



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Απομόνωση και χαρακτηρισμός του παθογόνου αιτίου που προκαλεί
καρκίνωση σε φυτά πικροδάφνης στο Νομό Μαγνησίας

Σοφία Ατόσογλου

Επιβλέπουσα : Φ. Λιολιοπούλου

ΒΟΛΟΣ 2025

Απομόνωση και χαρακτηρισμός του παθογόνου αιτίου που προκαλεί καρκίνωση σε φυτά πικροδάφνης στο Ν.Μαγνησίας

Isolation and characterization of the causal agent of knot disease in oleander plants in Magnesia region, Greece.

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

1. Dr Φεβρωνία Λιολιοπούλου, μέλος ΕΔΙΠ (Επιβλέπουσα)
2. Ευάγγελος Βέλλιος, Αναπληρωτής Καθηγητής
3. Ουρανία Παυλή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

«Βεβαιώνω ότι είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακής Εργασίας του ΤΓΦΠΑΠ»

Ατόσογλου Σοφία

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας εκπόνησης της πτυχιακής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Ευάγγελο Βέλλιο και την καθηγήτρια μου κα. Φεβρωνία Λιολιοπούλου για την αμέριστη υποστήριξη και βοήθεια στο όμορφο αυτό ταξίδι της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια φοίτησης μου στο τμήμα στο πλαίσιο των ακαδημαϊκών μαθημάτων και υποχρεώσεων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην κα. Φεβρωνία Λιολιοπούλου με την οποία συνεργαστήκαμε άρτια καθ' όλη την διαδικασία εκπόνησης της πτυχιακής μου διατριβής. Μου προσέφερε και μεταλαμπάδευσε γνώσεις, συμβουλές και κατάφερε να με μυήσει στον υπέροχο κόσμο της έρευνας και της αναζήτησης της γνώσης.

Είμαι ευγνώμων για το ταξίδι αυτό στον υπέροχο κόσμο της επιστήμης της Φυτοπαθολογίας και χάρηκα που στην πορεία αυτή είχα συνοδοιπόρους μου τους καθηγητές μου.

Όπως λέει και το αγαπημένο μου ποίημα του Κ.Π Καβάφη “*Η Ιθάκη*” σημασία δεν έχει ο προορισμός αλλά το ταξίδι.. Κρατάω ό,τι αποκόμισα και συνεχίζω.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω και την οικογένεια μου, τον πατέρα μου Πρόδρομο, την μητέρα μου Σπυριδούλα και την αδερφή μου Ελένη για την αμέριστη υποστήριξη τόσο ηθική όσο και υλική αλλά και για τις παραινέσεις και το κουράγιο που μου έδιναν στην πορεία των προπτυχιακών μου σπουδών. Είστε πάντα δίπλα μου στυλοβάτες για την επίτευξη και υλοποίηση των στόχων μου. Σας ευχαριστώ για ΟΛΑ...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κατάλογος Πινάκων.....	vii
Κατάλογος Εικόνων.....	viii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	x
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Πικροδάφνη.....	2
1.2 Η ασθένεια “Καρκίνωση της πικροδάφνης”	2
1.3 Συμπτωματολογία.....	3
1.3.1 <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>nerii</i>	4
1.3.2 Επιδημιολογία του παθογόνου.....	4
1.3.3 Ο ρόλος του γονιδίου <i>iaaL</i>	5
1.4 Μέθοδοι ταυτοποίησης του βακτηρίου.....	6
1.4.1 Δοκιμές παθογένειας του βακτηρίου.....	7
1.5 Σκοπός.....	7
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	8
2.1 Θρεπτικά υποστρώματα.....	8
2.1.1 Παρασκευή του στερεού θρεπτικού υποστρώματος King’s B Medium Agar.....	8
2.1.2 Παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος King’s B Medium Agar.....	8
2.1.3 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού Nutrient Sucrose Agar (NSA).....	8
2.2 Απομόνωση βακτηρίων από φυτά πικροδάφνης.....	9
2.2.1 Καλλιέργεια βακτηρίων σε King’s B Broth.....	11
2.3 Χρώση Gram.....	11
2.4 Μέθοδοι βιοχημικής ταυτοποίησης των βακτηρίων.....	12

2.4.1 Φθορισμός σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B.....	12
2.4.2 Παραγωγή λεβάνης σε θρεπτικό υπόστρωμα NSA.....	12
2.4.3 Παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων από τις βακτηριακές απομονώσεις.....	12
2.5 Αντίδραση υπεραισθησίας σε φυτά καπνού από τις απομονωθείσες αποικίες.....	13
2.6 Τεχνικές μοριακής ταυτοποίησης των βακτηρίων.....	14
2.6.1 Διαδικασία απομόνωσης βακτηριακού DNA.....	14
2.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Polymerase Chain Reaction (PCR) και οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	14
2.7 Μελέτη γενετικής ποικιλομορφίας των απομονωθέντων βακτηρίων.....	16
2.8 In vitro δοκιμές παθογένειας.....	17
2.8.1 Δοκιμή δημιουργίας όγκων σε καρότο.....	17
2.8.2 Δοκιμές δημιουργίας όγκων σε φύλλα και βλαστούς πικροδάφνης.....	17
3.Αποτελέσματα.....	19
3.1 Απομόνωση βακτηρίων σε προσβεβλημένα φύλλα και κλαδιά φυτών πικροδάφνης.....	19
3.2 Χρώση κατά Gram.....	26
3.3 Βιοχημική ταυτοποίηση.....	27
3.3.1 Παραγωγή λεβάνης.....	27
3.3.2 Παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων.....	27
3.3.3 Φθορισμός βακτηριακών απομονώσεων.....	28
3.3.4 Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού.....	30
3.4 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων.....	31
3.5 Αποτελέσματα γενετικής ποικιλομορφίας βακτηριακών απομονώσεων με ERIC-PCR και BOX-PCR.....	32
3.6 In vitro βιοδοκιμές παθογένειας.....	36
3.6.1 Δημιουργία όγκων σε κομμάτια καρότου	36

3.6.2 Δημιουργία όγκων σε φύλλα πικροδάφνης.....	40
3.6.3 Δημιουργία όγκων σε βλαστούς πικροδάφνης.....	44
4. Συζήτηση.....	46
5. Συμπεράσματα.....	51
6. Βιβλιογραφία.....	52
6.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία.....	52
6.2 Ελληνική Βιβλιογραφία.....	59

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Θερμοκρασιακό προφίλ της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με χρήση των εκκινητών IAALF και IAALR.....	15
Πίνακας 2. Στοιχεία βακτηριακών απομονώσεων.....	19
Πίνακας 3. Κωδικός απομόνωσης, χρώμα και υφή αποικίας	25
Πίνακας 4: Ομαδοποίηση απομονώσεων βάσει αποτελεσμάτων ERIC-PCR.....	33
Πίνακας 5. Αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμών και PCR των εξεταζόμενων απομονώσεων.....	34

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Ποικιλίες <i>Nerium oleander</i> L.....	2
Εικόνα 2. Όγκοι στο βλαστό του φυτού πικροδάφνης.....	3
Εικόνα 3. Όγκοι στην περιφέρεια του ελάσματος φύλλων πικροδάφνης.....	3
Εικόνα 4. Δορυφορική απεικόνιση των περιοχών δειγματοληψίας	10
Εικόνα 5. Μεμονωμένες λευκές αποικίες βακτηριακής απομονώσης σε τρυβλίο με υλικό King's B μετά από διασπορά.....	21
Εικόνα 6. Μεμονωμένες λευκές αποικίες βακτηριακής απομόνωσης σε τρυβλίο με υλικό King's B μετά από διασπορά.....	21
Εικόνα 7. Λευκές και κίτρινες βλεννώδεις αποικίες μεγαλύτερης διαμέτρου βακτηριακής απομόνωσης σε τρυβλίο με υλικό King's B.....	21
Εικόνα 8. Μεμονωμένες κίτρινες βλεννώδεις αποικίες βακτηριακής απομόνωσης σε τρυβλίο με υλικό King's B.....	21
Εικόνα 9. Ανάπτυξη λευκής αποικίας που δεν ήταν βλεννώδης από βακτηριακές απομονώσεις όγκων φυτού πικροδάφνη σε θρεπτικό υλικό King's B.....	22
Εικόνα 10. Ανάπτυξη λευκής αποικίας από απομονώσεις όγκων φυτού πικροδάφνης σε θρεπτικό υλικό King's B.....	22
Εικόνα 11. Ανάπτυξη υπόλευκης αποικίας από απομονώσεις όγκων φυτού πικροδάφνης σε θρεπτικό υλικό King's B.....	22
Εικόνα 12. Ανάπτυξη κίτρινης αποικίας που δεν ήταν βλεννώδης από βακτηριακές απομονώσεις από φυτά πικροδάφνης σε θρεπτικό υλικό King's B.....	23
Εικόνα 13. Ανάπτυξη κίτρινης βλεννώδους αποικίας από βακτηριακές απομονώσεις από φυτά πικροδάφνης σε θρεπτικό υλικό King's B.....	23
Εικόνα 14. Ανάπτυξη κίτρινης και ροζ βλεννώδους αποικίας από βακτηριακές απομονώσεις από φυτά πικροδάφνης σε θρεπτικό υλικό King's B.....	23
Εικόνα 15. Ανάπτυξη ροζ βλεννώδους αποικίας από την βακτηριακή απομόνωση 2.1.1P2 από φυτά πικροδάφνης σε θρεπτικό υλικό King's B.....	24

Εικόνα 16. Αποτελέσματα χρώσης Gram βακτηριακών απομονώσεων.....	26
Εικόνα 17. Μορφολογία των αποικιών 1.1M1, 1.5A, 2.3.1Λ, 2.3.3Λ1 σε θρεπτικό υλικό NSA.....	27
Εικόνα 18. Μορφολογία των αποικιών 2.3.2β2, 2.5Λ2, 5.4ΛΒ, 5.3ΛΒ σε θρεπτικό υλικό NSA....	27
Εικόνα 19. Τμήμα κονδύλου πατάτας μετά από έγχυση αιωρήματος βακτηριακών κυττάρων της απομόνωσης 2.5Λ2 εντός βοθρίου στο κέντρο του τμήματος.....	28
Εικόνα 20. Τμήμα κονδύλου πατάτας μετά από έγχυση με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό εντός βοθρίου στο κέντρο του τμήματος.....	28
Εικόνα 21. Παρατήρηση τρυβλίου με θρεπτικό υλικό King's B για φθορισμό σε UV.....	29
Εικόνα 22. Παρατήρηση τρυβλίου με θρεπτικό υλικό Kings'B για φθορισμό σε UV.....	29
Εικόνα 23. Αποτελέσματα αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φύλλο καπνού.....	30
Εικόνα 24. Προϊόντα PCR σε πηκτή αγαρόζης	31
Εικόνα 25. Αποτελέσματα ERIC-BOX PCR για τις απομονώσεις βακτηρίων από φυτά πικροδάφνης σε πηκτή αγαρόζης.....	33
Εικόνα 26. Αποτελέσματα από την πρώτη δοκιμή για δημιουργία όγκων σε κομμάτια καρότου.....	37
Εικόνα 27. Αποτελέσματα από την δεύτερη δοκιμής για δημιουργία όγκων σε κομμάτια καρότου.....	39
Εικόνα 28. Αποτελέσματα για την 1η επανάληψη βιοδοκιμής για την δημιουργία όγκων σε φύλλα πικροδάφνης.....	41
Εικόνα 29. Αποτελέσματα για την 2η επανάληψη βιοδοκιμής για την δημιουργία όγκων σε φύλλα πικροδάφνης.....	43
Εικόνα 30: Αποτελέσματα από την παρατήρηση για δημιουργία όγκων σε κομμάτια βλαστών πικροδάφνης.....	45

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

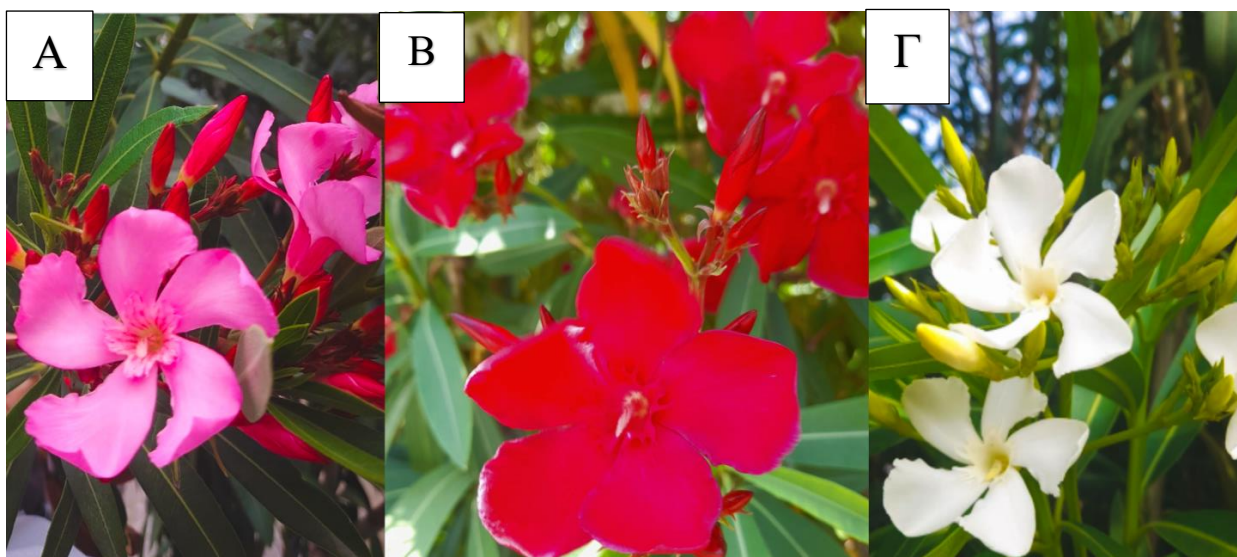
Κατά την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής διατριβής έγινε προσπάθεια απομόνωσης του παθογόνου αιτίου που προκαλεί όγκους σε φυτά πικροδάφνης και ταυτοποίησης του. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από φυτά πικροδάφνης του νομού Μαγνησίας και έγινε απομόνωση βακτηρίων από τους όγκους. Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των απομονώσεων έγινε με βιοχημικές τεχνικές όπως η παραγωγή λεβάνης και πηκτινολυτικών ενζύμων, η αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού, η χρώση Gram και φθορισμός. Αλλά και μοριακές τεχνικές όπως η αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR). Πραγματοποιήθηκαν επιπλέον βιοδοκιμές *in vitro* με σκοπό τη δημιουργία όγκων σε κομμάτια καρότου και σε φύλλα και βλαστούς πικροδάφνης. Από το σύνολο των αποικιών που απομονώθηκαν οι 12 απομονώσεις ταυτοποιήθηκαν ως θετικές με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Τέλος για την μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας των απομονώσεων πραγματοποιήθηκε PCR με χρήση εκκινητών που πολλαπλασιάζουν επαναλαμβανόμενα τμήματα του γονιδιώματος των βακτηρίων (ERIC- PCR και BOX- PCR).

Λέξεις κλειδιά: *Nerium oleander* L., *Pseudomonas savastanoi*, ταυτοποίηση, βιοδοκιμές, repetitive-element PCR

1.Εισαγωγή

1.1 Πικροδάφνη

Η πικροδάφνη (*Nerium oleander* L.) ανήκει στην οικογένεια Apocynaceae και είναι ένας αιθαλής θάμνος με μακρόστενα, σκουροπράσινα, δερματώδη και γυαλιστερά φύλλα. (Bellardi et al. 1996). Σύμφωνα με τους Cuisance & Seabrook (1970) όπως αναφέρει ο Herrera (1991), υπάρχουν έως και 11 ποικιλίες με άνθη με βαθύ κόκκινο, ροζ, κρεμ ή λευκό χρώμα που μερικές φορές είναι αρωματικά ενώ οι άγριες ποικιλίες έχουν ροζ άνθη που είναι σπάνια αρωματικά. Η πικροδάφνη είναι επιπλέον μία σημαντική θερμοκηπιακή καλλιέργεια σε πολλές χώρες (Kluchevich et al. 2018). Ως καλλωπιστικό φυτό η πικροδάφνη χρησιμοποιείται σε διάφορα περιβάλλοντα στον αστικό ιστό για την διαμόρφωση και βελτίωση του τοπίου (Rocha et al. 2022). Για το λόγο αυτό εντοπίζεται συχνά σε πάρκα αλλά και ως ανεμοφράκτης και φυτικό τείχος σε μεγάλους αυτοκινητόδρομους (Bellardi et al. 1996). Η ταχεία ανάπτυξη του και η ανθεκτικότητα του σε ισχυρούς ανέμους αποτελούν ισχυρά πλεονεκτήματα για την καλλιέργεια του. Επιπλέον φαίνεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυτό βιοπαρακολούθησης για την ατμοσφαιρική ρύπανση από βαρέα μέταλλα σε αστικές περιοχές. Αυτό αποδίδεται στην ικανότητα συσσώρευσης τοξικών μετάλλων, όπως ο μόλυβδος, από τα φύλλα (Vázquez et al. 2016). Ωστόσο πέρα από την καλλωπιστική χρήση του, το φυτό της πικροδάφνης έχει φαρμακευτικές ιδιότητες (Dey 2020). Όλα τα μέρη του φυτού είναι τοξικά και περιλαμβάνουν μία σειρά από καρδιοτονωτικούς γλυκοζίτες όπως η ολεανδρίνη (oleandrin) (Langford and Boor 1996). Επιπλέον το φυτό μπορεί να παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες όπως αλκαλοειδή και φλαβονοειδή. Οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον τομέα της βοτανικής ιατρικής και της φαρμακευτικής (Botelho et al. 2018).



Εικόνα 1: Ποικιλίες *Nerium oleander* L.

Α: Ποικιλία με ροζ άνθη, Β: Ποικιλία με κόκκινα άνθη, Γ: Ποικιλία με λευκά άνθη

1.2 Η ασθένεια “Καρκίνωση της πικροδάφνης”

Όπως αναφέρει ο Tilford (1932) “εφόσον τα καλλωπιστικά φυτά καλλιεργούνται λόγω της ομορφιάς τους, οι περισσότερες από τις ασθένειες που τα προσβάλλουν είναι σοβαρές από την σκοπιά του καλλιεργητή, παρόλο που η ζωή του φυτού δεν απειλείται”. Βάσει της Bella et al. (2006) όπως αναφέρουν οι Surico and Iacobellis (1992) στην πικροδάφνη η πλέον γνωστή ασθένεια βακτηριολογικής προέλευσης είναι η “Καρκίνωση της πικροδάφνης” και προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*. Η ασθένεια αποτελεί κίνδυνο για τα θερμοκηπιακά φυτά καθώς είναι πιθανή η μη εμφάνιση συμπτωμάτων ακόμα και σε προσβεβλημένα φυτά (Azad et al. 1995). Σύμφωνα με τον Smith (1906) η φύση των όγκων στη πικροδάφνη και στην ελιά δημιούργησαν υποψίες ότι και στις δύο ασθένειες το είδος του βακτηρίου ήταν κοινό. Η βακτηριακή προέλευση αυτής της ασθένειας στην ελιά είχε γίνει γνωστή ήδη από το 1886 από τους Savastano και Arcangeli (Smith et al. 1906). Βάσει του Janse (1982) το βακτήριο αρχικά στην ελιά ονομάστηκε από τον Erwin F. Smith το 1908 ως “*Bacterium savastanoi*” αποδίδοντας φόρο τιμής στον Savastano και αυτό που προσβάλλει την πικροδάφνη πήρε εν τέλει το δικό του όνομα και διαχωρίστηκε από αυτό της ελιάς από τον Smith (1928) που το περιέγραψε εκτενώς. Η αντιμετώπιση της ασθένειας είναι δύσκολη λόγω απουσίας κατάλληλων σκευασμάτων. Ως μέτρο πρόληψης φαίνεται να είναι η επιλογή αλλά και η ανάπτυξη κάποιων ανθεκτικών ποικιλιών πικροδάφνης (Bella et al. 2006).

1.3 Συμπτωματολογία

Όπως αναφέρει η Bella et al. (2006) βάσει των Surico and Iacobellis (1992) η προσβολή από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* προκαλεί τον σχηματισμό όγκων σε σημεία του φυτού όπως οι μίσχοι, οι κλαδίσκοι και τα φύλλα. Το βακτήριο επίσης μέσα από την έκκριση φυτορμονών εντείνει την συμπτωματολογία της ασθένειας. Επίσης η αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων και ο αποικισμός τους λόγω της δημιουργίας υπερπλασιών από το παθογόνο γίνονται ταχύτερα στην πικροδάφνη απ'ότι σε άλλα φυτά όπως στην ελιά (Temsah et al. 2010). Στα φυτά πικροδάφνης οι περισσότεροι βακτηριακοί όγκοι αναπτύσσονται σε νεαρούς βλαστούς κυρίως δεύτερου έτους και ποικίλλουν ως προς το μέγεθος. Στα φύλλα οι όγκοι εμφανίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην πάνω απ'ότι στην κάτω επιφάνεια. Επιπλέον υπερπλασίες μπορούν να σχηματιστούν και σε αναπαραγωγικά όργανα όπως ταξιανθίες κυρίως τους μήνες Απρίλιο με Ιούνιο (Kluchevich et al. 2018) με αποτέλεσμα την παραμόρφωση τους και την καταστροφή των στύλων (Smith 1928). Η ευρεία διασπορά του Psn κατά τον εμβολιασμό του σε ασυμπτωματικά φυτά μπορεί να οφείλεται στην παρουσία του παθογόνου ως ενδόφυτο (Bella et al. 2006).



