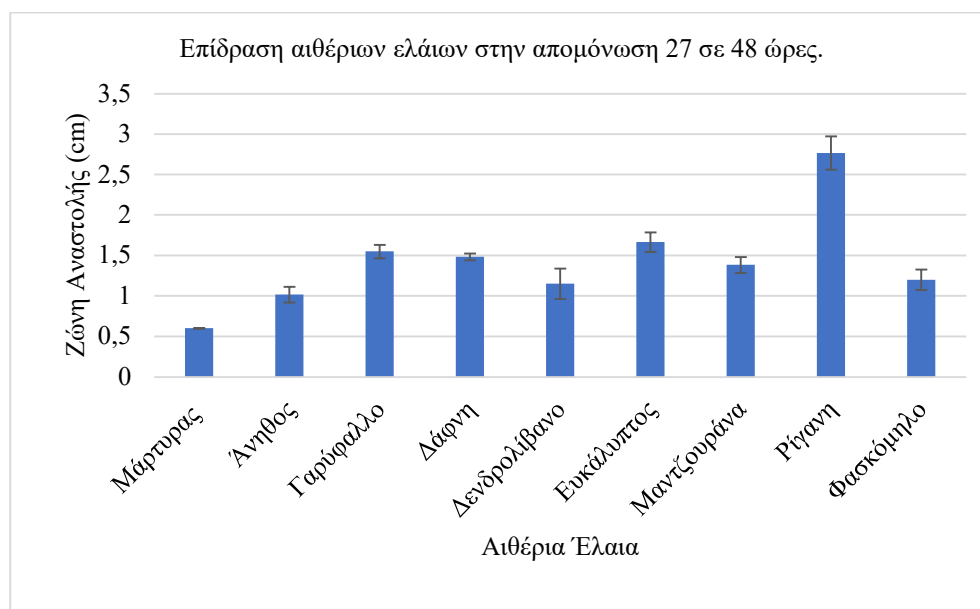
Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 24. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 24 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Q	Μάρτυρας	Άνηθος	Γαρύφαλλο	Δάφνη	Λεοντολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Ρίγανη	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x								
Άνηθος	7,379024326	x							
Γαρύφαλλο	23,14330357	15,76427924	x						
Δάφνη	19,45379141	12,07476708	3,689512163	x					
Λεοντολίβανο	9,391485506	2,01246118	13,75181806	10,0623059	x				
Ευκάλυπτος	15,42886905	8,04984472	7,714434523	4,02492236	6,03738354	x			
Μαντζουράνα	14,75804865	7,379024326	8,385254916	4,695742753	5,366563147	0,670820393	x		
Ρίγανη	53,33022127	45,95119694	30,1869177	33,87642986	43,93873576	37,90135222	38,57217262	x	
Φασκόμηλο	11,73935688	4,360332557	11,40394669	7,714434523	2,347871377	3,689512163	3,01869177	41,59086439	x
$q_{critical} = 4,955$									

Παρατηρήθηκε ότι στην απομόνωση με κωδικό 24 αρκετά ζεύγη διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 27:



Γράφημα 8. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 27 μετά από 48 ώρες.

Πίνακας 25. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 27 παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	8,558518519	8	1,069814815	105,0363636	1,63058E-13	2,510157895
Μέσα στις ομάδες	0,183333333	18	0,010185185			
Σύνολο	8,741851852	26				

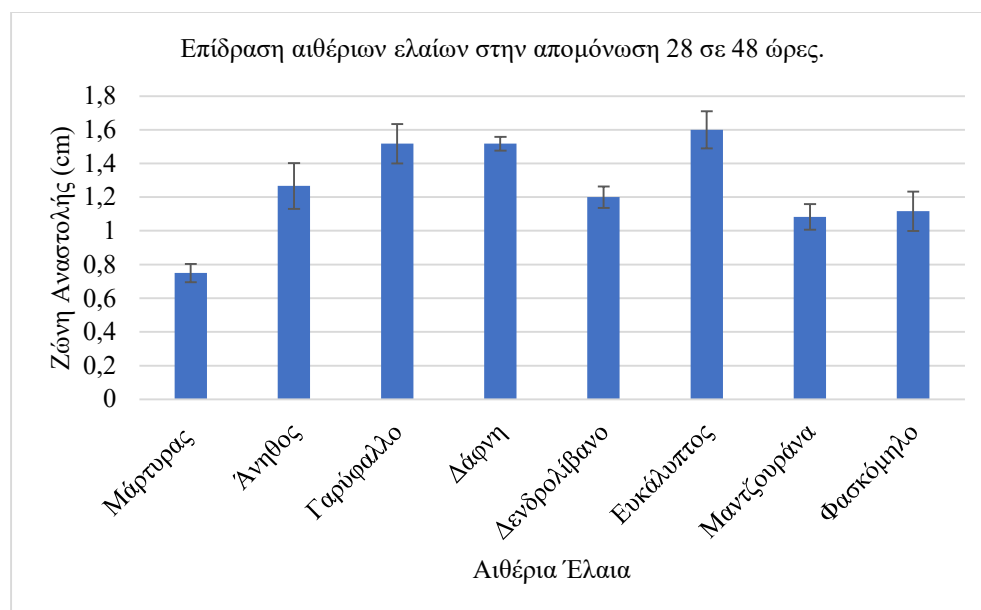
Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 26. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 27 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{\text{critical}}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

q	Μάρτυρας	Άνηθος	Γαρύφαλλο	Δάφνη	Λεοντολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Ρίγανη	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	X								
Άνηθος	8,758113123	x							
Γαρύφαλλο	19,96849792	11,2103848	x						
Δάφνη	18,56719982	9,809086697	1,4012981	x					
Λεοντολίβανο	11,56070932	2,802596199	8,407788598	7,006490498	x				
Ευκάλυπτος	22,42076959	13,66265647	2,452271674	3,853569774	10,86006027	x			
Μαντζουράνα	16,46525267	7,707139548	3,503245249	2,101947149	4,904543349	5,955516923	x		
Ρίγανη	45,54218824	36,78407512	25,57369032	26,97498842	33,98147892	23,12141864	29,07693557	x	
Φασκόμηλο	12,6116829	3,853569774	7,356815023	5,955516923	1,050973575	9,809086697	3,853569774	32,93050534	x
q critical= 4,955									

Παρατηρήθηκε ότι στην απομόνωση με κωδικό 27 αρκετά ζεύγη διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 28:



Γράφημα 9. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 28 μετά από 48 ώρες.

Στη συγκεκριμένη απομόνωση τα αιθέρια έλαια ρίγανης έδωσαν μη μετρήσιμα αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε πολύ μικρή ανάπτυξη βακτηρίου και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που ήταν σχεδόν διαυγές και στις τρεις επαναλήψεις της κάθε απομόνωσης. Μικρές μεμονωμένες αποικίες παρατηρήθηκαν σποραδικά γύρω από τον χάρτινο δίσκο που περιείχε το αιθέριο έλαιο.

Πίνακας 27. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 28 παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	1,688229167	7	0,241175595	37,34331797	9,5364E-09	2,6571966
Μέσα στις ομάδες	0,103333333	16	0,006458333			
Σύνολο	1,7915625	23				

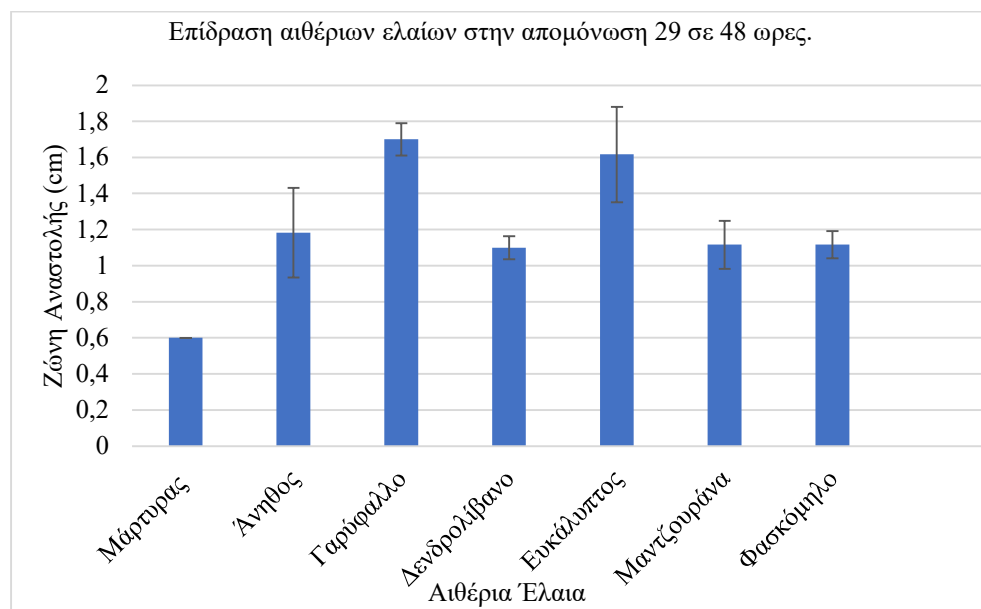
Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 28. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 28 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Q	Μάρτυρας	Άνηθος	Γαρύφαλλο	Δάφνη	Λεοντολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x							
Άνηθος	13,6381817	x						
Γαρύφαλλο	20,23730187	6,599120177	x					
Δάφνη	20,23730187	6,599120177		0	x			
Λεοντολίβανο	11,87841632	1,75976538	8,358885557	8,358885557	x			
Ευκάλυπτος	22,4370086	8,798826902	2,199706726	2,199706726	10,55859228	x		
Μαντζουράνα	8,798826902	4,839354796	11,43847497	11,43847497	3,079589416	13,6381817	x	
Φασκόμηλο	9,678709592	3,959472106	10,55859228	10,55859228	2,199706726	12,75829901	0,87988269	x
$q_{critical} = 4,896$								

Παρατηρήθηκε ότι στην απομόνωση με κωδικό 28 αρκετά ζεύγη διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 29:



Γράφημα 10. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 29 μετά από 48 ώρες.

Στην συγκεκριμένη απομόνωση τα αιθέρια έλαια δάφνης και ρίγανης παρουσίασαν μη μετρήσιμα αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε πολύ μικρή ανάπτυξη βακτηρίου και στερεό

θρεπτικό υπόστρωμα που ήταν σχεδόν διαυγές και στις τρεις επαναλήψεις της κάθε απομόνωσης. Μικρές μεμονωμένες αποικίες παρατηρήθηκαν σποραδικά γύρω από τον χάρτινο δίσκο που περιείχε το αιθέριο έλαιο.

Πίνακας 29. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 29 παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	2,422857143	6	0,403809524	20,80981595	3,16977E-06	2,847725996
Μέσα στις ομάδες	0,271666667	14	0,019404762			
Σύνολο	2,69452381	20				

Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 30. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 29 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{\text{critical}}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Q	Μάρτυρας	Ανηθος	Γαρύφαλλο	Λενδρολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x						
Ανηθος	8,883188783	x					
Γαρύφαλλο	16,75115599	7,867967208	x				
Λενδρολίβανο	7,614161814	1,269026969	9,136994177	x			
Ευκάλυπτος	15,48212902	6,598940239	1,269026969	7,867967208	x		
Μαντζουράνα	7,867967208	1,015221575	8,883188783	0,253805394	7,614161814	x	
Φασκόμηλο	7,867967208	1,015221575	8,883188783	0,253805394	7,614161814	3,38137E-15	x
q critical= 4,829							

Παρατηρήθηκε ότι στην απομόνωση με κωδικό 29 αρκετά ζεύγη διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 32:



Γράφημα 11. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 32 μετά από 48 ώρες.