Εικόνα 2: Όγκοι στο βλαστό του φυτού πικροδάφνης



Εικόνα 3: Όγκοι στην περιφέρεια του ελάσματος φύλλων πικροδάφνης

1.3.1 *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*

Το σύμπλεγμα των βακτηριακών ειδών *Pseudomonas syringae* διακρίνεται από φυτοπαθόγωνα βακτήρια με σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο και αρκετά από αυτά αποτέλεσαν αντικείμενο έρευνας (Mansfield et al. 2012). Παρά το μεγάλο εύρος του συμπλέγματος αυτού, φαίνεται ότι κάθε είδος του εμφανίζει συγκεκριμένη εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή (Moreno-Pérez et al. 2020). Το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* (Psn) συγκεκριμένα ανήκει στο φύλο Proteobacteria, στην κλάση Gammaproteobacteria, στην τάξη Pseudomonadales, οικογένεια Pseudomonadaceae και στο 3ο φυλογενετικό group του συμπλέγματος του *Pseudomonas syringae* (Ramos et al. 2012, Moreno-Pérez et al. 2020). Το group αυτό είναι το μόνο που προσβάλλει ξυλώδη φυτά προκαλώντας όγκους και περιλαμβάνει το *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) που προσβάλλει την ελιά (*Olea europaea*) , το *P. savastanoi* pv. *nerii* (Psn) που προσβάλλει την πικροδάφνη και το *P. savastanoi* pv. *fraxini* (Psf) προσβάλλει τον φράξινο (*Fraxinus excelsior*) (Lamichhane et al. 2013, Caballo-Ponce et al. 2017). Το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* και όλοι παθότυποι του είναι αερόβιο, Gram αρνητικό, ραβδοειδές, φέρει πολικά μαστίγια και έχει την ικανότητα παραγωγής ινδολοξεικού οξέος (IAA). Οι ευνοϊκές θερμοκρασίες ανάπτυξης του είναι οι 25°C με 26°C (Παναγόπουλος, 2007). Αναφορικά με την εξειδίκευση ως προς τους ξενιστές, βρέθηκε μέσα από δοκιμές παθογένειας ότι το Psn μπορεί να προσβάλλει τόσο την πικροδάφνη όσο και την ελιά αλλά το Psv μόνο την ελιά (Janse 1982, Caponero et al. 1995, Iacobellis et al. 1998, Ramos et al. 2012,).

1.3.2 Επιδημιολογία της ασθένειας

Στα νεαρά φυτάρια πικροδάφνης τα πρώτα συμπτώματα παρουσιάζονται δέκα μέρες από την προσβολή (Bella et al, 2006) και το βακτήριο μπορεί να μεταδοθεί με επιφανειακή μετάδοση είτε ενδοφυτικά (Azad et al. 1995). Η εξάπλωση της καρκίνωσης στα φυτά ελιάς και πικροδάφνης φαίνεται ότι σχετίζεται με πολλούς παράγοντες. Μεταξύ αυτών είναι η ηλικία των φυτών, οι ποικιλίες αλλά και ο βαθμός μολυσματικότητας του εκάστοτε στελέχους (Moreno et al. 2008, Bella et al. 2006). Για τα φυτά της πικροδάφνης συγκεκριμένα οι Wilson και Magie (1964) όπως επισημαίνουν οι Bella et al. (2006), όρισαν την εμφάνιση πρωτογενών και δευτερογενών συμπτωμάτων σε πολλά και διαφορετικά σημεία στο φυτό. Η ευρεία διασπορά της ασθένειας στα φυτά πικροδάφνης οφείλεται κυρίως στην εισβολή του παθογόνου στους γαλακτοφόρους αδένες του φυτού προκαλώντας έτσι την ανάπτυξη δευτερογενών συμπτωμάτων σε όλο το εύρος του και θέτοντας σε κίνδυνο και την αισθητική του αξία (Bella

et al. 2006). Σημαντικό ρόλο στην διασπορά του μολύσματος έχουν και οι καλλιεργητικές φροντίδες που δέχονται τα φυτά. Συγκεκριμένα το τακτικό κλάδεμα των φυτών ευνοεί τη είσοδο των βακτηρίων από ανοιχτές πληγές, ιδίως όταν τα εργαλεία δεν απολυμαίνονται (Kluchevich et al. 2018). Τέλος το μέγεθος διασποράς του μολύσματος σχετίζεται και με την εκάστοτε ποικιλία πικροδάφνης. Βάσει των Kluchevich et al. (2018) οι ποικιλίες *Nerium oleander* «Album» και *Nerium oleander* «Album Plenum» με λευκά άνθη είναι πιο ευαίσθητες στην προσβολή από Psn.

1.3.3 Ο ρόλος του γονιδίου *iaaL*

Έχει παρατηρηθεί ότι πολλά στελέχη που υπάγονται ταξινομικά στο σύμπλεγμα *Pseudomonas syringae* έχουν την ικανότητα παραγωγής του ινδολοξικού οξέος (IAA) (Comai and Kosuge, 1983, Aragón et al. 2014). Η έκκριση αυτής της φυτοορμόνης όπως και της κυτοκινίνης έχουν αναφερθεί ως οι κυριότεροι παράγοντες για την δημιουργία όγκων σε πολλούς παθότυπους (Marchi et al. 2011). Το ινδολοξικό οξύ (Indole-3-acetic acid, IAA) είναι μία ορμόνη που υπάρχει φυσιολογικά στα φυτά και ρυθμίζει την ανάπτυξη τους (Sitbon et al. 1991). Πολλά βακτήρια της ριζόσφαιρας, γνωστά ως Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται στελέχη των γενών *Rhizobium* και *Azotobacter*, εκκρίνουν φυτορρυθμιστικές ουσίες όπως IAA. Η παραγωγή αυτής της ορμόνης προάγει την απελευθέρωση μεταβολιτών που ενισχύουν τόσο τον βακτηριακό αποικισμό όσο και την ανάπτυξη του φυτού-ξενιστή (Vessey, 2003). Ωστόσο φαίνεται ότι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* έχουν την δυνατότητα να επεμβαίνουν στην παραγωγή αυτών των ορμονών. Πιο συγκεκριμένα φέρουν το γονίδιο *iaaL* που επάγει την παραγωγή του ενζύμου IAA-lysine synthase (*IaaL*) (Kunkel and Harper, 2018). Το ένζυμο αυτό καταλύει τη σύζευξη του ινδολοξικού οξέος με λυσίνη σχηματίζοντας το IAA-Lys που αδρανοποιεί την παραγωγή της αυξίνης IAA με αποτέλεσμα την αύξηση παθογένειας των βακτηρίων στους μολυσμένους ιστούς των φυτών (Glickmann et al. 1998, Kunkel and Harper, 2018). Μία από τις σημαντικότερες διαφορές μεταξύ του Psn και του Psv αναφέρεται ότι είναι η θέση στην οποία συναντάται το γονίδιο αυτό. Συγκεκριμένα το *iaaL* φέρει δύο αντίγραφα τα οποία στα στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* βρίσκονται στο χρωμοσωμικό DNA ενώ στα στελέχη του *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* βρίσκονται στο πλασμιδιακό DNA (Matas et al. 2009).

1.4 Μέθοδοι ταυτοποίησης του βακτηρίου

Η ταυτοποίηση στελεχών του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* βασίζεται σε ολοκληρωμένη μεθοδολογική προσέγγιση, η οποία περιλαμβάνει την απομόνωση του παθογόνου από συμπτωματικούς φυτικούς ιστούς, την εφαρμογή βιοχημικών και μοριακών τεχνικών, την ανάλυση του γονιδιώματος μέσω αλληλούχισης DNA, καθώς και βιοδοκιμές για την παθογόνο ικανότητα του σε κατάλληλους φυτικούς ξενιστές (Penyalver et al., 2000). Η απομόνωση του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* προτείνεται να γίνεται σε θρεπτικό υπόστρωμα ΟΚΑ (Azad et al. 1995). Το συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα φαίνεται πως είναι συγκριτικά καλύτερα από το θρεπτικό υπόστρωμα PVF-1 που πρότειναν οι Surico and Lavermicocca (1989) καθώς αναστέλλει την ανάπτυξη σαπροφυτικών βακτηρίων που μπορεί να συμβιώνουν μαζί με το βακτήριο στους όγκους των προσβεβλημένων ιστών (Azad et al. 1995). Εκτός από τα παραπάνω για την απομόνωση του Psn μπορούν να χρησιμοποιηθούν θρεπτικά υλικά όπως το King's B Medium Agar (KB) και το Nutrient Sucrose Agar (NSA) (Bella et al. 2008). Το θρεπτικό υπόστρωμα KB φαίνεται ότι προωθεί την γρήγορη ανάπτυξη του Psn αφού δίνει μεμονωμένες λευκές, γυαλιστερές, κρεμώδεις και υπόλευκες αποικίες μέσα σε δύο ημέρες (Mirik et al. 2011, Smith 1906). Αναφορικά με τις βιοχημικές μεθόδους ταυτοποίησης, για όλα τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* εφαρμόζονται τα πρωτόκολλα βάσει Lelliot et al. (1966). Τα βακτήρια *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* είναι Gram αρνητικά και δεν παράγουν λεβάνη σε θρεπτικό υπόστρωμα 5% Nutrient Sucrose Agar (NSA) (Mirik et al. 2011, Kavak and Üstün 2009, Kudela et al. 2005). Επίσης είναι αρνητικά ως προς την παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων, οξειδάσης και αργινίνης (Mirik et al. 2011). Αναφορικά με την ικανότητα φθορισμού σύμφωνα με τους Lelliot et. al (1966), ορισμένες απομονώσεις του είδους *Pseudomonas savastanoi* μπορούν να φθορίζουν. Το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* σε υπόστρωμα King's B μπορεί να φθορίζει ή και να φθορίζει ελάχιστα (Mirik et al. 2011, Kavak and Üstün, 2009). Η εμφάνιση της αντίδρασης υπερευαισθησίας στα φυτά καπνού εμφανίζεται 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό, υποδηλώνοντας την ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του φυτού έναντι του παθογόνου, όπως αναφέρουν Kavak and Üstün (2009). Επίσης σε παθότυπους του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* όπως στο Psv βρέθηκε η συνεργιστική δράση βακτηρίων για την δημιουργία όγκων σε φυτά ελιάς. Συγκεκριμένα η παρουσία του κίτρινου βακτηρίου *Pantoea agglomerans* σε όγκους, βοηθάει στην πιο έντονη εμφάνιση συμπτωμάτων και στον γρηγορότερο πολλαπλασιασμό του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Marchi et al. 2006). Για την μοριακή ταυτοποίηση του παθογόνου προτείνονται μέθοδοι όπως η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR). Η αλληλουχία που

χρησιμοποιείται ως δείκτης αφορά το γονίδιο *iaaL*. Οι εκκινητές είναι οι IAALF (5'-GGCACCAGCGGCAACATCAA-3') και IAALR (5'-CGCCCTCGGAACTGCCATAC-3'). Από στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* το προϊόν της PCR έχει μέγεθος 454-bp (Penyalver et al. 2000). Επίσης πέρα από την κλασσική μέθοδο της PCR μπορεί να εφαρμοστεί και η τεχνική real-time PCR που βασίζεται επίσης στην ανίχνευση αλληλουχιών του προαναφερθέντος γονιδίου. Στην προκειμένη περίπτωση δημιουργήθηκαν οι εκκινητές IAAL-F (5'-TTCCGCAGCAACGGCTTTAT-3') και IAAL-R1 (5'-CCGGCCATCATGGTAATCGT-3'). Μεταξύ των πλεονεκτημάτων της real-time PCR έναντι της κλασσικής PCR είναι η ικανότητα ποσοτικοποίησης του βακτηρίου Psn ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις (Bella et al. 2008).

1.4.1 Δοκιμές παθογένειας του βακτηρίου

Τόσο στην περίπτωση του Psv όσο και του Psn για τις *in vivo* τεχνικές μολύνσεων χρησιμοποιούνται νεαρά φυτά ηλικίας ενός έως και τριών ετών (Rodríguez-Moreno et al., 2008). Η συμπτωματολογία που αναμένεται μετά από προσβολή υγείων φυτών με το βακτηριακό στέλεχος αφορά την εμφάνιση όγκων. Οι δοκιμές παθογένειας εκτός από *in vivo* εφαρμόζονται και *in vitro*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται φύλλα ηλικίας ενός έτους από ασυμπτωματικά, υγιή φυτά ελιάς και πικροδάφνης. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η γρήγορη εμφάνιση συμπτωμάτων που κυμαίνεται στις δέκα μέρες μετά από την μόλυνση. (Salman et al. 2022, Bella et al. 2006). Μία άλλη γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική δοκιμασίας παθογένειας αφορά την χρήση του καρότου. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο έχει επιτευχθεί η εγκατάσταση διαφόρων ειδών του γένους *Pseudomonas* όπως το Psn, το Psv καθώς και του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*, το οποίο επίσης προκαλεί σχηματισμό όγκων (Doksöz and Bozkurt, 2020, Babich and Fox, 1998).

1.5 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής διατριβής ήταν η απομόνωση του παθογόνου αιτίου από προσβεβλημένα φυτά πικροδάφνης συλλεγμένα από διάφορες περιοχές του Νομού Μαγνησίας, ο χαρακτηρισμός και η ταυτοποίηση του καθώς και η διερεύνηση της γενετικής παραλλακτικότητας των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Θρεπτικά υποστρώματα

2.1.1 Παρασκευή του στερεού θρεπτικού υποστρώματος King's B Medium Agar

Για να παρασκευαστεί ποσότητα 1000 mL στερεού θρεπτικού υποστρώματος King's B Medium Agar (KB) χρησιμοποιήθηκαν 20 g πεπτόνης, 1,96 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (Merck), 1,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck), 30 mL γλυκερόλης (50%) και 15 g άγαρ (Sigma) σε απεσταγμένο νερό. Το υλικό θερμάνθηκε μέχρι βρασμού αποστειρώθηκε στους 121 °C , 1,1 atm για 15 min και στη συνέχεια μοιράστηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε αποστειρωμένα γυάλινα τρυβλία διαμέτρου 90 mm (18 mL/ τρυβλίο).

2.1.2 Παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος King's B Medium (KB Broth)

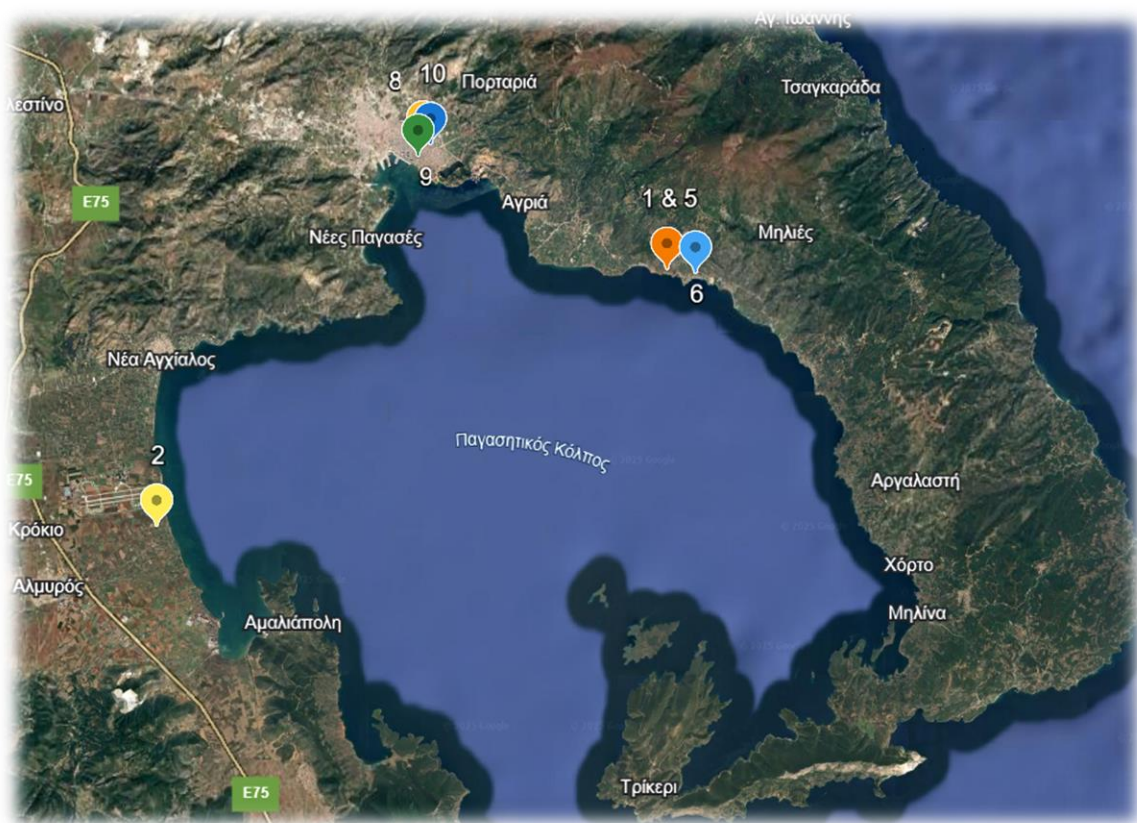
Για να παρασκευαστεί ποσότητα 1000 mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος KB χρησιμοποιήθηκαν 20 g πεπτόνης, 1,96 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (Merck), 1,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck), 30 mL γλυκερόλης (50%) σε απεσταγμένο νερό. Το υλικό αφού θερμάνθηκε μέχρι βρασμού μοιράστηκε σε γυάλινα φιαλίδια τύπου McCartney (5 mL/μπουκαλάκι) και αποστειρώθηκε στους 121 °C, 1,1 atm για 15 min.

2.1.3 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού Nutrient Sucrose Agar (NSA)

Για να παρασκευαστεί ποσότητα 1000 mL στερεού θρεπτικού υποστρώματος NSA τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη με 1000mL απεσταγμένου νερού, 28g LAB M Nutrient Agar (5 g/L πεπτόνη, 3 g/L βόειο εκχύλισμα, 8 g/L NaCl και 12 g/L άγαρ N° 2), 3 g άγαρ (Sigma) και 50 g σουκρόζη. Το υλικό αποστειρώθηκε στους 121 °C, 1,1 atm για 15 min και διαμοιράστηκε σε αποστειρωμένα γυάλινα τρυβλία διαμέτρου 90 mm (18 mL/ τρυβλίο).

2.2 Απομόνωση βακτηρίων από φυτά πικροδάφνης

Για την απομόνωση του βακτηρίου συλλέχθηκαν προσβεβλημένοι κλαδίσκοι και φύλλα πικροδάφνης από διάφορες περιοχές της ευρύτερης περιοχής της Μαγνησίας. Οι κλαδίσκοι έφεραν όγκους σε διάφορα μεγέθη, κλειστούς με ελαιοκαστανό και σκούρο καστανό χρώμα. Τα προσβεβλημένα φύλλα έφεραν μικρούς όγκους ανά σημεία στην πάνω και στην κάτω επιφάνεια. Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 4 °C μέχρι την επεξεργασία τους (εντός τριών ημερών από την δειγματοληψία). Αρχικά ο επιλεγμένος κλαδίσκος απολυμάνθηκε επιφανειακά με απορροφητικό χαρτί εμποτισμένο με αιθανόλη 95% για περίπου 30 sec. Υπό ασηπτικές συνθήκες έγινε κάθετη τομή στον όγκο προκειμένου να αποκαλυφθεί το εσωτερικό του. Επιλέχθηκαν όγκοι με πράσινο χρώμα στο εσωτερικό τους ενώ οι παλιοί όγκοι με καφέ χρώμα εσωτερικά απορρίφθηκαν. Από το εσωτερικό του όγκου αφαιρέθηκαν 3-4 κομμάτια ιστού μεγέθους 1x1 mm. Με τη χρήση νυστεριού τοποθετήθηκε σε φιαλίδια φυγοκέντρησης τύπου Eppendorf με 500 μ L αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού (dsH_2O). Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα φύλλα. Έγινε κατόπιν έντονη ανάδευση των δειγμάτων (vortex) για ένα με δύο λεπτά και παραμονή τους σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Ακολούθησε στη συνέχεια διασπορά με χρήση γυάλινου διανομέα (plating), ποσότητας 100 μ L από το υπερκείμενο σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα KB υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25 °C για 48 ώρες σε απόλυτο σκοτάδι και στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους 4 °C μέχρι την χρήση τους. Για τις βακτηριακές απομονώσεις που λήφθηκαν εφαρμόστηκε η μέθοδος της γραμμικής διασποράς βακτηριακών κυττάρων (streaking). Με την βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου, υπό ασηπτικές συνθήκες, λήφθηκαν βακτηριακά κύτταρα από μεμονωμένη αποικία και έγινε γραμμική διασπορά σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Τα βακτήρια επώαστηκαν σε θάλαμο με 25 °C για 48 ώρες σε απόλυτο σκοτάδι και στη συνέχεια διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4 °C έως 30 ημέρες.



Εικόνα 4: Δορυφορική απεικόνιση των περιοχών δειγματοληψίας (Google Earth, 2025)

Περιοχή 1 και 5: Καλά Νερά , Περιοχή 2: Αλμυρός , Περιοχή 6: Κάτω Γατζέα, Περιοχές 8,9,10 : Συνοικίες της περιοχής του Βόλου

2.2.1 Καλλιέργεια βακτηρίων σε King's B Broth

Βακτηριακά κύτταρα ηλικίας 2 έως και 15 ημερών από μία μεμονωμένη αποικία τοποθετήθηκαν, με την βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου υπό ασηπτικές συνθήκες, σε 5mL υγρού υλικού King's B σε γυάλινα φιαλίδια τύπου McCartney. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο με συνεχή ανακίνηση (150rpm) για 24 ώρες στους 25 °C σε απόλυτο σκοτάδι.

2.3 Χρώση Gram

Για την χρώση Gram χρησιμοποιήθηκαν αποικίες βακτηρίων ηλικίας 24 με 48 ωρών και ως Gram θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μείγμα Gram+ βακτηρίων και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Smith and Marise (2016) με τροποποιήσεις. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στο kit της Merck , Cat. No. 1.11885 και ήταν το διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους (Crystal violet solution), διάλυμα Lugol's (Lugol's solution), διάλυμα σαφρανίνης και τέλος ένα διάλυμα με σύσταση 80% αιθανόλη 20% ακετόνη. Αρχικά σε καθαρές αντικειμενοφόρους πλάκες τοποθετήθηκαν 10 μ L dsH_2O . Βακτηριακά κύτταρα από μεμονωμένες αποικίες μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες στην αντικειμενοφόρο πλάκα, αναμείχθηκαν με το νερό και απλώθηκαν πάνω στην πλάκα ώστε να δημιουργηθεί μία λεπτή στρώση κυττάρων. Η προσήλωση των βακτηρίων επιτεύχθηκε με θέρμανση της πλάκας περνώντας την πάνω από τη φλόγα του λύχνου Bunsen με γρήγορες κυκλικές κινήσεις. Στη συνέχεια η κηλίδα καλύφθηκε με σταγόνα διαλύματος κρυσταλλικού ιώδους για 1 λεπτό και η πλάκα με την λεπτή στρώση κυττάρων πλύθηκε με dsH_2O για 5 δευτερόλεπτα. Ακολούθως εφαρμόστηκε διάλυμα Lugol's για 1 λεπτό και μετά από πλύση με απεσταγμένο νερό, η περίσσεια χρωστικής απομακρύνθηκε με εμβάπτιση της αντικειμενοφόρου πλάκας σε διάλυμα αιθανόλης και αλκόολης για 30-60 sec και ξέπλυμα με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Τέλος η κηλίδα καλύφθηκε με διάλυμα σαφρανίνης για 1 λεπτό. Αφού έγινε έκπλυση με dsH_2O για 5 δευτερόλεπτα, οι πλάκες αφέθηκαν να στεγνώσουν σε διηθητικό χαρτί.

2.4 Μέθοδοι βιοχημικής ταυτοποίησης των βακτηρίων

2.4.1 Φθορισμός σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B

Προκειμένου να ελεγχθεί εάν τα απομονωθέντα βακτήρια παράγουν ουσίες που προκαλούν φθορισμό έγινε χωρισμός των τρυβλίων σε τεταρτημόρια με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα King's B (Lelliot et al. 1966) όπου κάθε τεταρτημόριο εμβολιάστηκε με μία απομόνωση. Τα τρυβλία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25 °C σε απόλυτο σκοτάδι και μετά από 48 ώρες έγινε παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολία ($\lambda=365\text{ nm}$).

2.4.2 Παραγωγή λεβάνης σε θρεπτικό υπόστρωμα NSA

Για να διαπιστωθεί εάν οι αποικίες βακτηρίων που απομονώθηκαν παράγουν λεβάνη έγινε καλλιέργεια αυτών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα NSA (Lelliot et al. 1966). Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25°C σε απόλυτο σκοτάδι και οι παρατηρήσεις λήφθηκαν μετά από 48 ώρες.

2.4.3 Παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων από τις βακτηριακές απομονώσεις

Για να διαπιστωθεί εάν οι αποικίες που απομονώθηκαν παράγουν πηκτινολυτικά ένζυμα υιοθετήθηκε το πρωτόκολλο των Lelliot et al. (1966) με τροποποιήσεις. Έγινε εμβολιασμός τεμαχίων κονδύλων από υγρές καλλιέργειες βακτηρίων. Αρχικά οι κόνδυλοι πατάτας πλύθηκαν διεξοδικά με τρεχούμενο νερό βρύσης. Αφού ξεφλουδίστηκαν, κόπηκαν σε εγκάρσια τμήματα πάχους 1 cm. Κάθε τμήμα κονδύλου πατάτας εμβαπτίστηκε σε αιθανόλη 95% για 2-3 λεπτά και αφού περάστηκε στιγμιαία πάνω από φλόγα, ξεπλύθηκε με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο γυάλινο τρυβλίο που περιείχε διηθητικό χαρτί. Με την βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού λαξεύτηκε βοθρίο στο κέντρο του κονδύλου και εντός του μεταφέρθηκαν 30 μL από την υγρή καλλιέργεια βακτηρίων. Σε κάθε δοκιμασία ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν 30 μL dsH_2O . Στο τέλος του εμβολιασμού, το διηθητικό χαρτί κάθε τρυβλίου εμποτίστηκε πλήρως με αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού και το τρυβλίο τυλίχθηκε με μεμβράνη για διατήρηση υγρασίας. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25 °C σε απόλυτο σκοτάδι για 72 ώρες.

2.5 Αντίδραση υπεραισθησίας σε φυτά καπνού από τις απομονωθείσες αποικίες

Προκειμένου να ελεγχθεί ότι τα βακτήρια που απομονώθηκαν είναι φυτοπαθογόνα έγιναν βιοδοκιμές σε φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum* L.) ποικιλίας “Ξάνθη 81” βάσει του πρωτόκολλου του Klement Z. (1963) και Wick R. (2010). Οι σπόροι των φυτών παραχωρήθηκαν ως δωρεά στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας από το Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών πόρων του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (Θέρμη, Θεσσαλονίκη). Καθ’ όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων τα φυτά διατηρούνταν σε χώρο με θερμοκρασία 23 °C με 27 °C, φωτοπερίοδο και συμπληρωματικό φωτισμό με λάμπες Osram Fluora 36W-T8. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης υπεραισθησίας χρησιμοποιήθηκαν 1,5 mL από υγρή καλλιέργεια βακτηρίων όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 2.2.2. Μετά από φυγοκέντρηση (5.100 xg για 10 min στους 4 °C) και απόρριψη του υπερκείμενου υλικού, τα βακτηριακά κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε ίσο όγκο αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού. Για την προετοιμασία των βακτηρίων για τον εμβολιασμό των φυτών καπνού έγιναν αραιώσεις με βάση την κλίμακα McFarland ώστε η τελική συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων ήταν περίπου 10⁸ CFU/mL (Lelliot et al. 1966). Ο εμβολιασμός έγινε με την χρήση αποστειρωμένης σύριγγας ινσουλίνης (1 mL) χωρίς τη βελόνη και επιλέχθηκαν υγιή φυτά με μεγάλο μέγεθος εύρωστων πράσινων φύλλων. Τα σημεία του εμβολιασμού επιλέχθηκαν κοντά στις νευρώσεις και στην κάτω επιφάνεια των φύλλων. Η σύριγγα πληρώθηκε με αιώρημα βακτηριακών κυττάρων και μετά από του στομίου της σύριγγας με το σημείο του εμβολιασμού, τα κύτταρα διοχετεύτηκαν εντός του ιστού. Ως αποτέλεσμα ο ιστός είχε υδατώδη όψη. Έγιναν δύο επαναλήψεις για κάθε απομόνωση. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και ως θετικός μάρτυρας απομόνωση Psv (PSS4) που διατηρείται από το Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων έγινε μετά από 48 με 72 ώρες από την ημέρα του εμβολιασμού.

2.6 Τεχνικές μοριακής ταυτοποίησης των βακτηρίων

2.6.1 Διαδικασία απομόνωσης βακτηριακού DNA

Για την διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης κατά Llor et al. (1999) με τροποποιήσεις. Ποσότητα 1,5 mL από υγρές καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια φυγοκέντρησης τύπου Eppendorf χωρητικότητας 2 mL και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 17.100 xg για 5 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 500 µL διαλύματος (DNA extraction buffer) με την ακόλουθη σύσταση: 200 mM Tris · HCL pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, 2% PVP-10. Πραγματοποιήθηκε κατόπιν έντονη ανάμειξη (vortex) για 3-5 sec και τα φιαλίδια επώαστηκαν στους 25 °C (θερμοκρασία δωματίου) με συνεχή ανακίνηση. Κατόπιν έγινε φυγοκέντρηση για 5 min σε 10.000 xg και λήφθηκε το υπερκείμενο υγρό (200 µL-300 µL), στο οποίο προστέθηκε ίση ποσότητα παγωμένης ισοπροπανόλης. Πραγματοποιήθηκε ανάμειξη και τα δείγματα έμειναν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στους 25 °C. Ακολούθησε η φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά στα 13.100 xg. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και το ίζημα, αφού στέγνωσε, επαναιωρήθηκε σε 100 µL απιονισμένου αποστειρωμένου νερού που είχε επεξεργαστεί με DEPC. Για τον υπολογισμό της ποσότητας και της καθαρότητας του απομονωθέντος DNA έγινε μέτρηση της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο σε τρία μήκη κύματος: 260 nm (A_{260}), 280 nm (A_{280}) και 230 nm (A_{230}). Η συγκέντρωση υπολογίστηκε με βάση τον τύπο $C_{DNA} = A_{260} \cdot 50$ / αραίωση ενώ η καθαρότητα από τους λόγους A_{260}/A_{280} με επιθυμητές τιμές από 1,8-2,0 και A_{260}/A_{230} με επιθυμητές τιμές >1,5. Τέλος τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

2.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Polymerase Chain Reaction (PCR) και οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της αλληλουχίας DNA του γονιδίου *iaaL*, ήταν οι ίδιοι που χρησιμοποιούνται και για την ταυτοποίηση του βακτηρίου Psv (Penyalver et al. 2000). Συγκεκριμένα έγινε χρήση των εκκινητών IAALF 5'GGCACCAGCGGCAACATCAA-3' και IAALR 5'-CGCCCTCGGAAGTCCATAC-3'. Για κάθε αντίδραση όγκου 25 µL χρησιμοποιήθηκαν 12,5 µL one-Taq 2x Master Mix with Standard Buffer (NEB), 0,5 µL από τον εκκινητή IAALR (συγκέντρωσης 10 pmol/ µL) , 0,5 µL

από τον εκκινητή IAALF (συγκέντρωσης 10 pmol/ μ L), 9,5 μ L DEPC- treated Water και τέλος 2 μ L από το DNA (50-100 ng). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* και ως αρνητικός μάρτυρας DEPC-treated Water.

Το θερμοκρασιακό προφίλ της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης δίνεται στον Πίνακα 1:

Πίνακας 1 : Θερμοκρασιακό προφίλ της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με χρήση των εκκινητών IAALF και IAALR.

<i>ΚΥΚΛΟΙ PCR</i>	<i>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΟ ΠΡΟΦΙΛ</i>		
1 κύκλος	80 °C για 20 sec (Φόρτωση τμημάτων)		
1 κύκλος	94 °C για 5 min		
35 κύκλοι	94 °C για 30 sec	62 °C για 30 sec	68 °C για 30 sec
1 κύκλος	68 °C για 5 min		
1 κύκλος	10 °C για 10 sec		

Η ανάλυση των προϊόντων της PCR έγινε σε πηκτή αγαρόζης 1,7% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (10,8 g/L Tris-base, 5,5 g/L Boric acid, 4 mL EDTA 0,5 M με pH 8.0, σε απεσταγμένο νερό). Χρησιμοποιήθηκαν 5 μ L από τα προϊόντα της PCR και 2 μ L διαλύματος φόρτωσης (Type III gel loading buffer, 6x) που περιλαμβάνει 0,25% bromophenol blue, 0,25% xylene cyanol και 30% γλυκερόλη σε DEPC- Treated Water (Sambrook, 1989). Ως δείκτης μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο 1 kb Ladder (NEB). Ο διαχωρισμός των τμημάτων DNA έγινε με εφαρμογή διαφοράς δυναμικού 80 V και διήρκεσε 30-90 min. Μετά την ηλεκτροφόρηση έγινε χρώση του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al. (1989). Τέλος η οπτικοποίηση των προϊόντων της PCR έγινε με UV ακτινοβολία (λ =365 nm) και συγκρίθηκαν οι ζώνες DNA με τις ζώνες του δείκτη 1Kb Ladder.

2.7 Μελέτη γενετικής ποικιλομορφίας των απομονωθέντων βακτηρίων

Για την μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας χρησιμοποιήθηκε η διαγνωστική μέθοδος της Rep-PCR και συγκεκριμένα ERIC-PCR και BOX-PCR βάσει του πρωτοκόλλου της EPPO (2010), με τροποποιήσεις. Για κάθε αντίδραση όγκου 25 μ L για την διενέργεια της ERIC-PCR χρησιμοποιήθηκαν 12,5 μ L one-Taq 2x Master Mix with Standard Buffer (NEB), 2,5 μ L από τον εκκινητή ERIC1 (συγκέντρωσης 2 mM) με αλληλουχία αναγνώρισης 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3', 2,5 μ L από τον εκκινητή ERIC2 (συγκέντρωσης 2 mM) με αλληλουχία αναγνώρισης 5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3', 5,5 μ L DEPC-treated Water και τέλος 2 μ L από το DNA (50-100 ng). Για την BOX-PCR για μία αντίδραση όγκου 25 μ L έγινε η ίδια διαδικασία αλλά χρησιμοποιήθηκαν 2,5 μ L από το BOX AIR με αλληλουχία αναγνώρισης: 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'. Σχετικά με το θερμοκρασιακό προφίλ των αντιδράσεων ERIC-BOX PCR, η φόρτωση των δειγμάτων γίνεται 80 °C για 30 sec ενώ η αρχική αποδιάταξη για την ERIC ξεκινάει στους 95°C και διαρκεί 7 λεπτά. Ακολουθούν άλλοι 30 κύκλοι (94 °C για 1 λεπτό , 52 °C για 1 λεπτό και στους 65 °C για 8 λεπτά). Η αντίδραση ολοκληρώνεται στους 65 °C για 16 λεπτά πριν κρυώσει στους 4 °C. Παρόμοιο θερμοκρασιακό προφίλ έχει και η BOX-PCR με την μόνη διαφορά ότι κατά την πραγματοποίηση των 30 κύκλων η θερμοκρασία είναι 53 °C για 1 λεπτό αντί για 52 °C. Η ανάλυση των προϊόντων της PCR έγινε σε πηκτή αгарόζης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (10,8 g/L Tris-base, 5,5 g/L Boric acid, 4mL EDTA 0,5 M με pH 8.0, σε απεσταγμένο νερό). Χρησιμοποιήθηκαν 10 μ L από τα προϊόντα της PCR και 2 μ L διαλύματος φόρτωσης (Type III gel loading buffer, 6x). Ως δείκτες μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκαν ο 1 kb Ladder (NEB) , ο φX174 DNA-HaeIII Digest (NEB) και ο Low Molecular Weight DNA Ladder (NEB). Ο διαχωρισμός των τμημάτων DNA έγινε με εφαρμογή διαφοράς δυναμικού 6 V/cm για 2 ώρες. Μετά την ηλεκτροφόρηση έγινε χρώση της πηκτής με βρωμιούχο αιθίδιο όπως περιγράφεται από τους Sambrook et al. 1989. Τέλος η οπτικοποίηση των προϊόντων της PCR έγινε με UV ακτινοβολία ($\lambda=365$ nm) και συγκρίθηκαν οι ζώνες DNA με τις ζώνες των δεικτών 1Kb Ladder (NEB), φX174 DNA-HaeIII Digest (NEB) και Low Molecular Weight DNA Ladder (NEB).

2.8 *In vitro* δοκιμές παθογένειας

2.8.1 Δοκιμή δημιουργίας όγκων σε κονδύλους καρότου

Για την αξιολόγηση δημιουργίας όγκων σε κονδύλους καρότων (*Dacus carota* subsp. *sativus* L.) από τις βακτηριακές απομονώσεις χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Fodor et al. (2024) με τροποποιήσεις. Αρχικά επιλέχθηκαν μικροί σε μέγεθος κόνδυλοι καρότου και πλύθηκαν με τρεχούμενο νερό βρύσης για 5 min. Στη συνέχεια απολυμάνθηκαν επιφανειακά με 95% αιθυλική αλκόολη και ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Κατόπιν τοποθετήθηκαν σε ένα φιαλίδιο τύπου Falcon χωρητικότητας 50 mL με αιθανόλη περιεκτικότητας 70% για 5 min. Οι κόνδυλοι στη συνέχεια πλύθηκαν εκ νέου με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκαν πάνω σε διηθητικό χαρτί. Με αποστειρωμένο μαχαίρι απομακρύνθηκε το πάνω και κάτω μέρος του, ξεφλουδίστηκε και κόπηκαν κομμάτια καρότου πάχους περίπου 0,5 cm. Σε κάθε κομμάτι καρότου λαξεύτηκε ένα μικρό βοθρίο στο κέντρο με την χρήση αποστειρωμένης βελόνης ανατομίας. Βακτηριακά κύτταρα από μεμονωμένες αποικίες τοποθετήθηκαν στο σημείο του νύγματος με μικροβιολογικό κρίκο. Χρησιμοποιήθηκε 1 τρυβλίο ανά εφαρμογή. Επιπλέον έγινε και δοκιμή του ίδιου πρωτοκόλλου με έκχυση με τη βοήθεια πιπέτας χωρητικότητας 20 μ L, 10 μ L αιωρήματος βακτηρίων. Συγκεκριμένα 750 μ L από την υγρή καλλιέργεια τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια τύπου Eppendorf και φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C για 10 min σε 5.100 xg. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και έγινε επαναιώρηση των βακτηρίων με ίση ποσότητα αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού. Δύο κομμάτια καρότου τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με διηθητικό χαρτί το οποίο είχε εμποτιστεί με αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό και τα τρυβλία διατηρήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με θερμοκρασία 25 °C, σε απόλυτο σκοτάδι για 13 και 29 ημέρες. Για κάθε δοκιμή χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό.

2.8.2 Δοκιμές δημιουργίας όγκων σε φύλλα και βλαστούς πικροδάφνης

Για την αξιολόγηση δημιουργίας όγκων σε φύλλα από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* εφαρμόστηκαν τα πρωτόκολλα των Bella et al. (2006) και Salman et al. (2022) με τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα αρχικά επιλέχθηκαν βλαστοί με φύλλα από φυτά τα οποία δεν εμφάνιζαν συμπτώματα. Στη συνέχεια τα φύλλα διαχωρίστηκαν από τους βλαστούς και τόσο τα φύλλα όσο και οι βλαστοί πλύθηκαν κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης για 5 min. Κατόπιν έγινε επιφανειακή απολύμανση με 95% αιθανόλη για 1 min. Ακολούθησε πλύσιμο με

αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και ο ιστός τοποθετήθηκε πάνω σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί για να στεγνώσει. Υπό ασηπτικές συνθήκες κόπηκαν εγκάρσια τέσσερα με πέντε κομμάτια βλαστών και φύλλων πικροδάφνης. Το κομμάτι βλαστού είχε μήκος 0,5 cm και των φύλλων 1 με 1,5 cm. Στη συνέχεια λαξεύτηκαν βοθρία στο κεντρικό νεύρο της κάτω επιφάνειας των τμημάτων των φύλλων, ενώ στους βλαστούς στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και με χρήση πιπέτας εγχύθηκαν 5 μ L-10 μ L από υγρή καλλιέργεια βακτηρίων (παράγραφος 2.2.2). Για να αποφευχθεί πιθανή επίδραση του θρεπτικού υλικού στον ιστό πριν την έγχυση τα βακτηριακά κύτταρα, μετά από φυγοκέντρωση για 10 min σε 5.100 xg, είχαν επαναιωρηθεί σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Για κάθε δοκιμή χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Τα κομμάτια φύλλων και βλαστών τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με 15 mL 0,5% W/V Water Agar (5 g agar/L σε αποστειρωμένο απεσταγμένο που αποστειρώθηκαν στους 121 °C , 1,1 atm για 15 min), τα οποία σφραγίστηκαν με ταινία parafilm και παρέμειναν σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 25 °C με φωτοπερίοδο 16/8h ημέρα/νύχτα για 29 ημέρες.

3.Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση βακτηρίων από προσβεβλημένα φύλλα και κλαδιά φυτών πικροδάφνης

Κατά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου απομόνωσης βακτηρίων τα φυτικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν κωδικοποιήθηκαν ανάλογα με το μέρος συλλογής των προσβεβλημένων φυτών και τα διαφορετικά φυτικά μέρη από τα οποία προέκυψαν. Στον πίνακα 2 περιγράφονται αναλυτικά στοιχεία των τελικών βακτηριακών απομονώσεων.