Πίνακας 31. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 32 παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	12,21074074	8	1,526342593	659,38	1,32597E-20	2,510157895
Μέσα στις ομάδες	0,041666667	18	0,002314815			
Σύνολο	12,25240741	26				

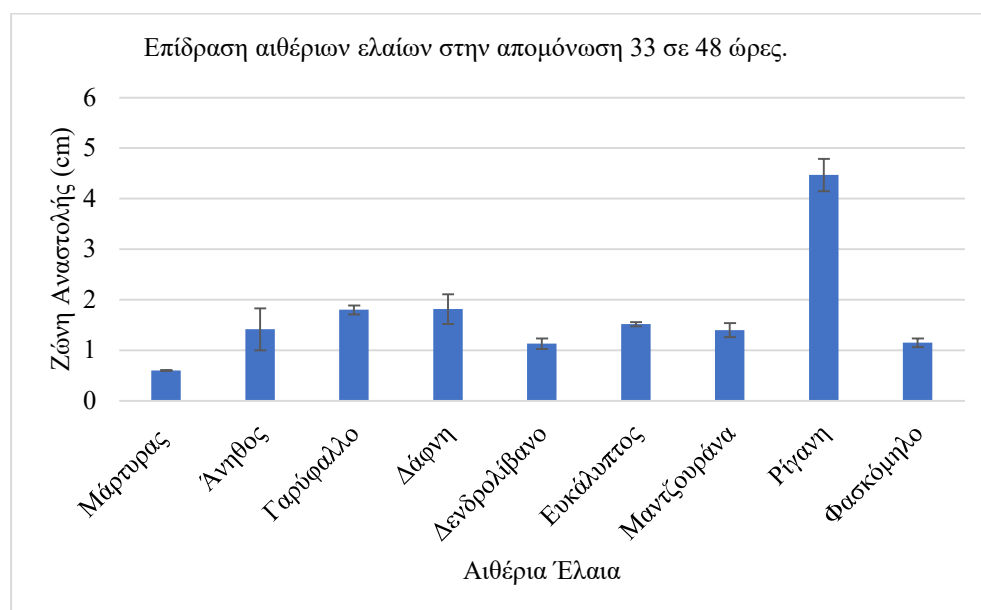
Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 32. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 32 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Q	Μάρτυρας	Άνηθος	Γαρύφαλλο	Δάφνη	Λεοντολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Ρίγανη	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x								
Άνηθος	19,10602	x							
Γαρύφαλλο	50,70443768	31,59841769	x						
Δάφνη	46,29535614	27,18933615	4,409081537	x					
Λεοντολίβανο	19,10602	9,79013E-15	31,59841769	27,18933615	x				
Ευκάλυπτος	24,24994846	5,14392846	26,45448922	22,04540769	5,14392846	x			
Μαντζουράνα	30,12872384	11,02270384	20,57571384	16,1666323	11,02270384	5,878775383	x		
Ρίγανη	108,7573446	89,65132459	58,05290691	62,46198845	89,65132459	84,50739613	78,62862075	x	
Φασκόμηλο	19,84086692	0,734846923	30,86357076	26,45448922	0,734846923	4,409081537	10,28785692	88,91647767	x
q critical= 4,955									

Παρατηρήθηκε ότι στην απομόνωση με κωδικό 32 αρκετά ζεύγη διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 33:



Γράφημα 12. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 33 μετά από 48 ώρες.

Πίνακας 33. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 33 παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	29,14666667	8	3,643333333	76,4038835	2,60982E-12	2,510157895
Μέσα στις ομάδες	0,858333333	18	0,047685185			
Σύνολο	30,005	26				

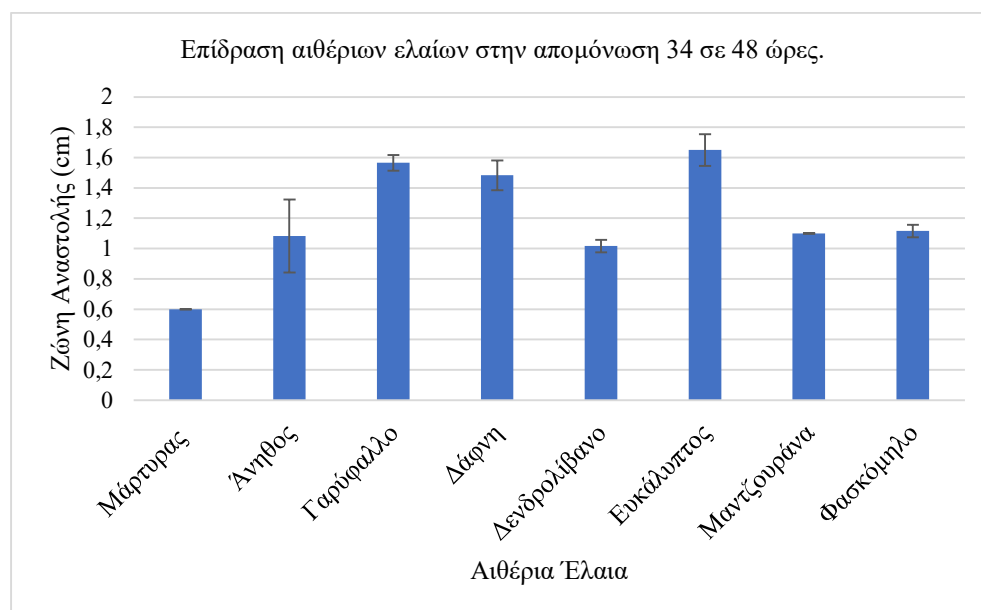
Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 34. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 33 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{\text{critical}}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

q	Μάρτυρας	Ανηθος	Γαρύφαλλο	Δάφνη	Λενδρόλιβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Ρίγανη	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x								
Ανηθος	7,933399962	x							
Γαρύφαλλο	11,65724076	3,723840799	x						
Δάφνη	11,81914688	3,88574692	0,161906122	x					
Λενδρόλιβανο	5,180995894	2,752404069	6,476244867	6,638150989	x				
Ευκάλυπτος	8,904836693	0,97143673	2,752404069	2,91431019	3,723840799	x			
Μαντζουράνα	7,771493841	0,161906122	3,88574692	4,047653042	2,590497947	1,133342852	x		
Ρίγανη	37,56222023	29,62882027	25,90497947	25,74307335	32,38122434	28,65738354	29,79072639	x	
Φασκόμηλο	5,342902016	2,590497947	6,314338746	6,476244867	0,161906122	3,561934677	2,428591825	32,21931821	x
q critical= 4,955									

Παρατηρήθηκε ότι στην απομόνωση με κωδικό 33 αρκετά ζεύγη διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 34:



Γράφημα 13. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 34 μετά από 48 ώρες.

Στη συγκεκριμένη απομόνωση τα αιθέρια έλαια ρίγανης έδωσαν μη μετρήσιμα αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε πολύ μικρή ανάπτυξη βακτηρίου και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που ήταν σχεδόν διαυγές και στις τρεις επαναλήψεις της κάθε απομόνωσης. Μικρές μεμονωμένες αποικίες παρατηρήθηκαν σποραδικά γύρω από τον χάρτινο δίσκο που περιείχε το αιθέριο έλαιο.

Πίνακας 35. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 34 παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	2,5240625	7	0,360580357	61,81377551	2,14194E-10	2,6571966
Μέσα στις ομάδες	0,093333333	16	0,005833333			
Σύνολο	2,617395833	23				

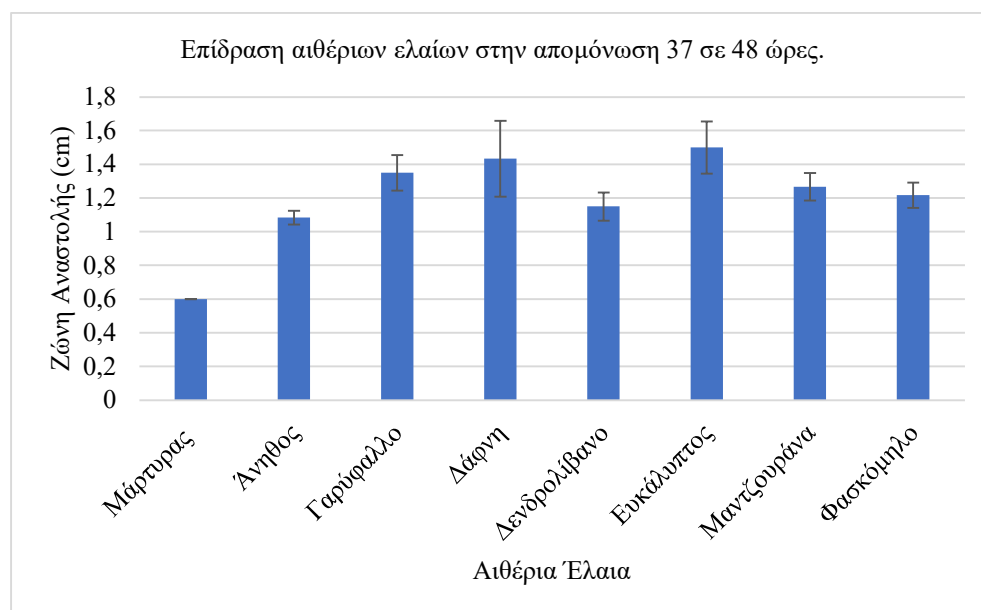
Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 36. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 34 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Q	Μάρτυρας	Άνηθος	Γαρύφαλλο	Δάφνη	Δενδρολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x							
Άνηθος	13,42439145	x						
Γαρύφαλλο	26,8487829	13,42439145	x					
Δάφνη	24,53423265	11,1098412	2,31455025	x				
Δενδρολίβανο	11,57275125	1,8516402	15,27603165	12,9614814	x			
Ευκάλυπτος	29,16333315	15,7389417	2,31455025	4,629100499	17,5905819	x		
Μαντζουράνα	13,8873015	0,46291005	12,9614814	10,64693115	2,31455025	15,27603165	x	
Φασκόμηλο	14,35021155	0,9258201	12,49857135	10,1840211	2,7774603	14,8131216	0,46291005	x
$q_{critical} = 4,896$								

Παρατηρήθηκε ότι στην απομόνωση με κωδικό 34 αρκετά ζεύγη διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 37:



Γράφημα 14. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 37 μετά από 48 ώρες.

Στη συγκεκριμένη απομόνωση τα αιθέρια έλαια ρίγανης έδωσαν μη μετρήσιμα αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε πολύ μικρή ανάπτυξη βακτηρίου και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που ήταν σχεδόν διαυγές και στις τρεις επαναλήψεις της κάθε απομόνωσης. Μικρές μεμονωμένες αποικίες παρατηρήθηκαν σποραδικά γύρω από τον χάρτινο δίσκο που περιείχε το αιθέριο έλαιο.

Πίνακας 37. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 37 παρουσία αιθέρων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	1,643333333	7	0,234761905	18,17511521	1,6588E-06	2,6571966
Μέσα στις ομάδες	0,206666667	16	0,012916667			
Σύνολο	1,85	23				

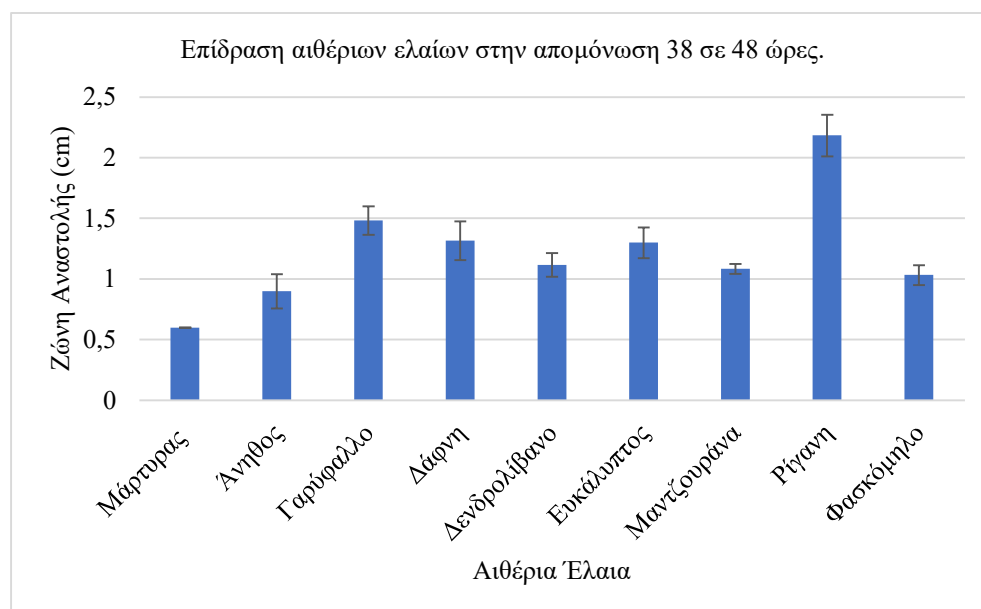
Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 38. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 37 παρουσία αιθέρων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{\text{critical}}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Q	Μάρτυρας	Άνηθος	Γαρύφαλλο	Δάφνη	Λεοντολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x							
Άνηθος	9,021479745	x						
Γαρύφαλλο	13,99884788	4,977368135	x					
Δάφνη	15,55427542	6,532795677	1,555427542	x				
Λεοντολίβανο	10,26582178	1,244342034	3,733026101	5,288453644	x			
Ευκάλυπτος	16,79861746	7,777137711	2,799769576	1,244342034	6,532795677	x		
Μαντζουράνα	12,44342034	3,421940593	1,555427542	3,110855085	2,177598559	4,355197118	x	
Φασκόμηλο	11,51016381	2,488684068	2,488684068	4,04411161	1,244342034	5,288453644	0,933256525	x
q critical=	4,896							

Παρατηρήθηκε ότι στην απομόνωση με κωδικό 37 αρκετά ζεύγη διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 38:



Γράφημα 15. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 38 μετά από 48 ώρες.