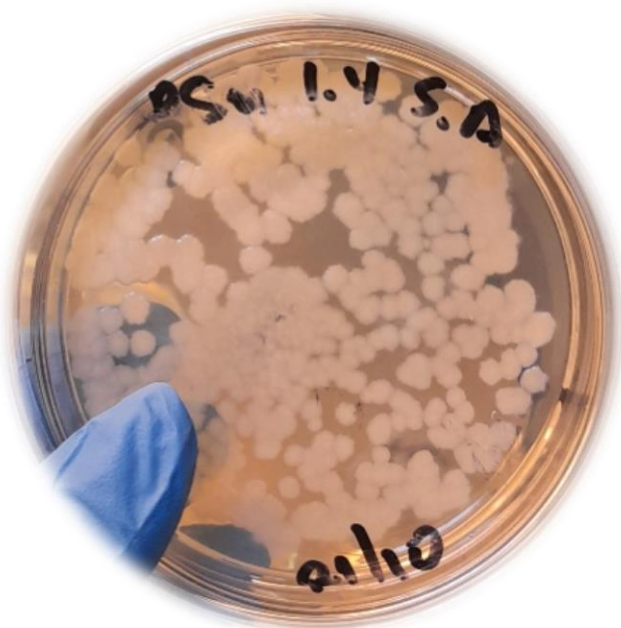
Πίνακας 2: Στοιχεία βακτηριακών απομονώσεων: κωδικός τμήματος φυτού, περιοχή, ημερομηνία συλλογής και όργανο φυτού που έφερε τον όγκο

ΚΩΔΙΚΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΦΥΤΟΥ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΦΥΤΙΚΟ ΟΡΓΑΝΟ ΠΟΥ ΕΦΕΡΕ ΟΓΚΟ
1.1	ΚΑΛΑ ΝΕΡΑ	10/11/24	ΒΛΑΣΤΟΣ
1.2	ΚΑΛΑ ΝΕΡΑ	10/11/24	ΦΥΛΛΟ
1.4	ΚΑΛΑ ΝΕΡΑ	10/11/24	ΦΥΛΛΟ
1.5	ΚΑΛΑ ΝΕΡΑ	10/11/24	ΦΥΛΛΟ
2.1.1	ΑΛΜΥΡΟΣ	10/11/24	ΦΥΛΛΟ
2.1.2	ΑΛΜΥΡΟΣ	10/11/24	ΦΥΛΛΟ
2.2.1	ΑΛΜΥΡΟΣ	10/11/24	ΦΥΛΛΟ
2.2.2	ΑΛΜΥΡΟΣ	10/11/24	ΦΥΛΛΟ
2.3.1	ΑΛΜΥΡΟΣ	10/11/24	ΦΥΛΛΟ
2.3.2	ΑΛΜΥΡΟΣ	10/11/24	ΦΥΛΛΟ
2.3.3	ΑΛΜΥΡΟΣ	10/11/24	ΦΥΛΛΟ
2.4	ΑΛΜΥΡΟΣ	10/11/24	ΦΥΛΛΟ
2.5	ΑΛΜΥΡΟΣ	10/11/24	ΦΥΛΛΟ
2.6	ΑΛΜΥΡΟΣ	10/11/24	ΦΥΛΛΟ
2.7	ΑΛΜΥΡΟΣ	10/11/24	ΦΥΛΛΟ

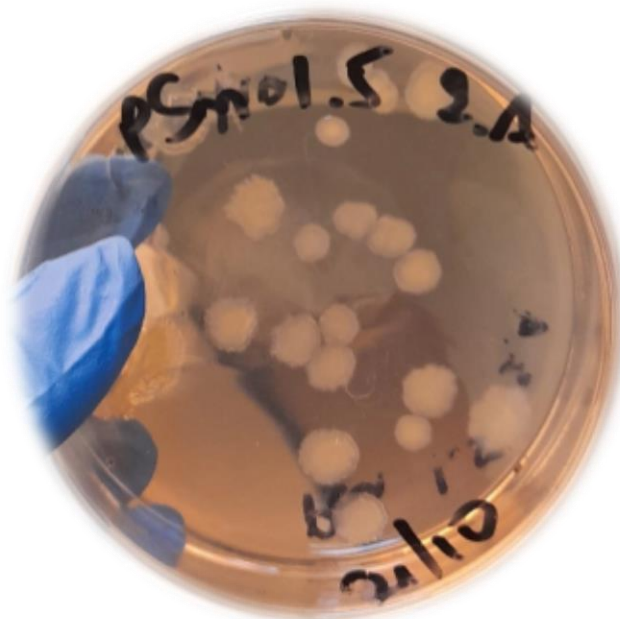
5.2	ΚΑΛΑ ΝΕΡΑ	1/03/25	ΦΥΛΛΟ
5.3	ΚΑΛΑ ΝΕΡΑ	1/03/25	ΒΛΑΣΤΟΣ
5.4	ΚΑΛΑ ΝΕΡΑ	1/03/25	ΒΛΑΣΤΟΣ
6.1	ΚΑΤΩ ΓΑΤΖΕΑ	1/03/25	ΦΥΛΛΟ
6.2	ΚΑΤΩ ΓΑΤΖΕΑ	1/03/25	ΒΛΑΣΤΟΣ
6.3	ΚΑΤΩ ΓΑΤΖΕΑ	1/03/25	ΦΥΛΛΟ
6.4	ΚΑΤΩ ΓΑΤΖΕΑ	1/03/25	ΒΛΑΣΤΟΣ
6.5	ΚΑΤΩ ΓΑΤΖΕΑ	1/03/25	ΦΥΛΛΟ
8.1.1	ΒΟΛΟΣ, ΟΙΚΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	14/03/25	ΦΥΛΛΟ
8.1.2	ΒΟΛΟΣ, ΟΙΚΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	14/03/25	ΦΥΛΛΟ
8.1.3	ΒΟΛΟΣ, ΟΙΚΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	14/03/25	ΒΛΑΣΤΟΣ
8.1.4	ΒΟΛΟΣ, ΟΙΚΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	14/03/25	ΒΛΑΣΤΟΣ
9.1.1	ΒΟΛΟΣ, ΟΙΚΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	16/03/25	ΒΛΑΣΤΟΣ
9.1.2	ΒΟΛΟΣ, ΟΙΚΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	16/03/25	ΒΛΑΣΤΟΣ
10.1.1	ΒΟΛΟΣ, ΟΙΚΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	6/04/25	ΦΥΛΛΟ
10.1.2	ΒΟΛΟΣ , ΟΙΚΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	6/04/25	ΒΛΑΣΤΟΣ

10.1.3	ΒΟΛΟΣ, ΟΙΚΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	6/04/25	ΒΛΑΣΤΟΣ
10.1.4	ΒΟΛΟΣ, ΟΙΚΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	6/04/25	ΒΛΑΣΤΟΣ
10.1.5	ΒΟΛΟΣ, ΟΙΚΙΣΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ	6/04/25	ΒΛΑΣΤΟΣ

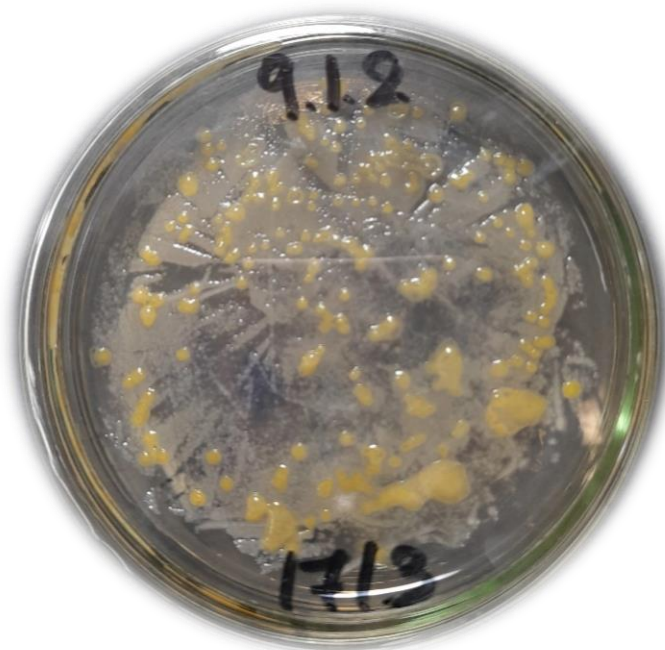
Ύστερα από την επώαση των τρυβλίων με θρεπτικό υλικό King's B στους 25 °C για 48 ώρες σε απόλυτο σκοτάδι, παρατηρήθηκε η ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών. Οι αποικίες ήταν άλλοτε μεμονωμένες και άλλοτε ενωμένες μεταξύ τους. Παρατηρήθηκαν μεγάλες λευκές κρεμώδεις γυαλιστερές αποικίες (Εικόνα 5) αλλά και λευκές αποικίες μικρής διαμέτρου ενώ πολύ κοινές ήταν βλεννώδεις κίτρινες αποικίες μεγαλύτερης διαμέτρου (Εικόνα 7). Επιπλέον προέκυψαν κίτρινες αποικίες με βλεννώδη υφή (Εικόνα 8) αλλά και χωρίς βλεννώδη υφή. Σε ορισμένες περιπτώσεις προέκυψαν και αποικίες ροζ χρώματος (Εικόνα 16) με βλεννώδη υφή.



Εικόνα 5: Μεμονωμένες και ενωμένες μεταξύ τους λευκές αποικίες σε τρυβλίο με υλικό King's B μετά από επώαση 48 ωρών στους 25 °C. Παρατήρηση υπό διερχόμενο ψυχρό λευκό φως



Εικόνα 6: Μεμονωμένες και ενωμένες μεταξύ τους λευκές αποικίες σε τρυβλίο με υλικό King's B μετά από επώαση 48 ωρών στους 25 °C. Παρατήρηση υπό διερχόμενο ψυχρό λευκό φως



Εικόνα 7: Λευκές και κίτρινες βλεννώδεις και ενωμένες μεταξύ τους σε τρυβλίο με υλικό King's B μετά από επώαση 48 ωρών στους 25 °C . Παρατήρηση υπό προσπίπτον ψυχρό λευκό φως



Εικόνα 8: Μεμονωμένες και ενωμένες μεταξύ τους κίτρινες βλεννώδεις αποικίες σε τρυβλίο με υλικό King's B μετά από επώαση 48 ωρών στους 25 °C. Παρατήρηση υπό προσπίπτον ψυχρό λευκό φως

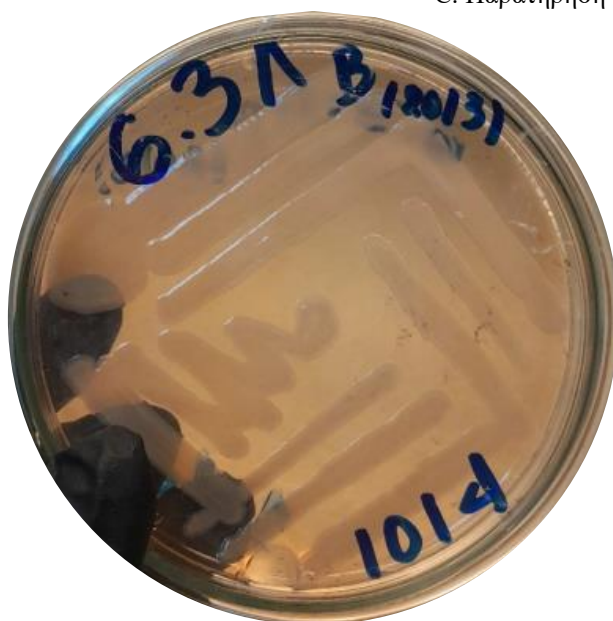
Μετά από επιλογή έγινε γραμμική διασπορά μεμονωμένων λευκών και κίτρινων αποικιών σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα KB και παρατηρήθηκε η μορφολογία τους όπως φαίνεται στις εικόνες 9 έως 15 και στον Πίνακα 3.



Εικόνα 9 : Ανάπτυξη μεμονωμένων και ενωμένων μεταξύ τους λευκών αποικιών χωρίς βλενώδη σύσταση από όγκους φυτού πικροδάφνης σε King's B μετά από επώαση για 48 ώρες στους 25 °C. Παρατήρηση υπό προσπίπτον ψυχρό λευκό



Εικόνα 10: Ανάπτυξη ενωμένων μεταξύ τους λευκών αποικιών που σχηματίζουν συνεχόμενες γραμμές από όγκους φυτού πικροδάφνης σε King's B μετά από επώαση για 48 ώρες στους 25 °C. Παρατήρηση υπό προσπίπτον ψυχρό λευκό



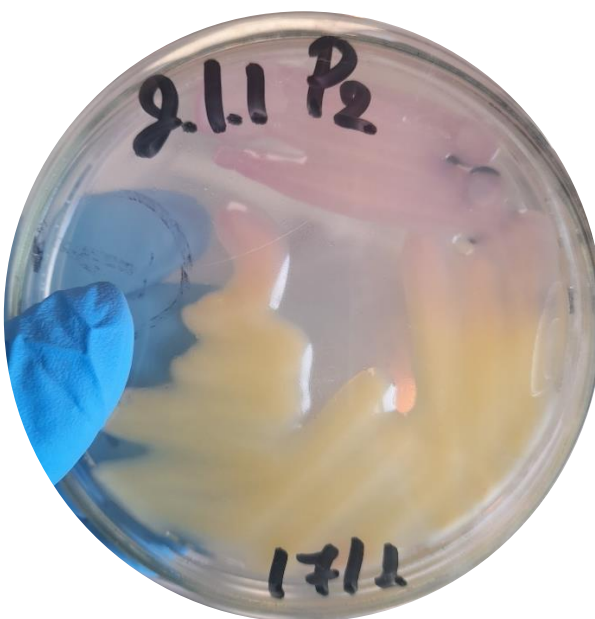
Εικόνα 11: Ανάπτυξη ενωμένων μεταξύ τους λευκών αποικιών που σχηματίζουν συνεχόμενες γραμμές από όγκους φυτού πικροδάφνης σε King's B μετά από επώαση για 48 ώρες στους 25 °C. Παρατήρηση υπό προσπίπτον ψυχρό λευκό



Εικόνα 12: Ανάπτυξη μεμονωμένων και ενωμένων μεταξύ τους κίτρινων αποικιών που σχηματίζουν συνεχόμενες γραμμές χωρίς βλεννώδη σύσταση από όγκους φυτού πικροδάφνης σε King's B μετά από επώαση για 48 ώρες στους 25 °C. Παρατήρηση υπό προσπίπτον ψυχρό λευκό φως



Εικόνα 13: Ανάπτυξη μεμονωμένων και ενωμένων μεταξύ τους κίτρινων αποικιών χωρίς βλεννώδη σύσταση από όγκους φυτού πικροδάφνης σε King's B μετά από επώαση για 48 ώρες στους 25 °C. Παρατήρηση υπό προσπίπτον ψυχρό λευκό φως



Εικόνα 14: Κίτρινες και ροζ αποικίες βλεννώδεις που έχουν ενωθεί μεταξύ τους σχηματίζοντας στρώμα καθώς και ροζ αποικίες που έχουν ομοίως ενωθεί μεταξύ τους σχηματίζοντας στρώμα και οι δύο με βλεννώδη εμφάνιση. από όγκους φυτού πικροδάφνης σε King's B μετά από επώαση για 48 ώρες στους 25 °C. Παρατήρηση υπό προσπίπτον ψυχρό λευκό φως



Εικόνα 15: Ανάπτυξη μεμονωμένων και ενωμένων μεταξύ τους ροζ αποικιών που σχηματίζουν συνεχόμενες γραμμές από όγκους φυτού πικροδάφνης σε King's B μετά από επώαση για 48 ώρες στους 25 °C. Παρατήρηση υπό προσπίπτον ψυχρό λευκό φως

Πίνακας 3: Κωδικός απομόνωσης, χρώμα και υφή αποικίας

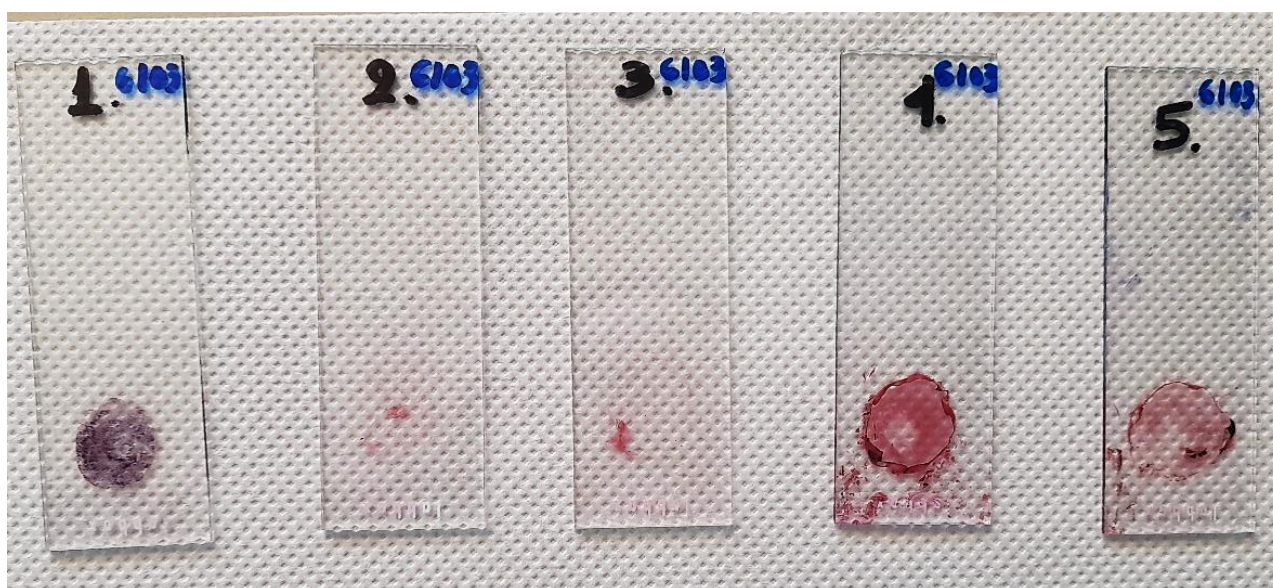
α/α	ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	ΧΡΩΜΑ ΑΠΟΙΚΙΑΣ	ΥΦΗ ΑΠΟΙΚΙΑΣ
1	1.1M1	Υπόλευκη/Μπεζ	Μη βλεννώδης
2	1.5A	Υπόλευκη/Μπεζ	Μη βλεννώδης
3	2.3.1A1	Λευκή	Μη βλεννώδης
4	2.3.2β2	Λευκή	Μη βλεννώδης
5	2.3.3A1	Λευκή	Μη βλεννώδης
6	2.5A2	Λευκή	Μη βλεννώδης
7	5.3AB	Υπόλευκη/Μπεζ	Μη βλεννώδης
8	5.4AB	Υπόλευκη/Μπεζ	Μη βλεννώδης
9	6.1A	Λευκή	Μη βλεννώδης
10	6.3AB	Υπόλευκη/Μπεζ	Μη βλεννώδης
11	6.5AB	Υπόλευκη/Μπεζ	Μη βλεννώδης
12	8.1.2A1	Λευκή	Μη βλεννώδης
13	9.1.1A1	Λευκή	Βλεννώδης
14	9.1.2.A1	Λευκή	Μη βλεννώδης
15	10.1.1	Λευκή	Μη Βλεννώδης
16	1.1K1	Κίτρινη	Βλεννώδης
17	2.1.1P2B	Ροζ	Βλεννώδης
18	2.2.2K1	Κίτρινη	Βλεννώδης
19	2.5K2	Κίτρινη	Βλεννώδης
20	8.1.1K1	Κίτρινη	Βλεννώδης
21	8.1.1K2	Κίτρινη	Βλεννώδης
22	8.1.2K	Κίτρινη	Μη βλεννώδης

23	8.1.4K2	Κίτρινη	Μη βλεννώδης
----	---------	---------	--------------

Συνολικά παρατηρήθηκαν 15 απομονώσεις (α/α 1-15 του Πίνακα 3) των οποίων η μορφολογία τους ήταν λευκή, κρεμώδης και γυαλιστερή όπως περιγράφεται και για το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* ρν. *nerii* και οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω χαρακτηρισμό.

3.2 Χρώση κατά Gram

Από τη χρώση Gram προέκυψε ότι οι 15 απομονώσεις του Πίνακα 3 (α/α 1-15) που ελέγχθηκαν είναι Gram- καθώς προέκυψε κόκκινο χρώμα κατά την τελική χρώση τους.



Εικόνα 16: Αποτελέσματα χρώσης Gram βακτηριακών απομονώσεων. 1: Gram+ (Μάρτυρας), 2: 1.1M1, 3: 1.5 A, 4: 2.1.1A2B, 5: 2.3.1 A1

3.3 Βιοχημική ταυτοποίηση

3.3.1 Παραγωγή λεβάνης

Μέρος των φυσιολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών του παθογόνου είναι και η παραγωγή λεβάνης σε θρεπτικό υπόστρωμα NSA μαζί με την παρατήρηση της μορφολογίας των αποικιών. Σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα NSA έγινε γραμμική διασπορά των βακτηριακών απομονώσεων 1-15 του Πίνακα 3. Παρατηρήσεις λήφθηκαν μετά από τρεις με πέντε ημέρες επώασης. Η μόνη αποικία που είχε βλεννώδης μορφή ήταν η 9.1.1Λ1. Οι αποικίες 8.1.2Λ1 και 9.1.2Λ1 είχαν ενδιάμεση σύσταση δηλαδή βλεννώδη και μη βλεννώδη μορφή (Πίνακας 4).



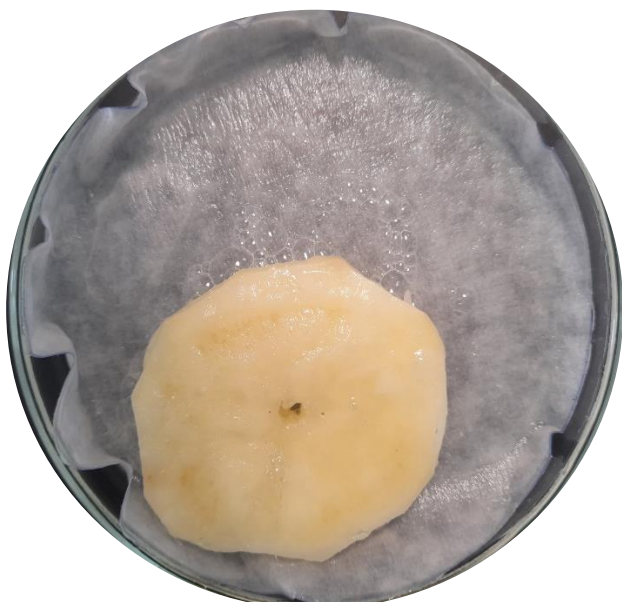
Εικόνα 17: Μορφολογία των αποικιών 1.1M1, 1.5A, 2.3.1Λ, 2.3.3Λ1 σε θρεπτικό υλικό NSA



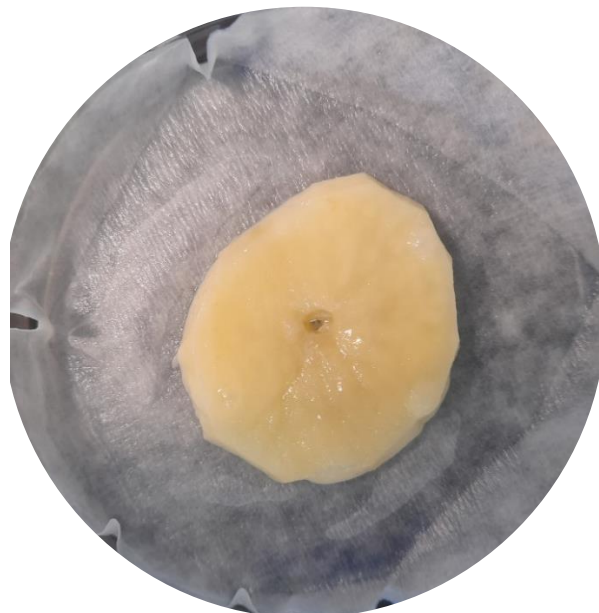
Εικόνα 18: Μορφολογία των αποικιών 2.3.2β2, 2.5Λ2, 5.4ΛB, 5.3ΛB σε θρεπτικό υλικό NSA

3.3.2 Παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων

Για την παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων ελέγχθηκαν οι απομονώσεις 1-15 του Πίνακα 3. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Σε καμία από τις απομονώσεις δεν παρουσιάστηκε σήψη κονδύλων πατάτας. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές (Πίνακας 5).



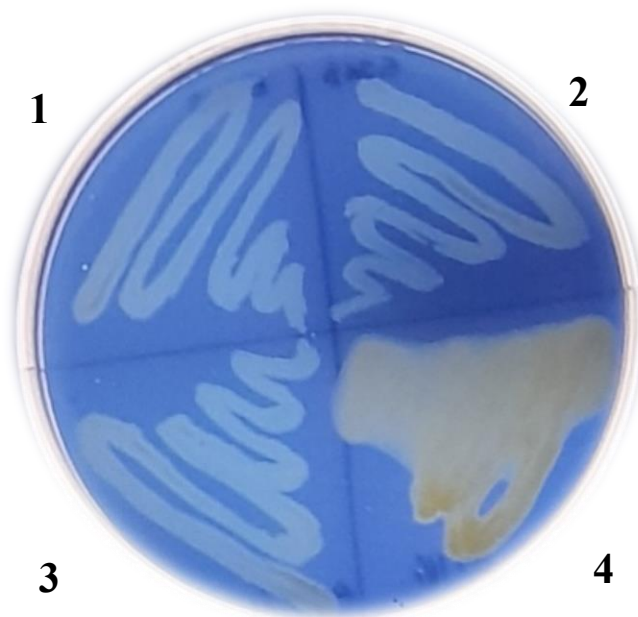
Εικόνα 19: Τμήμα κονδύλου πατάτας μετά από έγχυση αιωρήματος βακτηριακών κυττάρων της απομόνωσης 2.5Δ2 εντός βοθρίου στο κέντρο του τμήματος. Δεν παρατηρείται αλλοίωση του ιστού από πηκτινολυτικά ένζυμα



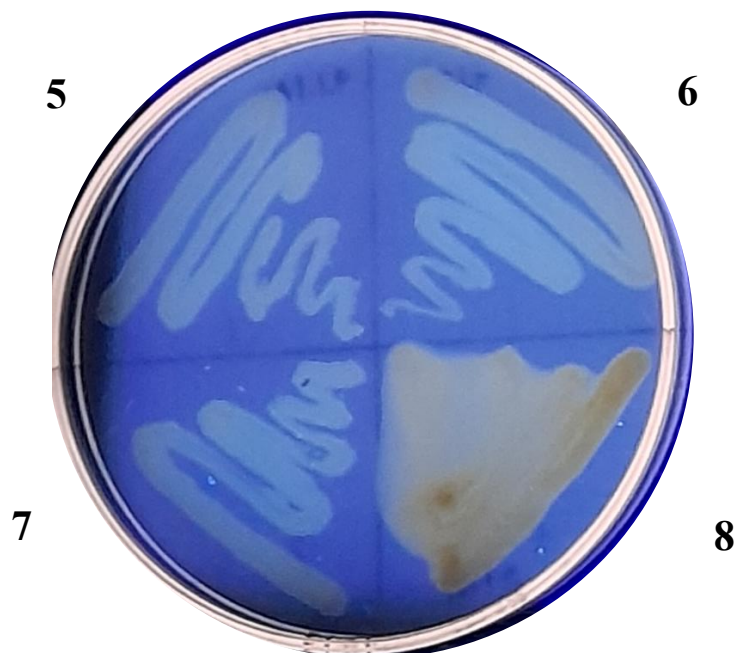
Εικόνα 20: Τμήμα κονδύλου πατάτας μετά από έγχυση αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού εντός βοθρίου στο κέντρο του τμήματος. Δεν παρατηρείται αλλοίωση του ιστού από πηκτινολυτικά ένζυμα

3.3.3 Φθορισμός βακτηριακών απομονώσεων

Σε καμία από τις απομονώσεις λευκού χρώματος 1-15 του Πίνακα 3 όπως και στην απομόνωση 8.1.1K1 κίτρινου χρώματος δεν παρατηρήθηκε φθορισμός μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία με μήκος κύματος 365 nm.



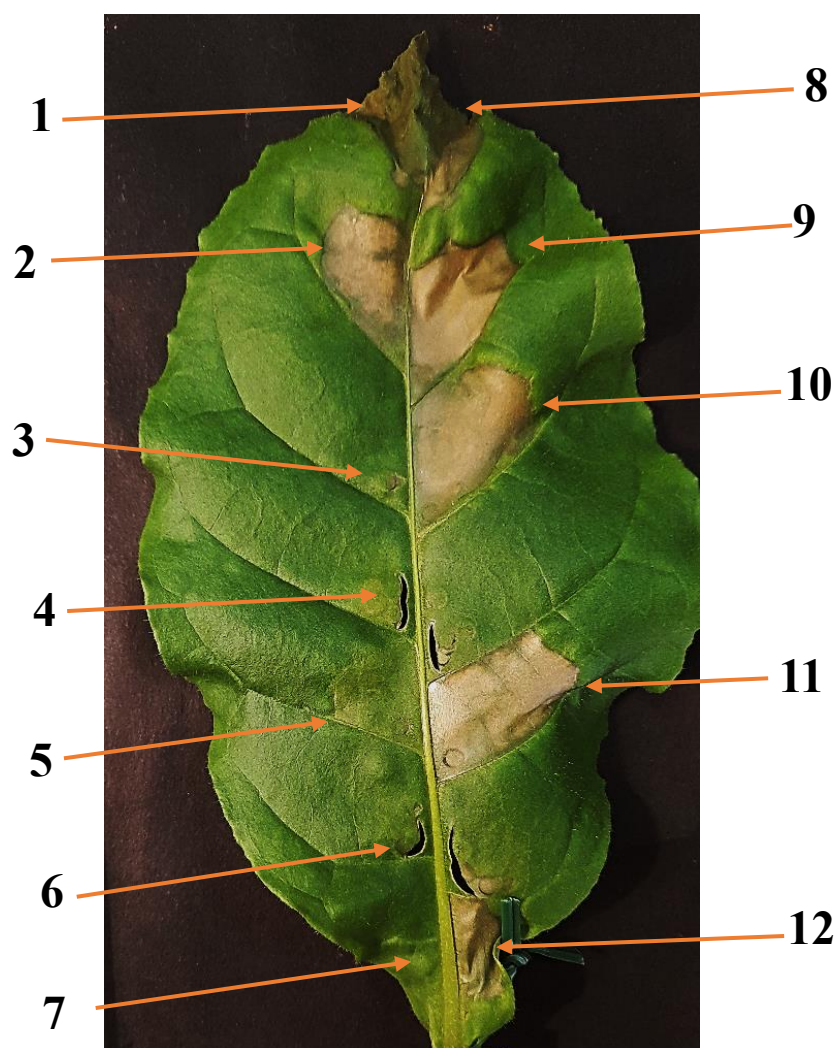
Εικόνα 21: Τρυβλίο με θρεπτικό υλικό King's B χωρισμένο σε τεταρτημόρια όπου έχουν αναπτυχθεί οι απομονώσεις 1: 6.3ΔΒ, 2: 6.5ΔΒ, 3: 8.1.2Δ1, 4: 8.1.1Κ. Η παρατήρηση έγινε με διερχόμενη ακτινοβολία $\lambda = 365 \text{ nm}$



Εικόνα 22: Τρυβλίο με θρεπτικό υλικό King's B χωρισμένο σε τεταρτημόρια όπου έχουν αναπτυχθεί οι απομονώσεις 5: 9.1.1Δ1, 6: 9.1.2Δ1, 7: 10.1.1, 8: 8.1.1Κ1. Η παρατήρηση έγινε με διερχόμενη ακτινοβολία $\lambda = 365 \text{ nm}$

3.3.4 Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού

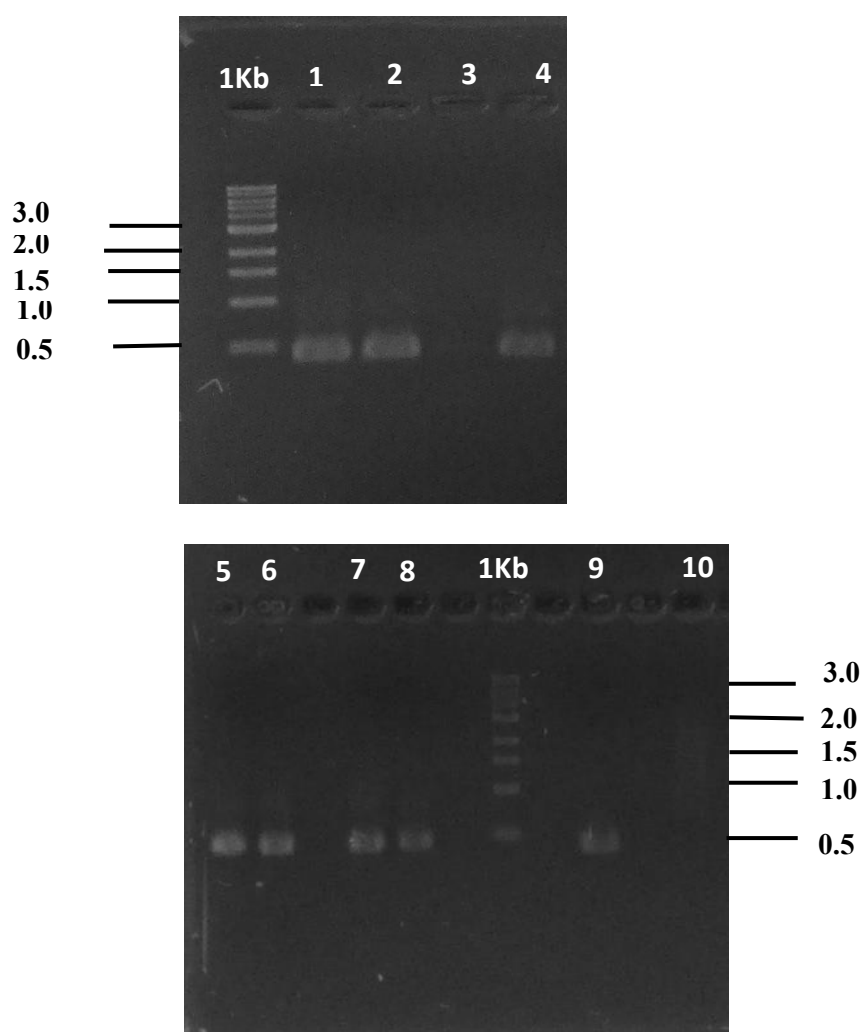
Από τις απομονώσεις 1-15 του Πίνακα 3 εκτός από την απομόνωση 6.1Λ η οποία δεν έδωσε αντίδραση υπερευαισθησίας με χαρακτηριστική ξήρανση, οι υπόλοιπες 14 απομονώσεις προκάλεσαν θετική αντίδραση υπερευαισθησίας, με ξηράνσεις στα σημεία του εμβολιασμού (Εικόνα 23). Τέλος παρατηρήθηκε ότι από τις απομονώσεις με κίτρινο χρώμα αποικίας η 8.1.4K2 έδωσε αντίδραση υπερευαισθησίας σε αντίθεση με την 8.1.1K2. Τέλος ο αρνητικός μάρτυρας (dsH_2O) δεν προκάλεσε καμιά αντίδραση στο σημείο εμβολιασμού (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Αποτελέσματα αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φύλλο καπνού. 1: 5.4ΛΒ, 2: 5.3ΛΒ, 3: 6.1Λ, 4: 8.1.2Κ, 5: 8.1.2Λ1 (1^η δοκιμή της), 6: 8.1.1Κ2, 7: dsH_2O , 8: 8.1.4Κ2, 9: 9.1.1Λ1, 10: 9.1.2Λ1, 11 & 12: Pss4

3.4 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων

Μετά την οριζόντια ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, έγινε χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και η πηκτή αγαρόζης παρατηρήθηκε κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν ζώνες DNA μεγέθους ελάχιστα μικρότερου από 0,5 Kb σε 12 λευκές απομονώσεις του Πίνακα 3 (Πίνακας 5). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το DEPC-Treated Water και ως θετικός μάρτυρας η απομόνωση Pss4. Το προϊόν που έδωσε η PCR ήταν στα 454bp και το βακτήριο χαρακτηρίστηκε ως *Pseudomonas savastanoi*.



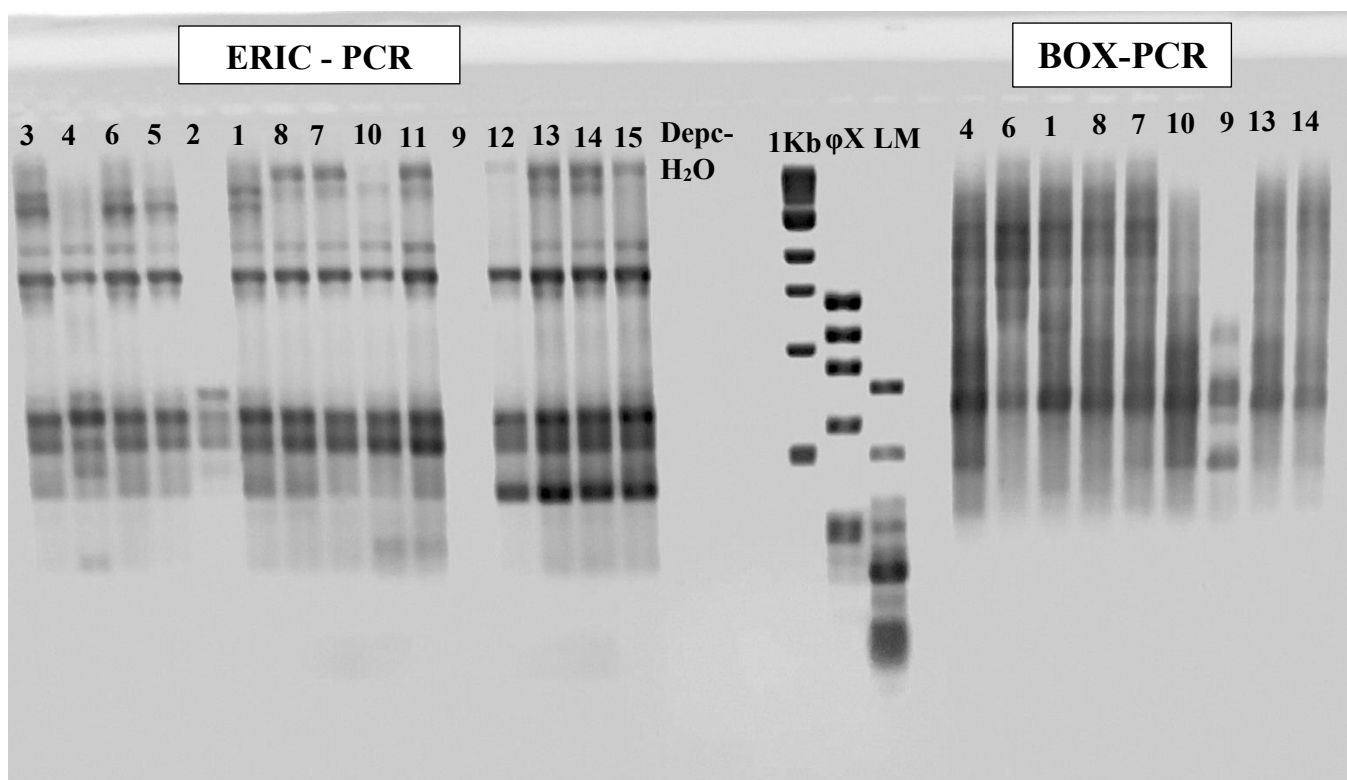
Εικόνα 24: Προϊόντα PCR σε πηκτή αγαρόζης. Βοθρίο 1Kb: 1Kb Ladder.

Βοθρίου 1: 5.4ΛΒ, Βοθρίο 2: 5.3ΛΒ, Βοθρίο 3: 2.1.1 Λ2Β, Βοθρίο 4: 8.1.2Λ1, Βοθρίο 5: 9.1.1Λ1, Βοθρίο 6: 9.1.2Λ1, Βοθρίο 7 και 8: Pss4 (Θετικός μάρτυρας), Βοθρίο 9: 2.3.2β2, Βοθρίο 10(Αρνητικός μάρτυρας): DEPC-Treated Water

3.5 Αποτελέσματα γενετικής ποικιλομορφίας βακτηριακών απομονώσεων με ERIC- PCR και BOX-PCR

Με βάση τα αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τους εκκινητές ERIC1R - ERIC2 και BOXAIR1 (Εικόνα 25) οι απομονώσεις που προέκυψαν από όγκους σε φυτά πικροδάφνης ταξινομήθηκαν σε εννιά ομάδες. Μία ομάδα αποτελούν οι απομονώσεις 2.3.1Α1 , 2.5Α2, 2.3.3Α1 και 1.1Μ1 που απομονώθηκαν από τον Αλμυρό και από τα Καλά Νερά αντίστοιχα και φέρουν ζώνες στα 8.000 bp, στα 6.000 bp, στα 2.000 bp, στα 1.500 bp, στα 603 bp, στα 500 bp και στα 350 bp. Δεύτερη ομάδα αποτελεί η απομόνωση 2.3.2β2 που απομονώθηκε από τον Αλμυρό και φέρει ζώνες στα 2.000 bp, 1.500 bp, 872 bp, 603 bp, 500 bp και στα 350 bp και στα 250 bp. Τρίτη ομάδα αποτελεί η απομόνωση 1.5Α που απομονώθηκε από τα Καλά Νερά και φέρει ζώνες στα 766 bp, 603 bp, 500 bp. Τέταρτη ομάδα αποτελούν οι απομόνωσεις 5.4ΑΒ και 5.3ΑΒ που απομονώθηκαν από τα Καλά Νερά με ζώνες 10.000 bp, 8.000 bp, 2.000 bp, 1.500 bp, 603 bp, 500 bp, 350 bp. Πέμπτη ομάδα αποτελεί η απομόνωση 6.3ΑΒ που απομονώθηκε από την Κάτω Γατζέα και φέρει ζώνες στα 8.000 bp, 2.000 bp, 1.500 bp, 603 bp, 500 bp, 350 bp, 281 bp. Έκτη ομάδα αποτελεί η απομόνωση 6.5ΑΒ που απομονώθηκε από τα Καλά Νερά και φέρει ζώνες στα 10.000 bp, 8.000 bp, 2.000 bp, 1.500 bp, 603 bp, 500 bp, 350 bp, 281 bp. Έβδομη ομάδα αποτελεί η απομόνωση 8.1.2Α1 που απομονώθηκε από τον οικιστικό ιστό του Βόλου και φέρει ζώνες στα 10.000 bp, 1.500 bp, 603 bp, 500 bp, 350 bp. Όγδοη ομάδα αποτελούν οι απομονώσεις 9.1.1Α1 και 9.1.2Α1 που απομονώθηκαν από τον οικιστικό ιστό του Βόλου και φέρουν ζώνες στα 10.000 bp, 8.000 bp, 2.000 bp, 1.500 bp, 603 bp, 500 bp, 350 bp. Ένατη ομάδα αποτελεί η απομόνωση 10.1.1 που απομονώθηκε από τον οικιστικό ιστό του Βόλου και φέρει ζώνες στα 10.000 bp, 2.000 bp, 1.500 bp, 603 bp, 500 bp, 350 bp.

Τα αποτελέσματα της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε με τους εκκινητή BOXAIR1 δεν κατέστησαν εφικτή την ταξινόμηση των απομονώσεων από όγκους σε φυτά πικροδάφνης σε ομάδες. Ωστόσο ξεχώρισαν η απομόνωση 6.3ΑΒ που απομονώθηκε από την Κάτω Γατζέα φέρει ζώνες στα 1.353 bp, 1.000 bp, 766 bp, 500 bp και η απομόνωση 6.1Α που απομονώθηκε από την Κάτω Γατζέα και φέρει ζώνες στα 1.078 bp, 872 bp, 603 bp, 500 bp.