Πίνακας 39. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 38 παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	4,691851852	8	0,586481481	55,56140351	4,05047E-11	2,510157895
Μέσα στις ομάδες	0,19	18	0,010555556			
Σύνολο	4,881851852	26				

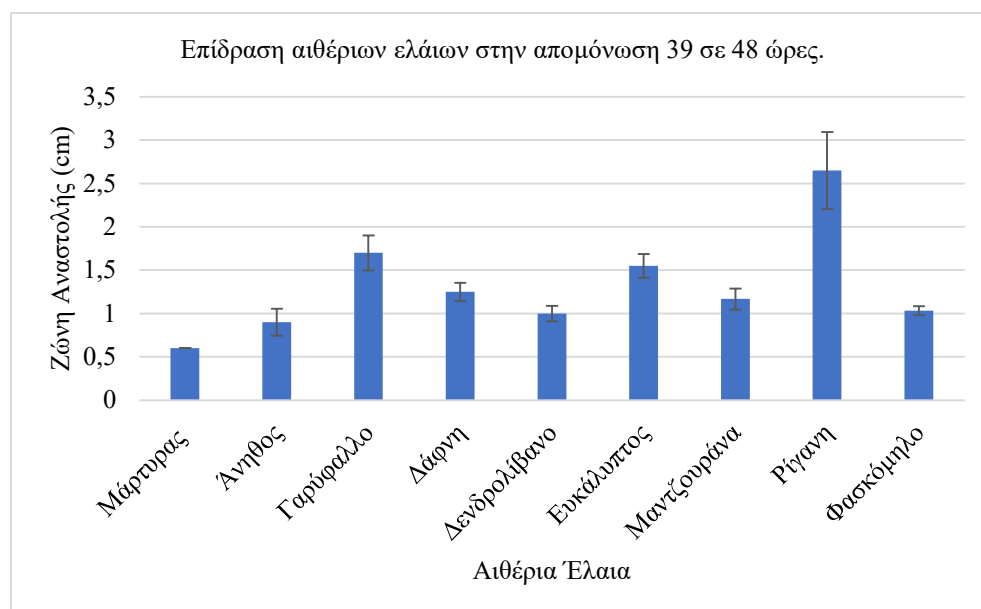
Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 40. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 38 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Q	Μάρτυρας	Ανηθος	Γαρύφαλλο	Δάφνη	Λεοντολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Ρίγανη	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x								
Ανηθος	6,194224815	x							
Γαρύφαλλο	18,23855084	12,04432603	x						
Δάφνη	14,79731484	8,603090021	3,441236008	x					
Λεοντολίβανο	10,66783163	4,473606811	7,570719218	4,12948321	x				
Ευκάλυπτος	14,45319124	8,25896642	3,785359609	0,344123601	3,785359609	x			
Μαντζουράνα	9,979584424	3,785359609	8,25896642	4,817730412	0,688247202	4,473606811	x		
Ρίγανη	32,69174208	26,49751726	14,45319124	17,89442724	22,02391045	18,23855084	22,71215766	x	
Φασκόμηλο	8,947213622	2,752988807	9,291337223	5,850101214	1,720618004	5,505977613	1,032370803	23,74452846	x
$q_{critical} = 4,955$									

Παρατηρήθηκε ότι στην απομόνωση με κωδικό 38 αρκετά ζεύγη διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 39:



Γράφημα 16. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 39 μετά από 48 ώρες.

Πίνακας 41. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 39 παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	8,621666667	8	1,077708333	28,81002475	9,87358E-09	2,510157895
Μέσα στις ομάδες	0,673333333	18	0,037407407			
Σύνολο	9,295	26				

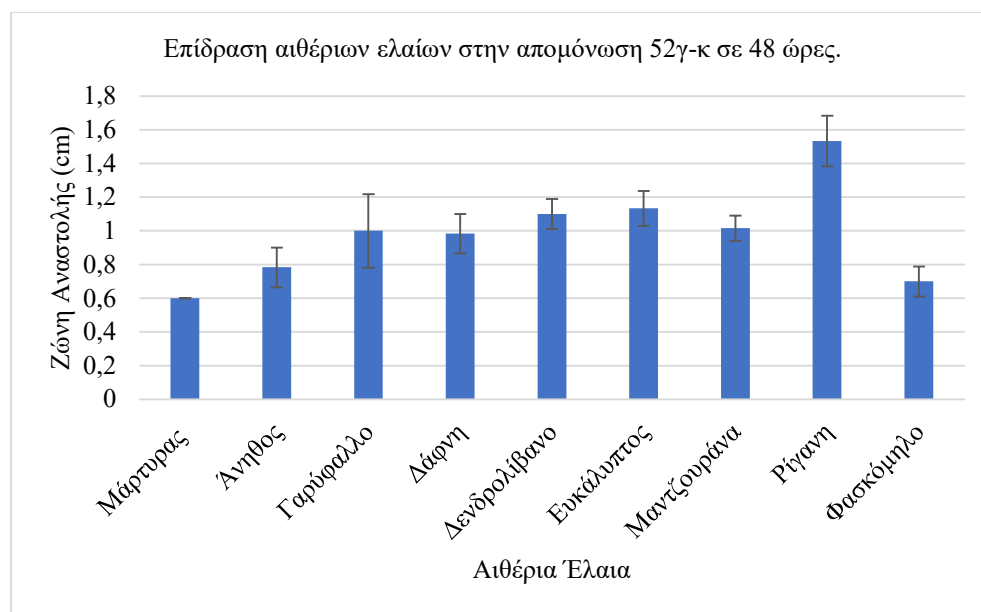
Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 42. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 39 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{\text{critical}}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Q	Μάρτυρας	Ανηθος	Γαρύφαλλο	Λάφνη	Δενδρολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Ρίγανη	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x								
Ανηθος	3,290400078	x							
Γαρύφαλλο	12,06480029	8,774400209	x						
Λάφνη	7,12920017	3,838800091	4,935600117	x					
Δενδρολίβανο	4,387200104	1,096800026	7,677600183	2,742000065	x				
Ευκάλυπτος	10,41960025	7,12920017	1,645200039	3,290400078	6,032400144	x			
Μαντζουράνα	6,215200148	2,92480007	5,849600139	0,914000022	1,828000044	4,2044001	x		
Ρίγανη	22,48440054	19,19400046	10,41960025	15,35520037	18,09720043	12,06480029	16,26920039	x	
Φασκόμηλο	4,752800113	1,462400035	7,312000174	2,376400057	0,365600009	5,666800135	1,462400035	17,73160042	x
$q_{\text{critical}} = 4,955$									

Παρατηρήθηκε ότι στην απομόνωση με κωδικό 39 αρκετά ζεύγη διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 52γ-κ:



Γράφημα 17. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 52γ-κ μετά από 48 ώρες.

Πίνακας 43. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 52γ-κ παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	1,821666667	8	0,227708333	21,20043103	1,15654E-07	2,510157895
Μέσα στις ομάδες	0,193333333	18	0,010740741			
Σύνολο	2,015	26				

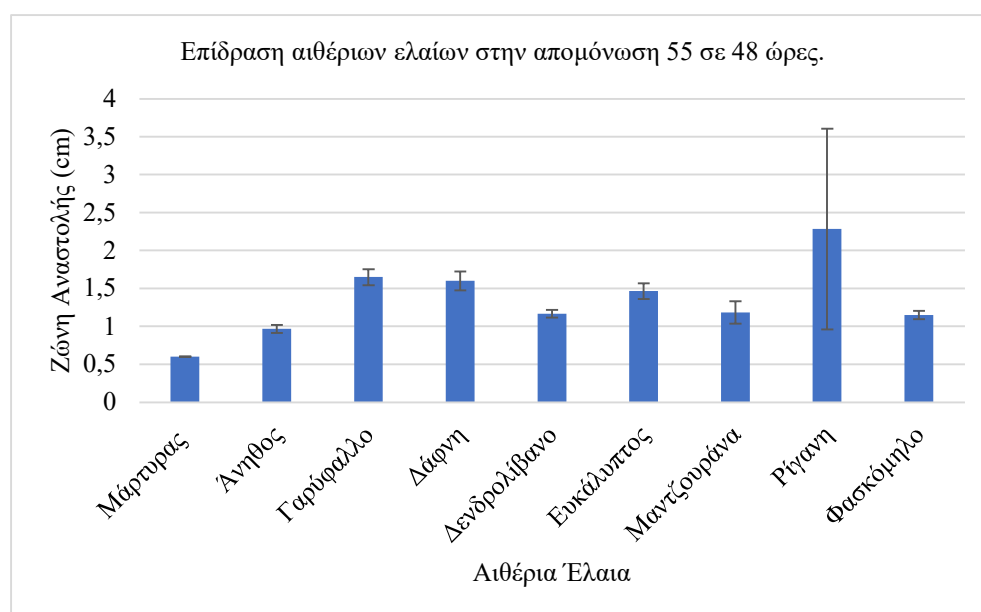
Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 44. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 52γ-κ παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Q	Μάρτυρας	Άνηθος	Γαρύφαλλο	Δάφνη	Δενδρολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Ρίγανη	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x								
Άνηθος	3,752585316	x							
Γαρύφαλλο	8,187458871	4,434873555	x						
Δάφνη	7,846314752	4,093729436	0,34114412	x					
Δενδρολίβανο	10,23432359	6,481738273	2,046864718	2,388008838	x				
Ευκάλυπτος	10,91661183	7,164026513	2,729152957	3,070297077	0,682288239	x			
Μαντζουράνα	8,528602991	4,776017675	0,34114412	0,682288239	1,705720598	2,388008838	x		
Ρίγανη	19,1040707	15,35148538	10,91661183	11,25775595	8,869747111	8,187458871	10,57546771	x	
Φασκόμηλο	2,046864718	1,705720598	6,140594154	5,799450034	8,187458871	8,869747111	6,481738273	17,05720598	x
$q_{critical} = 4,955$									

Παρατηρήθηκε ότι στην απομόνωση με κωδικό 52γ-κ αρκετά ζεύγη διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 55:



Γράφημα 18. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 55 μετά από 48 ώρες.

Πίνακας 45. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 55 παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	5,541851852	8	0,692731481	2,79682243	0,033321064	2,510157895
Μέσα στις ομάδες	4,458333333	18	0,247685185			
Σύνολο	10,00018519	26				

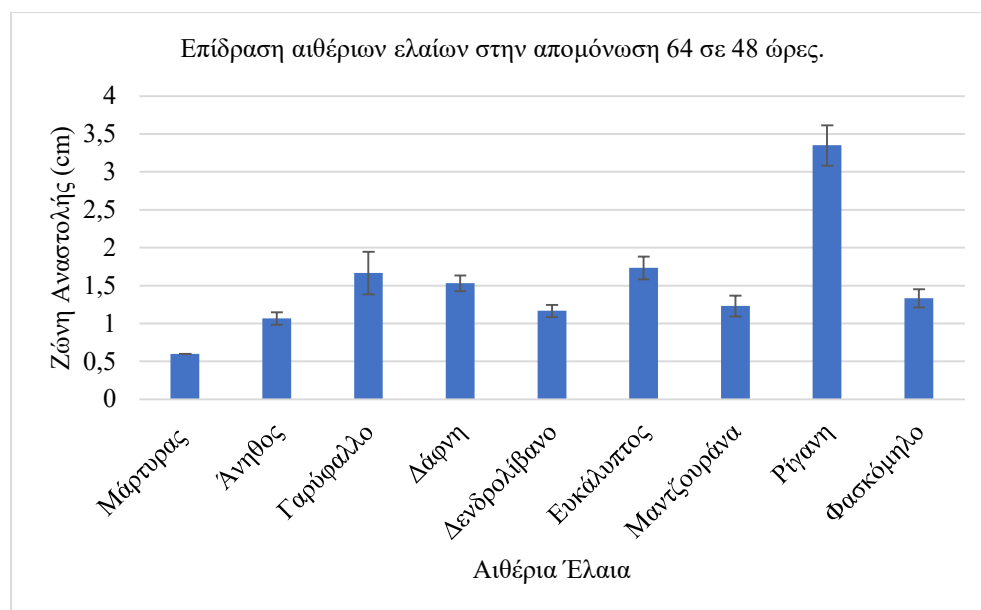
Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 46. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 55 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{\text{critical}}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

q	Μάρτυρας	Άνηθος	Γαρύφαλλο	Δάφνη	Δενδρολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Ρίγανη	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x								
Άνηθος	1,562887335	x							
Γαρύφαλλο	4,475541006	2,91265367	x						
Δάφνη	4,262420005	2,69953267	0,213121	x					
Δενδρολίβανο	2,415371336	0,852484001	2,060169669	1,847048669	x				
Ευκάλυπτος	3,694097338	2,131210003	0,781443668	0,568322667	1,278726002	x			
Μαντζουράνα	2,48641167	0,923524335	1,989129336	1,776008336	0,071040333	1,207685668	x		
Ρίγανη	7,175073676	5,61218634	2,69953267	2,91265367	4,759702339	3,480976338	4,688662006	x	
Φασκόμηλο	2,344331003	0,781443668	2,131210003	1,918089002	0,071040333	1,349766335	0,142080667	4,830742673	x
q critical= 4,955									

Στην συγκεκριμένη απομόνωση παρατηρήθηκε ότι μόνο δύο ζεύγη διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 64:



Γράφημα 19. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 64 μετά από 48 ώρες.