Εικόνα 25: Αποτελέσματα ERIC-BOX PCR για τις απομονώσεις βακτηρίων από φυτά πικροδάφνης σε πηκτή αγαρόζης. Όπου 1Kb: 1 kb Ladder (NEB) , φX: φX174 DNA-HaeIII Digest (NEB) και LM: Low Molecular Weight DNA Ladder (NEB). 1: 1.1M1, 2: 1.5A, 3: 2.3.1A1, 4: 2.3.2β2, 5: 2.3.3A1, 6: 2.5A2, 7: 5.3AB, 8: 5.4AB, 9: 6.1A, 10: 6.3AB, 11: 6.5AB, 12: 8.1.2A1, 13: 9.1.1A1, 14: 9.1.2A1, 15: 10.1.1

Πίνακας 4: Ομαδοποίηση απομονώσεων βάσει αποτελεσμάτων ERIC- PCR

ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ	ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ
ΟΜΑΔΑ I	2.3.1A1 , 2.5A2, 2.3.3A1, 1.1M1
ΟΜΑΔΑ II	2.3.2β2
ΟΜΑΔΑ III	1.5A
ΟΜΑΔΑ IV	5.4AB, 5.3AB
ΟΜΑΔΑ V	6.3AB
ΟΜΑΔΑ VI	6.5AB
ΟΜΑΔΑ VII	8.1.2A1
ΟΜΑΔΑ VIII	9.1.1A1, 9.1.2A1
ΟΜΑΔΑ IX	10.1.1

Πίνακας 5: Αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμών και PCR των εξεταζόμενων απομονώσεων (-): OXI, (+): NAI

Για τη χρώση Gram: - : Συμβολισμός Gram αρνητικών βακτηρίων

α/α	Απομονώσεις	Χρώση Gram	Αντίδραση υπεραισθησίας	Λεβάνη	Παραγωγή Πηκτινολυτικών Ενζύμων	Φθορισμός	PCR
1	1.1M1	-	+	-	-	-	
2	1.5A	-	+	-	-	-	
3	2.3.1Λ1	-	+	-	-	-	+
4	2.3.2β2	-	+	-	-	-	+
5	2.3.3Λ1	-	+	-	-	-	
6	2.5Λ2	-	+	-	-	-	+
7	5.3ΛB	-	+	-	-	-	+
8	5.4ΛB	-	+	-	-	-	+
9	6.1Λ	-	-	-	-	-	+
10	6.3ΛB	-	+	-	-	-	+
11	6.5ΛB	-	+	-	-	-	+
12	8.1.2Λ1	-	+	+ -	-	-	+

13	9.1.1A1	-	+	++	-	-	+
14	9.1.2A1	-	+	+-	-	-	+
15	10.1.1	-	+	-	-	-	+
16	1.1K1	-					
17	2.1.1P2B	-	-				
18	2.2.2K1	-					
19	2.5K2	-	+				
20	8.1.1K1	-					
21	8.1.1K2	-	-				+
22	8.1.2K	-	+				
23	8.1.4K2		+				

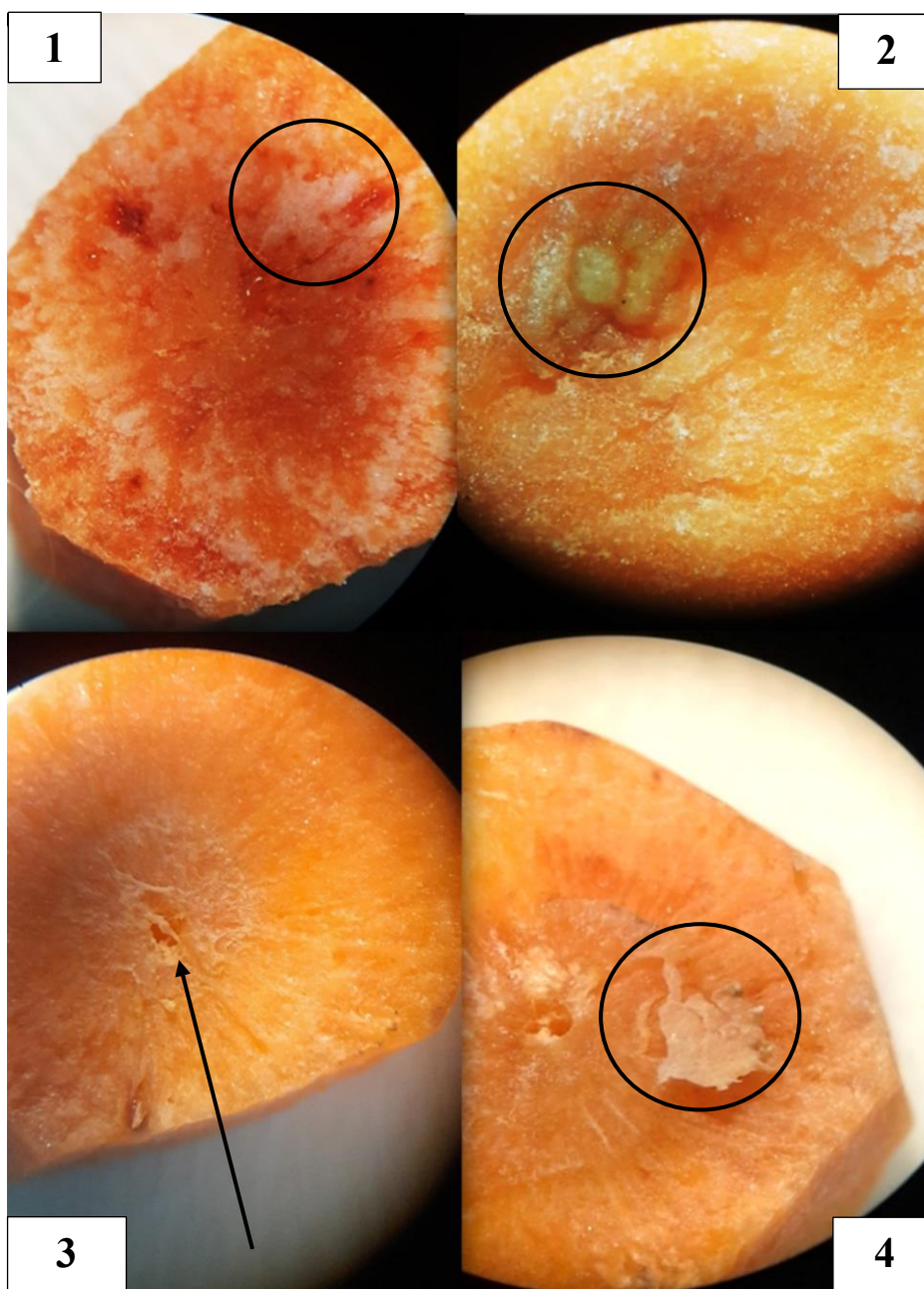
3.6 *In vitro* βιοδοκιμές παθογένειας

3.6.1 Δημιουργία όγκων σε κομμάτια καρότου

Η δοκιμή για δημιουργία όγκων στα κομμάτια καρότου επαναλήφθηκε δύο φορές. Στην πρώτη δοκιμή οι παρατηρήσεις λήφθηκαν 13 ημέρες μετά την τοποθέτηση τμήματος αποικίας εντός του βοθρίου του τμήματος του κονδύλου καρότου. Στη δεύτερη δοκιμή, όπου έγινε εφαρμογή 10 μL υγρής καλλιέργειας, οι παρατηρήσεις έγιναν 29 ημέρες μετά. Οι απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 2.5K2, 2.5A2 οι οποίες προήλθαν από το ίδιο φυτό και από τον ίδιο όγκο. Σκοπός της επιλογής τους ήταν ο έλεγχος για την ενδεχόμενη συνεργιστική δράση των δύο απομονώσεων για την δημιουργία όγκων. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η βακτηριακή απομόνωση Pss4 ως θετικός μάρτυρας και ως αρνητικός μάρτυρας το αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό.

Αποτελέσματα για την 1^η δοκιμή:

- 1) Απομόνωση 2.5A2:** Τα κομμάτια καρότου ύστερα από παρατήρηση στο στερεοσκόπιο φαίνεται ότι εμφάνισαν ελάχιστη διόγκωση της επιδερμίδας και σχηματίστηκαν κρύσταλλοι στην πάνω επιφάνεια όπου έγινε η μόλυνση με το βακτήριο. Δεν σχηματίστηκαν όγκοι (Εικόνα 26. 1).
- 2) Απομόνωση 2.5K2 :** Ύστερα από παρατήρηση στο στερεοσκόπιο παρατηρήθηκε ότι σε ένα κομμάτι καρότου δημιουργήθηκαν στην πάνω επιφάνεια της τομής και κοντά στο βοθρίο υπερπλασίες που θυμίζουν μικρούς όγκους (Εικόνα 26. 2).
- 3) Αρνητικός μάρτυρας dsH2O:** Τα κομμάτια καρότου στην περίπτωση αυτή δεν εμφάνισαν σχηματισμό όγκου ούτε κάποιο σύμπτωμα ή σημείο (Εικόνα 26. 3).
- 4) Απομόνωση Pss4:** Δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός όγκων. Σε ένα κομμάτι παρατηρήθηκε ξεφλούδισμα και νέκρωση σε σημείο της πάνω επιφάνειας του καρότου περιφερειακά από το βοθρίο. Το δεύτερο κομμάτι καρότου στο ίδιο τρυβλίο, μαύρισε στο σημείο του βοθρίου και πιθανώς να υπήρχε δευτερογενής μόλυνση από σαπρόφυτα (Εικόνα 26. 4).



Εικόνα 26: Αποτελέσματα από την πρώτη δοκιμή για δημιουργία όγκων σε κομμάτια καρότου. 1) Απομόνωση 2.5Λ2: Δημιουργία κρυστάλλων στην πάνω επιφάνεια του καρότου και περιφερειακά από το σημείο του νύγματος, 2) Απομόνωση 2.5K2: Δημιουργία σχηματισμού υπερπλασιών στην πάνω επιφάνεια της φέτας του καρότου που θυμίζουν μικρούς όγκους, 3) Αρνητικός μάρτυρας dsH_2O : Καμία εμφάνιση συμπτωμάτων, 4) Απομόνωση Pss4: Ξεφλούδισμα και νέκρωση τμήματος της πάνω επιφάνειας του καρότου

Αποτελέσματα για την 2^η δοκιμή:

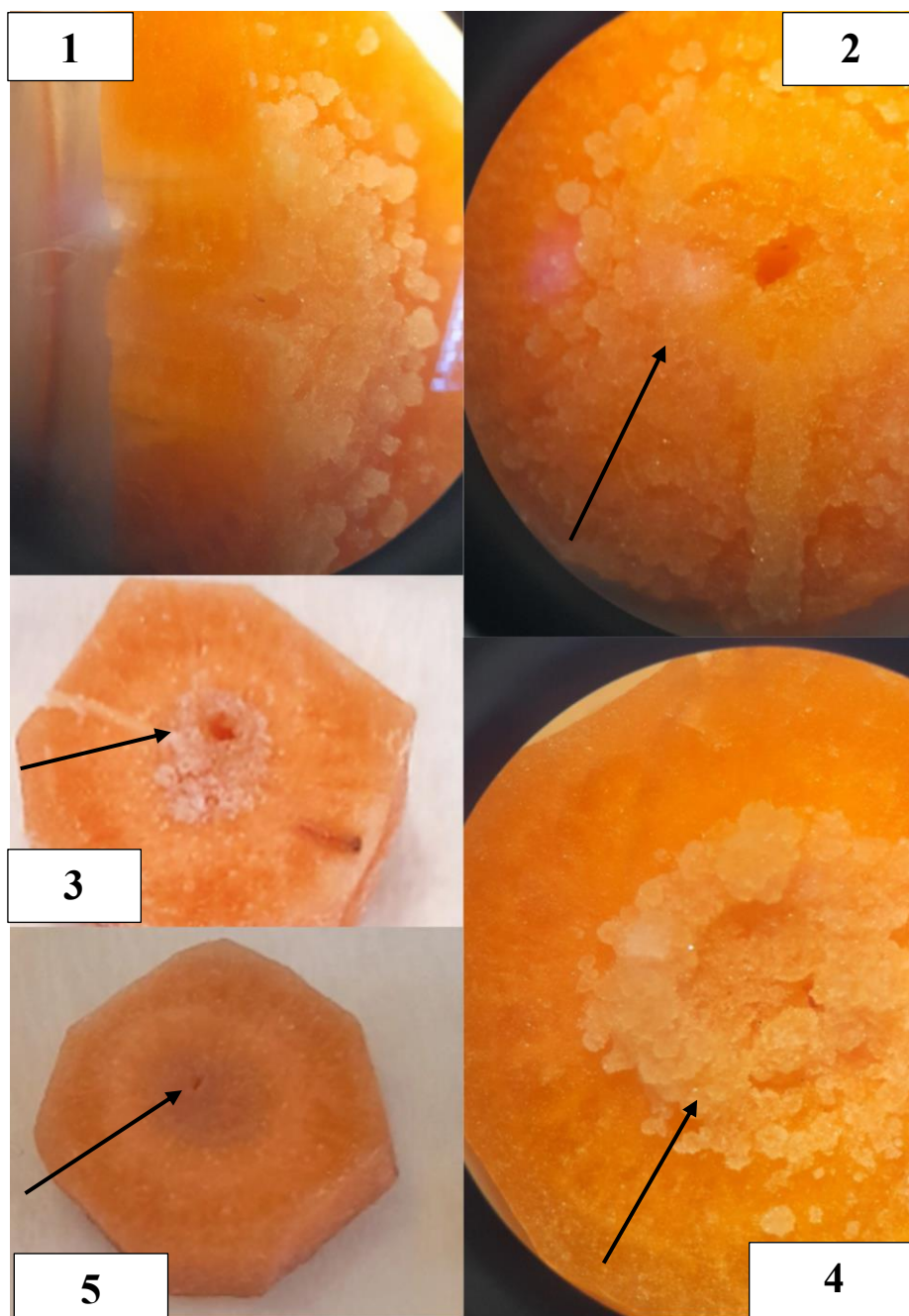
1)Απομόνωση 2.5Λ2: Παρατηρήθηκαν σχηματισμοί που μοιάζουν με κρυστάλλους σε σφαιρικό σχήμα στην πάνω επιφάνεια του καρότου και περιφερειακά του βοθρίου (Εικόνα 27. 1).

2) Απομόνωση 2.5 K2: Παρατηρήθηκαν σχηματισμοί που μοιάζουν με κρυστάλλους στην πάνω επιφάνεια του καρότου και περιφερειακά του βοθρίου (Εικόνα 27. 2).

3) Αρνητικός μάρτυρας dsH_2O : Δημιουργία κρυστάλλων περιφερειακά του βοθρίου (Εικόνα 27. 3).

4)Απομόνωση Pss4: Παρατηρήθηκαν σχηματισμοί που μοιάζουν με κρυστάλλους περιφερειακά του βοθρίου στο κέντρο του καρότου (Εικόνα 27. 4).

5) Απομονώσεις 2.5K2 και 2.5Λ2: Μετά από ταυτόχρονη μόλυνση με τις απομονώσεις 2.5K2 και 2.5Λ2 παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχε κάποια επίδραση στα κομμάτια καρότου εφόσον δεν δημιουργήθηκαν υπερπλασίες ή άλλοι σχηματισμοί (Εικόνα 27. 5)



Εικόνα 27: Αποτελέσματα από την δεύτερη δοκιμή για την δημιουργία όγκων σε κομμάτια καρότου. 1) Απομόνωση 2.5Λ2: Δημιουργία κρυστάλλων σφαιρικού σχήματος στην πάνω επιφάνεια του καρότου και περιφερειακά από το βοθρίο, 2) Απομόνωση 2.5Κ2: Δημιουργία κρυστάλλων σφαιρικού σχήματος στην πάνω επιφάνεια του καρότου και περιφερειακά από το βοθρίο, 3) Αρνητικός μάρτυρας dsH₂O: Δημιουργία κρυστάλλων περιφερειακά του νύγματος, 4) Απομόνωση Pss4: Δημιουργία κρυστάλλων σφαιρικού σχήματος περιφερειακά του βοθρίου 5) Ταυτόχρονη μόλυνση με απομονώσεις 2.5Κ2+2.5Λ2: Δημιουργία σχηματισμού κρυστάλλων περιφερειακά του βοθρίου

3.6.2 Δημιουργία όγκων σε φύλλα πικροδάφνης

Η πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές. Οι παρατηρήσεις για την πρώτη επανάληψη έγιναν 29 ημέρες μετά την παραμονής τους στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών σε θερμοκρασία 25 °C και για την δεύτερη επανάληψη 28 ημέρες μετά. Οι απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν οι 2.5K2, 2.5Λ2 οι οποίες απομονώθηκαν από το ίδιο φυτό και από τον ίδιο όγκο. Σκοπός της επιλογής τους ήταν ο έλεγχος για την ενδεχόμενη συνεργατική δράση των δύο απομονώσεων για την δημιουργία όγκων. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η βακτηριακή απομόνωση Pss4 και ως αρνητικός μάρτυρας το αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό.

Αποτελέσματα για την 1^η βιοδοκιμή:

1)Απομόνωση 2.5Λ2: Παρατηρήθηκε η ανάπτυξη όγκων τόσο στο σημείο που έγινε ο εμβολιασμός δηλαδή πάνω στο κεντρικό νεύρο αλλά και στις άκρες των κομματιών των φύλλων στο τέλος των ηθμαγγειωδών δεσμίδων. Οι όγκοι που παρατηρήθηκαν ήταν πολύ μικροί σε μέγεθος (1-2 mm), ήταν ορατοί με γυμνό οφθαλμό με χρώμα από υπόλευκο έως σκούρο καφέ. Επίσης δημιουργήθηκαν χλωρώσεις στην πάνω και κάτω επιφάνεια των φύλλων (Εικόνα 28: 1).

2) Απομόνωση 2.5K2: Δεν παρατηρήθηκαν όγκοι στο βοθρίο πάνω στο κεντρικό νεύρο (Εικόνα 24) ούτε στα άκρα του κομματιών των φύλλων. Όγκοι λευκού χρώματος παρατηρήθηκαν στο τέλος του κεντρικού νεύρου και εμφανίστηκε ξήρανση σε επιδερμικά κυττάρων που βρίσκονται κοντά στο σημείο που έγινε ο εμβολιασμός. Δεν δημιουργήθηκαν χλωρωτικές κηλίδες στην επιφάνεια των κομματιών των φύλλων όπως στην περίπτωση προσβολής με την απομόνωση 2.5Λ2 (Εικόνα 28: 2).

3)Απομόνωση Pss4: Σχηματίστηκαν όγκοι στην άκρη του φύλλου με λευκό έως υπόλευκο χρωματισμό, μικρό μέγεθος. Επιπλέον στο σημείο του κεντρικού νεύρου δημιουργήθηκαν όγκοι εκατέρωθεν αυτού (Εικόνα 28: 3).

4)Αρνητικός μάρτυρας dsH2O: Τα κομμάτια φύλλων δεν εμφάνισαν όγκους τόσο στο βοθρίο στο κεντρικό νεύρο όσο και στις άκρες των κομματιών των φύλλων Ωστόσο στο άκρο του κεντρικού νεύρου στο σημείο της τομής παρατηρήθηκε η δημιουργία όγκων λευκού χρώματος (Εικόνα 28 : 4).



Εικόνα 28: Αποτελέσματα για την 1^η επανάληψη βιοδοκιμής για την δημιουργία όγκων σε φύλλα πικροδάφνης. 1) Απομόνωση 2.5Δ2: Όγκοι υπόλευκου χρώματος στο βοθρίο στο κεντρικό νεύρο(αριστερά) και όγκοι υπόλευκου και καφέ χρώματος στις άκρες των φύλλων (δεξιά), 2) Απομόνωση 2.5K2: Βοθρίο στο κεντρικό νεύρο χωρίς δημιουργία όγκων(αριστερά) και δημιουργίας σχηματισμών που μοιάζουν με όγκους λευκού χρώματος στο σημείο τομής του κεντρικού νεύρου (δεξιά), 3) Απομόνωση Pss4: Όγκοι εκατέρωθεν από το βοθρίο στο κεντρικό νεύρο (αριστερά) και στα άκρα των τμημάτων των φύλλων (δεξιά), 4) Αρνητικός μάρτυρας dsH₂O: Σχηματισμοί όγκων στο άκρο του κεντρικού νεύρου του τμήματος φύλλου (αριστερά) και απουσία σχηματισμών όγκων στο βοθρίο του κεντρικού νεύρου (δεξιά)

Αποτελέσματα για την 2^η βιοδοκιμή:

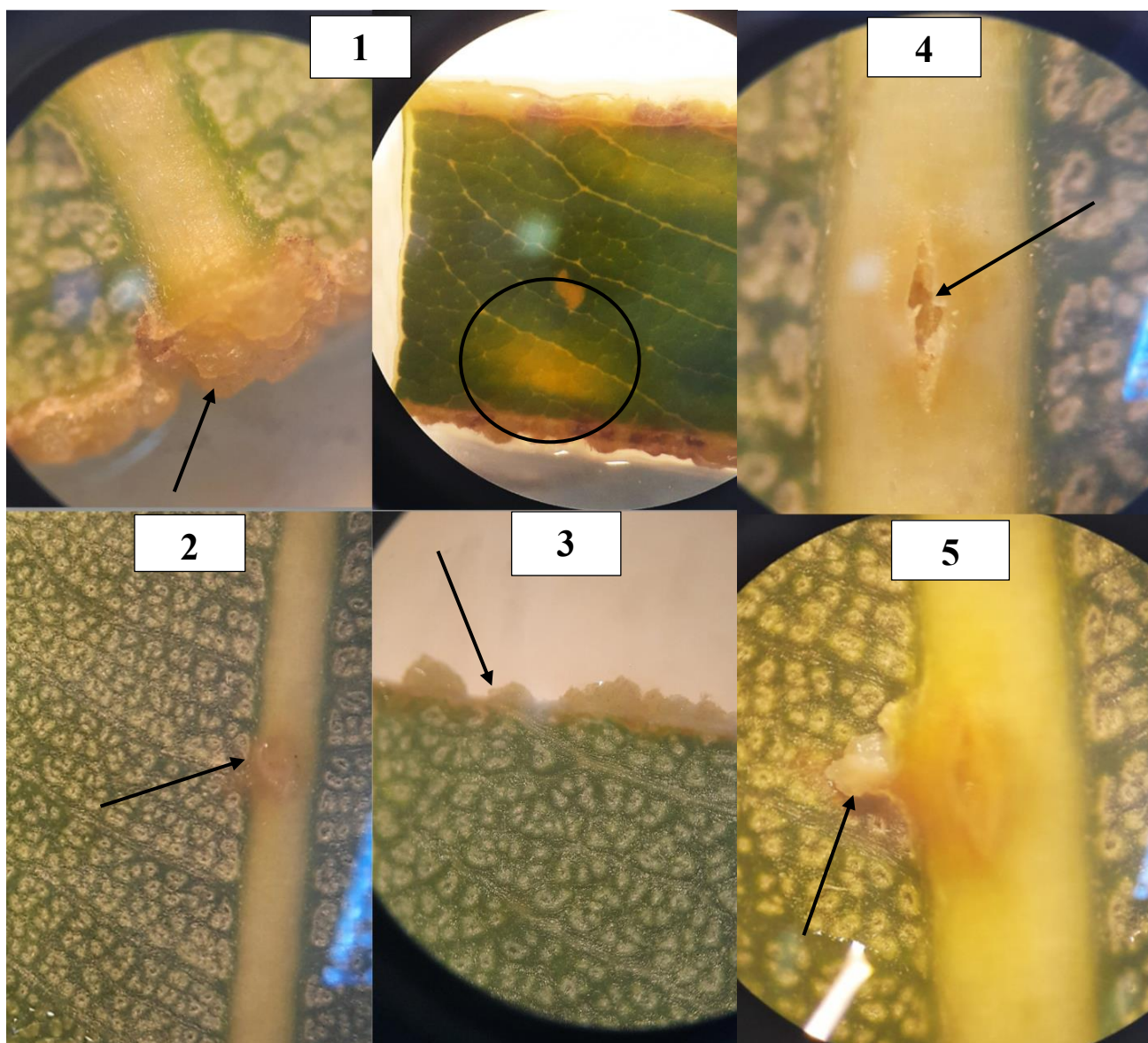
1) Απομόνωση 2.5Λ2: Παρατηρήθηκαν όγκοι στις άκρες των τμημάτων των φύλλων μικρού μεγέθους σε υπόλευκο έως μπεζ χρωματισμό. Εμφανίστηκε και χλώρωση στην πάνω και κάτω μεριά των προσβεβλημένων τμημάτων φύλλων. Στο βοθρίο στο κεντρικό νεύρο δεν εμφανίστηκαν σχηματισμοί όγκων (Εικόνα 29. 1).

2) Απομόνωση 2.5Κ2: Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη σχηματισμών όγκων στα τμήματα των φύλλων (Εικόνα 29. 2).

3) Απομόνωση Pss4: Σχηματισμοί που μοιάζουν με όγκους δημιουργήθηκαν στα άκρα των τμημάτων των φύλλων και εκατέρωθεν του βοθρίου στο κεντρικό νεύρο (Εικόνα 29.3).

4)Αρνητικός μάρτυρας dsH₂O: Τα τμήματα φύλλων δεν εμφάνισαν όγκους τόσο στο βοθρίο στο κεντρικό νεύρο όσο και στις άκρες των τμημάτων των φύλλων (Εικόνα 29. 4).

5) Απομονώσεις 2.5Κ2 και 2.5Λ2: Μετά από ταυτόχρονη μόλυνση με τις απομονώσεις 2.5Κ2 και 2.5Λ2 παρατηρήθηκε η ανάπτυξη σχηματισμού που μοιάζει με όγκο με υπόλευκο χρώμα παράπλευρα του βοθρίου στο κεντρικό νεύρο του τμήματος του φύλλου πικροδάφνης (Εικόνα 29: 5).



Εικόνα 29: Αποτελέσματα για την 2^η επανάληψη βιοδοκιμής για δημιουργία όγκων σε φύλλα πικροδάφνης. 1) Απομόνωση 2.5Λ2: Σχηματισμοί όγκων στο σημείο τομής του κεντρικού νεύρου και χλωρωτικές κηλίδες σε φύλλα, 2) Απομόνωση 2.5 K2: Απουσία σχηματισμού όγκων, 3) Απομόνωση Pss4: Δημιουργία όγκων στις άκρες των τμημάτων των φύλλων, 4) Αρνητικός μάρτυρας dsH₂O: Απουσία σχηματισμού όγκων, 5) Ταυτόχρονη μόλυνση με απομονώσεις 2.5K2+2.5Λ2: Δημιουργία σχηματισμού όγκων εκατέρωθεν του βοθρίου στο κεντρικό νεύρο

2.6.3 Δημιουργία όγκων σε βλαστούς πικροδάφνης

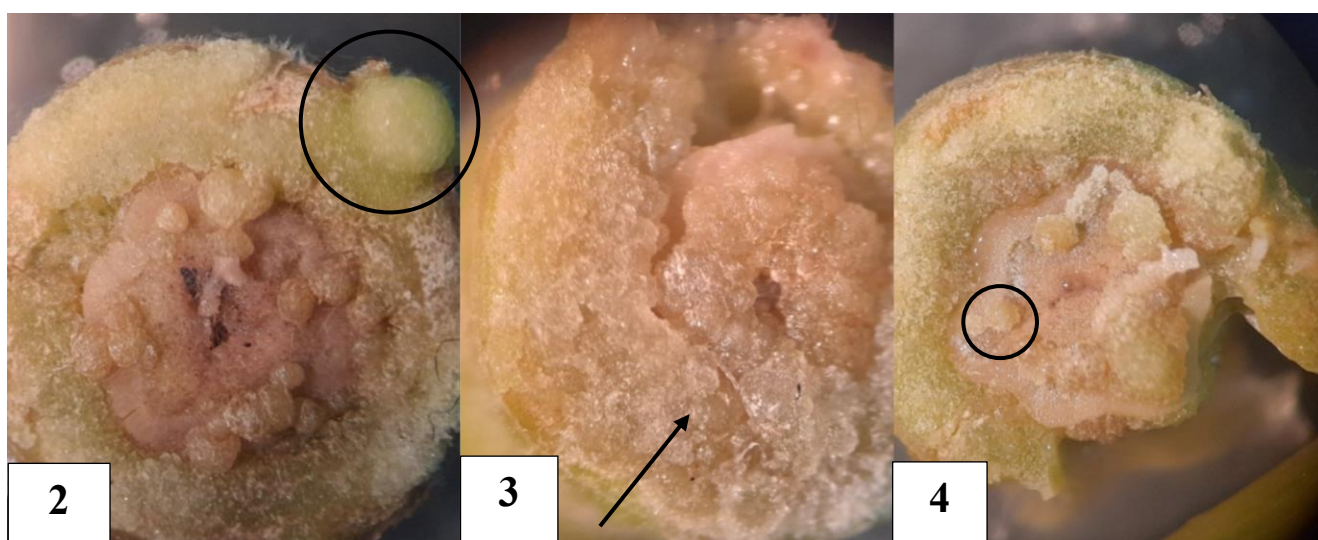
Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε χωρίς επανάληψη και αποτέλεσε αντικείμενο προκαταρκτικής εξέτασης για την δημιουργία όγκων σε βλαστούς πικροδάφνης. Οι παρατηρήσεις λήφθηκαν ύστερα από 29 ημέρες μετά την επώαση τους στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών σε θερμοκρασία 25 °C. Οι απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν οι 2.5K2, 2.5Λ2 οι οποίες απομονώθηκαν από το ίδιο φυτό και από τον ίδιο όγκο. Σκοπός της επιλογής τους ήταν ο έλεγχος για την ενδεχόμενη συνεργατική δράση των δύο απομονώσεων για την δημιουργία όγκων. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η βακτηριακή απομόνωση Pss4 και ως αρνητικός μάρτυρας το αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό dsH₂O.

1) Απομόνωση 2.5Λ2: Τα τμήματα των βλαστών εμφάνισαν ανάπτυξης μύκητα στην πάνω επιφάνεια τους. Επομένως δεν ήταν δυνατή η λήψη παρατηρήσεων.

2) Απομόνωση 2.5K2: Στα τμήματα βλαστών παρατηρήθηκε η δημιουργία υπερπλασιών που μοιάζουν με όγκους. Στο κέντρο του βλαστού όπου λαξεύτηκε το βοθρίο είναι εμφανής η παραμόρφωση του ιστού με την δημιουργία υπερπλασίας που θυμίζει όγκο όπως και στη μία πλευρά του τμήματος του βλαστού είναι ορατός ένας μεγάλος όγκος (Εικόνα 30. 2).

3) Απομόνωση Pss4: Ο κεντρικός ιστός του βλαστού εμφανίζει σπογγώδη υφή και εκτεταμένη παραμόρφωση αφού δεν είναι διακριτή η παρουσία των ηθμαγγειωδών δεσμίδων λόγω της έντονης δημιουργίας υπερπλασιών (Εικόνα 30. 3)

4) Αρνητικός μάρτυρας dsH₂O: Τα κομμάτια των βλαστών εμφάνισαν ανάπτυξη σχηματισμών μικρών όγκων κοντά στην περιοχή που λαξεύτηκε το βοθρίο δηλαδή κοντά στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Ωστόσο μορφολογικά η εικόνα του βλαστού δεν έχει αλλάξει συγκριτικά με τις προηγούμενες παρατηρήσεις. Στην περιφέρεια του τμήματος του βλαστού παρατηρήθηκε ελαφρά διόγκωση χωρίς να συνοδεύεται από την δημιουργία όγκων (Εικόνα 30. 4).



Εικόνα 30: Αποτελέσματα από την παρατήρηση για δημιουργία όγκων σε κομμάτια βλαστών πικροδάφνης.

2) Απομόνωση 2.5K2: Σχηματισμός υπερπλασιών και όγκων στην περιοχή των ηθμαγγειωδών δεσμίδων και περιφερειακά της επιφάνειας του βλαστού 3) Απομόνωση Pss4: Εκτεταμένη παραμόρφωση του βλαστού λόγω εκτεταμένης υπερπλασίας. Δεν είναι ευδιάκριτη η παρουσία ηθμαγγειωδών δεσμίδων, 4) Αρνητικός μάρτυρας dsH_2O : Ανάπτυξη σχηματισμών όγκων/υπερπλασιών κοντά στην περιοχή του βοθρίου.

4. Συζήτηση

Οι βακτηριακές απομονώσεις 1.5A, 1.1M1, 2.3.1A2, 2.3.2B2, 2.3.3A1, 2.5A2, 5.3AB, 5.4AB, 6.1A, 6.3AB, 6.5AB, 8.1.1A1, 9.1.1A1, 9.1.2A1, 10.1.1 προήλθαν από όγκους σε φύλλα και βλαστούς προσβεβλημένων φυτών πικροδάφνης. Η μορφολογία των αποικιών ταιριάζει με τα χαρακτηριστικά που τους αποδίδουν οι Kavak et al. (2009), Mirik et al. (2011) και ο Smith (1906) καθώς σε θρεπτικό υλικό King's B οι αποικίες ήταν λευκές έως υπόλευκες, σφαιρικές και κρεμώδεις. Η ένδειξη παραγωγής λεβάνης αφορά την μορφολογία των αποικιών αφού σύμφωνα με τους Lelliot et al. (1996) οι μεγάλες, λευκές, βλεννώδεις αποικίες υποδεικνύουν το σχηματισμό αυτού του μεταβολίτη. Από τις 15 λευκές απομονώσεις οι 12 δεν παρήγαγαν λεβάνης αφού δεν είχαν βλεννώδη μορφή ενώ η 9.1.1A1 ήταν η μόνη βλεννώδης. Σε θρεπτικό υπόστρωμα NSA και οι 8.1.2A1, 9.1.2A1 έχουν ενδιάμεση σύσταση υφής.

Σύμφωνα με τους Kavak and Üstün (2009) το βακτήριο που απομονώθηκε από φυτά πικροδάφνης στην Τουρκία, ήταν αρνητικό ως προς την παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων. Αντιθέτως σύμφωνα με τους González et al. (2003), στελέχη βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* sp. από την χώρα της Ισπανίας παρουσίασαν πηκτινολυτική δραστηριότητα όταν σε τμήματα κονδύλων πατάτας έδωσαν καφέ έως μαύρες ζώνες σήψης μεγέθους 0 έως περίπου 10 mm. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη δεν προκάλεσαν σήψη και καφέ μεταχρωματισμό σε φέτες πατάτας, αποτέλεσμα που συμφωνεί με τους Kavak and Üstün (2009).

Κατά τον έλεγχο των απομονώσεων καμία από τις 15 απομονώσεις που εξετάστηκαν δεν εμφάνισε φθορισμό. Σύμφωνα με τους Lelliot et al. (1966) ορισμένα είδη του γένους *Pseudomonas* μπορούν να προκαλούν φθορισμό. Συγκεκριμένα κατά την παρατήρηση σε UV ακτινοβολία, βακτηριακών απομονώσεων του είδους *Pseudomonas aeruginosa* σύμφωνα με τους Banerjee et al. (2017), παρατηρείται χαρακτηριστικός μπλε έως πράσινος χρωματισμός λόγω παραγωγής πυοβερδίνης. Από μελέτες για το παθότυπο του είδους *Pseudomonas savastanoi* που προσβάλλει την πικροδάφνη φαίνεται ότι ορισμένες απομονώσεις φθορίζουν (Mirik et al. 2011). Ωστόσο οι Kavak and Üstün (2009) αναφέρουν ότι στο ίδιο θρεπτικό υλικό KB απομονώσεις που λήφθηκαν από όγκους προσβεβλημένων φυτών από διαφορετικές περιοχές φθορίζουν ή φθορίζουν ελάχιστα έως καθόλου. Τέλος οι Kudela et al. (2005) επισημαίνουν πως τους όγκους των προσβεβλημένων φυτών μπορούν να τους εκμεταλλευτούν δευτερογενείς σαπροφυτικοί οργανισμοί μη φθορίζοντες.

Όσον αφορά τις δοκιμές υπεραισθησίας σε φυτά καπνού, οι οποίες επαναλήφθηκαν δύο φορές, από τις 15 λευκές απομονώσεις, οι 14 λευκές έδωσαν αντίδραση υπεραισθησίας με δημιουργία ξήρανσης όπως αναφέρεται και από τους Kavak and Üstün (2009) ενώ η αποικία 6.1Α ήταν η μόνη λευκή αποικία που δεν έδωσε αντίδραση υπεραισθησίας παρότι επαναλήφθηκε δύο φορές. Η αποικία 6.1Α ήταν η μόνη αποικία από τις λευκές οι οποίες είχε μικρότερη και πιο αργή ανάπτυξη σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα KB και NSA.

Αναφορικά με τις μοριακές τεχνικές η αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης έδωσε θετικό αποτέλεσμα και για τις 12 λευκές απομονώσεις που εξετάστηκαν. Αυτό μας επιτρέπει να χαρακτηρίσουμε το παθογόνο ως Psn ή Psv. Το προϊόν της PCR για τις εξεταζόμενες βακτηριακές απομονώσεις ήταν 454 bp. Σύμφωνα με τον Penyalver et al. (2000) το προϊόν της PCR είχε ακριβώς ίδιο μέγεθος για τα στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* που μελέτησε. Το γεγονός ότι το βακτήριο απομονώθηκε από όγκους πικροδάφνης που είναι ο φυσικός ξενιστής του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* αποτελεί ένδειξη για την παρουσία του συγκεκριμένου παθότυπου αφού σύμφωνα με τους Ramos et al. (2012) βρέθηκε ότι το Psn μπορεί να προσβάλλει την πικροδάφνη την ελιά αλλά το Psv μόνο την ελιά. Για να διαπιστωθεί ακριβώς αν οι απομονώσεις που μελετήθηκαν είναι απομονώσεις του βακτηρίου Psn ή Psv, σύμφωνα με τους Matas et al. (2009) συνίσταται η εφαρμογή μοριακών τεχνικών όπως η nested-PCR με χρήση διαφορετικών εκκινητών που αυξάνουν την ευαισθησία και την εξειδίκευση της μεθόδου για το συγκεκριμένο παθότυπο αλλά και η εφαρμογή περιοριστικών ενζύμων (RFLPs) όπως το ένζυμο HaeIII το οποίο αναγνωρίζει και κόβει μία συγκεκριμένη περιοχή από την αλληλουχία μήκους 454 bp του γονιδίου *iaaL* που συμπίπτει με το προϊόν της PCR. Ειδοποιός διαφορά μεταξύ των βακτηρίων Psv και Psn είναι και η θέση του γονιδίου *iaaL* σύμφωνα με τους Matas et al. (2009). Συγκεκριμένα το γονίδιο *iaaL* το οποίο εμφανίζεται σε δύο αντίγραφα στο βακτήριο Psn εντοπίζεται στο πλασμίδιο κυρίως, ενώ στο βακτήριο Psv συναντάται στο χρωμοσωμικό γονιδίωμα. Συνίσταται επομένως η εφαρμογή τεχνικών όπως η απομόνωση των πλασμιδίων όπως αναφέρεται και από τους Pérez-Martínez et al. (2008) από τις βακτηριακές απομονώσεις προκειμένου να διεξαχθεί συμπέρασμα για τον παθότυπο του είδους *Pseudomonas savastanoi* που μελετήθηκε.

Με την εφαρμογή βιοδοκιμών στο καρότο και σε φύλλα πικροδάφνης επιδιώχθηκε η αξιολόγηση ικανότητας δημιουργίας όγκων από βακτηριακές απομονώσεις. Όπως επισημαίνεται και από τους Fodor et al. (2024) οι βιοδοκιμές σε τμήματα κονδύλων καρότου αποτελούν μία απλή και γρήγορη μέθοδος για έλεγχο παθογένειας βακτηρίων όπως το *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* με την εμφάνιση των ορατών συμπτωμάτων να γίνεται από 9

έως 20 ημέρες. Σύμφωνα με την Bella et al. (2006) οι δοκιμές παθογένειας σε φυτά είναι δύσκολες να εφαρμοστούν λόγω του μεγάλου όγκου των πειραματικών μονάδων που απαιτούνται αλλά και γιατί τα πρώτα ορατά αποτελέσματα λαμβάνονται μετά από 8 έως 10 εβδομάδες. Οι απομονώσεις που επιλέχθηκαν ήταν η λευκή 2.5Λ2 και η κίτρινη 2.5Κ2 που απομονώθηκαν από το ίδιο φυτό και από τον ίδιο όγκο. Σκοπός της επιλογής τους ήταν η διερεύνηση της δράσης τους δηλαδή για το αν δρουν συνεργιστικά και αν για την δημιουργία όγκων είναι απαραίτητη η παρουσία και των δύο αποικιών. Σύμφωνα με τους Marchi et al. (2006) σε όγκους προσβεβλημένων φυτών ελιάς βρέθηκε το *Pantoea agglomerans* που σχηματίζει κίτρινες αποικίες και έντονη έκφραση συμπτωμάτων βοηθώντας επίσης και στην πιο έντονη συμπτωματολογία και στον γρηγορότερο πολλαπλασιασμό του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Σε μελλοντική έρευνα θα μπορούσαν να μελετηθεί αν για την δημιουργία όγκων στο φυτό της πικροδάφνης είναι απαραίτητα και η παρουσία άλλων βακτηρίων εκτός από βακτήρια του γένους *Pseudomonas*.

Για τις δοκιμές παθογένειας στο καρότο η μόνη ορατή ένδειξη σχηματισμών όγκων εμφανίστηκαν κατά την πρώτη επανάληψη της δοκιμής από την απομόνωση 2.5Κ2. Η απομόνωση 2.5Λ2 και στις δύο επαναλήψεις έδωσε στην επιφάνεια του καρότου σχηματισμούς που θυμίζουν κρυστάλλους τόσο κοντά στην περιοχή του βοθρίου όσο και διάσπαρτους στην πάνω επιφάνεια του καρότου. Οι Heredia-Ponce et al. (2021) αναφέρουν ότι τα φυτοπαθογόνα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, παράγουν εξωπολυσακχαρίτες όπως κυτταρίνη και οι οποίοι συμβάλλουν στην δημιουργία εξωκυτταρικού βιοφίλμ. Η παρουσία κρυσταλλοειδών δομών στην επιφάνεια του τμήματος του κονδύλου καρότου μπορεί να οφείλεται σε εξωπολυσακχαρίτες που παράγονται επομένως από το βακτήριο. Οι κρυσταλλικές αυτές δομές ωστόσο παρατηρήθηκαν και σε τμήματα κονδύλου καρότου στα οποία έγινε εφαρμογή μόνο αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού. Οι Doksöz and Bozkurt (2020) αναφέρουν ότι στα τμήματα κονδύλων καρότου στα οποία τοποθετήθηκε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό υπήρχε απουσία σχηματισμού όγκων όπως και κρυσταλλοειδών δομών. Επομένως η παρουσία των σχηματισμών αυτών μπορεί να μην σχετίζεται αποκλειστικά με το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* αλλά ίσως να είναι αποτέλεσμα αποσύνθεσης των φυτικών κυττάρων και συγκέντρωσης των φυσικών σακχάρων που υπάρχουν στα καρότα. Σύμφωνα με τον Suojala (2000) με αναφορά τους στους Ricardo and Soria (1974) οι περισσότερες από τις ενώσεις που αποθηκεύονται στους χώρους των παρεγχυματικών κυττάρων του καρότου είναι υδατοδιαλυτά σάκχαρα που αποτελούν το 34% με 70% του ξηρού βάρους του.

Για τα φύλλα πικροδάφνης και στις δύο επαναλήψεις της δοκιμής βάσει πρωτοκόλλου των Bella et al. (2006), παρατηρήθηκε ότι η απομόνωση 2.5K2 δεν προκαλεί δημιουργία όγκων. Η απομόνωση 2.5Λ2 και στις δύο επαναλήψεις προκάλεσε τον σχηματισμό όγκων αλλά και χλωρωτικών κηλίδων στα τμήματα των φύλλων. Κατά την ταυτόχρονη μόλυνση από υγρές καλλιέργειες των απομονώσεων 2.5K2 και 2.5Λ2 παρατηρήθηκε όγκος εκατέρωθεν του βοθρίου. Στα φύλλα που έγινε εφαρμογή αποστειρωμένου απεσταγμένου νερό παρατηρήθηκε ότι δεν δημιουργήθηκαν όγκοι στο βοθρίο κάτι το οποίο αναφέρεται και από τους Salman et al. (2022). Η παρουσία ωστόσο όγκων στο σημείο τομής του κεντρικού νεύρου ενδέχεται να είναι ανταπόκριση του φυτού στην πληγή αφού σύμφωνα με τους Ikeuchi et al. (2017) τα κύτταρα μπορούν να μεταδίδουν σήματα τραύματος ενεργοποιώντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον σχηματισμό κάλων. Σε μία ενδεχόμενη επανάληψη της μεθόδου θα επιδιωκόταν η χρήση φύλλων ποικιλίας πικροδάφνης με λευκά άνθη αντί της ποικιλίας πικροδάφνης με ροζ άνθη που χρησιμοποιήθηκε, εφόσον βάσει των Kluchevich et al. (2018) είναι πιο ευαίσθητα στην προσβολή από το βακτήριο Psn. Θα μπορούσε επίσης να γίνει απομόνωση από τους όγκους και διασπορά τους σε εκλεκτικό υπόστρωμα King's B (KB_{cvc}) για να παρατηρηθεί αν αναπτύχθηκε βακτήριο και αν αυτό μοιάζει μορφολογικά με τις απομονώσεις του *Pseudomonas savastanoi*. Η τελική διαπίστωση θα μπορούσε να επιτευχθεί μοριακά με την χρήση της Αντίδρασης Αλυσιδωτής Πολυμεράσης και των εκκινητών IAAI για την παραγωγή προϊόντος PCR ίσο με 454 bp (Salman et al. 2022).