Πίνακας 47. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 64 παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	14,12962963	8	1,766203704	97,32142857	3,17752E-13	2,510157895
Μέσα στις ομάδες	0,326666667	18	0,018148148			
Σύνολο	14,4562963	26				

Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 48. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 64 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{critical}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Q	Μάρτυρας	Άνηθος	Γαρύφαλλο	Δάφνη	Λεοντολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Ρίγανη	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x								
Άνηθος	7,348469229	x							
Γαρύφαλλο	16,7965011	9,448031866	x						
Δάφνη	14,69693846	7,348469229	2,099562637	x					
Λεοντολίβανο	8,923141207	1,574671978	7,873359888	5,773797251	x				
Ευκάλυπτος	17,84628241	10,49781318	1,049781318	3,149343955	8,923141207	x			
Μαντζουράνα	9,972922525	2,624453296	6,82357857	4,724015933	1,049781318	7,873359888	x		
Ρίγανη	43,30347939	35,95501016	26,50697829	28,60654093	34,38033818	25,45719697	33,33055686	x	
Φασκόμηλο	11,5475945	4,199125274	5,248906592	3,149343955	2,624453296	6,298687911	1,574671978	31,75588488	x
$q_{critical} = 4,955$									

Στην συγκεκριμένη απομόνωση παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές σε αρκετά ζεύγη. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Απομόνωση με κωδικό 73:



Γράφημα 20. Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων στην απομόνωση με κωδικό 73 μετά από 48 ώρες.

Πίνακας 49. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των διαμέτρων αναστολής της απομόνωσης με κωδικό 73 παρουσία αιθέριων ελαίων.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	20,70407407	8	2,588009259	41,96771772	4,37172E-10	2,510157895
Μέσα στις ομάδες	1,11	18	0,061666667			
Σύνολο	21,81407407	26				

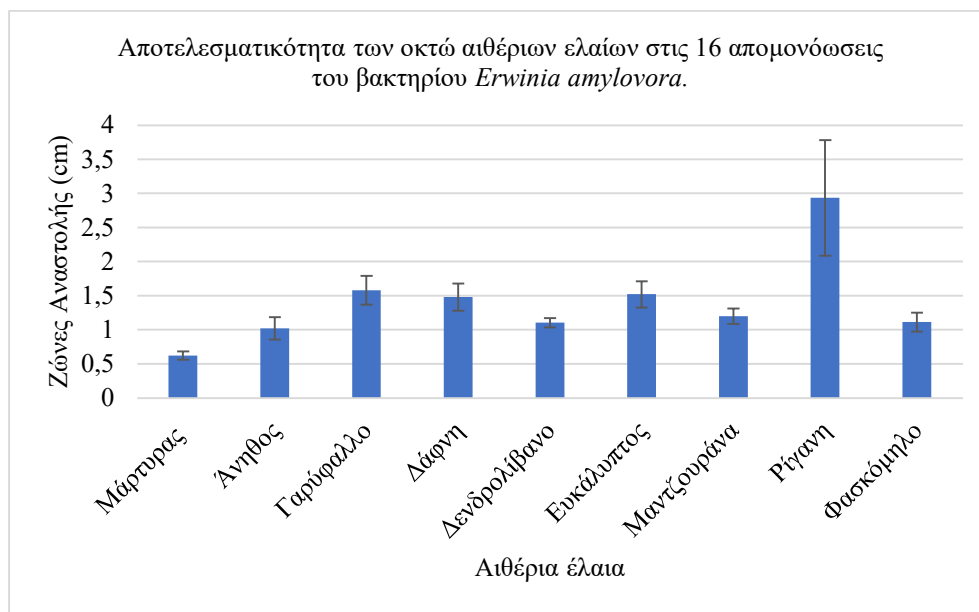
Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι $F > \text{κριτήριο } F$ και έτσι οι μέσοι όροι κάποιων ομάδων διαφέρουν μεταξύ τους και ο αριθμός των ομάδων που διαφέρουν βρίσκεται με την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey.

Πίνακας 50. Μέθοδος πολλαπλών συγκρίσεων με το κριτήριο Tukey στην απομόνωση με κωδικό 73 παρουσία αιθέριων ελαίων. Τα ζεύγη που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($q > q_{\text{critical}}$) φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Q	Μάρτυρας	Άνηθος	Γαρύφαλλο	Δάφνη	Λεοντολίβανο	Ευκάλυπτος	Μαντζουράνα	Ρίγανη	Φασκόμηλο
Μάρτυρας	x								
Άνηθος	2,135605491	x							
Γαρύφαλλο	10,82040115	8,684795662	x						
Δάφνη	8,542421963	6,406816472	2,27797919	x					
Λεοντολίβανο	5,125453178	2,989847687	5,694947975	3,416968785	x				
Ευκάλυπτος	9,396664159	7,261058668	1,423736994	0,854242196	4,271210981	x			
Μαντζουράνα	5,410200576	3,274595086	5,410200576	3,132221386	0,284747399	3,986463583	x		
Ρίγανη	27,33575028	25,20014479	16,51534913	18,79332832	22,2102971	17,93908612	21,9255497	x	
Φασκόμηλο	5,410200576	3,274595086	5,410200576	3,132221386	0,284747399	3,986463583	0	21,9255497	x
q critical= 4,955									

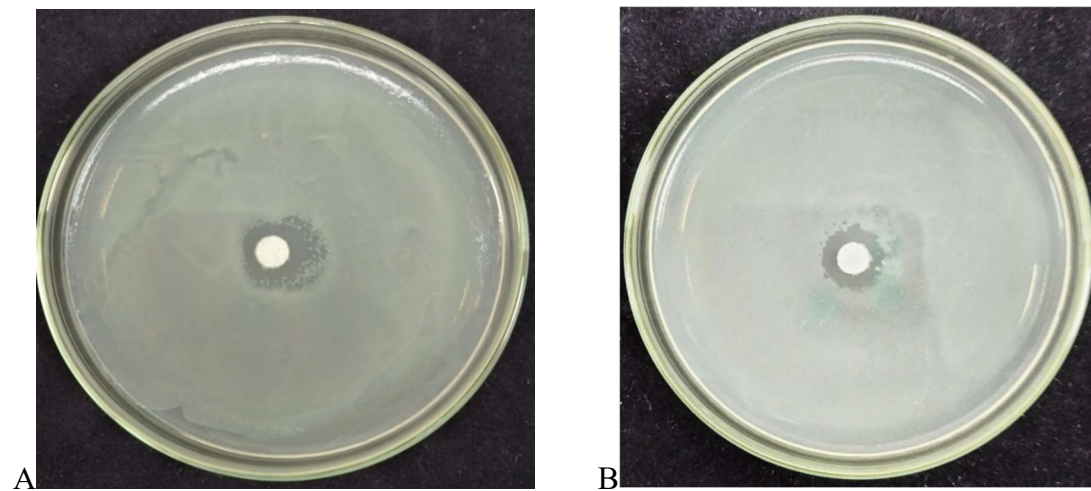
Στην συγκεκριμένη απομόνωση παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές σε αρκετά ζεύγη. Τα ζεύγη φαίνονται με μπλε χρωματισμό.

Στο παρακάτω γράφημα φαίνεται η επίδραση των 8 διαφορετικών αιθέριων ελαίων στις 16 απομονώσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora*. Η επίδραση των αιθέριων ελαίων κατά φθίνουσα σειρά ήταν ρίγανη> γαρύφαλλο> δάφνη> μαντζουράνα> φασκόμηλο> δενδρολίβανο> άνηθος.

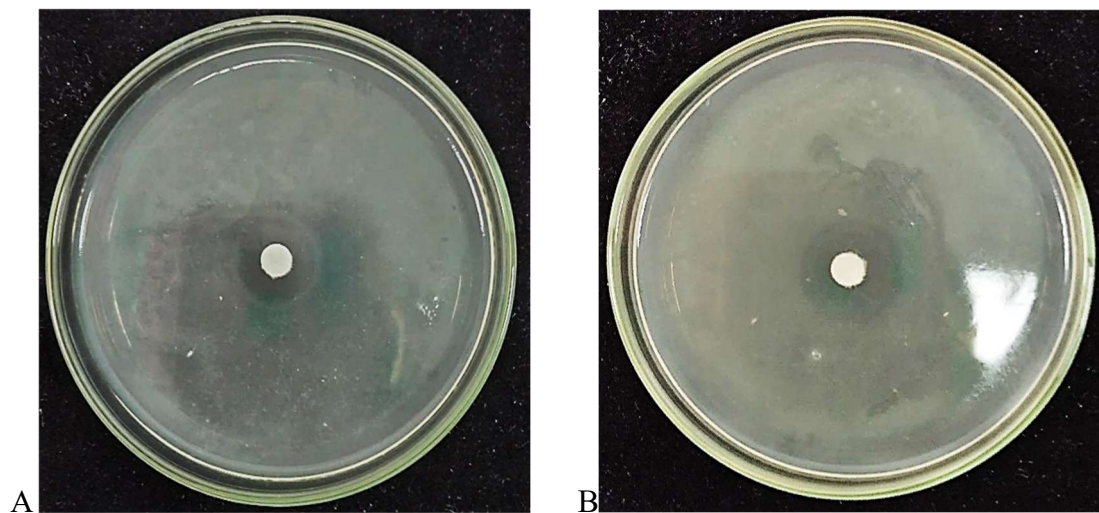


Γράφημα 21. Αποτελεσματικότητα των οκτώ αιθέριων ελαίων στις 16 απομονώσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora*.

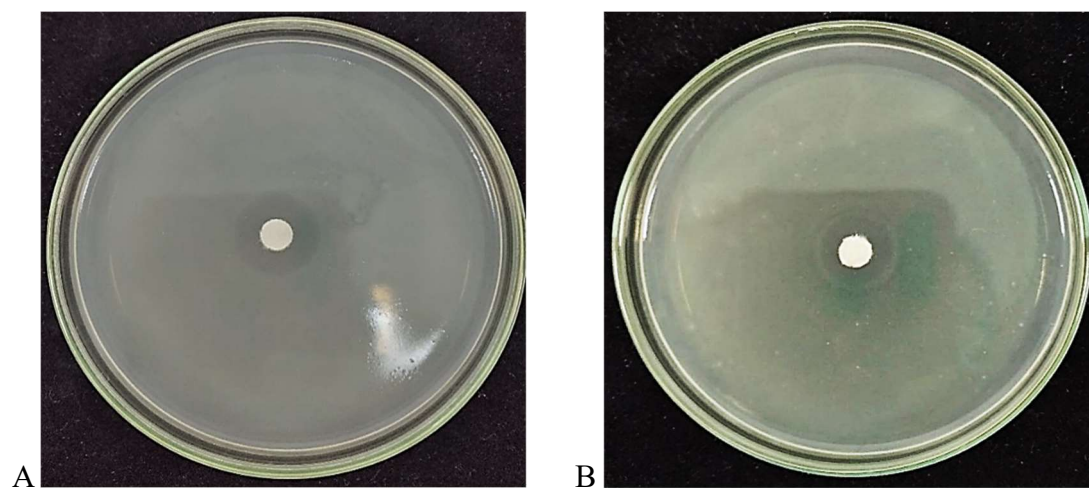
Στη συνέχεια ακολουθούν φωτογραφίες από τη δράση που είχαν τα αιθέρια έλαια στις απομονώσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora*.



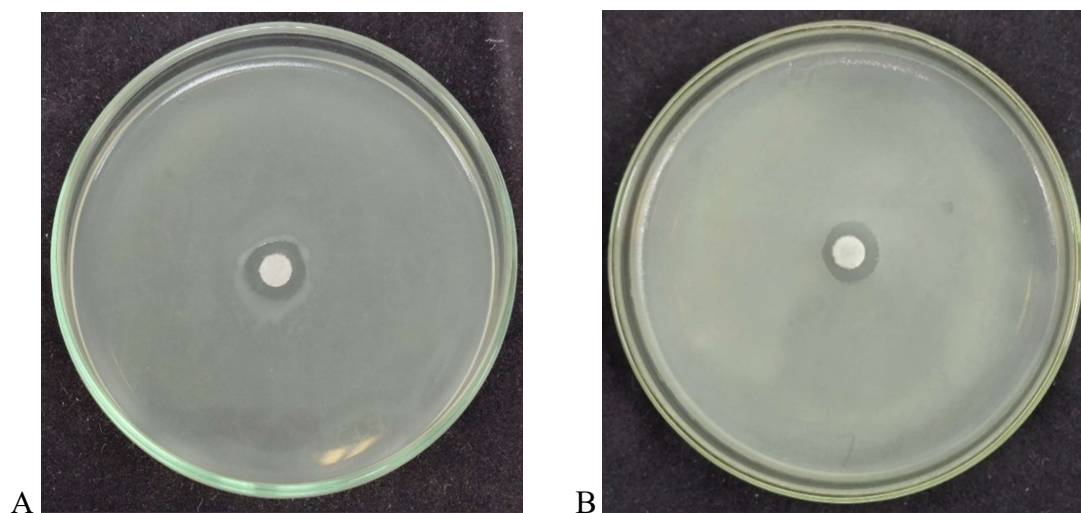
Εικόνα 16. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Άνηθου στην εικόνα Α στην απομόνωση 32 και στη Β στην απομόνωση 37 του βακτηρίου *Erwinia amylovora*.



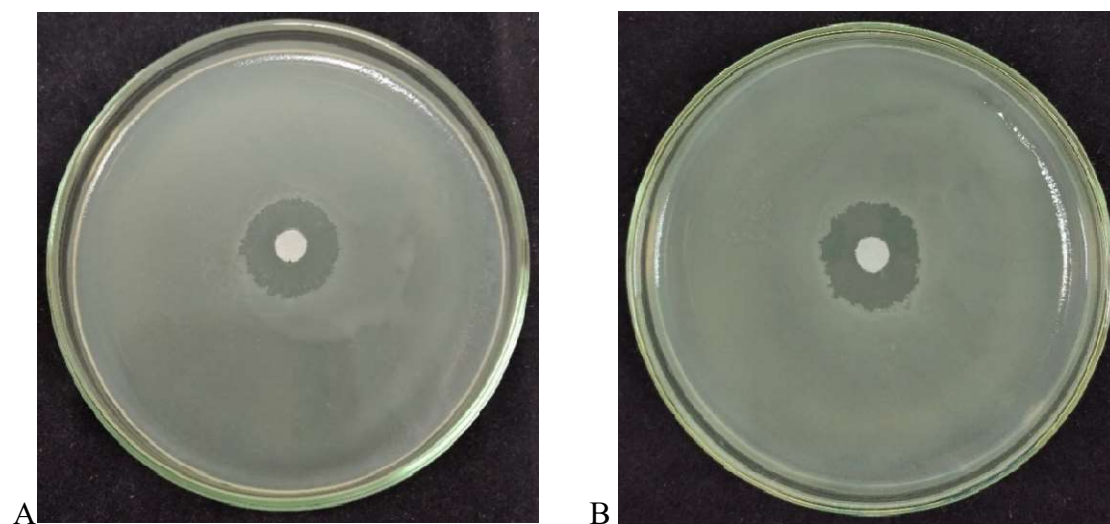
Εικόνα 17. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Γαρύφαλλου στην εικόνα Α στην απομόνωση 39 και στη Β στην απομόνωση 64 του βακτηρίου *Erwinia amylovora*.



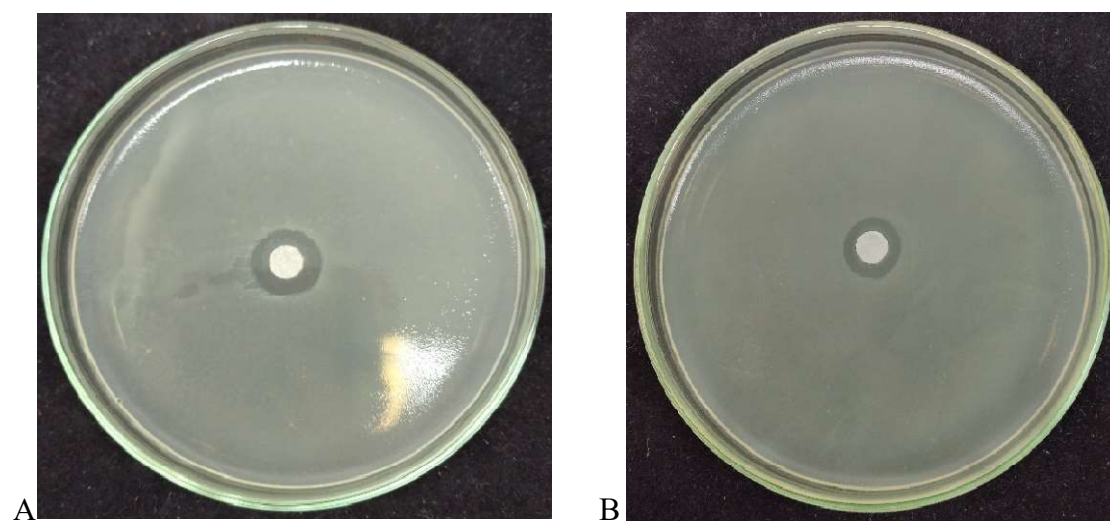
Εικόνα 18. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Δάφνης στην εικόνα Α στην απομόνωση 28 και στη Β στην απομόνωση 38 του βακτηρίου *Erwinia amylovora*.



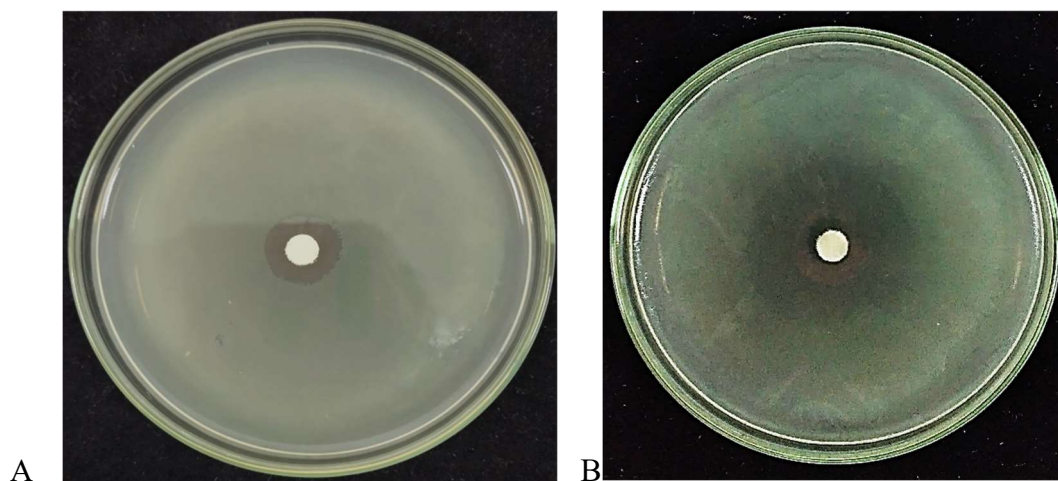
Εικόνα 19. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Δενδρολίβανου στην εικόνα Α στην απομόνωση 22 και στη Β στην απομόνωση 24 του βακτηρίου *Erwinia amylovora*.



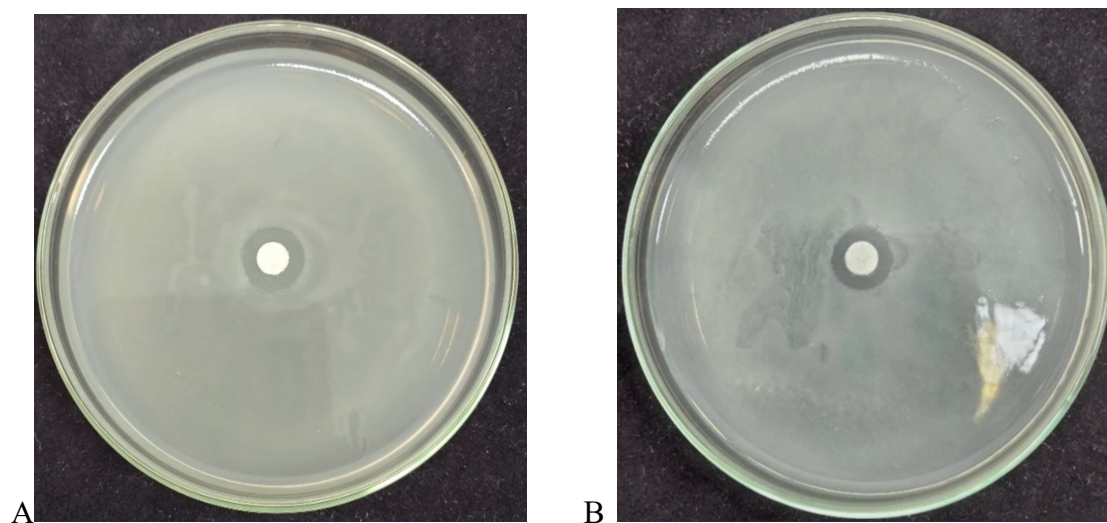
Εικόνα 20. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Ευκαλύπτου στην εικόνα Α στην απομόνωση 23 και στη Β στην απομόνωση 27 του βακτηρίου *Erwinia amylovora*.



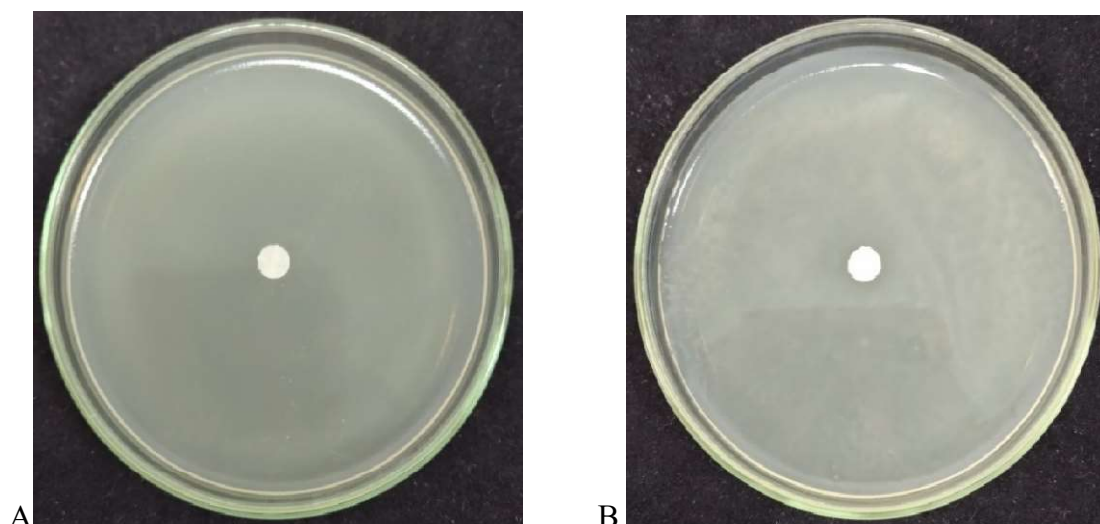
Εικόνα 21. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Μαντζουράνας στην εικόνα Α στην απομόνωση 55 και στη Β στην απομόνωση 34 του βακτηρίου *Erwinia amylovora*.



Εικόνα 22. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Ρίγανης στην εικόνα Α στην απομόνωση 52γ-κ και στη Β στην απομόνωση 24 του βακτηρίου *Erwinia amylovora*.



Εικόνα 23. Επίδραση του αιθέριου ελαίου Φασκόμηλου στην εικόνα Α στην απομόνωση 37 και στη Β στην απομόνωση 55 του βακτηρίου *Erwinia amylovora*.



Εικόνα 24. Στην εικόνα Α ο μάρτυρας της απομόνωσης 34 και στη Β ο μάρτυρας της απομόνωσης 38 του βακτηρίου *Erwinia amylovora*.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Η επίδραση του χαλκού στο βακτήριο *Erwinia amylovora*

Ο έλεγχος της ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora* στον χαλκό πραγματοποιήθηκε με το σκεύασμα χαλκού: Copperfield 20 WG (20% w/w) της Bayer. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις χαλκού: 0 M, 0,1 M, 0,5 M, 1 M και 1,5 M. Οι 16 απομονώσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora* δεν παρουσίασαν ευαισθησία σε καμία συγκέντρωση χαλκού. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μετά από επτά ημέρες και υπήρχε ανάπτυξη του βακτηρίου σε όλα τα τρυβλία. Η ικανότητα του βακτηρίου να επιβιώνει παρουσία χαλκού αναφέρεται ότι μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα ιόντα χαλκού προκαλούν αύξηση των εξωπολυσακχαριτών EPS και η συσσώρευση των ιόντων χαλκού οδηγεί στη δημιουργία ενός παχύτερου εξωτερικού στρώματος στο βακτήριο προσδίδοντάς του διαφορετική μορφολογία και αντοχή στο χαλκό (Ordax et al., 2006). Ο ρόλος των εξωπολυσακχαριτών είναι πολύτιμος για τα βακτηριακά κύτταρα, καθώς βοηθούν στην επιβίωση του βακτηρίου μετά την εφαρμογή χαλκού ή όταν τα θρεπτικά συστατικά του ξενιστή είναι σε έλλειψη κατά την περίοδο του λήθαργου. Σε μελέτη βρέθηκε ότι οι εξωπολυσακχαρίτες ευθύνονται για τον σχηματισμό βιοφίλμ στο βακτήριο *Erwinia amylovora* και κατ' επέκταση για τη μακρόχρονη επιβίωσή του (Ordax et al., 2010). Αξιοσημείωτη μπορεί να χαρακτηριστεί και η επίδραση ενός γονιδίου στην ομοιόσταση του βακτηρίου *Erwinia amylovora* ως προς τον χαλκό. Το γονίδιο CopA είναι ένα από τα άμεσα εμπλεκόμενα

γονίδια που είναι υπεύθυνα για την μεταφορά του χαλκού από το κυτταρόπλασμα στο περίπλασμα και ύστερα στην εξωκυτταρική μήτρα του κυττάρου. Το γονίδιο CopA διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο ως προς την ευαισθησία του βακτηρίου *Erwinia amylovora* στον χαλκό. Σύμφωνα με την έρευνα Águila-Clares et al. (2018), διαπιστώθηκε ότι το βακτήριο μπορεί να εμφανίσει ευαισθησία στον χαλκό λόγω της υπερέκφρασης πολλών γονιδίων. Στο συγκεκριμένο μικροοργανισμό λαμβάνουν μέρος δύο γενετικά συστήματα α) η έκφραση του γονιδίου CopA είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση της ομοιόστασης του χαλκού και β) η ύπαρξη ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) προκαλεί οξειδωτικό στρες και τελικά καταλήγει σε τοξικότητα του χαλκού (Águila-Clares et al., 2018). Τα ιόντα χαλκού μπορούν να προκαλέσουν μεταβολές στις ενζυμικές δραστηριότητες των βακτηριακών κυττάρων, ωστόσο η διαδικασία φαίνεται να είναι αντιστρέψιμη διότι το βακτήριο εμφανίζεται ανθεκτικό στην εφαρμογή του χαλκού. Ο χαλκός μπορεί να προκαλέσει ισχυρή αναστολή της ανάπτυξης του *Erwinia amylovora* όταν προκαλέσει αυτόλυση των κυττάρων (Geider, 1999). Μία λύση που φαίνεται στο μέλλον ότι θα αποτελέσει αρωγό της φυτοπροστασίας είναι η χρήση νανοσωματιδίων χαλκού. Νωρίτερα από τη δεκαετία του 1990, ξεκίνησαν οι πρώτες δοκιμές για την αξιολόγηση των νανοσωματιδίων του Cu, τα οποία περιεγράφηκαν ως μέσα που αποτελούνται κατά το 50% από σωματίδια μεγέθους μικρότερου των 100 nm (Varympori et al., 2020). Τα νανοσωματίδια των μετάλλων δεν έχουν μεγάλο κόστος παραγωγής, η αντιμικροβιακή τους δράση διαρκεί περισσότερο χρόνο, μπορούν να προκαλέσουν την έναρξη πολλών βιοχημικών και φυσιολογικών διεργασιών στα φυτά που χορηγούνται και δεν προκαλούν τα επίπεδα τοξικότητας που προκαλούνται από τη χρήση αλάτων των μετάλλων (Doolotkeldieva et al., 2022). Στην έρευνα Zaki et al. (2021), μελετήθηκε η επίδραση των νανοσωματιδίων διαφόρων μετάλλων, στα οποία συμπεριλαμβανόταν και ο χαλκός, ως προς την αντιμικροβιακή τους δραστηριότητα. Αναφέρθηκε ότι, τα νανοσωματίδια των μετάλλων μπορούν να παράγουν ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) και να δημιουργούν ελεύθερες ρίζες OH⁻ στα κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο προκαλείται οξειδωτικό στρες, το οποίο οδηγεί σε βλάβη των κυτταρικών μεμβρανών και στη συνέχεια θάνατο του κυττάρου. Η εφαρμογή νανοσωματιδίων του CuO φάνηκε ότι μπορεί να ευθύνεται για την οξείδωση των πρωτεϊνών, την υπεροξείδωση των λιπιδίων και τελικά την αποικοδόμηση του DNA σε βακτηριακά κύτταρα που ανήκαν στο βακτήριο *Escherichia coli*. Βρέθηκε ότι, τα νανοσωματίδια Fe, Cu και Co σε συγκεντρώσεις 50- 100 µg/ml μπορούν να είναι αποτελεσματικά ενάντια σε φυτοπαθογόνα βακτήρια που εξετάστηκαν στην παραπάνω

έρευνα (Zaki et al., 2021). Στο βακτήριο *Erwinia amylovora* δοκιμάστηκε η επίδραση των συνθετικών νανοσκονών Cu και αποδείχθηκε υψηλή ανασταλτική δράση ενάντια στο βακτήριο. Τα αποτελέσματα της ανασταλτικής δράσης του χαλκού ποικίλλουν ανάλογα με τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων και το μέσο που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη του βακτηρίου. Αποδείχθηκε ότι, σε αλκαλικό μέσο η δράση των νανοσωματιδίων χαλκού είναι καλύτερη για το βακτήριο *Erwinia amylovora*. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη ζώνη παρεμπόδισης σε συγκέντρωση νανοσωματιδίων Cu 5 mg/ml μετά από 72 ώρες και ζώνη λύσης διαμέτρου 2 cm. Σε συγκέντρωση νανοσωματιδίων Cu 1 mg/ml παρατηρήθηκε ζώνη λύσης 1,6 cm (Satyvaldiev et al., 2018). Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε άλλες έρευνες έχει αποδειχθεί ότι τα νανοσωματίδια σε αλκαλικό μέσο αποδίδουν καλύτερα ως προς τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες κάτι το οποίο δεν παρατηρείται σε μέσα που έχουν ως βάση την αμμωνία ή είναι ουδέτερα (Zhasnakunov et al., 2018).

4.2 Η επίδραση των αιθέριων ελαίων στο βακτήριο *Erwinia amylovora*

Στην συγκεκριμένη έρευνα, παρατηρήθηκε η ανασταλτική επίδραση *in vitro* οκτώ διαφορετικών αιθέριων ελαίων σε 16 απομονώσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora*. Χρησιμοποιήθηκαν χάρτινοι δίσκοι διαμέτρου 6 mm, οι οποίοι ήταν εμποτισμένοι με 5 μ L αιθέριο έλαιο. Σε κάθε βακτηριακή απομόνωση πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για το κάθε αιθέριο έλαιο και μετρήθηκαν οι διάμετροι των ζωνών αναστολής που δημιουργήθηκαν εξαιτίας της επίδρασης των αιθέριων ελαίων. Τα τρυβλία που περιείχαν χάρτινο δίσκο ο οποίος δεν είχε εμποτιστεί με αιθέριο έλαιο παρατηρήθηκε ότι δεν παρουσίασαν ανασταλτικό χαρακτήρα ενάντια στο βακτήριο εκτός από τις απομονώσεις με κωδικό 22 και 28 στις οποίες σχηματίστηκε μία μικρή ζώνη παρεμπόδισης. Στην απομόνωση με κωδικό 22 η ζώνη αναστολής ήταν κατά μέσο όρο 0,8 cm και στην απομόνωση με κωδικό 28 ήταν 0,75 cm. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα αιθέρια έλαια: άνηθου, γαρύφαλλου, δάφνης, δενδρολίβανου, ευκάλυπτου, μαντζουράνας, ρίγανης και φασκόμηλου. Σε όλα τα αιθέρια έλαια παρατηρήθηκαν ζώνες παρεμπόδισης γύρω από τους χάρτινους δίσκους. Στην περίπτωση του άνηθου παρατηρήθηκε ανασταλτική δράση σε όλες τις βακτηριακές απομονώσεις *Erwinia amylovora* και οι ζώνες αναστολής κυμάνθηκαν από 0,7- 1,9 cm. Στην έρευνα Snuossi et al. (2016) που πραγματοποιήθηκε σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια του γένους *Klebsiella* και συγκεκριμένα τα *Klebsiella ornithinolytica* και *Klebsiella oxytoca* που απομονώθηκαν από ψάρια, βρέθηκε ότι, τα

αιθέρια έλαια του άνηθου δημιούργησαν ζώνες αναστολής των βακτηρίων με τη μέθοδο διάχυσης αιθέριου ελαίου μέσω χάρτινου δίσκου διαμέτρου 6 mm. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν για το *Klebsiella ornithinolytica*, ζώνη αναστολής $0,867 \pm 0,058$ cm και για το *Klebsiella oxytoca*, ζώνη αναστολής $1,2 \pm 0$ cm (Snuossi et al., 2016). Συγκριτικά με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας για το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Erwinia amylovora* οι ζώνες παρεμπόδισης δεν φάνηκε να έχουν μεγάλες διαφορές από αυτές των *Klebsiella ornithinolytica* και *Klebsiella oxytoca*. Τα αιθέρια έλαια γαρύφαλλου είχαν ανασταλτική επίδραση σε όλες τις απομονώσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora* και οι ζώνες παρεμπόδισης που δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο διάχυσης των ελαίων, με τη βοήθεια χάρτινων δίσκων, είχαν διάμετρο που κυμάνθηκε από 0,8 cm μέχρι 1,95 cm. Στην έρευνα Doukkali et al. (2021), που πραγματοποιήθηκε για το ίδιο φυτοπαθογόνο βακτήριο η ζώνη αναστολής ήταν $1,5 \pm 0,017$ cm. Συνεπώς, τα αποτελέσματα που προέκυψαν είχαν παρόμοιες τιμές με αυτά της έρευνας και φάνηκε ότι το αιθέριο έλαιο γαρύφαλλο μπορεί να ασκήσει ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη του βακτηρίου *Erwinia amylovora*. Οι 16 απομονώσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora* αποδείχθηκε ότι ήταν ευαίσθητες στα αιθέρια έλαια του δενδρολίβανου με ζώνες αναστολής που κυμάνθηκαν από 0,9- 1,55 cm. Στην μελέτη Doukkali et al. (2018), αξιολογήθηκε η επίδραση δύο ειδών αιθέριων ελαίων του *Rosmarinus officinalis* (δενδρολίβανου) και του *Rosmarinus eriocalyx* στο βακτήριο *Erwinia amylovora*. Το βακτήριο αναπτύχθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Levan αφού πρώτα είχε υποστεί αραίωση 10^7 CFU/ml. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης των αιθέριων ελαίων μέσω χάρτινων δίσκων διαμέτρου 6 mm, οι οποίοι περιείχαν 2 μ L, 6 μ L και 10 μ L ελαίων. Τα τρυβλία παρατηρήθηκαν μετά από 72 ώρες στους 28 °C και τα αποτελέσματα έδειξαν για το *Rosmarinus officinalis* (δενδρολίβανο), ζώνες παρεμπόδισης για τα 2 μ L: 0,8 cm, για τα 6 μ L: 1,2 cm και για τα 10 μ L: 2 cm. Στην περίπτωση του είδους *Rosmarinus eriocalyx* οι ζώνες παρεμπόδισης ήταν για τα 2 μ L: 0,8 cm, για τα 6 μ L: 1 cm και για τα 10 μ L: 1,6 cm. Οι παραπάνω τιμές αποδεικνύουν ότι το δενδρολίβανο παρουσιάζει ανασταλτικό χαρακτήρα ενάντια του φυτοπαθογόνου βακτηρίου και οι τιμές που προέκυψαν στο παρόν πείραμα δεν διαφέρουν από τις τιμές της έρευνας της μελέτης Doukkali et al. (2018). Η βακτηριοστατική δράση των αιθέριων ελαίων του ευκαλύπτου παρουσιάστηκε σε όλες τις απομονώσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora*. Προέκυψαν ζώνες παρεμπόδισης από 1,05- 1,95 cm. Στη μελέτη Ghaffar et al. (2015), χρησιμοποιήθηκαν επτά διαφορετικά είδη αιθέριων ελαίων ευκαλύπτου για τον έλεγχο

της ευαισθησίας του αρνητικού Gram βακτηρίου *Escherichia coli*. Το βακτήριο αναπτύχθηκε σε στερεό θρεπτικό υλικό Mueller Hinton Agar (MHA) και χρησιμοποιήθηκε αραιώση 10^5 με 10^6 βακτήρια/ml. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν χάρτινοι δίσκοι διαμέτρου 9 mm με 20 μ L αιθέριο έλαιο για κάθε είδος ευκαλύπτου. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μετά από 24 ώρες στους 37 °C και μετρήθηκαν ζώνες αναστολής για κάθε είδος ευκαλύπτου, οι οποίες κυμαίνονταν από 1 έως 2 cm (Ghaffar et al., 2015). Συγκριτικά με τις μετρήσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora* παρατηρείται παρόμοια επίδραση του αιθέριου ελαίου ευκαλύπτου και στα δύο αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Ακόμα, στο πείραμα αξιολογήθηκε η ευαισθησία του βακτηρίου στα αιθέρια έλαια μαντζουράνας. Παρατηρήθηκαν οι ανασταλτικές ιδιότητες του ελαίου και στις 16 απομονώσεις με ζώνες αναστολής που κυμάνθηκαν από 0,95- 1,5 cm. Στην έρευνα Ouedrhiri et al. (2016), ο έλεγχος ευαισθησίας των βακτηρίων στο αιθέριο έλαιο μαντζουράνας ανέδειξε παρεμπόδιση της ανάπτυξης του βακτηρίου *Escherichia coli* με τη μέθοδο διάχυσης του ελαίου με τη βοήθεια χάρτινου δίσκου διαμέτρου 6 mm. Το βακτήριο αραιώθηκε σύμφωνα με τα πρότυπα Mc Farland και αναπτύχθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton Agar (MHA). Κάθε χάρτινος δίσκος εμποτίστηκε με 10 μ L αιθέριου ελαίου μαντζουράνας. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μετά από 18-24 ώρες. Οι ζώνες αναστολής που προέκυψαν για το *Escherichia coli* ήταν $2,033 \pm 0,23$ cm (Ouedrhiri et al., 2016). Σε διαφορετική μελέτη Stefanakis et al. (2013), αξιολογήθηκε η ανασταλτική επίδραση του αιθέριου ελαίου μαντζουράνας στο βακτήριο *Escherichia coli*. Το βακτήριο αραιώθηκε στα 10^8 CFU/ml και αναπτύχθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα LB agar. Τοποθετήθηκαν χάρτινοι δίσκοι διαμέτρου 6 mm εμποτισμένοι με 2 μ L αιθέριο έλαιο. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μετά από 24 ώρες. Οι ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν ήταν $1,34 \pm 0,103$ cm (Stefanakis et al., 2013). Τα αποτελέσματα που βρέθηκαν για το βακτήριο *Erwinia amylovora* ως προς τις μετρήσεις των ζωνών αναστολής που προκλήθηκαν από τη χρήση αιθέριου ελαίου μαντζουράνας δεν διαφέρουν πολύ από τις μετρήσεις που βρέθηκαν για το βακτήριο *Escherichia coli*. Επίσης, η εφαρμογή αιθέριων ελαίων φασκόμηλου έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως προς την αναστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, με τις ζώνες αναστολής να κυμαίνονται από έως 1,4 cm. Στην έρευνα Yazgan (2020), ελέγχθηκε η ευαισθησία βακτηρίων που απομονώθηκαν από αλλοιωμένα τρόφιμα και συγκεκριμένα από ψάρια, στο αιθέριο έλαιο του φασκόμηλου. Ένα αρνητικό Gram βακτήριο που εξετάστηκε ως προς την αντοχή του στο αιθέριο έλαιο φασκόμηλου ήταν

το *Pseudomonas luteola*. Η ανάπτυξή του πραγματοποιήθηκε σε στερεό υλικό nutrient agar αφού πρώτα είχε γίνει αραιώση της βακτηριακής καλλιέργειας στα 10^8 CFU/ml. Τα έλαια εφαρμόστηκαν με τη μέθοδο διάχυσης μέσω χάρτινου δίσκου και έτσι τοποθετήθηκαν δίσκοι διαμέτρου 6 mm εμποτισμένοι με 50 μ L του ελαίου. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μετά από 24 ώρες. Οι ζώνες αναστολής που προκλήθηκαν στην βακτηριακή καλλιέργεια ήταν $1,275 \pm 0,05$ cm (Yazgan, 2020). Επομένως, και στις δύο περιπτώσεις βακτηρίων παρατηρούνται παρόμοιες μετρήσεις στις ζώνες αναστολής. Στην περίπτωση της εφαρμογής αιθέριου ελαίου δάφνης σε μερικές απομονώσεις δεν παρατηρήθηκαν αποτελέσματα. Οι απομονώσεις που έδωσαν μη μετρήσιμα αποτελέσματα ήταν αυτές με κωδικό 23 και 29. Σε αυτές τις απομονώσεις παρατηρήθηκε πολύ μικρή ανάπτυξη βακτηρίου και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που ήταν σχεδόν διαυγές και στις τρεις επαναλήψεις της κάθε απομόνωσης. Μικρές μεμονωμένες αποικίες παρατηρήθηκαν σποραδικά γύρω από τον χάρτινο δίσκο που περιείχε το αιθέριο έλαιο δάφνης. Έτσι, η μέτρηση ήταν αδύνατη και θεωρήθηκε μη μετρήσιμο το αποτέλεσμα. Η αργή ανάπτυξη του βακτηρίου μπορεί να οφείλεται σε εξωτερικούς παράγοντες όπως η μικρότερη συγκέντρωσή του λόγω νέκρωσης μίας ποσότητας από την θερμότητα των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της επίστρωσης στα τρυβλία. Οι μικρές αποικίες που εμφανίστηκαν πολύ κοντά στο χάρτινο δίσκο μαρτυρούν την αντοχή του βακτηρίου στο συγκεκριμένο αιθέριο έλαιο. Συγκεκριμένα, στη μελέτη Fidan et al. (2019), ελέγχθηκε η ευαισθησία σε θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Κάποια από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια ήταν το *Escherichia coli* και το *Pseudomonas aeruginosa*. Τα βακτήρια αφού αραιώθηκαν σε συγκέντρωση 10^7 CFU/ml σύμφωνα με τα Mc Farland Standards καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptic soy agar (Merck). Με αποστειρωμένο τρυπάνι δημιουργήθηκε οπή διαμέτρου 8 mm στις πλάκες agar και τοποθετήθηκαν 50 μ L αιθέριου ελαίου δάφνης. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μετά από 24 ή 72 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa* δεν εμφάνισαν ζώνη αναστολής. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην παρουσία μίας εξωτερικής μεμβράνης που έχουν τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, η οποία παρέχει προστασία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και δεν επιτρέπει την εύκολη πρόσβαση των αντιβακτηριακών ουσιών άρα και των αιθέριων ελαίων (Fidan et al., 2019). Οι υπόλοιπες 14 απομονώσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora* έδωσαν μετρήσιμες ζώνες αναστολής, οι οποίες κυμαίνονταν από 0,9- 2,15 cm. Σε διαφορετική μελέτη

Nafis et al. (2020), αξιολογήθηκε η επίδραση των αιθέριων ελαίων δάφνης στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Klebsiella pneumoniae*. Η ανάπτυξη τους πραγματοποιήθηκε με αραιωμένη βακτηριακή καλλιέργεια συγκέντρωσης 10^8 CFU/ml σε θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton Agar (MHA). Στα τρυβλία τοποθετήθηκαν χάρτινοι δίσκοι διαμέτρου 6 mm εμποτισμένοι με 10 μ L αιθέριου ελαίου δάφνης. Οι μετρήσεις των ζωνών αναστολής έγιναν μετά από 24 ώρες. Το *Escherichia coli* εμφάνισε $0,9 \pm 0,045$ cm ζώνη παρεμπόδισης, το *Pseudomonas aeruginosa* εμφάνισε $0,9 \pm 0,054$ cm και το *Klebsiella pneumoniae* εμφάνισε $0,9 \pm 0,06$ cm (Nafis et al., 2020). Στο παρόν πείραμα οι ζώνες αναστολής που εμφάνισε το βακτήριο *Erwinia amylovora* στις 14 απομονώσεις ήταν παρόμοιες και μεγαλύτερες συγκριτικά με το πείραμα των Nafis et al. (2020). Στην περίπτωση της εφαρμογής αιθέριου ελαίου ρίγανης σε μερικές απομονώσεις δεν παρατηρήθηκαν αποτελέσματα. Οι απομονώσεις που έδωσαν μη μετρήσιμα αποτελέσματα ήταν αυτές με κωδικό 22, 23, 28, 29, 34 και η απομόνωση 37 στην οποία το ένα τρυβλίο εμφάνισε ζώνη αναστολής 3,8 cm, ενώ τα άλλα δύο έδωσαν μη μετρήσιμα αποτελέσματα. Στις παραπάνω απομονώσεις παρατηρήθηκε πολύ μικρή ανάπτυξη βακτηρίου και στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που ήταν σχεδόν διαυγές και στις τρεις επαναλήψεις της κάθε απομόνωσης. Η αργή ανάπτυξη του βακτηρίου μπορεί να οφείλεται σε εξωτερικούς παράγοντες όπως η μικρότερη συγκέντρωσή του λόγω νέκρωσης μίας ποσότητας από την θερμότητα των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της επίστρωσης στα τρυβλία. Μικρές μεμονωμένες αποικίες παρατηρήθηκαν σποραδικά, γύρω από τον χάρτινο δίσκο που περιείχε το αιθέριο έλαιο ρίγανης. Έτσι, η μέτρηση ήταν αδύνατη και θεωρήθηκε μη μετρήσιμο το αποτέλεσμα. Στην έρευνα Fournomiti et al. (2015), αναφέρεται ότι τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια φαίνεται να παρουσιάζουν αντοχή σε υδρόφοβες ουσίες, καθώς αυτές μπορούν να διαπερνούν αργά την εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων. Επιπλέον, η σύνθεση του κάθε είδους αιθέριου ελαίου ποικίλει και εξαρτάται από την εποχή, το κλίμα, την καλλιέργεια και τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή του. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης αναφέρεται ότι παρουσιάζει πολλούς χημειότυπους στους οποίους περιέχονται κυρίως ποσότητες καρβακρόλης, θυμόλης, γ-τερπινένιου και π-κιμένιου. Το αρνητικό κατά Gram βακτήριο *Escherichia coli* παρουσίασε υψηλή αντοχή ως προς το έλαιο ρίγανης (Fournomiti et al., 2015). Σύμφωνα με το πείραμα Sivropoulou et al. (1996), ελέγχθηκαν ως προς την αντοχή τους αρνητικά κατά Gram βακτήρια όπως το

Escherichia coli και το *Pseudomonas aeruginosa*, τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα agar στους 37 °C. Στα τρυβλία τοποθετήθηκαν χάρτινοι δίσκοι διαμέτρου 5 mm εμποτισμένοι με 5 μ L αιθέριο έλαιο ρίγανης. Μετά από 24 ώρες οι διάμετροι των ζωνών αναστολής που προέκυψαν ήταν για το *Escherichia coli* 1,5 cm για το ένα στέλεχος που δοκιμάστηκε και 1,9 cm για το άλλο στέλεχος του βακτηρίου, χωρίς να υπολογίζονται στις παραπάνω διαμέτρους τα 0,5 cm του χάρτινου δίσκου. Στο βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, καθώς φαίνεται το βακτήριο να μην παρουσιάζει ευαισθησία σε πολλές αντιβακτηριακές ουσίες. Στην ίδια έρευνα Sivropoulou et al. (1996), διαπιστώθηκε ότι η επίδραση της καρβακρόλης και της θυμόλης εμφάνισε σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη διαφορετικών στελεχών του ίδιου βακτηρίου και συγκεκριμένα σε δύο διαφορετικά στελέχη του *Staphylococcus aureus* (Sivropoulou et al., 1996). Στο παρόν πείραμα δοκιμάστηκαν 16 απομονώσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora* από τις οποίες οι 10 παρουσίασαν ανασταλτικές επιδράσεις του αιθέριου ελαίου ρίγανης και οι ζώνες αναστολής κυμάνθηκαν από 0,6- 4,85 cm. Συγκριτικά με το πείραμα των Sivropoulou et al. (1996), οι ζώνες αναστολής του βακτηρίου *Escherichia coli* είχαν ομοιότητες με τις ζώνες που εμφάνισε το βακτήριο *Erwinia amylovora* ως προς τις διαμέτρους τους. Τα συστατικά του ελαίου της ρίγανης μπορούν να διαταράξουν τις μεμβράνες των βακτηριακών κυττάρων και να προκαλέσουν την αναστολή ενζύμων (Fournomiti et al., 2015). Το γεγονός ότι τα αιθέρια έλαια ρίγανης δεν ανέστειλαν την ανάπτυξη σε μερικές απομονώσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora* μπορεί να οφείλεται όπως αναφέρθηκε παραπάνω σε εξωτερικούς παράγοντες ή στην διαφορετική αντίδραση που μπορεί να είχε η κάθε απομόνωση του βακτηρίου στις αναλογίες της ποσότητας καρβακρόλης και θυμόλης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το βακτήριο *Erwinia amylovora* παρουσιάζει στρατηγικές επιβίωσης σε σκευάσματα χαλκού εξαιτίας της ύπαρξης εξωπολυσακχαριτών EPS που του προσδίδουν αντοχή ή εξαιτίας της υπερέκφρασης κάποιων γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την μεταφορά του χαλκού στο βακτηριακό κύτταρο όπως το γονίδιο CopA. Τα νανοσωματίδια του χαλκού φαίνεται να έχουν καλύτερη ανταπόκριση ως προς την αναστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου ειδικότερα όταν χρησιμοποιούνται σε αλκαλικό μέσο. Στο

μέλλον, η χρήση των αιθέριων ελαίων θα μπορούσε να αποτελέσει πολύτιμο αρωγό στη φυτοπροστασία. Τα αιθέρια έλαια εμφανίζουν αντιβακτηριακές ιδιότητες και μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη πολλών φυτοπαθογόνων αλλά και παθογόνων που προσβάλουν τα τρόφιμα και τον άνθρωπο. Το ενδιαφέρον της έρευνας στρέφεται στις δοκιμασίες *in vivo*, ώστε να προσδιοριστούν οι τρόποι εφαρμογής των αιθέριων ελαίων στις καλλιέργειες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Águila-Clares, B., Castiblanco, L. F., Quesada, J. M., Penyalver, R., Carbonell, J., and López, M. M. (2018). Transcriptional response of *Erwinia amylovora* to copper shock: *in vivo* role of the *copA* gene. *Molecular plant pathology* 19, 169-179.

Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., and Karadoğan, T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food control* 15, 169-172.

Busatta, C., Vidal, R. S., Popiolski, A. S., Mossi, A. J., Dariva, C., and Rodrigues, M. R. A. (2008). Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food microbiology* 25, 207-211.

Carezzano, M. E., Sotelo, J. P., Primo, E., Reinoso, E. B., PalettiRovey, M. F., and Demo, M. S. (2017). Inhibitory effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* essential oils on virulence factors of phytopathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Plant Biology* 19, 599-607.

Chizzola, R. (2013). Regular Monoterpenes and Sesquiterpenes (Essential Oils). In *Natural Products*. K. Ramawat & J. M. Mérillon Eds. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 2973-3008.

Ciocarlan, A., Lupascu, L., Aricu, A., Dragalin, I., Popescu, V., and Geana, E. I. (2021). Chemical Composition and Assessment of Antimicrobial Activity of Lavender Essential Oil and Some By-Products. *Plants* 10.

Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S., Zhasnakunov, Z., and Satybaldiev, A. (2022). Biological Activity of Ag and Cu Monometallic Nanoparticles and Ag-Cu Bimetallic Nanocomposites against Plant Pathogens and Seeds. *Journal of Nanomaterials* 2022.

Doukkali, L., Tahiri, A., Tazi, B., and Guenoun, F. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of two essential oils of rosemary against *Erwinia amylovora*, the causal agent fire blight. *Journal of Materials and Environmental Sciences* 9, 2913-2918.

- Doukkali, E., Radouane, N., Tahiri A., Tazi, B., Guenoun, F., and Lahlali, R. (2021). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Cinnamomum cassia* and *Syzygium aromaticum* plants and their nanoparticles against *Erwinia amylovora*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 55, 217-234.
- Elshafie, S. S., Elshafie, H. S., El Bayomi, R. M., Camele, I., and Morshdy, A. E. M. (2022). Evaluation of the antimicrobial activity of four plant essential oils against some food and phytopathogens isolated from processed meat products in Egypt. *Foods* 11.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) (2013). PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin* 43, 21-45.
- Förster, H., McGhee, G.C., Sundin, G.W., and Adaskaveg, J.E. (2015). Characterization of Streptomycin Resistance in Isolates of *Erwinia amylovora* in California. *Bacteriology* 105, 1302- 1310.
- Fidan, H., Stefanova, G., Kostova, I., Stankov, S., Damyanova, S., and Stoyanova, A. (2019). Chemical composition and antimicrobial activity of *Laurus nobilis* L. essential oils from Bulgaria. *Molecules* 24.
- Fournomiti, M., Kimbaris, A., Mantzourani, I., Plessas, S., Theodoridou, I., and Papaemmanouil, V. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial ecology in health and disease* 26.
- Geider, K. (1999). Interference of copper sulphate in growth of *Erwinia amylovora*. *Journal of Phytopathology* 147, 521-526.
- Ghaffar, A., Yameen, M., Kiran, S., Kamal, S., Jalal, F., and Munir, B. (2015). Chemical composition and in-vitro evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils extracted from seven *Eucalyptus* species. *Molecules* 20.
- Gilles, M., Zhao, J., An, M., and Agboola, S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry* 119, 731-737.

Gkanatsiou, Ch., Karamanoli, K., Menkissoglu- Spiroudi, U., and Dendrinou- Samara, C. (2019). Composition effect of Cu- based nanoparticles on phytopathogenic bacteria. Antibacterial studies and phytotoxicity evaluation. *Polyhedron* 170, 395-403.

ISPM 27 (International Plant Protection Convention) (2016). Diagnostic protocols for regulated pests DP 13: *Erwinia amylovora*, annex 13.

Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C., and López, M. M. (1999). A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of microbiological methods* 37, 23-31.

Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J., and López, M. M. (2000). Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and environmental microbiology* 66.

Medhioub, I., Cheffi, M., Tousni, S., and Triki, M.A. (2022). Study of *Bacillus velezensis* OEE1 potentialities in the biocontrol against *Erwinia amylovora*, casual agent of fire blight disease of rosaceous plants. *Biological control* 167.

Nafis, A., Kasrati, A., Jamali, C. A., Custódio, L., Vitalini, S., and Iriti, M. (2020). A comparative study of the in vitro antimicrobial and synergistic effect of essential oils from *Laurus nobilis* L. and *Prunus armeniaca* L. from Morocco with antimicrobial drugs: New approach for health promoting products. *Antibiotics* 9.

Okla, M.K., Alamri, S.A., Salem, M.Z.M., Ali, H.M., Behiry, S.I., and Nasser R.A., (2019). Yield, Phytochemical Constituents, and Antibacterial Activity of Essential Oils from the Leaves/ Twigs, Branches, Branch Wood, and Branch Bark of Sour Orange (*Citrus aurantium* L.). *Processes* 7.

Olson, N. D., and Morrow, J. B. (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC research notes* 5, 1-14.

Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M. M., and Biosca, E. G. (2006). Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Applied and environmental microbiology* 72.

- Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M. M., and Biosca, E. G. (2010). Exopolysaccharides favor the survival of *Erwinia amylovora* under copper stress through different strategies. *Research in Microbiology* 161, 549-555.
- Ouedrhiri, W., Balouiri, M., Bouhdid, S., Moja, S., Chahdi, F. O., and Taleb, M. (2016). Mixture design of *Origanum compactum*, *Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: optimization of their antibacterial effect. *Industrial Crops and Products* 89, 1-9.
- Piqué, N., Minana- Galbis, D., Merino, S., and Tomas, J.M. (2015). Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 16.
- Proto, M. R., Biondi, E., Baldo, D., Levoni, M., Filippini, G., and Modesto, M. (2022). Essential Oils and Hydrolates: Potential Tools for Defense against Bacterial Plant Pathogens. *Microorganisms* 10.
- Safeena, M. I. S., Dissanayake, Y., Zakeel, M. C. M., Warnakula, L., Cooray, R., and Dayarathna, D. A. R. K. (2021). An improved method for efficient recovery of high quality DNA from date palm (*Phoenix dactylifera* L; *Arecaceae*). *Methods X* 8.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning A Laboratory Manual* Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA
- Sanchez-Hernandez, E., Buzon- Duran, L., Andres- Juan, C., Lorenzo-Vidal, B., Martin-Gil, J., and Martin- Ramos, P. (2021). Physicochemical Characterization of *Crithmum maritimum* L. and *Daucus carota* subsp. *Gummifer* (Syme) Hook. fil. and Their Antimicrobial Activity against Apple Tree and Grapevine Phytopathogens. *Agronomy* 11.
- Santander, R.D., Catala-Senent, J.F., Marco- Noales, E., and Biosca, E.G. (2011). In planta recovery of *Erwinia amylovora* viable but nonculturable cells. *Trees* 26, 75-82.
- Satyvaldiev, A. S., Zhasnakunov, Z. K., Omurzak, E., Doolotkeldieva, T. D., Bobusheva, S. T., and Orozmatova, G. T. (2018). Copper nanoparticles: synthesis and biological activity. *IOP Science* 302.

- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., and Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of agricultural and Food Chemistry* 44, 1202-1205.
- Snuossi, M., Trabelsi, N., Ben Taleb, S., Dehmeni, A., Flamini, G., and De Feo, V. (2016). *Laurus nobilis*, *Zingiber officinale* and *Anethum graveolens* essential oils: Composition, antioxidant and antibacterial activities against bacteria isolated from fish and shellfish. *Molecules* 21.
- Sobiczewski, P., Iakimova, E.T., Mikicinski, A., Wegrzynowicz-Lesiak, E., Dyki, B. (2017). Necrotrophic behavior of *Erwinia amylovora* in apple and tobacco leaf tissue. *Plant Pathology* 66, 842- 855.
- Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., and Makridis, P. (2013). Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food control* 34, 539-546.
- Tancos, K.A., Borejsza Wysocka, E., Kuehne, S., Breth, D., and Cox, K.D. (2016). Fire Blight Symptomatic Shoots and the Presence of *Erwinia amylovora* in Asymptomatic Apple Budwood. *Plant Disease* 101, 186-191.
- Taylor, R. K., Guilford, P. J., Clark, R. G., Hale, C. N., and Forster, R. L. S. (2001). Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 29, 35-43.
- Thomson, S.V. (2000). Epidemiology of fire blight. In *The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. J. L. Vanneste Ed. CABI Publishing, Wallingford, pp. 9-36.
- Varympopi, A., Dimopoulou, A., Theologidis, I., Karamanidou, T., KaldeliKerou, A., and Vlachou, A. (2020). Bactericides based on copper nanoparticles restrain growth of important plant pathogens. *Pathogens* 9.
- Walid, Y., Malgorzata, N., Katarzyna, R., Piotr, B., Ewa, O. L., and Izabela, B. (2022). Effect of rosemary essential oil and ethanol extract on physicochemical and antibacterial properties of optimized gelatin–chitosan film using mixture design. *Journal of Food Processing and Preservation* 46.

Yazgan, H. (2020). Investigation of antimicrobial properties of sage essential oil and its nanoemulsion as antimicrobial agent. *Lwt* 130.

Zaki, S. A. E. F., Kamal, A., Ashmawy, N. A., and Shoeib, A. A. (2021). Nano-metals forming bacteria in Egypt. I. Synthesis, characterization and effect on some phytopathogenic bacteria in vitro. *Scientific reports* 11.

Zhasnakunov, Z. K., Satyvaldiev, A. C., Doolotkeldieva, T., Omurzak, E., Bobusheva, S. T., and Kelgenbaeva, Z. (2018). Synthesis of biologically active silver and copper nanocomposites. *Materials Research Express* 5.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Ζιώγας, Β. και Μαρκόγλου, Α. (2017). *Γεωργική Φαρμακολογία. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων*. 2^η έκδοση. Greenbooks publications, Αθήνα

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (2023). [Online]. *Κατάλογοι Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων και Βιοκτόνων*. <<https://1click.minagric.gr/oneClickUI/frmFytoPro.zul>> [Ανακτήθηκε 13 Μαρτίου 2023]