Αναφορικά με τους βλαστούς πικροδάφνης, η πειραματικά δοκιμή πραγματοποιήθηκε μία φορά χωρίς επανάληψη. Αποτέλεσε δηλαδή προκαταρκτική εξέταση για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου βάσει Salman et al. (2022) σε βλαστούς αντί για φύλλα προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα δημιουργίας όγκων. Οι εξεταζόμενες απομονώσεις 2.5K2 και Pss4 φαίνεται να προκάλεσαν στα τμήματα βλαστών όπως ακριβώς συμβαίνει σε φυσικές μολύνσεις από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi*. Ωστόσο ο αρνητικός μάρτυρας που ήταν το αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό, φαίνεται ότι επίσης προκάλεσε την δημιουργία σχηματισμών που θυμίζουν όγκους κυρίως στην περιοχή κοντά στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες δηλαδή εκεί όπου λαξεύτηκε το βοθρίο. Αυτό δείχνει ότι η παρουσία των σχηματισμών αυτών μπορεί να μην σχετίζεται αποκλειστικά με το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* και να είναι αποτέλεσμα του τραυματισμού των φυτικών κυττάρων λόγω της δημιουργίας βοθρίου. Σύμφωνα με τους Ikeuchi et al. (2017) ο τραυματισμός των φυτικών κυττάρων εγείρει τον έντονο κυτταρικό πολλαπλασιασμό ως απόκριση απέναντι στο τραύμα για επούλωση. Σε μία ενδεχόμενη επανάληψη του πειράματος θα επιδιωκόταν η επιλογή βλαστών από ποικιλίες πιο

ευαίσθητες απέναντι στη προσβολή από βακτηριακές απομονώσεις του Psn όπως λευκές ποικιλίες (Bella et al. 2006) αλλά και η αντίστοιχη αντιμετώπιση με αυτή που αναφέρθηκε προηγουμένως για τους όγκους στα κομμάτια φύλλων πικροδάφνης βάσει Salman et al. (2022)

Στις διαφορετικές βακτηριακές απομονώσεις 1-15 του Πίνακα 3 που μελετήθηκαν βρέθηκε ότι υπάρχει γενετική ποικιλομορφία ύστερα από ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCR με εκκινητές ERIC-BOX PCR. Η γενετική ποικιλομορφία εντοπίζεται ακόμα και σε απομονώσεις που συλλέχθηκαν από την ίδια περιοχή αλλά απομονώθηκαν από διαφορετικό όγκο και από διαφορετικά φυτά. Με βάση τα αποτελέσματα της ERIC-PCR, οι απομονώσεις ταξινομήθηκαν σε εννιά ομάδες. Ο διαχωρισμός των ομάδων δείχνει ότι υπάρχει γενετική ποικιλομορφία των βακτηρίων που απομονώθηκαν και από ίδιες αλλά και από διαφορετικές περιοχές. Σύμφωνα με τον Moretti et al. (2017) η εφαρμογή των διαγνωστικών τεχνικών Rep-PCR (ERIC-BOX PCR) κατέστησε δυνατή την γενετική διαφοροποίηση απομονώσεων των παθότυπων *nerii*, *fraxini* από τον παθότυπο *savastanoi* του είδους *Pseudomonas savastanoi*. Ωστόσο μεταξύ των βακτηριακών απομονώσεων του Psn δεν υπήρχε σημαντική γενετική ποικιλομορφία κάτι το οποίο αναφέρεται και από τους Mirik et al. (2011). Η απομόνωση 9 που αντιστοιχεί στην 6.1Λ (Εικόνα 25) δεν έδωσε ζώνες στην ERIC-PCR ενώ στην BOX-PCR έδωσε καθαρές ζώνες. Αυτό μπορεί να αιτιολογηθεί εφόσον οι ERIC και BOX-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της EPPO (2010) αναγνωρίζουν διαφορετικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο γονιδίωμα βάσει των διαφορετικών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε διαδικασία. Επομένως στην 6.1Λ η αλληλουχία του εκκινητή BOXAIR1 υπάρχει στο γονιδίωμα και αναγνωρίζεται από αυτόν ενώ στην ERIC-PCR δεν υπάρχουν οι αλληλουχίες στόχοι για να προσδεθούν οι εκκινητές ERIC1 και ERIC2. Σχετικά με την αδυναμία ομαδοποίησης των απομονώσεων με την BOX-PCR αναφέρεται ότι θα πρέπει να γίνουν πειράματα για βελτιστοποιήσεις των συνθηκών της PCR. Μπορεί αναφορικά να δοκιμαστεί ο διαχωρισμός των προϊόντων της σε 1,5% πηκτή αгарόζης σύμφωνα και με τους Moretti et al. (2017) και Vincente and Roberts (2007) ή να γίνει ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και να αυξηθεί η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης στις 8 ώρες όπως εφάρμοσαν και οι Vincente and Roberts (2007) για την πραγματοποίηση των τεχνικών REP-PCR σε παθότυπους του γένους *Pseudomonas*.

5. Συμπεράσματα

- Οι βακτηριακές απομονώσεις 1.5A, 1.1M1, 2.3.1Λ2, 2.3.2β2, 2.3.3Λ1, 2.5Λ2, 5.3ΛB, 5.4ΛB, 6.1Λ, 6.3ΛB, 6.5ΛB, 8.1.1Λ1, 9.1.1Λ1, 9.1.2Λ1, 10.1.1 που απομονώθηκαν από όγκους σε φύλλα και βλαστούς πικροδάφνης μοιάζουν μορφολογικά, βιοχημικά και μοριακά με τις αποικίες του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi*.
- Ο ξενιστής του βακτηρίου που είναι η πικροδάφνη από την οποία απομονώθηκαν οι όγκοι σε συνδυασμό με θετική PCR αποτελούν ισχυρή ένδειξη ότι πρόκειται για απομονώσεις του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*.
- Για την πλήρη ταυτοποίηση του ωστόσο απαιτούνται μοριακές τεχνικές ειδικά σχεδιασμένες για την διάκριση του συγκεκριμένου παθότυπου.
- Οι παραπάνω βακτηριακές απομονώσεις έδειξαν φυτοπαθογόνο δράση αφού προκάλεσαν αντίδραση υπεραισθησίας σε φυτά καπνού πλην της απομόνωσης 6.1Λ η οποία διαφέρει μορφολογικά από τις υπόλοιπες απομονώσεις.
- Η πειραματική δοκιμή δημιουργίας όγκων σε καρότο δεν έδωσε ασφαλή αποτελέσματα.
- Στις *in vitro* βιοδοκιμές δημιουργίας όγκων των απομονώσεων σε φύλλα και βλαστούς πικροδάφνης οι αρχικές ενδείξεις είναι ενθαρρυντικές όμως χρειάζονται περαιτέρω πειράματα για να διαπιστωθεί αν οι σχηματισμοί όγκων οφείλονται στην δράση των βακτηρίων ή αποτελούν αντίδραση των φυτικών κυττάρων απέναντι στη μόλυνση.
- Μετά από σύγκριση των βακτηριακών απομονώσεων που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές διαπιστώνεται ότι υπάρχει γενετική ποικιλομορφία. Γενετική ποικιλομορφία φαίνεται να παρουσιάζεται απομονώσεις του βακτηρίου που προέρχονται από την ίδια περιοχή βάσει των αποτελεσμάτων της ERIC-PCR. Ωστόσο λόγω ανικανότητας ομαδοποίησης των εξεταζόμενων απομονώσεων από την BOX-PCR δεν μπορεί να δοθεί ασφαλές συμπέρασμα.

6. Βιβλιογραφία

6.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Aragón I.M., Pérez-Martínez I., Moreno-Pérez A., Cerezo M and Ramos C., 2014. New insights into the role of indole-3-acetic acid in the virulence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. FEMS Microbiology Letters 356 :184-92. Available at < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24606017/>> [Accessed 26 May]

Azad H.R., Cooksey D.A., 1995. A semiselective medium for detecting epiphytic and systemic populations of *Pseudomonas savastanoi* from oleander. Phytopathology 85: 740-74. Available at <https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1995Articles/Phyto85n07_740.pdf> [Accessed 26 May, 2025]

Babich H. and Fox K. D., 1998. Induction of Crown Gall on Carrot Slices. The American Biology Teacher 60 : 445–47. Available at < <https://www.jstor.org/stable/4450518> > [Accessed 26 May, 2025]

Banerjee S., Batabyal K., Joardar S. N., Isore D. P., Dey S., Samanta I., Samanta T. K., and Murmu S., 2017. "Detection and Characterization of Pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* from Bovine Subclinical Mastitis in West Bengal, India." Veterinary World 10 : 738–742. Available at : < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28831214/> > [Accessed 16 May, 2025]

Bella P., Catara V., Guarino C., Cirvilleri G., 2006. Evaluation of oleander accessions for resistance to *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*. Journal of Plant Pathology 88: 273-278. Available at < https://www.researchgate.net/publication/242766021_Evaluation_of_oleander_accessions_for_resistance_to_Pseudomonas_savastanoi_pv_nerii > [Accessed 26 May, 2025]

Bella P., Licciardello G., Tessitori M., and Catara V., 2008. A Real-Time PCR Quantitative Detection Assay for *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* in *Nerium oleander*. Phytopathologia Mediterranea 47: 204-213. Available at < <https://www.jstor.org/stable/26463313> > [Accessed 26 May, 2025]

Bellardi M.G., Betti L., Marani F., 1996. "Virus Diseases of Ornamental Shrubs. XI. *Nerium Oleander* L. Infected by Cucumber Mosaic Virus and a Potyvirus." Phytopathologia Mediterranea 35 : 133–36. Available at < <https://www.jstor.org/stable/42685258> > [Accessed 26, 2025]

- Botelho A. F., Oliveira F. A. S., Fiúza A. T. L., Pedroza H., Branco S., Pierezan F., et al. 2018. Improved Method for Diagnosis of Nerium Oleander Poisoning in Necropsy Tissues. Pesquisa Veterinária Brasileira 38: 967–972. Available at: < https://www.researchgate.net/publication/326702580_Improved_method_for_diagnosis_of_Nerium_oleander_poisoning_in_necropsy_tissues > [Accessed 10 June, 2025]
- Caballo-Ponce E., Murillo J., Martínez-Gil M., Moreno-Pérez A., Pintado A., Ramos C., 2017. Knots Untie: Molecular Determinants Involved in Knot Formation Induced by *Pseudomonas savastanoi* in Woody Hosts. Frontiers in Plant Science. Volume 8. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28680437/> > [Accessed 26 May, 2025]
- Caponero A., Contesini A. M., Iacobellis N. S., 1995. Population diversity of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive and oleander. Plant Pathology 44: 848-855. Available at: < <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02744.x> > [Accessed 26 May, 2025]
- Comai L., Kosuge T., 1983. Transposable element that causes mutations in a plant pathogenic *Pseudomonas* sp. .Journal of Bacteriology 154 :1162-7. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6304006/> > [Accessed 26 May, 2025]
- Cuisance P. and Seabrook P., 1970. Les arbustes d'ornement. Paris: Larousse.
- Dey P., 2020. The pharmaco-toxicological conundrum of oleander: Potential role of gut microbiome. Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 129. Available at: < <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110422> > [Accessed 26 May, 2025]
- Doksöz F.S., Bozkurt İ.A., 2020. A new and simple pathogenicity test using carrot slices for *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, causal disease agent of olive knot. Journal of Plant Pathology 102 :1173–1177. Available at: < https://www.researchgate.net/publication/342818862_A_new_and_simple_pathogenicity_test_using_carrot_slices_for_Pseudomonas_savastanoi_pv_savastanoi_causal_disease_agent_of_olive_knot > [Accessed 26 May, 2025]
- EPPO, 2010. Rep-PCR tests for identification of bacteria. Diagnostics, PM 7/100(1). Available at: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2338.2010.02409.x> > [Accessed 16 June, 2025]
- Fodor A., Juhasz A., Vitári V., Anita K. 2024, Carrot slice test: A reliable method for evaluating the tumorigenicity of *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*. Open Journal of Bacteriology 8: 1-5. Available at: <

https://www.researchgate.net/publication/379564756_Carrot_slice_test_A_reliable_method_for_evaluating_the_tumorigenicity_of_Pseudomonas_savastanoi_pv_nerii > [Accessed 26 May, 2025]

Glickmann E., Gardan L., Jacquet S., Hussain S., Elasri M., Petit A., Dessaux Y., 1998. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. Molecular Plant Microbe Interaction :156-62. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9450337/> > [Accessed 26 May, 2025]

González A.J., Rosario R.M., and Carmen M.M., 2003. Identification of an Emergent and Atypical *Pseudomonas viridiflava* Lineage Causing Bacteriosis in Plants of Agronomic Importance in a Spanish Region. Applied and Environmental Microbiology 69 : 2936–2941. Available at: < https://www.researchgate.net/publication/10772099_Identification_of_an_Emergent_and_Atypical_Pseudomonas_viridiflava_Lineage_Causing_Bacteriosis_in_Plants_of_Agronomic_Importance_in_a_Spanish_Region > [Accessed 10 June, 2025]

Herrera J., 1991. The reproductive biology of a riparian Mediterranean shrub, *Nerium oleander* L. (Apocynaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 106:147-172. Available at: < <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1991.tb02289.x> > [Accessed 26 May, 2025]

Heredia-Ponce Z., Vicente A., Cazorla F. M. and Gutiérrez-Barranquero J. A., 2021. Beyond the wall: Exopolysaccharides in the biofilm lifestyle of pathogenic and beneficial plant-associated *Pseudomonas*. Microorganisms 9: 445. Available at < <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/2/445> > [Accessed 15 June, 2025]

Iacobellis N.S., Caponero A. and Evidente A. 1998. Characterization of *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* strains isolated from ash. Plant Pathology, 47: 73-83. Available at: < <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00202.x> > [Accessed 26 May, 2025]

Ikeuchi M., Iwase A., Rymen B., Lambolez A., Kojima M., Takebayashi Y., Heyman J., Watanabe S., Seo M., De Veylder L., Sakakibara H., & Sugimoto K., 2017. Wounding Triggers Callus Formation via Dynamic Hormonal and Transcriptional Changes. Plant physiology, 175: 1158–1174. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28904073/> > [Accessed 10 June, 2025]

Janse J.D., 1982. *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (ex Smith) subsp. nov., nom. rev., the Bacterium Causing Excrescences on Oleaceae and *Nerium oleander* L. International Journal

of Systemic Bacteriology, 32: 146-169. Available at <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-32-2-166?crawler=true&mimetype=application/pdf> [Accessed 26 May, 2025]

Kavak H. and Üstün N., 2009. Oleander knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* in Turkey. Journal of Plant Pathology, 91: 701–3. Available at: < <https://www.jstor.org/stable/41998690> > [Accessed 10 June, 2025]

Klement Z., (1963). Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. Nature, 199, 299–300

Kluchevich M.M., Chumak P. Ya., Viger, Sergey M., 2018. New and dangerous bacterial disease of oleander *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* in greenhouses of Ukraine. Modern Phytomorphology, 12: 131–13. Available at <<https://www.phytomorphology.com/articles/New-and-dangerous-bacterial-disease-of-oleander-pseudomonas-savastanoi-pv-nerii-in-greenhouses-of-ukraine.pdf>>

[Accessed 26 May, 2025]

Kudela V., Šafrankova I., Krejzar V., Korba J., 2005. First report of *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* on oleander in the Czech Republic. Plant Protect. Sci., 41: 33–37. Available at <<https://pps.agriculturejournals.cz/pdfs/pps/2005/01/06.pdf>> [Accessed 26 May, 2025]

Kunkel B.N., Harper CP., 2018. The roles of auxin during interactions between bacterial plant pathogens and their hosts. Journal of Experimental Botany, 69 : 245–254. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29272462/> > [Accessed 10 June, 2025]

Lamichhane J.R., Varvaro L., 2013. Epiphytic *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* can infect and cause olive knot disease on *Olea europaea* subsp. *cuspidata* . Australasian Plant Pathology, 42: 219–225. Available at: < https://www.researchgate.net/publication/257801825_Epiphytic_Pseudomonas_savastanoi_pv_savastanoi_can_infect_and_cause_olive_knot_disease_on_Olea_europaea_subsp_cuspidata > [Accessed 26 May, 2025]

Langford S.D, Boor P.J., 1996. Oleander toxicity: an examination of human and animal toxic exposures. Toxicology, 109: 1-13. Available at <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0300483X9503296R>> [Accessed 10 June, 2025]

Lelliot R.A., Billing E., Hayward A.C., 1966. A Determinative Scheme for the Fluorescent Plant Pathogenic *Pseudomonads*. *Journal of Applied Bacteriology*, 29: 470-489. Available at: < <https://enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1966.tb03499.x> > [Accessed 26 May, 2025]

Llop P., Caruso P., Cubero J., Morente C., 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. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10395461/> > [Accessed 26 May, 2025]

Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S.V., Machado M.A., Toth I., Salmond G., Foster G.D., 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 6: 614-29. Available at: < <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x> > [Accessed 26 May, 2025]

Marchi G., Sisto A., Cimmino A., Andolfi A., Cipriani M.G., Evidente A., Surico G., 2006. Interaction between *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Pantoea agglomerans* in olive knots. *Plant Pathology*, 55: 614–624. Available at < <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2006.01449.x> > [Accessed 10 June, 2025]

Matas I.M, Pérez-Martínez I., Quesada J.M., Rodríguez-Herva J., Penyalver R., Ramos C., 2009. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Contains Two *iaaL* Paralogs, One of Which Exhibits a Variable Number of a Trinucleotide (TAC) Tandem Repeat. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 1030–1035. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19098222/> > [Accessed 26 May, 2025]

Mirik M., Aysan Y., and Sahin F., 2011 Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated from several host plants in Turkey and report of fontanesia as a new host. *Journal of Plant Pathology*, 93: 263–70. Available at: < <https://www.jstor.org/stable/41998996> > [Accessed 26 May, 2025]

Moreno-Pérez A., Pintado A., Murillo J., Caballo-Ponce E., Tegli S., Moretti C., Rodríguez-Palenzuela P., Ramos C., 2020. Host Range Determinants of *Pseudomonas savastanoi* Pathovars of Woody Hosts Revealed by Comparative Genomics and Cross-Pathogenicity Tests.

Frontiers in Plant Science. Volume 11. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32714356/> > [Accessed 26 May, 2025]

Moretti C., Ferrante P., Scortichini M. 2017. Genetic and Phenotypic Diversity of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from Different Hosts and Locations in Italy. *Plant Pathology* 66, : 948–959.. Available at : < <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppa.12614> > [Accessed 16 June, 2025]

Penyalver R., García A., Ferrer A., Bertolini E., López M.M., 2000. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 6 : 2673-7. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10831456/> > [Accessed 26 May, 2025]

Pérez-Martínez I., Zhao Y., Murillo J., Sundin G.W., Ramos C., 2008. Global genomic analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plasmids. *Journal of Bacteriology*,: 190(2):625-35. Available at< <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2223701/> > [Accessed 15 June, 2025]

Ramos C., Matas I.M., Bardaji L., Aragón I.M. and Murillo J., 2012. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* : some like it knot . *Molecular Plant Pathology*, 13: 998-1009. Available at: < <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00816.x> > [Accessed 26 May, 2025]

Ricardo, C.P.P., Sovia, D., 1974. Development of tuberous roots and sugar accumulation as related to invertase activity and mineral nutrition. *Planta* 118, 43-55.

Rocha C. S., Rocha D. C., Kochi L. Y., Carneiro D. N. M., Dos Reis M. V., Gomes, M. P., 2022. Phytoremediation by ornamental plants: a beautiful and ecological alternative. *Environmental Science and Pollution Research*, 29: 3336–3354. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34766223/> > [Accessed 26 May, 2025]

Rodríguez-Moreno L., Barceló-Muñoz A., Ramos C., 2008. In vitro analysis of the interaction of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *nerii* with micropropagated olive plants. *Phytopathology*, 7: 815-22. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18943258/> > [Accessed 26 May, 2025]

Salman M., McClean A. and Kluepfel D., 2022. An in vitro bioassay for evaluating the virulence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* isolates on olive. *Australasian Plant Disease Notes* 17:1. Available at: < https://www.researchgate.net/publication/357668626_An_in_vitro_bioassay_for_evaluating_t

[he_virulence_of_Pseudomonas_savastanoi_pv_savastanoi_isolates_on_olive](#) > [Accessed 26 May, 2025]

Sambrook J., Fritsch E. R., & Maniatis T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sitbon F., Sundberg B., Olsson O., Sandberg G., 1991. Free and Conjugated Indoleacetic Acid (IAA) Contents in Transgenic Tobacco Plants Expressing the *iaaM* and *iaaH* IAA Biosynthesis Genes from *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiology, 95: 480-5. Available at: < <https://academic.oup.com/plphys/article/95/2/480/6086633> > [Accessed 26 May, 2025]

Smith C.O., 1906. A Bacterial Disease of Oleander. *Bacillus Oleae* (Arcang.) Trev. Botanical Gazette, 42: 301-310 Available at <<https://images.app.goo.gl/Pi1XSDhqxTwoNFL7>> [Accessed 26 May, 2025]

Smith, C.O., 1928. Oleander bacteriosis in California. *Phytopathology* ,18: 503-518.

Smith A.C., and Marise A.H., 2016. Gram Stain Protocols. Protocol No. 2886. American Society for Microbiology. Available at <<https://asm.org/getattachment/5c95a063-326b-4b2f-98ce-001de9a5ece3/gram-stain-protocol-2886.pdf>> [Accessed 26 May, 2025]

Suojala, T., 2000. Variation in sugar content and composition of carrot storage roots at harvest and during storage. *Scientia Horticulturae*, 85: 1–19. Available at < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423899001338>> [Accessed 15 June, 2025]

Surico G., Lavermicocca P., 1989. A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Phytopathology*, 78: 185-190. Available at <https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1989Articles/Phyto79n02_185.pdf> [Accessed 26 May, 2025]

Surico G., Iacobellis N.S., 1992. Phytohormones and olive Knot disease. In: Verma DPS (ed.) *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*, pp. 209-227. CRC Press, Boca Raton, USA.

Temsah M., Hanna L., and Saad A.T., 2010. Histological Pathogenesis of *Pseudomonas savastanoi* on *Nerium Oleander*. *Journal of Plant Pathology*, 92: 407–13. Available at: < <https://www.jstor.org/stable/41998499> > [Accessed 26 May, 2025]

Tilford P.E., 1932. Diseases of ornamental plants. Ohio Agricultural Experiment Station . Available at <<https://core.ac.uk/download/pdf/159578136.pdf>> [Accessed 26 May, 2025]

Vázquez, S., Martín, A., García, M., Español, C., & Navarro, E. 2016. Metal uptake of *Nerium oleander* from aerial and underground organs and its use as a biomonitoring tool for airborne metallic pollution in cities. Environmental Science and Pollution Research, 23: 7582–7594. Available at: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26732705/> > [Accessed 26 May, 2025]

Vessey J., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. Plant and Soil, 255: 571-586. Available at: < <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1026037216893> > [Accessed 26 May, 2025]

Vicente J.G., Roberts S.J., 2007. Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR. European Journal of Plant Pathology, 117: 383–392. Available at: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-007-9107-y#citeas> > [Accessed 18 June, 2025]

Wick R., 2010. Tobacco Hypersensitivity, the first test to screen bacteria for pathogenicity. NBDN Newsletter. Diagnostic Tips 7/10: 3-4. Available at <https://www.npdn.org/sites/npdnd9b.ceris.purdue.edu/files/newsletter/July%202010_diagnostic.pdf> [Accessed 6 June, 2025]

Wilson E.E., Magie A.R., 1964. Systemic invasion of the host plant by the tumor-inducing bacterium, *Pseudomonas savastanoi*. Phytopathology, 54: 576-579

6.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

Παναγόπουλος Χ.Γ., 2007. Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων & Αμπέλου. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα.