



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

“Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά απομονώσεων των φυτοπαθογόνων βακτηρίων *Pseudomonas savastanoi* ρν. *savastanoi* και *Erwinia amylovora* από περιοχές της Κεντρικής Ελλάδας”

Ρουμेलιώτη Αγγελική- Μαρία

Επιβλέπων καθηγητής: Ευάγγελος Βέλλιος, Επίκουρος Καθηγητής

ΒΟΛΟΣ 2021

“Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά απομονώσεων των φυτοπαθογόνων βακτηρίων *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* και *Erwinia amylovora* από περιοχές της Κεντρικής Ελλάδας”

“Antibiotic susceptibility of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Erwinia amylovora* isolates from Central Greece.”

Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

1. Ευάγγελος Βέλλιος, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)
2. Ανέστης Καρκάνης, Επίκουρος Καθηγητής
3. Dr Φεβρωνία Λιολιοπούλου, μέλος ΕΔΙΠ

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

Ρουμελιώτη Αγγελική- Μαρία

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου, κ. Ευάγγελο Βέλλιο, για την επιστημονική καθοδήγηση και τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια, τόσο στα μαθήματα που δίδασκε όσο και κατά τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστίες οφείλω και στη κ. Λιολιοπούλου Φεβρωνία, για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια της καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη στήριξη που μου προσέφερε, ηθική και υλική, ώστε να πραγματοποιήσω τους στόχους μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	viii
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Καλλιέργεια ελιάς.....	1
1.2 Η ασθένεια <<καρκίνωση ελιάς>>.....	1
1.2.1 Γενικά.....	1
1.2.2 Συμπτωματολογία της ασθένειας.....	2
1.2.3 Αντιμετώπιση της ασθένειας.....	4
1.3 Παθογόνο αίτιο.....	5
1.3.1 Συστηματική κατάταξη.....	5
1.3.2 Ξενιστές του παθογόνου.....	6
1.3.3 Βιολογία του βακτηρίου.....	6
1.3.4 Συνθήκες ανάπτυξης - επιδημιολογία.....	7
1.3.5 Ανίχνευση παθογόνου – μελέτη παθογένειας.....	8
2.1 Καλλιέργεια μηλιάς και αχλαδιάς.....	9
2.2 Η ασθένεια <<βακτηριακό κάψιμο>>.....	10
2.2.1 Γενικά.....	10
2.2.2 Συμπτωματολογία της ασθένειας <<βακτηριακό κάψιμο>>.....	10
2.2.3 Αντιμετώπιση <<βακτηριακού καψίματος>>.....	11
2.3 Παθογόνο αίτιο.....	12
2.3.1 Συστηματική κατάταξη - ονοματολογία.....	12
2.3.2 Εύρος ξενιστών.....	13
2.3.3 Βιολογία του παθογόνου.....	13

2.3.4 Συνθήκες ανάπτυξης - επιδημιολογία.....	14
2.3.5 Διάγνωση παθογόνου – μελέτη παθογένειας.....	14
3. Αντιβιοτικά .....	15
3.1 Ορισμός.....	15
3.2.1 Χρήση αντιβιοτικών στη φυτική και ζωική παραγωγή.....	16
3.2.2. Αντιβιοτικά και μηχανισμός δράσης.....	17
3.3.1 Ανθεκτικότητα βακτηρίων στα αντιβιοτικά.....	18
3.3.2 Περιορισμοί στη χρήση αντιβιοτικών στη φυτική και ζωική παραγωγή.....	19
3.4.1. Ανθεκτικότητα βακτηρίων στα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη.....	20
3.4.2 Ανθεκτικότητα <i>Erwinia amylovora</i> σε αντιβιοτικά.....	20
3.4.3 Ανθεκτικότητα <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> σε αντιβιοτικά.....	21
3.5 Σκοπός της εργασίας.....	22
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
4.1 Απομόνωση του βακτηρίου <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> από όγκους ελιάς.....	23
4.2 Θρεπτικά υλικά.....	24
4.2.1 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού King's B.....	24
4.2.2 Παρασκευή υγρού θρεπτικού υλικού King's B.....	24
4.2.3 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού NSA.....	24
4.2.4 Παρασκευή υγρού θρεπτικού υλικού NS Broth.....	25
4.3 Έλεγχος ευαισθησίας βακτηρίων στα αντιβιοτικά.....	25
4.3.1 Έλεγχος ευαισθησίας <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> στα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη.....	25

4.3.2 Έλεγχος ευαισθησίας <i>Erwinia amylovora</i> στα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και πενικιλλίνη.....	26
4.4 Στατιστική ανάλυση .....	28
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	30
5.1 Απομόνωση του βακτηρίου <i>P. savastanoi</i> ρν. <i>savastanoi</i> από όγκους ελιάς.....	30
5.2.1 Έλεγχος ευαισθησίας <i>P. savastanoi</i> ρν. <i>savastanoi</i> στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη.....	30
5.2.2 Έλεγχος ευαισθησίας <i>P. savastanoi</i> ρν. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 1 µg.....	35
5.2.3 Έλεγχος ευαισθησίας <i>P. savastanoi</i> ρν. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 10 µg.....	37
5.2.4 Έλεγχος ευαισθησίας <i>P. savastanoi</i> ρν. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 50 µg.....	39
5.2.5 Έλεγχος ευαισθησίας <i>P. savastanoi</i> ρν. <i>savastanoi</i> στο αντιβιοτικό πενικιλλίνη.....	41
5.2.6 Έλεγχος ευαισθησίας <i>P. savastanoi</i> ρν. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα πενικιλλίνης 50 µg.....	47
5.2.7 Έλεγχος ευαισθησίας <i>P. savastanoi</i> ρν. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα πενικιλλίνης 100 µg.....	49
5.2.8 Έλεγχος ευαισθησίας <i>P. savastanoi</i> ρν. <i>savastanoi</i> σε ποσότητα πενικιλλίνης 250 µg.....	52
5.2.9 Σύγκριση αποτελεσματικότητας στρεπτομυκίνης και πενικιλλίνης έναντι του βακτηρίου <i>P. savastanoi</i> ρν. <i>savastanoi</i> .....	54
5.3 Έλεγχος ευαισθησίας <i>Erwinia amylovora</i> στα αντιβιοτικά.....	54
5.3.1 Δοκιμή ποσότητας μολύσματος .....	54

5.3.2 Έλεγχος ευαισθησίας <i>Erwinia amylovora</i> στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη.....	57
5.3.3 Έλεγχος ευαισθησίας <i>Erwinia amylovora</i> σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 1 μg.....	61
5.3.4 Έλεγχος ευαισθησίας <i>Erwinia amylovora</i> σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 10 μg.....	63
5.3.5 Έλεγχος ευαισθησίας <i>Erwinia amylovora</i> σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 50 μg.....	64
5.3.6 Έλεγχος ευαισθησίας <i>Erwinia amylovora</i> στο αντιβιοτικό πενικιλίνη ...	66
5.3.7 Έλεγχος ευαισθησίας <i>Erwinia amylovora</i> σε ποσότητα πενικιλίνης 50 μg.....	71
5.3.8 Έλεγχος ευαισθησίας <i>Erwinia amylovora</i> σε ποσότητα πενικιλίνης 100 μg.....	72
5.3.9 Έλεγχος ευαισθησίας <i>Erwinia amylovora</i> σε ποσότητα πενικιλίνης 250 μg.....	74
5.3.10 Σύγκριση αποτελεσματικότητας στρεπτομυκίνης και πενικιλίνης έναντι του βακτηρίου <i>Erwinia amylovora</i> .....	76
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	78
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	82
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	83
8.1.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	83
8.1.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	91



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε έλεγχος ευαισθησίας δέκα απομονώσεων του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* ρν. *savastanoi* και δέκα απομονώσεων του βακτηρίου *Erwinia amylovora* στα αντιβιοτικά, με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με χρήση δισκίων διηθητικού χαρτιού εμποτισμένων με το αντιβιοτικό (disc diffusion method). Για κάθε απομόνωση και αντιβιοτικό πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η στρεπτομυκίνη σε ποσότητες 0 μg, 1 μg, 10 μg και 50 μg και η πενικιλίνη, σε ποσότητες 0 μg, 50 μg, 100 μg και 250 μg. Μετρήθηκαν οι ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν γύρω από το κάθε δισκίο και οι τιμές συγκρίθηκαν με παρόμοια πειράματα. Όλες οι απομονώσεις του βακτηρίου *P. savastanoi* ρν. *savastanoi* ήταν ευαίσθητες στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη και πιθανώς ανθεκτικές στην πενικιλίνη. Δύο απομονώσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora* ήταν ευαίσθητες στην στρεπτομυκίνη και μία πιθανώς ανθεκτική, ενώ οι υπόλοιπες μετρίως ευαίσθητες. Στο αντιβιοτικό πενικιλίνη όλες οι απομονώσεις ήταν ανθεκτικές. Η πιθανή ανθεκτικότητα, δεδομένου ότι η χρήση αντιβιοτικών στην Ελλάδα απαγορεύεται, μπορεί να αποδοθεί στην οριζόντια μετακίνηση γονιδίων από ανθεκτικά βακτήρια του περιβάλλοντος. Τέλος πραγματοποιήθηκε απομόνωση του βακτηρίου *P. savastanoi* ρν. *savastanoi* από παλιούς και νέους όγκους ελιάς, με δύο μεθόδους.

Λέξεις κλειδιά: disc diffusion method, ζώνες παρεμπόδισης, ευαισθησία, ανθεκτικότητα

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Καλλιέργεια ελιάς

Η ελιά (*Olea europaea*, οικογένεια Oleaceae) είναι ένα αειθαλές δέντρο, που καλλιεργείται από τα προϊστορικά χρόνια κυρίως στη Μεσόγειο. Η καλλιέργεια είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη σε όλο τον κόσμο, όπου επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες. Κύριες χώρες παραγωγής ελαιοκομικών προϊόντων είναι η Ισπανία, η Ελλάδα, η Ιταλία, η Τουρκία, το Μαρόκο και άλλες παραμεσόγειες χώρες. Πρόκειται για μία σημαντική για την οικονομία καλλιέργεια, καθώς το 25% του γεωργικού εισοδήματος στη Μεσόγειο προέρχεται από προϊόντα ελιάς. Η έκταση που καταλαμβάνει παγκοσμίως είναι περί τα 9 εκατομμύρια εκτάρια (Raina 2003). Ο καρπός της ελιάς καθώς και το λάδι της αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι στη διατροφή του ανθρώπου, λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους στην υγεία. Περιέχουν ουσίες που προστατεύουν τον οργανισμό από υπεροξειδωση, όπως αντιοξειδωτικά, καροτενοειδή, πολυφαινόλες και συνεπώς από σοβαρά νοσήματα, όπως καρδιοαγγειακά. Η κατανάλωση ελαιολάδου συμβάλλει στην καλύτερη απορρόφηση λιποδιαλυτών πρωτεϊνών και στον καλύτερο μεταβολισμό υδατανθράκων. Παράλληλα αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας (Βασιλακάκης 2016). Η καλλιέργεια της ελιάς πλήττεται από πλήθος εχθρών, ζιζανίων και φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορούν να μειώσουν την παραγωγή ή να υποβαθμίσουν την ποιότητα του προϊόντος (Gonzalez-Andujar 2009). Λόγω της σημαντικότητάς της τόσο σε οικονομικό, όσο και σε διατροφικό επίπεδο, κρίνεται απαραίτητη η μελέτη των ασθενειών της.

### 1.2 Η ασθένεια <<καρκίνωση της ελιάς>>

#### 1.2.1 Γενικά

Η καρκίνωση ή φυματίωση της ελιάς θεωρείται μια από τις σημαντικότερες ασθένειες της ελιάς (*Olea europaea*). Προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Παναγόπουλος 2007), το οποίο υπάρχει στις περισσότερες ελαιοκομικές περιοχές και κυρίως στις παραμεσόγειες χώρες, προκαλώντας ασθένειες με αποτέλεσμα την

καταστροφή του φυτικού κεφαλαίου και σημαντική μείωση της παραγωγής. Η πρώτη αναφορά έγινε από το Θεόφραστο τον τέταρτο αιώνα π.Χ. και η βακτηριακή φύση της ασθένειας έγινε γνωστή το 1887 από τον Ιταλό Savastano (Quesada et al. 2012).

### **1.2.2 Συμπτωματολογία της ασθένειας**

Το χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι οι όγκοι που σχηματίζονται κυρίως στους κλάδους, στους κλαδίσκους, στον κορμό και σπάνια στα νεύρα και στους μίσχους των φύλλων καθώς και στις ρίζες. Η μόλυνση ξεκινά από τραύματα και στις θέσεις αυτές μετά την εγκατάσταση του βακτηρίου παρατηρείται μια κοιλότητα λόγω της κατάρρευσης των φυτικών κυττάρων. Στη συνέχεια αρχίζει η δημιουργία των όγκων (Quesada et al. 2012). Ο σχηματισμός τους σχετίζεται με την παραγωγή από το βακτήριο ινδολο-3-οξικού οξέος (IAA) και κυτοκινίνων (Surico et al.1985). Οι όγκοι στα αρχικά στάδια της ασθένειας εμφανίζονται σαν μικρά εξογκώματα, έχουν λεία επιφάνεια και είναι μαλακοί (Εικόνα 2), ενώ αργότερα μεγαλώνουν σε μέγεθος, γίνονται σκληροί και η επιφάνεια τους παρουσιάζει σχισμές (Εικόνα 1). Στο εσωτερικό των όγκων υπάρχουν κοιλότητες (Εικόνα 3). Επίσης το χρώμα αρχικά είναι ανοιχτό, ενώ αργότερα πιο σκούρο (Young 2004, Παναγόπουλος 2007). Τα έντονα προσβεβλημένα δέντρα σταδιακά εξασθενούν και μπορεί να παρατηρηθεί φυλλόπτωση, νέκρωση κλάδων και μείωση της παραγωγής (Nguyen et al. 2018). Όσον αφορά τους καρπούς, τα συμπτώματα που παρατηρούνται είναι καστανόμαυρες κυκλικές κηλίδες διαμέτρου 0,5-2,5 mm που περιβάλλονται από χλωρωτική άλω. Οι κηλίδες αρχικά είναι υπερυψωμένες αλλά αργότερα βυθίζονται ελαφρά και σκίζονται. Από τις σκισμές εξέρχεται γλοιώδης ουσία που περιέχει το βακτήριο (Young 2004, Παναγόπουλος 2007).



Εικόνα 1. Όγκος με σχισμές σε βλαστό ελιάς



Εικόνα 2. Νέος όγκος σε βλαστό ελιάς



Εικόνα 3. Εσωτερικό όγκου

### 1.2.3 Αντιμετώπιση της ασθένειας

Εφόσον γίνει εγκατάσταση του παθογόνου στο χωράφι, η αντιμετώπιση της ασθένειας είναι δύσκολη. Ωστόσο υπάρχουν προληπτικά και καλλιεργητικά μέτρα που μπορούν να εφαρμοστούν. Κατά την εγκατάσταση νέων ελαιώνων, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην περιοχή, ώστε να μην επικρατούν ακραία καιρικά φαινόμενα, όπως παγετός και συχνές βροχοπτώσεις και να χρησιμοποιείται υγιές και πιστοποιημένο πολλαπλασιαστικό υλικό (Young 2004, Nguyen et al. 2018). Επιπροσθέτως, μπορεί να γίνει χρήση ανθεκτικών ποικιλιών (Καλαμών, Θασίτικη) (Παναγόπουλος 2007). Πιθανοί ξενιστές σε ακτίνα 500 m πρέπει να ελέγχονται, καθώς μπορεί να αποτελέσουν πηγές μόλυσματος για τα νέα φυτά (Young 2004). Το κλάδεμα και το ράβδισμα να μη γίνονται κατά τη διάρκεια βροχερού και υγρού καιρού και τα εργαλεία πρέπει να απολυμαίνονται, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος μετάδοσης του παθογόνου (Παναγόπουλος 2007, Nguyen et al. 2018). Κατά τη διάρκεια της συγκομιδής, αν υπάρχει η δυνατότητα να προτιμάται η χρήση μηχανημάτων με δόνηση, για μείωση των τραυματισμών (Quesada et al. 2012). Για προσβεβλημένα δέντρα, εκτός από την εκρίζωσή τους, συνίσταται η αφαίρεση και καταστροφή των προσβεβλημένων κλάδων ή η αφαίρεση των όγκων με μαχαίρι και η επάλειψη

των πληγών με πυκνό βορδιγάλειο πολτό. Όσον αφορά τη χημική αντιμετώπιση, προτείνεται προληπτικός ψεκάσμος με χαλκούχα σκευάσματα, μετά από πτώση των φύλλων ή τραυματισμούς και ακραία καιρικά φαινόμενα όπως παγετός και χαλάζι (Παναγόπουλος 2007, Quesada et al. 2012).

### 1.3 Παθογόνο αίτιο

#### 1.3.1 Συστηματική κατάσταση

Το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, προκαλεί την ασθένεια γνωστή ως καρκίνωση ή φυματίωση της ελιάς. Η πλήρης περιγραφή και ταξινόμηση του βακτηρίου έγινε από τον Erwin F. Smith το 1908, ο οποίος το ονόμασε *Bacterium savastanoi* (Gardan et al. 1992). Το παθογόνο κατατάσσεται στο βασίλειο Bacteria, στο φύλο Proteobacteria, στην κλάση Gammaproteobacteria, στην τάξη Pseudomonadales και στην οικογένεια Pseudomonadaceae. Συνώνυμο του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* είναι το *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Ramos et al. 2012). Το γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνει 21 φυτοπαθογόνα είδη, από τα οποία το είδος *Pseudomonas syringae* περιλαμβάνει διακριτούς πληθυσμούς, οι οποίοι είναι ικανοί να μολύνουν ένα περιορισμένο αριθμό διαφορετικών ξενιστών ο καθένας. Οι πληθυσμοί αυτοί δεν αποτελούν ξεχωριστά είδη και ανήκουν στο *Pseudomonas syringae* complex. Για την διάκριση των διαφορετικών φυλών του κάθε είδους χρησιμοποιείται ο όρος παθότυπος. Στο *Pseudomonas syringae* complex περιλαμβάνονται περίπου 57 παθότυποι (Marcelletti and Scortichini 2014). Οι παθότυποι και τα είδη του *Pseudomonas syringae* complex με βάση μοριακές τεχνικές που εντοπίζουν ομοιότητες στο γονιδίωμα δύο οργανισμών, όπως DNA-DNA hybridization, κατατάσσονται σε εννιά είδη (Genomospecies). Το *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ανήκει στο Genomospecies 2 το οποίο περιλαμβάνει βακτήρια που προκαλούν όγκους σε ξυλώδεις ξενιστές (Caballo–Ponce et al. 2017). Σε αυτό κατατάσσονται 17 παθότυποι και τα είδη *P. amygdali*, *P. ficuserectae* και *P. meliae* (Gardan et al. 1999, Young 2010, Ramos et al. 2012).

### 1.3.2 Ξενιστές του παθογόνου

Το βακτήριο *P. savastanoi* προσβάλλει κυρίως φυτά της οικογένειας Oleaceae. Κύριοι ξενιστές αποτελούν τόσο η καλλιεργούμενη (*Olea europaea*), όσο και η αγριελιά (*Olea europaea* var. *oleaster*), το γιασεμί (*Jasminum* spp.), ο φράξος (*Fraxinus excelsior*) και η πικροδάφνη (*Nerium oleander*). Από το 1996 αναγνωρίστηκε ότι το κάθε φυτό προσβάλλεται από διαφορετικούς παθότυπους, οι οποίοι είναι οι *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, που προσβάλλει το είδος *Olea europaea*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*, που προσβάλλει το είδος *Nerium oleander* και *Pseudomonas savastanoi* pv. *fraxini*, που προσβάλλει το είδος *Fraxinus excelsior* (Sisto et al. 2007). Έχει αναφερθεί ότι στελέχη του βακτηρίου που απομονώθηκαν από ελιά προσβάλλουν το είδος *Nerium oleander*, πράγμα το οποίο δεν έχει επιβεβαιωθεί. Ωστόσο στελέχη του *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* είναι ικανά να μολύνουν την ελιά (Ramos et al. 2012). Με τεχνητές μολύνσεις σχηματισμός όγκων από το βακτήριο έχει παρατηρηθεί και σε άλλα φυτά, όπως στο γιασεμί, στο λιγούστρο, στη μυρτιά και στη ροδιά. Αν και οι ξενιστές που ανέπτυξαν όγκους ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες, πάνω από το 50% αυτών των φυτών ανήκει στην οικογένεια Oleaceae (Caballo-Ponce et al. 2017).

### 1.3.3 Βιολογία του βακτηρίου

Τα βακτήρια του είδους είναι αρνητικά κατά Gram, ραβδόμορφα, ευθεία ή ελαφρά κυρτωμένα με διαστάσεις 0,4– 0,8 X 1,0–3,0 μm. Κινούνται με τη βοήθεια ενός έως τεσσάρων πολικών μαστιγίων και είναι υποχρεωτικά αερόβια. Αναπτύσσονται σχετικά αργά με ιδανικές θερμοκρασίες ανάπτυξης αυτές μεταξύ 25-30 °C (Ramos et al. 2012). Το *P. savastanoi* προκαλεί αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού, δεν παράγει οξειδάση, ενώ παράγει ινδολυλοξικό οξύ (IAA), με το υπεύθυνο γονίδιο να εδράζεται στο χρωμόσωμα και μερικές απομονώσεις του παράγουν πρασινοκίτρινη φθορίζουσα χρωστική (Παναγόπουλος 2007, Ramos et al. 2012).

### 1.3.4 Συνθήκες ανάπτυξης - επιδημιολογία

Για την πραγματοποίηση μολύνσεων από το *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε μια περιοχή, είναι απαραίτητη η ύπαρξη βροχοπτώσεων τη συγκεκριμένη περίοδο ή παγετός και χαλάζι καθώς και άνεμος. Το εύρος της θερμοκρασίας στο οποίο μπορεί να γίνει η μόλυνση κυμαίνεται από 5 έως 37 °C με άριστη μεταξύ 22-25 °C. Το βακτήριο μπορεί να δράσει οποιαδήποτε εποχή του έτους επικρατούν οι συγκεκριμένες συνθήκες, πιο πιθανές παρόλα αυτά είναι οι μολύνσεις το φθινόπωρο έως την άνοιξη (Quesada et al. 2012). Το βακτήριο δεν επιβιώνει για πολύ στο έδαφος (Ramos et al. 2012). Βρίσκεται επιφυτικά στα φύλλα και στα άλλα πράσινα μέρη του δέντρου, όπου και αλληλεπιδρά με άλλους μικροοργανισμούς της φυλλόσφαιρας (Quesada et al. 2012). Έχει βρεθεί ότι το βακτήριο συμβιώνει με μη φυτοπαθογόνα βακτήρια. Για παράδειγμα βρέθηκε ότι ο πληθυσμός του βακτηρίου αυξάνεται με την ύπαρξη στη φυλλόσφαιρα του βακτηρίου *Erwinia toletana*, όπως και η μολυσματικότητά του, αφού παρατηρήθηκε σχηματισμός μεγαλύτερων όγκων (Ramos et al. 2012). Επίσης βρέθηκε να συμβιώνει με το βακτήριο *Pantoea agglomerans*, το οποίο ομοίως παράγει IAA και πιθανώς ευνοεί των αποικισμό του φυτού από το *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Επιπροσθέτως, επιβιώνει ενδοφυτικά μέσα στους παλαιούς όγκους, στους μεσοκυττάριους χώρους και στα αγγεία χωρίς την εμφάνιση συμπτωμάτων (Quesada et al. 2012). Ύστερα από το ράβδισμα, από το κλάδεμα ή από ακραία καιρικά φαινόμενα, όπως χαλάζι και παγετό, καθώς και από την πτώση των φύλλων δημιουργούνται πληγές και ουλές στους κλάδους που αποτελούν πύλες εισόδου για το παθογόνο. Όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, επικρατεί δηλαδή βροχερός καιρός και αέρας το βακτήριο μετακινείται στις μη επουλωμένες πληγές και προκαλεί μόλυνση. Το παθογόνο εγκαθίσταται στους ιστούς. Ο χρόνος από τη μόλυνση μέχρι την εκδήλωση των συμπτωμάτων ποικίλλει και σχετίζεται με την εποχή που έγινε η μόλυνση και τις μετέπειτα συνθήκες (Παναγόπουλος 2007, Nguyen et al. 2018). Αν γίνει το φθινόπωρο ο σχηματισμός των όγκων πραγματοποιείται μετά από μήνες, ενώ αν γίνει την άνοιξη τα συμπτώματα εμφανίζονται μέσα σε λίγες εβδομάδες (Παναγόπουλος 2007).



### 1.3.5 Ανίχνευση παθογόνου – μελέτη παθογένειας

Για τη μελέτη της παθογένειας φυλών του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* η καλύτερη μέθοδος είναι ο εμβολιασμός με το παθογόνο, φυτών ελιάς που προήλθαν από ιστοκαλλιέργεια. Η μέθοδος αυτή, σε σχέση με τον εμβολιασμό φυτών ηλικίας 1-3 ετών που καλλιεργούνται σε θερμοκήπιο, είναι πιο γρήγορη, απαιτεί λιγότερο χώρο και οι συνθήκες είναι ελεγχόμενες. Τα έκφυτα προέρχονται από σπόρο που βλαστάνει *in vitro* σε θρεπτικό υλικό και έχουν διαστάσεις 60-80 mm. Πριν τον εμβολιασμό δημιουργούνται στα φυτά πληγές και μολύνονται με διάλυμα που περιέχει το βακτήριο σε συγκεντρώσεις ( $10^7$ - $10^8$  CFU/mL). Τα φυτά μετά τον εμβολιασμό ελέγχονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα για το σχηματισμό όγκων και σε περίπτωση σχηματισμού όγκων μετριέται το βάρος τους (Rodríguez- Moreno et al. 2008). Η ελιά μπορεί να προσβληθεί και από το *P. savastanoi* pv. *nerii*. Για να προσδιοριστεί η παρουσία του *P. savastanoi* pv. *nerii* πραγματοποιείται Real-Time PCR ή End-Point PCR με παρουσία φθορίζουσας χρωστικής που συνδέεται με κάθε μόριο ολιγονουκλεοτιδίου που συντίθεται ή ολιγονουκλεοτιδίου που φέρει μια φθορίζουσα ομάδα στο ένα άκρο και ένα μόριο ουσίας που απορροφά το φθορισμό στο άλλο και υβριδοποιείται με μία αλληλουχία του μορίου στόχου. Οι τεχνικές αυτές επιτρέπουν τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA στόχου στο δείγμα. Οι εκκινητές καθώς και το ολιγονουκλεοτίδιο που χρησιμοποιούνται είναι εξειδικευμένοι για το συγκεκριμένο παθότυπο και δημιουργήθηκαν μετά από ταυτοποίηση χαρακτηριστικών αλληλουχιών στο γονιδίωμα του με EPIC PCR. Στην Real-Time PCR είναι δυνατή η ανίχνευση του μορίου στόχου στα αρχικά στάδια, λόγω του αυξανόμενου φθορισμού που μετριέται καθώς προχωρά η αντίδραση, ενώ στην End-Point PCR η ανίχνευση γίνεται στο τέλος της διαδικασίας (Tegli et al. 2010). Για τη διάγνωση του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* εκτός από τις παραπάνω τεχνικές εφαρμόζεται διαγνωστική PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης). Η αλληλουχία στόχος προς ενίσχυση βρίσκεται στο γονίδιο *iaaL*, αποτελείται από 454 βάσεις (bp) και οι εκκινητές είναι οι IAALF, 5'-GGCACCAGCGGCAACATCAA-3' και IAALR, 5'-CGCCCTCGGAACTGCC ATAC-3'. Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση (Penyalver et al. 2000). Άλλη τεχνική είναι η Nested PCR στην οποία πραγματοποιείται PCR δύο φορές. Την πρώτη με τους

παραπάνω εκκινητές και τη δεύτερη με εκκινητές που υβριδίζουν εντός της περιοχής που οριοθετείται από τους δύο προηγούμενους, οι οποίοι είναι οι εξής: IAALN1, 5'-CTCCCTCTCCAACGTCTTC-3' και IAALN2, 5'-GCCTGATGATTTTCTTCTG-3'. Η μέθοδος αυτή είναι πιο γρήγορη και ακριβής από την απλή PCR (Bertolini et al. 2003). Για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας διαφορετικών φυλών του παθογόνου και τη διάγνωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνολογία πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων (AFLP). Το DNA υφίσταται διπλή πέψη με δύο ένζυμα περιορισμού, τα EcoRI και MseI. Στη συνέχεια τα άκρα των περιορισμένων τμημάτων ενώνονται μεταξύ τους με ειδικούς προσαρμοστές, ακολουθεί PCR με εκκινητές συμπληρωματικούς των προσαρμοστών και πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR (Sisto et al. 2007).

## 2.1 Καλλιέργεια μηλιάς και αχλαδιάς

Η μηλιά (*Malus domestica*), ανήκει στην οικογένεια Rosaceae και στην υποοικογένεια Pomoidea. Το γένος περιλαμβάνει περίπου 30 είδη (Hancock et al. 2008). Καλλιεργείται σε πολλές περιοχές του πλανήτη και κυρίως στις εύκρατες. Η παγκόσμια παραγωγή μήλων ξεπερνά τους 89 εκατομμύρια τόνους ετησίως. Κύριες χώρες παραγωγής είναι η Κίνα και οι Η.Π.Α με ετήσια παραγωγή μεγαλύτερη από 4,5 εκατομμύρια τόνους (Cornille et al. 2019). Οι ποικιλίες μηλιάς ανέρχονται σε χιλιάδες, παρόλα αυτά το 60% της παγκόσμιας παραγωγής προέρχεται από τις ποικιλίες Delicious, Golden Delicious, Granny Smith, Fuji και Gala (Hancock et al. 2008, Castel et al. 2020). Ο καρπός αποτελεί πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών, φυτικών ινών, σακχάρων όπως φρουκτόζη, γλυκόζη και οργανικών οξέων όπως μηλικό και κιτρικό οξύ (Castel et al. 2020). Τα μήλα αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου. Καταναλώνονται νωπά ή χρησιμοποιούνται για την παρασκευή χυμών, ξυδιού, αρτοποιημάτων και άλλων προϊόντων (Hancock et al. 2008). Η αχλαδιά (*Pyrus spp.*) ανήκει όπως και η μηλιά στην οικογένεια Rosaceae. Τα κυριότερα είδη του γένους είναι τα *P. communis* (Ευρωπαϊκή), *P. amygdaliformis* (γκορτσιά) και τα ασιατικά είδη *P. pyrifolia*, *P. betulaefolia*, *P. ussuriensis*, *P. calleryana* και *P. bretschneideri* (Βασιλακάκης 2016).

Καλλιεργείται και στις 5 ηπείρους σε περίπου 85 χώρες (Zhang et al. 2020) και η ετήσια παγκόσμια παραγωγή ανέρχεται στους 24 εκατομμύρια τόνους. Κύρια χώρα παραγωγής είναι η Κίνα με ετήσια παραγωγή 16 εκατομμύρια τόνους και ακολουθεί η Ιταλία και οι Η.Π.Α. Οι καρποί καταναλώνονται νωποί ή χρησιμοποιούνται για την παρασκευή προϊόντων όπως χυμού, μαρμελάδας, ζελέ. Τα αχλάδια αποτελούν σημαντική πηγή ενέργειας, φυτικών ινών, μετάλλων, βιταμινών και αντιοξειδωτικών ουσιών όπως φλαβονοειδή, καροτενοειδή, ανθοκυάνες, η περιεκτικότητα των οποίων εξαρτάται από την ποικιλία και το στάδιο ωρίμανσης (Li et al. 2016).

## **2.2 Η ασθένεια <<βακτηριακό κάψιμο>>**

### **2.2.1 Γενικά**

Η ασθένεια βακτηριακό κάψιμο θεωρείται από τις σημαντικότερες ασθένειες της μηλιάς και της αχλαδιάς, καθώς και άλλων φυτών της οικογένειας Rosaceae. Το παθογόνο αίτιο είναι το βακτήριο *Erwinia amylovora*. Προκαλεί σοβαρές οικονομικές απώλειες λόγω μείωσης της παραγωγής και της καταστροφής ολόκληρης της καλλιέργειας λόγω ξήρανσης των προσβεβλημένων οργάνων του φυτού. Η ασθένεια εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1700 στη Νέα Υόρκη σε καλλιέργειες μηλιάς, αχλαδιάς και κυδωνιάς και έκτοτε έχει διαδοθεί σε περισσότερο από 50 χώρες σε όλο τον κόσμο (Malnoy et al. 2012, Zhao et al. 2019). Η βακτηριακή φύση της ασθένειας έγινε γνωστή το 1878 από τον Thomas J. Burrill (de Moura 2010). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, στην Αυστραλία και Ιαπωνία, το βακτήριο αποτελεί παθογόνο καραντίνας (Powney et al. 2011, EPPO 2021).

### **2.2.2 Συμπτωματολογία της ασθένειας <<βακτηριακό κάψιμο>>**

Το παθογόνο προσβάλλει όλα τα εναέρια όργανα του φυτού (EPPO 2021). Το χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι το μαύρισμα φύλλων, ανθέων και βλαστών, από το οποίο παίρνει και το όνομά της η ασθένεια, λόγω της ομοιότητας με ζημιά από φωτιά (Παναγόπουλος 2007). Τα συμπτώματα στα

άνθη, από τα οποία συνήθως ξεκινά η μόλυνση, εμφανίζονται 1-2 εβδομάδες μετά την πτώση των πετάλων (Zhao et al. 2019). Αρχικά αποκτούν υδατώδη εμφάνιση και σύντομα γίνονται καστανά-μαύρα, συρρικνώνονται, ξηραίνονται και παραμένουν προσκολλημένα πάνω στο δέντρο. Η προσβολή εξαπλώνεται σε ολόκληρη την ταξιανθία, στο βλαστό και στα φύλλα μέσω των μίσχων και στα κοντινά κλαδιά. Τα φύλλα παρουσιάζουν μαύρες αλλοιώσεις κατά μήκος των νευρώσεων και της περιφέρειας και τελικά συστρέφονται, μαραίνονται και ξηραίνονται και παραμένουν προσκολλημένα στο δέντρο (Παναγόπουλος 2007). Η μόλυνση μπορεί να ξεκινήσει και από τους νεαρούς βλαστούς, οι οποίοι στις αρχή είναι υδατώδεις και μαλακοί και στη συνέχεια σκληραίνουν, αποκτούν μαύρο χρώμα, μαραίνονται, κάμπτονται προς τα κάτω με τη μορφή γάτζου και ξηραίνονται από την κορυφή προς τα κάτω (Agris 2005). Η προσβολή επεκτείνεται προς τους μεγαλύτερους κλάδους και βραχίονες και μέσω αυτών στον κορμό ή ακόμη και στο υποκείμενο, όπου παρατηρείται σχηματισμός ελκών. Τα έλκη ποικίλλουν σε μέγεθος, είναι ελαφρώς βυθισμένα και έχουν υδατώδη εμφάνιση και ασαφή περιθώρια. Εσωτερικά οι ιστοί τους παρουσιάζουν ερυθρό-καστανό μεταχρωματισμό (EPPO 2021). Αν τα έλκη περιβάλλουν το όργανο, το τμήμα πάνω από το έλκος νεκρώνεται (Agris 2005). Όσον αφορά τους καρπούς, παρουσιάζουν καστανή μέχρι μαύρη σήψη, συρρικνώνονται, μουμιοποιούνται και παραμένουν επάνω στο δέντρο. Με υγρές συνθήκες από τους μολυσμένους ιστούς βγαίνει υπόλευκη, κολλώδης βακτηριακή εξίδρωση (EPPO 2021) η οποία μετά από έκθεση στον αέρα αποκτά χρώμα καστανό. Η ασθένεια μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο ολόκληρου του δέντρου (Agris 2005).

### **2.2.3 Αντιμετώπιση <<βακτηριακού καψίματος>>**

Η αντιμετώπιση της ασθένειας μετά την εγκατάσταση του παθογόνου είναι δύσκολη, για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η πρόληψη. Στη μηλιά έχουν δημιουργηθεί ποικιλίες οι οποίες είναι ανθεκτικές στο βακτηριακό κάψιμο. Ενδεικτικές είναι οι Red, Golden Delicious, Fushi, και Fucui. Στην αχλαδιά η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών είναι πιο δύσκολη, καθώς μια ανθεκτική ποικιλία δεν μπορεί να συγκεντρώσει όλα τα επιθυμητά ποιοτικά

χαρακτηριστικά. Παρόλα αυτά το είδος *Pyrus serotina* είναι πιο ανθεκτικό από το Ευρωπαϊκό (Zhao et al. 2019). Σημαντικά καλλιεργητικά μέτρα είναι η απολύμανση των εργαλείων και η αποφυγή τραυματισμών (Mikiciński et al. 2020), η καταστροφή των υπολειμμάτων καλλιέργειας, η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού και η ζιζανιοκτονία (EPPO 2021). Επίσης πρέπει να γίνεται προσεκτική επιλογή της περιοχής εγκατάστασης νέων οπωρώνων, ώστε το έδαφος να είναι καλά αποστραγγιζόμενο (Παναγόπουλος 2007). Όσον αφορά τη χημική αντιμετώπιση, προτείνεται προληπτικός ψεκασμός με χαλκούχα σκευάσματα. Αν ο ψεκασμός γίνει μετά την εγκατάσταση του παθογόνου δεν έχει αποτέλεσμα. Σε κάποιες περιοχές, όπως οι Η.Π.Α. και η Ν. Ζηλανδία επιτρέπεται η χρήση αντιβιοτικών (Mikiciński et al. 2020), κυρίως στρεπτομυκίνης και κασουγκαμυκίνης (Tancos et al. 2017). Επιπλέον σε μεγάλα δέντρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ουσία prohexadione-calcium, η οποία ενισχύει την άμυνα του φυτού, καθώς επάγει τη βιοσύνθεση της ουσίας luteoliflavan (Mikiciński et al. 2020). Η πρόδρομος ουσία luteoforol, έχει βρεθεί με πειράματα *in vitro*, ότι είναι τοξική έναντι στελεχών του βακτηρίου *Erwinia amylovora* (Spinelli et al. 2005). Επίσης βρέθηκε ότι τα κυτταρικά τοιχώματα του φλοιώδους παρεγχύματος υφίστανται πάχυνση και έτσι εμποδίζεται η εγκατάσταση του παθογόνου (Wallis and Cox 2019).

## 2.3 Παθογόνο αίτιο

### 2.3.1 Συστηματική κατάταξη - ονοματολογία

Το βακτήριο *Erwinia amylovora* προκαλεί την ασθένεια η οποία είναι γνωστή ως βακτηριακό κάψιμο της μηλιάς και της αχλαδιάς. Ο μικροοργανισμός αυτός ανήκει στο βασίλειο Bacteria, στο φύλο Proteobacteria, στην κλάση Gammaproteobacteria, στην τάξη Enterobacteriales και στην οικογένεια Enterobacteriaceae (Integrated Taxonomic Information System 2021). Στην ίδια οικογένεια ανήκουν και κάποια από τα σημαντικότερα παθογόνα που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο και στα ζώα, όπως *Escherichia coli*, *Yersinia pestis* και *Salmonella enterica* (Wang et al. 2010). Τα στελέχη του βακτηρίου δεν διακρίνονται σε παθότυπους με βάση το είδος του φυτού που

προσβάλλουν. Όλες οι απομονώσεις ανεξαρτήτως ξενιστή έχουν κοινή ονομασία (Roberts et al. 1998).

### 2.3.2 Εύρος ξενιστών

Το βακτήριο έχει μεγάλο εύρος ξενιστών. Προσβάλλει περίπου 200 είδη καλλιεργούμενων, αυτοφυών και καλλωπιστικών φυτών της οικογένειας Rosaceae (Palacio-Bielsa et al. 2012). Κύριοι ξενιστές είναι η μηλιά (*Malus* spp.), αχλαδιά (*Pyrus* spp.) και κυδωνιά (*Cydonia oblonga*) (Roberts et al. 1998). Στην υποοικογένεια Pomoidae ξενιστές είναι και τα φυτά *Eryobotria*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Pyracantha* και *Sorbus*, τα οποία αποτελούν πηγές μόλυσματος για τη μηλιά και την αχλαδιά (EPPO 2021). Ευπαθή είναι επίσης φυτά που ανήκουν στις υποοικογένειες Rosoideae, όπως τα *Rosa* spp. και *Rubus idaeus*, Amygdaloideae και Spiraeoideae. Στην τελευταία οι ξενιστές έχουν προκύψει με τεχνητές μολύνσεις και σπάνια παρατηρούνται προσβολές στη φύση. Όλες οι απομονώσεις ανεξαρτήτως ξενιστή είναι ικανές να μολύνουν τη μηλιά και την αχλαδιά εκτός από τις απομονώσεις που προέρχονται από φυτά του γένους *Rubus* (Palacio-Bielsa et al. 2012).

### 2.3.3 Βιολογία του παθογόνου

Τα βακτήρια του είδους *Erwinia amylovora* είναι αρνητικά κατά Gram, ραβδόμορφα (Paulin, 1996), με διαστάσεις 0,3 μm x 1–3 μm. Κινούνται με τη βοήθεια 2-7 περίτριχων μαστιγίων και εμφανίζονται μόνα τους ή σε ζεύγη και μερικές φορές σχηματίζουν αλυσίδες (EPPO 2021). Όταν οι συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές το κύτταρο περιβάλλεται από ένα παχύ στρώμα από πολυσακχαρίτες, το οποίο το προστατεύει από αφυδάτωση. Οι εξωτερικοί πολυσακχαρίτες (amylonoran, levan) συνδέονται επίσης με την παθογένεση του βακτηρίου (Du et al. 2004). Είναι προαιρετικά αναερόβιο και ως παράγοντα αύξησης χρειάζεται νικοτινικό οξύ (Paulin 1996). Η άριστη θερμοκρασία για την ανάπτυξή του κυμαίνεται από 25-27 °C. Η ελάχιστη είναι 6 °C και η μέγιστη 34 °C (Παναγόπουλος 2007).

### **2.3.4 Συνθήκες ανάπτυξης- επιδημιολογία**

Το βακτήριο διαχειμάζει σε έλκη προσβεβλημένων φυτών. Την άνοιξη, όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, σχηματίζονται νέα έλκη και παράγεται βακτηριακό εκκρίμα, το οποίο αποτελεί το μόλυσμα για τις πρωτογενείς μολύνσεις (Parsey et al. 2020). Για την πραγματοποίηση των μολύνσεων πρέπει να επικρατεί βροχερός καιρός, η σχετική υγρασία να είναι υψηλή και η θερμοκρασία να είναι μεγαλύτερη από 18 °C. Τα βακτήρια μεταφέρονται στους ευπαθείς ιστούς με τον άνεμο, τη βροχή, τα έντομα και τα καλλιεργητικά εργαλεία. (Παναγόπουλος 2007, Borruso et al. 2017). Το παθογόνο αρχικά αναπτύσσεται επιφυτικά και στη συνέχεια εισέρχεται στους ιστούς του ξενιστή. Στα άνθη εισέρχεται από τα στόματα, τα νεκάρια και από πιθανές πληγές. Στους νεαρούς βλαστούς και φύλλα από πληγές και στόματα (Roberts et al. 1998). Μετά την είσοδο τους τα βακτήρια μεταφέρονται μέσω των αγγείων του ξύλου σε άλλα μέρη του φυτού και η μόλυνση γίνεται διασυστηματική, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στη νέκρωση ολόκληρου του φυτού (Singh and Khan 2019).

### **2.3.5 Διάγνωση παθογόνου- μελέτη παθογένειας**

Για τη μελέτη παθογένειας μία μέθοδος είναι ο εμβολιασμός με το παθογόνο ανώριμων καρπών αχλαδιού. Ο εμβολιασμός γίνεται σε διάφορα σημεία του καρπού υποδερμικά, η συγκέντρωση του παθογόνου είναι  $10^8$ - $10^9$  CFU/mL και ανά τακτά χρονικά διαστήματα μετριέται η διάμετρος της περιοχής γύρω από το σημείο εμβολιασμού που νεκρώνεται. Όταν το αποτέλεσμα είναι θετικό παρατηρείται και ο σχηματισμός βακτηριακού εκκρίματος. (EPPO Bulletin 2013, Ρορονιό et al. 2020). Μία ακόμη μέθοδος είναι η μόλυνση ολόκληρων φυτών που προέρχονται από ιστοκαλλιέργεια ή καλλιεργούνται σε θερμοκήπιο. Στην περίπτωση αυτή δημιουργούνται τομές στα νεύρα των ανώτερων φύλλων από νεαρούς βλαστούς αφού πρώτα έχουν βυθιστεί στο διάλυμα που περιέχει το βακτήριο (Keck et al. 2002, EPPO Bulletin 2013). Για τη διάγνωση του παθογόνου, χρησιμοποιούνται κυρίως μοριακές τεχνικές λόγω της ακρίβειάς τους (Powney et al. 2011). Υπάρχουν πολλά πρωτόκολλα για την τεχνική της PCR με διαφορετικούς εκκινητές το καθένα, τα οποία έχουν αξιολογηθεί για την αποτελεσματικότητά τους. Οι αλληλουχίες στόχος προς ενίσχυση βρίσκονται

είτε στα χρωμοσώματα, είτε στο πλασμίδιο pEA29. Επειδή βρέθηκε ότι ορισμένες μολυσματικές φυλές του βακτηρίου δε διαθέτουν το συγκεκριμένο πλασμίδιο, προτείνεται η διενέργεια PCR δύο φορές, την πρώτη με εκκινητές που βασίζονται σε αλληλουχίες του πλασμιδιακού DNA και τη δεύτερη με εκκινητές που βασίζονται στο χρωμοσωμικό DNA. Επίσης για τη διάγνωση του βακτηρίου μπορεί να πραγματοποιηθεί Real-time PCR, καθώς και Nested PCR. Η αλληλουχία στόχος προς ενίσχυση βρίσκεται στο πλασμίδιο pEA29 και αποτελείται από 391 βάσεις (EPPO Bulletin 2013).

### **3. Αντιβιοτικά**

#### **3.1 Ορισμός**

Ο όρος αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1942, από τον μικροβιολόγο και βιοχημικό Selman Waksman και τους συνεργάτες του, για να περιγράψουν οποιαδήποτε ουσία παράγεται από μικροοργανισμούς και είναι ικανή να εμποδίσει την ανάπτυξη ή τις μεταβολικές δραστηριότητες άλλων μικροοργανισμών (Waksman 1947). Ο ορισμός δεν περιλάμβανε ουσίες με αντιμικροβιακή δράση που δεν παράγονταν από μικροοργανισμούς ή ήταν συνθετικές. Σήμερα, ο όρος αντιβιοτικό χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις οργανικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς ή συνθετικά, οι οποίες ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις είναι ικανές να αναστείλουν ή να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών (McManus et al. 2002, Zimdahl 2015). Σύμφωνα με τον WHO (2020), αντιβιοτικά είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση ασθενειών που οφείλονται σε βακτήρια. Δρουν είτε σαν βακτηριοκτόνα, είτε σαν βακτηριοστατικά. Τα βακτηριοκτόνα σκοτώνουν τα βακτήρια παρεμβαίνοντας στο σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος ή των συστατικών του κυττάρου, ενώ τα βακτηριοστατικά αναστέλλουν την ανάπτυξη ή τον πολλαπλασιασμό τους παρεμβαίνοντας στην παραγωγή πρωτεϊνών, στην αντιγραφή του DNA ή σε άλλες μεταβολικές διεργασίες (Zimdahl 2015).



### 3.2.1 Χρήση αντιβιοτικών στη φυτική και ζωική παραγωγή

Μετά την ανακάλυψη των αντιβιοτικών και τη συνεισφορά τους στην αντιμετώπιση ασθενειών του ανθρώπου, οι επιστήμονες πρότειναν τη χρήση τους για την αντιμετώπιση ασθενειών των φυτών που οφείλονται σε βακτήρια. Από το 1950, περισσότερα από 40 αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν σε καλλιέργειες λαχανικών και κυρίως σε καλλιέργειες μηλιάς και αχλαδιάς για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος (McManus et al. 2002). Το πρώτο αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε στην πράξη ήταν η στρεπτομυκίνη για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος σε αχλαδιές στις Η.Π.Α. (Misato et al. 1977). Ο λόγος της διάδοσης τους ήταν η αποτελεσματικότητά τους σε χαμηλές δόσεις και ότι δεν ήταν τοξικά στα φυτά. Τα σκευάσματα που χρησιμοποιούνται στη φυτική παραγωγή περιέχουν το αντιβιοτικό σε ποσοστό 17-20%, είναι σε μορφή σκόνης και πριν την εφαρμογή τους στα φυτά διαλύονται σε νερό, ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 50-300 ppm (McManus et al. 2002). Σήμερα η χρήση των αντιβιοτικών είναι περιορισμένη και σε πολλές χώρες έχει απαγορευτεί εξαιτίας της δημιουργίας ανθεκτικών στελεχών των παθογόνων. Δεδομένα που παρουσιάζουν τις περιοχές που χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά, σε τι ποσότητες και σε ποιες καλλιέργειες είναι ελάχιστα και πολλές φορές αναξιόπιστα. Είναι γνωστό ότι η μεγαλύτερη κατανάλωση κυρίως σε στρεπτομυκίνη και οξυτετρακυκλίνη παρατηρείται στη Νότια Αμερική για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος (Taylor and Reeder 2020). Αντιβιοτικά για τον ίδιο σκοπό χρησιμοποιούνται στη Ν. Ζηλανδία, Ισραήλ, Καναδά και Μεξικό (Mikiciński et al. 2020). Αντιβιοτικά όπως η κασουγκαμυκίνη χρησιμοποιούνται σε χώρες της Ασίας και κυρίως στην Ιαπωνία (Taylor and Reeder 2020). Αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό και στην κτηνοτροφία, για την θεραπεία ενός άρρωστου ζώου και για την μείωση της πιθανότητας μετάδοσής της ασθένειας στα υπόλοιπα. Επίσης χρησιμοποιούνται προληπτικά σε περιόδους που ο κίνδυνος ασθενειών είναι αυξημένος και ως πρόσθετα στις ζωοτροφές ως αυξητικοί παράγοντες (Zimdahl 2015). Υπολογίζεται ότι το 50% των αντιβιοτικών για τη θεραπεία λοιμώξεων του ανθρώπου, χρησιμοποιούνται και στην κτηνοτροφία (O'Neill 2015).

### 3.2.2. Αντιβιοτικά και μηχανισμός δράσης

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στη γεωργία ανήκουν κυρίως στις εξής χημικές ομάδες: τετρακυκλίνες, αμινογλυκοσίδες, β-λακτάμες, μακρολίδια, λινκοσαμίδες, πλεуроμουτιλίνες και σουλφοναμίδια. Στις ίδιες ομάδες ανήκουν και αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων του ανθρώπου (Manyi-Loh et al. 2018). Μερικά ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά στη γεωργία, είναι τα εξής: στρεπτομυκίνη, υδροχλωρική τετρακυκλίνη, χλωραμφαινικόλη, ερυθρομυκίνη και πενικιλίνη. Το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, ανήκει στην χημική ομάδα αμινογλυκοσίδες (Zimdahl 2015) και παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces griseus*. Ανακαλύφθηκε το 1944 (Ζιώγας και Μαρκόγλου 2017) και στη φυτοπροστασία εισάχθηκε το 1955 και έκτοτε χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος ή για την προστασία σπορόφυτων καθώς και πολλαπλασιαστικού υλικού όπως οι κόνδυλοι πατάτας (Stockwell and Duffy 2012). Είναι αποτελεσματικό έναντι μεγάλου αριθμού θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και δρα παρεμποδίζοντας τη σύνθεση πρωτεϊνών στα προκαρυωτικά (70S) ριβοσώματα (Τζάμος 2007, Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2017). Το αντιβιοτικό υδροχλωρική τετρακυκλίνη ανήκει στις τετρακυκλίνες (Zimdahl 2015) και παράγεται ημισυνθετικά από το αντιβιοτικό χλωροτετρακυκλίνη, το οποίο απομονώνεται από το βακτήριο *Streptomyces aureofaciens* (National Center for Biotechnology Information 2021). Χρησιμοποιείται έναντι βακτηρίων, όπως το *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas* spp. και *Xanthomonas* spp. αλλά και μυκοπλασμάτων. Δρα παρεμποδίζοντας τη σύνθεση πρωτεϊνών στα προκαρυωτικά (70S) και ευκαρυωτικά (80S) ριβοσώματα (Ζιώγας και Μαρκόγλου 2017). Η χλωραμφαινικόλη παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces venezuelae*. Είναι βακτηριοστατικό και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1-10 µg/mL) παρεμποδίζει την ανάπτυξη θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Δεν είναι αποτελεσματικό σε μύκητες. Δρα παρεμποδίζοντας την ολική σύνθεση πρωτεϊνών και ενζύμων (Brock 1961). Το 1964 χρησιμοποιήθηκε στην Ιαπωνία, για την αντιμετώπιση της βακτηριακής σήψης των φύλλων σε καλλιέργειες ρυζιού (Misato et al., 1977). Το αντιβιοτικό ερυθρομυκίνη ανήκει στη χημική ομάδα μακρολίδια (Zimdahl 2015) και δρα παρεμποδίζοντας τη πρωτεϊνοσύνθεση (Vannuffel and Cocito 1996). Είναι πιο

αποτελεσματικό ενάντια στα θετικά κατά Gram βακτήρια. Η αποτελεσματικότητά του αυξάνεται σε αλκαλικό pH. Σε pH μικρότερο από 5 είναι ασταθές (Pollock et al. 1983). Η πενικιλίνη ανήκει στις β-λακτάμες και παράγεται από μύκητες του γένους *Penicillium*. Είναι βακτηριοκτόνο και δρα παρεμποδίζοντας το σχηματισμό των πεπτιδογλυκάνων του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Το κύτταρο τελικά οδηγείται σε ρήξη (Soares et al. 2012).

### **3.3.1 Ανθεκτικότητα βακτηρίων στα αντιβιοτικά**

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται κυρίως στην ιατρική για την αντιμετώπιση ασθενειών του ανθρώπου. Τα τελευταία χρόνια παρατηρήθηκε η δημιουργία ανθεκτικών βακτηρίων που προσβάλλουν τον άνθρωπο στα αντιβιοτικά (Stockwel and Duffy 2012). Ο σχηματισμός ανθεκτικότητας μπορεί να αποδοθεί στην αλόγιστη και άσκοπη χρήση τους, στη λανθασμένη χρήση τους και στην αδυναμία παραγωγής νέων αντιβιοτικών ουσιών (Ventola 2015). Τα βακτήρια μπορεί να είναι ανθεκτικά από τη φύση τους ή να αναπτύξουν ανθεκτικότητα λόγω της βαθμιαίας έκθεσής τους στο αντιβιοτικό. Η ανθεκτικότητα περιλαμβάνει μεταβολές στο DNA, οι οποίες είναι είτε αποτέλεσμα μετάλλαξης, είτε οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων από έναν οργανισμό ανθεκτικό σε έναν άλλο (Sabtu et al. 2015). Η μεταφορά γονιδίων μπορεί να συμβεί όταν τα δύο βακτήρια έρθουν σε επαφή, που είναι και η πιο κοινή διαδικασία ή με την είσοδο βακτηριοφάγων που μεταφέρουν το γονίδιο (Soares et al. 2012). Οι μεταβολές έχουν ως αποτέλεσμα μια από τις εξής στρατηγικές: τροποποίηση του μορίου του αντιβιοτικού, μείωση πρόσληψης του αντιβιοτικού ή ενεργό απόρριψή του ώστε να μη φτάσει το μόριο-στόχο, μετά-μεταγραφική ή μετά-μεταφραστική αλλαγή του μορίου στόχου (Dowling et al. 2017, Sundin and Wang 2018). Μεταφορά γονιδίων μπορεί να συμβεί και μεταξύ μη συγγενικών ειδών (Sabtu et al. 2015). Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό και η επιστημονική κοινότητα εκτός από τη χρήση των αντιβιοτικών στην ιατρική, εξετάζει και αυτή στην κτηνοτροφία και τη γεωργία (Stockwel and Duffy 2012). Όσον αφορά την κτηνοτροφία, η μεταφορά ανθεκτικών βακτηρίων στον άνθρωπο μπορεί να συμβεί με κατανάλωση ωμού κρέατος ή μέσω της κοπριάς, καθώς το 80% των

αντιβιοτικών που καταναλώνουν τα ζώα αποβάλλεται. Επίσης σε αυξημένο κίνδυνο βρίσκονται οι εργαζόμενοι (Allerberger et al. 2003). Όσον αφορά τη φυτική παραγωγή, ο κίνδυνος είναι περιορισμένος, καθώς τα ανθεκτικά φυτοπαθογόνα βακτήρια δεν έρχονται σε άμεση επαφή με βακτήρια που μολύνουν τον άνθρωπο. Επιπλέον δεν υπάρχουν αναφορές ότι το αντιβιοτικό που καταλήγει στο έδαφος κατά τη διάρκεια του ψεκάσμου συμβάλλει στη δημιουργία ανθεκτικών βακτηρίων. Επιπρόσθετα, τα αντιβιοτικά χάνουν την δραστηριότητά τους γρήγορα όταν εκτεθούν στις συνθήκες του περιβάλλοντος, όπως η θερμοκρασία και η ηλιακή ακτινοβολία (Stockwel and Duffy 2012).

### **3.3.2 Περιορισμοί στη χρήση αντιβιοτικών στη φυτική και ζωική παραγωγή**

Πολλές χώρες έχουν θέσει περιορισμούς στη χρήση των αντιβιοτικών στη ζωική και φυτική παραγωγή. Η Ευρωπαϊκή Ένωση από το 1997 άρχισε να καταργεί σταδιακά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνταν στις ζωοτροφές (Allerberger et al. 2003) και από την 1<sup>η</sup> Ιανουαρίου 2006, απαγόρευσε ολοκληρωτικά τη χρήση αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στις ζωοτροφές (Anadon 2006). Στην Ευρώπη, η χρήση αντιβιοτικών στη φυτοπροστασία απαγορεύεται. Εξαιρέση αποτελούν η Αυστρία και η Ελβετία, οι οποίες επιτρέπουν τη χρήση στρεπτομυκίνης για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος σε μικρές ποσότητες, σε περιπτώσεις έκτακτης ανάγκης. Τα δεδομένα για τις χώρες στις οποίες επιτρέπεται η χρήση αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων βακτηρίων είναι περιορισμένα, ωστόσο υπάρχουν αναφορές ότι είναι 30-40. Σε κάποιες από αυτές υπάρχουν περιορισμοί (Haynes et al. 2020). Ο Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος των Η.Π.Α., έχει θεσπίσει κανόνες όσον αφορά τη χρήση των αντιβιοτικών οξυτετρακυκλίνη και στρεπτομυκίνη για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Ο παραγωγός είναι υποχρεωμένος να φοράει κατάλληλο ρουχισμό, προστατευτικά γυαλιά και μάσκα, και μετά την εφαρμογή απαγορεύεται η είσοδος στο χωράφι μέχρι να περάσει ένα καθορισμένο διάστημα. Στις ετικέτες αναγράφεται ο χρόνος από την τελευταία επέμβαση ως τη συγκομιδή, ο οποίος

κυμαίνεται από 21-60 ημέρες. Τέλος καθορίζονται και τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων στο συγκομισμένο προϊόν (McManus et al. 2002).

#### **3.4.1. Ανθεκτικότητα βακτηρίων στα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη**

Το αντιβιοτικό πενικιλίνη δρα παρεμποδίζοντας τη σύνθεση των πεπτιδογλυκάνων του κυτταρικού τοιχώματος. Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στην πενικιλίνη είναι οι εξής: σύνθεση των ενζύμων βήτα-λακταμάσες, τα οποία υδρολύουν το αντιβιοτικό, τροποποίηση των πρωτεϊνών PBPs στις οποίες συνδέεται το αντιβιοτικό και αλλαγές στις πρωτεΐνες των μεμβρανών (Cesur and Demiroz 2013). Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη είναι δύο. Ο πρώτος, που είναι και ο πιο κοινός, είναι η μετάλλαξη μιας βάσης στο κωδικόνιο 43 του χρωμοσωμικού γονιδίου *rpsL*, το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη της υπομονάδας 30S του ριβοσώματος. Αποτέλεσμα της μετάλλαξης είναι η αδυναμία σύνδεσης του αντιβιοτικού στο ριβόσωμα (Stockwell and Duffy 2012, Acosta-Muniz et al. 2013). Ο δεύτερος είναι η ύπαρξη ενός πλασμιδίου που φέρει τα γονίδια *strA* και *strB*, τα οποία κωδικοποιούν το ένζυμο αμινογλυκοσίδη-φωσφοροτρανσφεράση, το οποίο καθιστά το αντιβιοτικό ανενεργό. Τα γονίδια αυτά βρίσκονται πάνω στο μεταθετό στοιχείο Tn5393, το οποίο είναι κινητό μόριο DNA και βρίσκεται είτε στο πλασμίδιο pEa34, είτε στο pEA29 (McManus and Stockwell 2000, Acosta-Muniz et al. 2013)

#### **3.4.2 Ανθεκτικότητα *Erwinia amylovora* σε αντιβιοτικά**

Το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη χρησιμοποιείται στην φυτοπροστασία από το 1955, κυρίως για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος σε μηλιές και αχλαδιές (Stockwell et al. 2012). Η πρώτη αναφορά για ανθεκτικότητα του βακτηρίου στο αντιβιοτικό έγινε το 1971 στην Καλιφόρνια και έκτοτε ακολούθησαν και άλλες (Tancos et al. 2016). Σε πείραμά τους οι Tancos et al. (2016), εντόπισαν ανθεκτικές απομονώσεις του παθογόνου σε περιοχές της Ν. Υόρκης, οι οποίες περιείχαν τα γονίδια *strA* και *strB*, στο πλασμίδιο pEA29. Οι

Islam et al. (2014) σε πείραμά τους δοκίμασαν την αποτελεσματικότητα *in vitro* των αντιβιοτικών στρεπτομυκίνη (10 µg), γενταμυκίνη (10 µg), χλωραμφαινικόλη (30 µg), κεφοταξίμη (5 µg), βακιτρακίνη (10 µg). Ο έλεγχος ευαισθησίας έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Kirby-Bauer. Ανθεκτικότητα παρατηρήθηκε σε όλα τα αντιβιοτικά, εκτός από την χλωραμφαινικόλη.

### **3.4.3 Ανθεκτικότητα *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε αντιβιοτικά**

Για την αντιμετώπιση της ασθένειας έχει προταθεί η χρήση ορισμένων αντιβιοτικών. Σε πείραμα που διεξάχθηκε από τον Khlaif (2006) δοκιμάστηκε η αποτελεσματικότητα *in vitro* έναντι του παθογόνου των εξής αντιβιοτικών: στρεπτομυκίνη, ερυθρομυκίνη, γενταμυκίνη και τετρακυκλίνη. Ανθεκτικότητα του παθογόνου δε βρέθηκε σε κανένα αντιβιοτικό καθώς σε όλες τις δοκιμές υπήρχε ζώνη παρεμπόδισης ανάπτυξης. Μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην ίδια συγκέντρωση είχε το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη καθώς σχηματίστηκε η μεγαλύτερη ζώνη παρεμπόδισης (32,3mm) και μικρότερη το αντιβιοτικό ερυθρομυκίνη. Σε παρόμοιο πείραμα οι Bouaichi et al. (2019), εξέτασαν την αποτελεσματικότητα έναντι του *P. savastanoi* pv *savastanoi* των αντιβιοτικών χλωροτετρακυκλίνη, βακιτρακίνη, κεφαλεξίνη, αμπικιλίνη, D-κυκλοσερίνη και νοβοβιοσίνη. Το παθογόνο ήταν ανθεκτικό στα αντιβιοτικά βακιτρακίνη, κεφαλεξίνη, αμπικιλίνη και D-κυκλοσερίνη σε όλες τις συγκεντρώσεις. Ανθεκτικότητα παρατηρήθηκε και στη νοβοβιοσίνη στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Τα αντιβιοτικά χλωροτετρακυκλίνη και στρεπτομυκίνη ήταν αποτελεσματικά σε όλες τις συγκεντρώσεις, καθώς σχηματίστηκαν ζώνες παρεμπόδισης ανάπτυξης. Οι Fernandes and Marcelo (2008) σε πείραμα τους, εντόπισαν στελέχη του παθογόνου τα οποία ήταν ανθεκτικά στα αντιβιοτικά χλωρομυκετίνη, χλωραμφαινικόλη, πενικιλίνη, διυδροστρεπτομυκίνη, νοβοβιοσίνη, ολεαντομυκίνη, ερυθρομυκίνη και polymyxin B.

### 3.5 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη, απομονώσεων των φυτοπαθογόνων βακτηρίων *Pseudomonas savastanoi* pv. *sanastanoi* και *Erwinia amylovora*.

## 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1 Απομόνωση του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* από όγκους ελιάς

Για την απομόνωση του βακτηρίου εξετάστηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι. Η απομόνωση έγινε από δύο όγκους σε βλαστούς ελιάς. Ο πρώτος όγκος ήταν παλιός αλλά κλειστός, μεγάλος σε μέγεθος, με σκούρο καφέ χρώμα. Το εσωτερικό του ήταν καφέ σκούρο. Ο δεύτερος ήταν νεοσχηματισμένος και κλειστός, μικρός σε μέγεθος, με ανοιχτό καφέ χρώμα. Το εσωτερικό του ήταν πράσινο. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το King's B (παρ. 4.2). Σύμφωνα με την 1<sup>η</sup> μέθοδο (Bouaichi et al. 2019), οι βλαστοί απολυμάνθηκαν επιφανειακά με αιθανόλη 90%, χρησιμοποιώντας χαρτί εμποτισμένο με αιθανόλη. Στη συνέχεια ο όγκος απομακρύνθηκε από το βλαστό με νυστέρι υπό ασηπτικές συνθήκες και τεμαχίστηκε. Κομμάτια 1-2 mm από το εσωτερικό του όγκου τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια φυγοκέντρησης των 1,5 mL που περιείχαν 200  $\mu$ L αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και με κατάλληλα διαμορφωμένο έμβολο σύνθλιψης (micropestle) πραγματοποιήθηκε λειοτρίβιση του περιεχομένου των φιαλιδίων. Μετά από 30 min το αιώρημα τοποθετήθηκε με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό King's B και έγινε διασπορά (plating). Τέλος τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25 °C για επώαση. Σύμφωνα με τη 2<sup>η</sup> μέθοδο (Nguyen et al. 2018), οι βλαστοί απολυμάνθηκαν επιφανειακά με αιθανόλη 90%, χρησιμοποιώντας χαρτί εμποτισμένο με αιθανόλη. Στη συνέχεια ο όγκος απομακρύνθηκε με νυστέρι υπό ασηπτικές συνθήκες και τεμαχίστηκε. Κομμάτια 1-2 mm από το εσωτερικό του όγκου τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια φυγοκέντρησης των 1,5 mL που περιείχαν 600  $\mu$ L αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Τα φιαλίδια αναδεύτηκαν έντονα (vortex) για 5 min και το περιεχόμενο τους τοποθετήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό King's B. Πραγματοποιήθηκε διασπορά και τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 25 °C.



## 4.2 Θρεπτικά υλικά

Για την ανάπτυξη του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* παρασκευάστηκε θρεπτικό υλικό King's B, ενώ για την ανάπτυξη του *Erwinia amylovora* στερεό θρεπτικό υλικό NSA και υγρό NS broth.

### 4.2.1 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού King's B

Σε 1000 mL απιονισμένο νερό περιέχονται 20 g πεπτόνη πρωτεάσης (Oxoid), 1,96 g  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  (Merck), 1,5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck), 15 mL γλυκερόλη, 15 g άγαρ (Sigma). Για την παρασκευή του υλικού, θερμάνθηκαν μέχρι βρασμό η πεπτόνη και το άγαρ με 900 mL απιονισμένο νερό και στη συνέχεια στο ζεστό διάλυμα προστέθηκαν τα υπόλοιπα συστατικά. Πραγματοποιήθηκε ογκομέτρηση και το υλικό αποστειρώθηκε στους 121 °C και διαμοιράστηκε σε τρυβλία διαμέτρου 90 mm (15 mL/τρυβλίο).

### 4.2.2 Παρασκευή υγρού θρεπτικού υλικού King's B

Υγρό θρεπτικό υλικό KB (20 g πεπτόνη πρωτεάσης από Oxoid, 1,96 g  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  (Merck), 1,5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck), 15 ml γλυκερόλη σε 1000 mL απιονισμένο νερό). Για την παρασκευή του υλικού θερμάνθηκαν η πεπτόνη και 900 mL απιονισμένο νερό, χωρίς να φτάσουν σε βρασμό και στο διάλυμα προστέθηκαν τα υπόλοιπα συστατικά. Πραγματοποιήθηκε ογκομέτρηση και το υλικό αποστειρώθηκε στους 121 °C και διαμοιράστηκε σε φιαλίδια (10 mL/φιαλίδιο).

### 4.2.3 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού NSA

Σε 1000 mL απιονισμένο νερό περιέχονται 28 g LAB M Nutrient Agar (σύσταση πεπτόνη 5 g/L, βόειο εκχύλισμα 3 g/L, NaCl 8 g/L, άγαρ No2 12 g/L, pH 7,5 ± 0,2), 3 g άγαρ (Sigma), ώστε η τελική συγκέντρωση για το άγαρ να είναι 1,5% και 50 g D (+)- σακχαρόζη (Roth). Για την παρασκευή του προστέθηκαν στην κωνική όλα τα υλικά μαζί με το απιονισμένο νερό και αφέθηκαν για 10 λεπτά

ώστε να ενυδατωθούν. Μετά έγινε ανάδευση για 5 λεπτά. Τέλος το υλικό αποστειρώθηκε στους 121 °C και διαμοιράστηκε σε τρυβλία διαμέτρου 90 mm (15 mL/τρυβλίο).

#### **4.2.4 Παρασκευή υγρού θρεπτικού υλικού NS Broth**

Σε 1000 mL απιονισμένο νερό περιέχονται 3 g βόειο εκχύλισμα (LAB Lemco Powder), 5 g πεπτόνη πρωτεάσης (Oxoid) και 50 g D (+)- σακχαρόζη (Roth). Για την παρασκευή του προστέθηκε σε κωνική φιάλη το βόειο εκχύλισμα, η πεπτόνη και το απιονισμένο νερό και θερμάνθηκαν χωρίς να φτάσουν σε βρασμό. Κατόπιν προστέθηκε η D (+)- σακχαρόζη. Τέλος το υλικό αποστειρώθηκε στους 121 °C και διαμοιράστηκε σε φιαλίδια (10 mL/φιαλίδιο).

### **4.3 Έλεγχος ευαισθησίας βακτηρίων στα αντιβιοτικά**

#### **4.3.1 Έλεγχος ευαισθησίας *P. savastanoi* pv. *savastanoi* στα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη**

Για τον έλεγχο ευαισθησίας χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά θειικό άλας στρεπτομυκίνης (SERVA, 750 unit/mg) και άλας πενικιλίνης G με κάλιο (ROTH, 1600 unit/mg), σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις και ως μάρτυρας αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε δέκα απομονώσεις *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (PSS1, PSS2, PSS3, PSS4, PP5, PSS6, PSS7, PSS8, PSS9, PSS10), του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που διατηρούνταν στους -80 °C. Για το κάθε αντιβιοτικό και απομόνωση έγιναν 3 επαναλήψεις. Οι απομονώσεις PSS1, PSS2, PSS5, PSS10 προέρχονται από ελιές από περιοχές του νομού Μαγνησίας και οι υπόλοιπες από περιοχές του νομού Φθιώτιδας. Ως μόλυσμα χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες του βακτηρίου σε υγρό υλικό King´ B (με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου, μικρή ποσότητα από την κάθε αποικία τοποθετήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε φιαλίδια που περιείχαν 10 mL υγρού θρεπτικού υλικού King's B, τα οποία τοποθετήθηκαν

στον επωαστικό θάλαμο στους 25°C, που πραγματοποιεί ταυτόχρονη ανακίνηση στα 150 rpm, για 12 h).

Για τον έλεγχο ευαισθησίας του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στα αντιβιοτικά, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με χρήση δισκίων διηθητικού χαρτιού εμποτισμένων με αντιβιοτικά (disc diffusion method). Για τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, το κάθε τρυβλίο που περιείχε θρεπτικό υλικό King's B, χωρίστηκε σε τεταρτημόρια. Αρχικά πραγματοποιήθηκε διασπορά 200  $\mu$ L από τις υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων. Στη συνέχεια σε φιαλίδια φυγοκέντρησης, δημιουργήθηκαν τα υδατικά διαλύματα στρεπτομυκίνης με διαδοχικές αραιώσεις. Οι τελικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων ήταν οι εξής: 0  $\mu$ g/ $\mu$ L, 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ L, 2  $\mu$ g/ $\mu$ L και 10  $\mu$ g/ $\mu$ L. Ποσότητα ίση με 5  $\mu$ L από το κάθε διάλυμα αντιβιοτικού προστέθηκε σε δισκίο διηθητικού χαρτιού (Macherey- nagel MN 640 md, Ashless Filter Circles) με διάμετρο 6mm, ώστε να προκύψουν δισκία που περιείχαν 0, 1, 10 και 50  $\mu$ g αντιβιοτικού. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκε ένα δισκίο με 0  $\mu$ g, ένα με 1  $\mu$ g, ένα με 10  $\mu$ g και ένα με 50  $\mu$ g. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ανά απομόνωση και με ταυτόχρονη απολύμανση της λαβίδας ώστε να μην υπάρξει επιμόλυνση. Τέλος τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 25 °C και μετά από 24 h μετρήθηκε με χάρακα η ζώνη παρεμπόδισης (διάμετρος κύκλου που σχηματίστηκε γύρω από το κάθε φίλτρο). Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για το αντιβιοτικό πενικιλίνη. Αρχικά έγινε έλεγχος ευαισθησίας 3 απομονώσεων (PSS1, PSS10 και PSS6) του βακτηρίου στις συγκεντρώσεις 0  $\mu$ g/ $\mu$ L, 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ L, 2  $\mu$ g/ $\mu$ L και 10  $\mu$ g/ $\mu$ L και στη συνέχεια σε όλες τις απομονώσεις στις εξής συγκεντρώσεις: 0  $\mu$ g/ $\mu$ L, 10  $\mu$ g/ $\mu$ L, 20  $\mu$ g/ $\mu$ L και 50  $\mu$ g/ $\mu$ L.

#### **4.3.2 Έλεγχος ευαισθησίας *Erwinia amylovora* στα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη**

Ο έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, πραγματοποιήθηκε σε δέκα απομονώσεις του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που διατηρούνταν στους -80 °C. Οι απομονώσεις προέρχονταν από αχλαδιές του νομού Μαγνησίας και ήταν οι εξής: Eam3, Eam7, Eam8,

Eam9, Eam10, Eam11, Eam12, Eam13, Eam14, Eam15. Για την κάθε απομόνωση έγινε έλεγχος ευαισθησίας της σε 2 αντιβιοτικά, σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις το καθένα και για την κάθε συγκέντρωση και αντιβιοτικό έγιναν 3 επαναλήψεις. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν θειικό άλας στρεπτομυκίνης (SERVA, 750 unit/mg) και άλας πενικιλίνης G με κάλιο (ROTH, 1600 unit/mg). Ως μόλυσμα χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες του βακτηρίου σε υγρό υλικό NS Broth (με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου, μικρή ποσότητα από την κάθε αποικία τοποθετήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε μπουκαλάκια που περιείχαν 10 mL υγρού θρεπτικού υλικού NS broth, τα οποία τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο στους 25 °C, που πραγματοποιεί ταυτόχρονη ανακίνηση στα 150 rpm, για 12 h).

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δύο προκαταρκτικά πειράματα, στα οποία αξιολογήθηκε η ποσότητα μολύσματος από τις υγρές καλλιέργειες, που έπρεπε να τοποθετηθεί στα τρυβλία για διασπορά. Οι ποσότητες του μολύσματος που δοκιμάστηκαν ήταν οι εξής: 200  $\mu$ L από την υγρή καλλιέργεια, 100  $\mu$ L από την υγρή με 100 $\mu$ L NS broth (αραίωση 1:1) και 50  $\mu$ L από την υγρή με 150  $\mu$ L NS broth (αραίωση 1:4). Οι απομονώσεις στις οποίες έγινε η δοκιμή ήταν η Eam3 και Eam10.

Για τον έλεγχο ευαισθησίας του βακτηρίου *Erwinia amylovora* στα αντιβιοτικά, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με χρήση δισκίων διηθητικού χαρτιού εμποτισμένων με αντιβιοτικά. Τα τρυβλία χωρίστηκαν σε τεταρτημόρια και στη συνέχεια έγινε διασπορά 200  $\mu$ L διαλύματος υγρής καλλιέργειας του βακτηρίου με υγρό υλικό NS broth σε αναλογία 1:5. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων στρεπτομυκίνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 0  $\mu$ g/ $\mu$ L, 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ L, 2  $\mu$ g/ $\mu$ L και 10  $\mu$ g/ $\mu$ L, ώστε στο κάθε τρυβλίο να υπάρχουν τέσσερα φίλτρα με 0  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g και 50  $\mu$ g στρεπτομυκίνη, ενώ οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων πενικιλίνης ήταν 0  $\mu$ g/ $\mu$ L, 10  $\mu$ g/ $\mu$ L, 20  $\mu$ g/ $\mu$ L και 50  $\mu$ g/ $\mu$ L, ώστε στο κάθε τρυβλίο να υπάρχουν τέσσερα δισκία με 0  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, 100  $\mu$ g και 250  $\mu$ g πενικιλίνη. Η διαδικασία ήταν ίδια και για τα δύο αντιβιοτικά. Ποσότητα ίση με 5  $\mu$ L από το κάθε διάλυμα αντιβιοτικού προστέθηκε σε δισκίο διηθητικού χαρτιού (Macherey- nagel MN 640 md, Ashless Filter Circles) με διάμετρο 6mm. Στη συνέχεια, ένα δισκίο από την κάθε συγκέντρωση τοποθετήθηκε

ασηπτικά με λαβίδα στα τρυβλία στο κέντρο κάθε τεταρτημορίου. Τέλος τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 25 °C και μετά από 24 h μετρήθηκε με χάρακα η ζώνη παρεμπόδισης (διάμετρος κύκλου που σχηματίστηκε γύρω από το κάθε φίλτρο).

#### 4.4 Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA) μέσω του Microsoft Excel, ώστε να διαπιστωθεί αρχικά αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων στις 3 συγκεντρώσεις του κάθε αντιβιοτικού. Η υπόθεση 0 ήταν ότι οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης δε διέφεραν μεταξύ τους. Αν προέκυπτε  $F > F_{critical}$ , δηλαδή υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, πραγματοποιούνταν ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα για την κάθε συγκέντρωση.

Αν κάποιος ή όλοι οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων του κάθε βακτηρίου διέφεραν μεταξύ τους ( $F > F_{critical}$ ), πραγματοποιούνταν Tukey HSD (Honestly Significant Difference) test, ώστε να βρεθούν ποιοι μέσοι όροι διέφεραν μεταξύ τους. Στο test αυτό συγκρίθηκε το  $q$ , όπου  $q = \text{Διαφορά} / \text{Τυπικό σφάλμα}$ , με το  $q_{critical}$ , το οποίο προκύπτει από το Studentized Range  $q$  Table. Διαφορά είναι η απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των απομονώσεων (ανά δύο) και το τυπικό σφάλμα δίνεται από τον τύπο  $\text{Τυπικό σφάλμα} = \sqrt{0,5 * MSw * (1/n_1 + 1/n_2)}$ , όπου MSw είναι το Means square error within groups από τον πίνακα ANOVA και  $n_1, n_2$  ο αριθμός των επαναλήψεων. Αν  $q > q_{critical}$ , τα ζεύγη των απομονώσεων διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Τέλος με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα και t-test οι απομονώσεις στην κάθε συγκέντρωση ομαδοποιήθηκαν. Στην ίδια ομάδα κατατάχθηκαν απομονώσεις στις οποίες  $F < F_{critical}$ . Το t-test πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί αν δύο απομονώσεις βρίσκονταν στην ίδια ομάδα. Αν  $P\text{-two tail} > \alpha$ ,

όπου  $\alpha=0,05$  οι απομονώσεις ανήκαν στην ίδια ομάδα και αν  $P\text{-two tail}<\alpha$ , υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων τους.

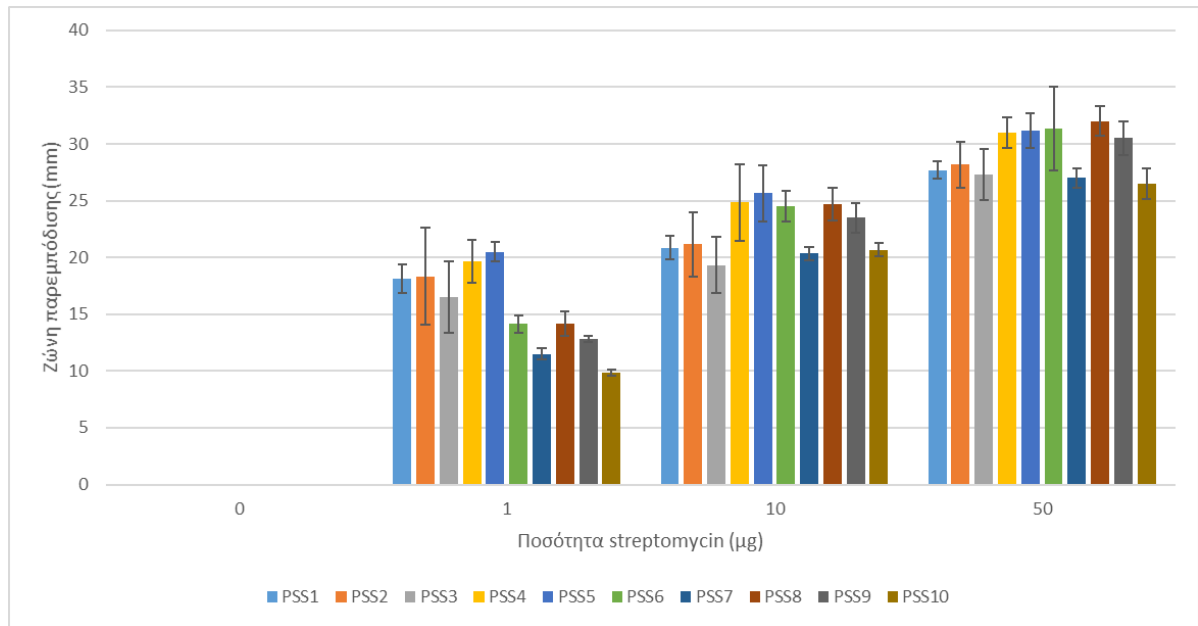
## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 5.1 Απομόνωση του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* από όγκους ελιάς

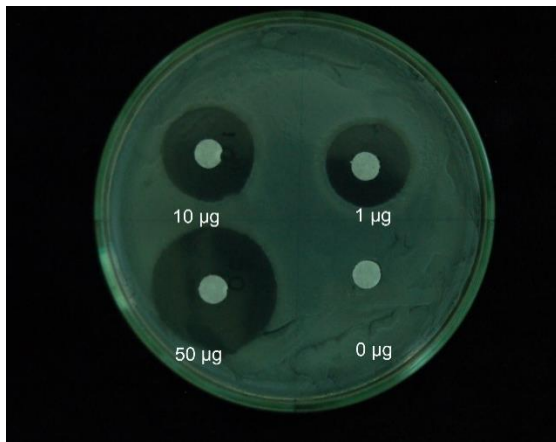
Στην απομόνωση από τον παλιό όγκο που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την πρώτη μέθοδο, προέκυψαν μικρές άσπρες αποικίες βακτηρίου, οι οποίες διακρίνονταν μεταξύ τους. Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε και ανάπτυξη μυκήτων. Στην απομόνωση από τον ίδιο όγκο που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη δεύτερη μέθοδο, παρατηρήθηκαν επίσης μικρές διακριτές άσπρες αποικίες. Στην περίπτωση αυτή δεν υπήρξε ανάπτυξη μυκήτων. Όσον αφορά το νέο όγκο και με τις δύο μεθόδους η ανάπτυξη του βακτηρίου ήταν μεγάλη και οι αποικίες δεν διαχωρίζονταν μεταξύ τους.

#### 5.2.1 Έλεγχος ευαισθησίας *P. savastanoi* pv. *savastanoi* στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη

Στον έλεγχο ευαισθησίας των δέκα απομονώσεων του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με χρήση δισκίων διηθητικού χαρτιού εμποτισμένων με το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, δημιουργήθηκαν ζώνες παρεμπόδισης σε όλες τις ποσότητες από όλες τις απομονώσεις (Εικόνες 4 - 13). Στο διάγραμμα 1 παρουσιάζεται για την κάθε απομόνωση, ο μέσος όρος των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψε από τις 3 επαναλήψεις, για κάθε ποσότητα αντιβιοτικού και η τυπική απόκλιση. Στη ζώνη παρεμπόδισης συμπεριλαμβάνεται και η διάμετρος του δισκίου (6 mm).

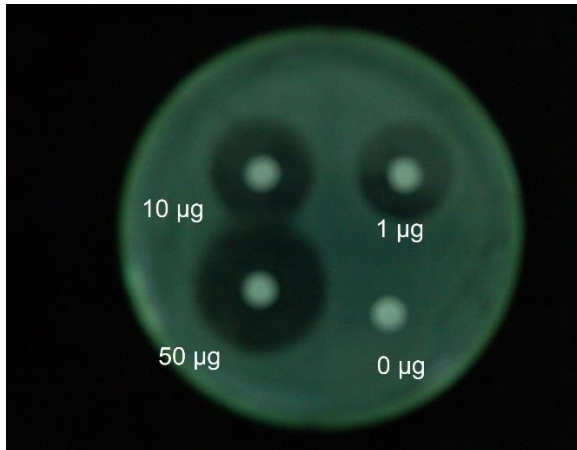


Διάγραμμα 1: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση ζωνών παρεμπόδισης (mm) των απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, στις διάφορες ποσότητες στρεπτομυκίνης.

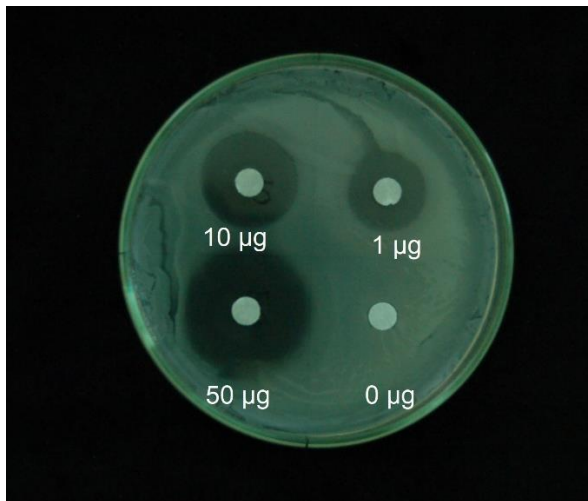


Εικόνα 4. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS1 κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.

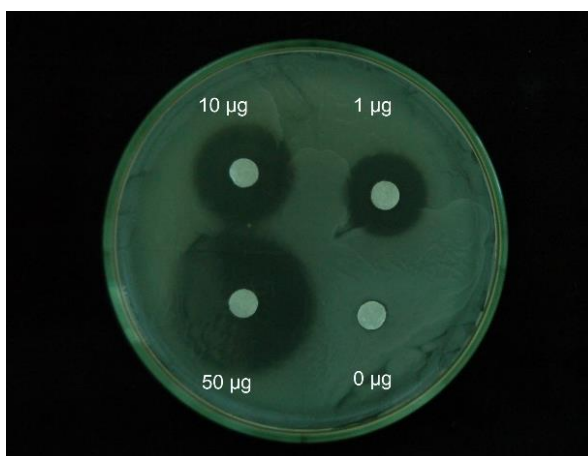




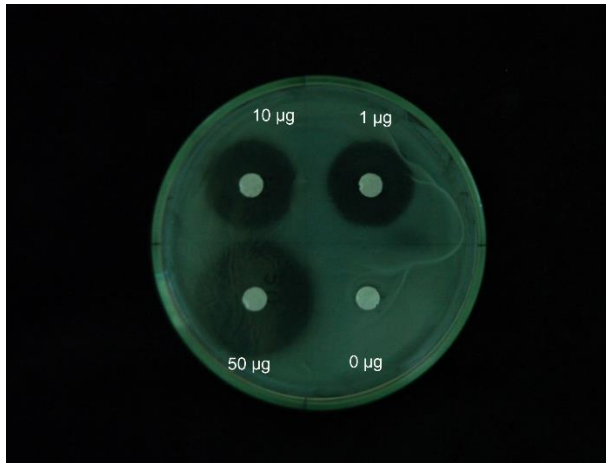
Εικόνα 5. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS2 κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



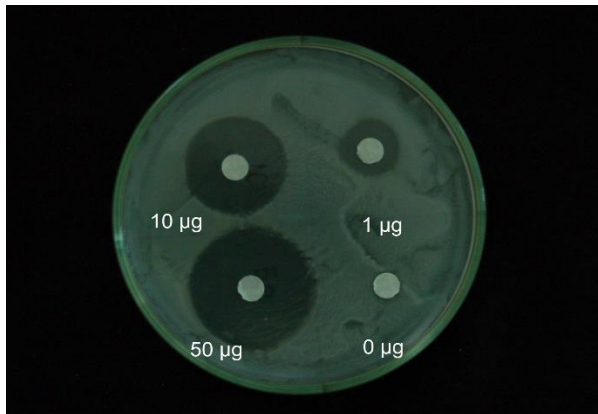
Εικόνα 6. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS3 κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



Εικόνα 7. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS4 κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



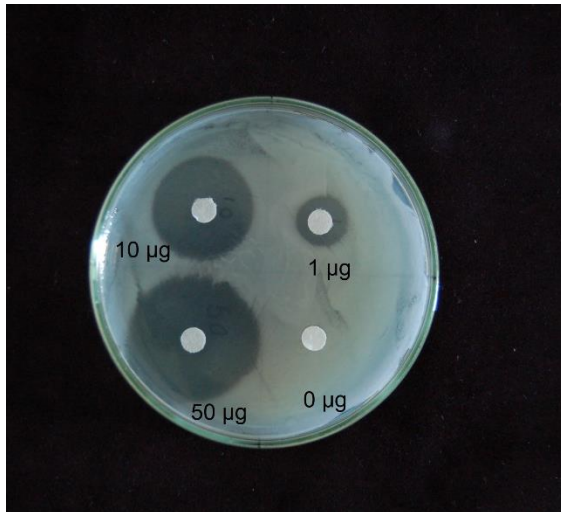
Εικόνα 8. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS5, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



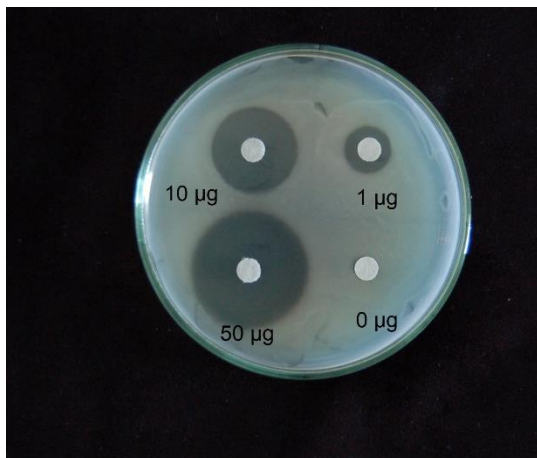
Εικόνα 9. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS6, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



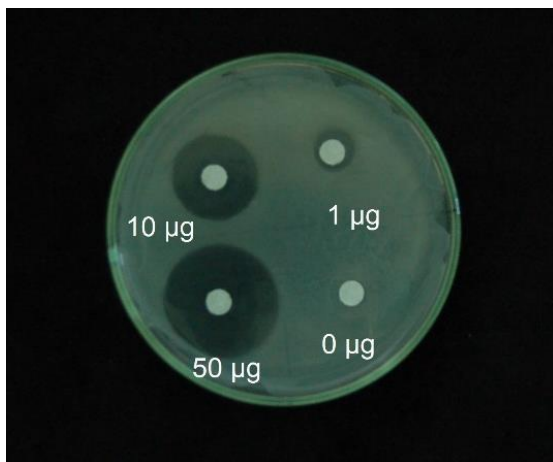
Εικόνα 10. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης PSS7 του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS7, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



Εικόνα 11. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS8, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



Εικόνα 12. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS9, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



Εικόνα 13. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS10, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.

### 5.2.2 Έλεγχος ευαισθησίας *P. savastanoi* πν. *savastanoi* σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 1 μg

Οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης του βακτηρίου *P. savastanoi* πν. *savastanoi* στην ποσότητα 1 μg παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων παρουσία 1μg στρεπτομυκίνης/δισκίο.

	1 μg streptomycin
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ	Ζώνη παρεμπόδισης (mm)
PSS1	18,16666667
PSS2	18,33333333
PSS3	16,5
PSS4	19,66666667
PSS5	20,5
PSS6	14,16666667
PSS7	11,5
PSS8	14,16666667
PSS9	12,83333333
PSS10	9,83333333

Από την ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA), προέκυψε ότι μεταξύ των δέκα απομονώσεων παρουσία 1μg/δισκίο, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη ζώνη παρεμπόδισης, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 1μg στρεπτομυκίνης/δισκίο, για τις δέκα απομονώσεις PSS.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	351,7	9	39,0777778	10,90542636	5,896E-06	2,392814108
Within Groups	71,66666667	20	3,58333333			
Total	423,3666667	29				

Από το Tukey HSD test, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 3) και με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις PSS1, PSS2, PSS3, PSS4 και PSS5 όπου σε δοκιμή ANOVA των μέσων όρων τους,  $F < F_{critical}$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 4). Στη

δεύτερη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις PSS6, PSS8 και PSS9 όπου σε δοκιμή ANOVA των μέσων όρων τους,  $F < F_{critical}$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 5). Τέλος οι απομονώσεις PSS7, PSS10 δεν ανήκουν σε καμία ομάδα και διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, καθώς στο t-test προέκυψε ότι  $P \text{ two-tail} < \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$ . (Πίνακας 6).

Πίνακας 3. Tukey HSD test μεταξύ των δέκα απομονώσεων στη συγκέντρωση στρεπτομυκίνης 1μg/δισκίο. Ζεύγη με  $q > q_{critical}$ , όπου  $q_{critical} = 5,008$  (real-statistics.com), διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και σημειώνονται με κίτρινο χρώμα.

q	PSS1	PSS2	PSS3	PSS4	PSS5	PSS6	PSS7	PSS8	PSS9	PSS10
PSS1	x									
PSS2	0,152499 x									
PSS3	1,524986	1,677484 x								
PSS4	1,372487	1,219989	2,897473 x							
PSS5	2,13498	1,982481	3,659966	0,762493 x						
PSS6	3,659966	3,812464	2,13498	5,032453	5,794946 x					
PSS7	6,099943	6,252441	4,574957	7,47243	8,234923	2,439977 x				
PSS8	3,659966	3,812464	2,13498	5,032453	5,794946	0	2,439977 x			
PSS9	4,879954	5,032453	3,354969	6,252441	7,014934	1,219989	1,219989	1,219989 x		
PSS10	7,624929	7,777427	6,099943	8,997416	9,759909	3,964963	1,524986	3,964963	0,384615 x	
<b>q<sub>critical</sub>=5,008</b>										

Πίνακας 4. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS1, PSS2, PSS3, PSS4, PSS5 παρουσία 1μg στρεπτομυκίνης/δισκίο.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	28,23333	4	7,0583333	1,045679	0,431225902	3,478049691
Within Groups	67,5	10	6,75			
Total	95,73333	14				

Πίνακας 5. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS6, PSS8, PSS9, παρουσία 1μg στρεπτομυκίνης/δισκίο.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	3,55555556	2	1,7777778	3,047619	0,12207	5,14325285
Within Groups	3,5	6	0,5833333			
Total	7,05555556	8				

Πίνακας 6. T test για τους μέσους όρους των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS7 και PSS10, παρουσία 1μg στρεπτομικίνης/δισκίο.

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	PSS7	PSS10
Mean	11,5	9,833333
Variance	0,25	0,083333
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	3	
t	5	
P(T<=t) one-tail	0,007696219	
t Critical one- tail	2,353363435	
P(T<=t) two-tail	0,015392438	
t critical two-tail	3,182446305	

### 5.2.3 Έλεγχος ευαισθησίας *P. savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα στρεπτομικίνης 10 μg

Οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν στην ποσότητα 10 μg στρεπτομικίνης παρουσιάζονται στο Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων παρουσία 10 μg στρεπτομικίνης/δισκίο.

	10 μg streptomycin
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ	Ζώνη παρεμπόδισης (mm)
PSS1	20,83333333
PSS2	21,16666667
PSS3	19,33333333
PSS4	24,83333333
PSS5	25,66666667
PSS6	24,5
PSS7	20,33333333
PSS8	24,66666667
PSS9	23,5
PSS10	20,66666667

Με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, προέκυψε ότι μεταξύ των απομονώσεων σε ποσότητα στρεπτομικίνης 10 μg/δισκίο, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά τους μέσους όρους, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης/δισκίο, για τις δέκα απομονώσεις PSS.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	143,3416667	9	15,92685185	4,0664303	0,004315224	2,392814108
Within Groups	78,33333333	20	3,916666667			
Total	221,675	29				

Από το Tukey HSD test, βρέθηκε ότι ο μέσος όρος της ζώνης παρεμπόδισης της απομόνωσης PSS3 διαφέρει στατιστικά σημαντικά με αυτόν της απομόνωσης PSS5, καθώς  $q > q_{critical}$  (Πίνακας 9) και με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν.

Πίνακας 9. Tukey HSD test μεταξύ των δέκα απομονώσεων στη συγκέντρωση στρεπτομυκίνης 10 µg/δισκίο. Ζεύγη με  $q > q_{critical}$ , όπου  $q_{critical}$  5,008, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και σημειώνονται με κίτρινο χρώμα.

q	PSS1	PSS2	PSS3	PSS4	PSS5	PSS6	PSS7	PSS8	PSS9	PSS10
PSS1	x									
PSS2	0,291729983 x									
PSS3	1,312784923	1,604515 x								
PSS4	3,500759796	3,20903	4,813544719 x							
PSS5	4,230084753	3,938355	5,542869677	0,729325 x						
PSS6	3,209029813	2,9173	4,521814736	0,29173	1,02105494 x					
PSS7	0,437594974	0,729325	0,875189949	3,9383548	4,667679728	3,64662479 x				
PSS8	3,354894804	3,063165	4,667679728	0,145865	0,875189949	0,14586499	3,79249 x			
PSS9	2,333839864	2,04211	3,646624787	1,1669199	1,896244889	0,87518995	2,771435	1,021055 x		
PSS10	0,145864991	0,437595	1,166919932	3,6466248	4,375949745	3,3548948	0,29173	3,50076	2,479705 x	
$q_{critical}=5,008$										

Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις PSS1, PSS2, PSS3, PSS7 και PSS10, όπου σε δοκιμή ANOVA των μέσων όρων τους,  $F < F_{critical}$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 10). Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις PSS4, PSS5, PSS6, PSS8 και PSS9, όπου σε δοκιμή ANOVA των μέσων όρων τους,  $F < F_{critical}$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 11).

Πίνακας 10. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS1, PSS2, PSS3, PSS7 και PSS10 παρουσία 10μg στρεπτομικίνης/δισκίο.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	5,9	4	1,475	0,463351	0,761455	3,47805
Within Groups	31,83333333	10	3,183333			
Total	37,73333333	14				

Πίνακας 11. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS4, PSS5, PSS6, PSS8 και PSS9 παρουσία 10μg στρεπτομικίνης/δισκίο.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	7,233333	4	1,808333	0,388889	0,812011	3,47805
Within Groups	46,5	10	4,65			
Total	53,73333	14				

#### 5.2.4 Έλεγχος ευαισθησίας *P. savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα στρεπτομικίνης 50 μg

Στο Πίνακα 12 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν από τις δέκα απομονώσεις του βακτηρίου παρουσία 50 μg στρεπτομικίνης. Με έλεγχο διακύμανσης κατά ένα παράγοντα βρέθηκε ότι οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 13).

Πίνακας 12. Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων παρουσία 50μg στρεπτομικίνης/δισκίο.

50 μg streptomycin	
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ	Ζώνη παρεμπόδισης (mm)
PSS1	27,66666667
PSS2	28,16666667
PSS3	27,33333333
PSS4	31
PSS5	31,16666667
PSS6	31,33333333
PSS7	27
PSS8	32
PSS9	30,5
PSS10	26,5



Πίνακας 13. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 50 µg στρεπτομυκίνης/δισκίο, για τις δέκα απομονώσεις PSS.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	120,53333	9	13,39259259	3,94867595	0,005052635	2,392814108
Within Groups	67,833333	20	3,391666667			
Total	188,36667	29				

Από το Tukey HSD test, βρέθηκε ότι ο μέσος όρος της ζώνης παρεμπόδισης της απομόνωσης PSS3 διαφέρει στατιστικά σημαντικά με αυτόν της απομόνωσης PSS5, καθώς  $q > q_{critical}$  (Πίνακας 14) και με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Οι απομονώσεις PSS1, PSS2, PSS3, PSS7 και PSS10 με μέσο όρο ζώνη παρεμπόδισης 26,5-28,1 mm ανήκουν στην πρώτη ομάδα, όπου σε δοκιμή ANOVA των μέσων όρων τους,  $F < F_{critical}$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 15). Οι απομονώσεις PSS4, PSS5, PSS6, PSS8 και PSS9 (30,5-32 mm) ανήκουν στη δεύτερη ομάδα, όπου σε δοκιμή ANOVA των μέσων όρων τους,  $F < F_{critical}$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 16).

Πίνακας 14. Tukey HSD test μεταξύ των δέκα απομονώσεων στη συγκέντρωση στρεπτομυκίνης 50 µg/δισκίο. Ζεύγη με  $q > q_{critical}$ , όπου  $q_{critical}$  5,008, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και σημειώνονται με κίτρινο χρώμα.

q	PSS1	PSS2	PSS3	PSS4	PSS5	PSS6	PSS7	PSS8	PSS9	PSS10
PSS1	x									
PSS2	0,470245 x									
PSS3	0,313497	0,783741 x								
PSS4	3,134966	2,664721	3,44846225 x							
PSS5	3,291714	2,821469	3,60521053	0,156748284 x						
PSS6	3,448462	2,978217	3,76195882	0,313496568	12 x					
PSS7	0,626993	1,097238	0,31349657	3,761958819	0,083333	4,075455 x				
PSS8	4,075455	3,605211	4,38895195	0,940489705	4,666667	0,626993	4,702449 x			
PSS9	2,664721	2,194476	2,9782174	0,470244852	6,333333	0,783741	3,291714	1,410735 x		
PSS10	1,097238	1,567483	0,78374142	4,232203671	0,185185	4,5457	0,470245	5,172693	3,761959 x	
$q_{critical}=5,008$										

Πίνακας 15. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS1, PSS2, PSS3, PSS7 και PSS10 παρουσία 50µg στρεπτομυκίνης/δισκίο

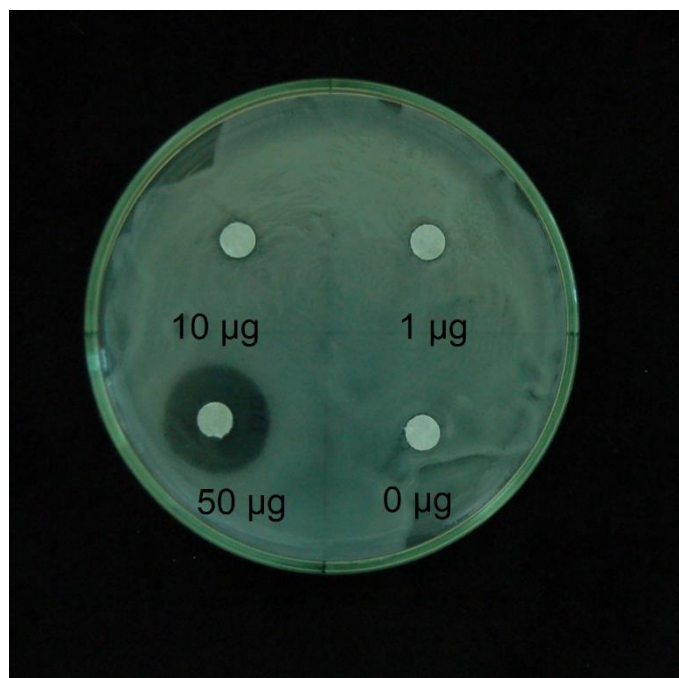
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	4,833333	4	1,208333	0,493197	0,741337	3,47805
Within Groups	24,5	10	2,45			
Total	29,33333	14				

Πίνακας 16. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS4, PSS5, PSS6, PSS8 και PSS9 παρουσία 50μg στρεπτομυκίνης/δισκίο

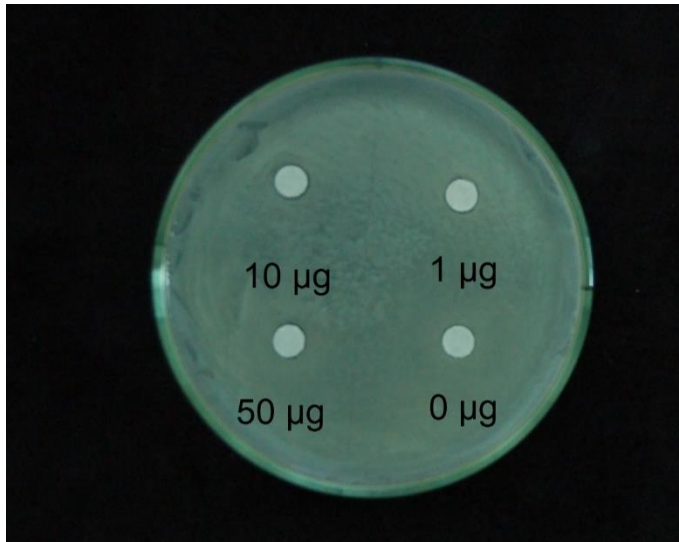
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	3,566667	4	0,891667	0,205769	0,929397	3,47805
Within Groups	43,33333	10	4,333333			
Total	46,9	14				

### 5.2.5 Έλεγχος *P. savastanoi* pv. *savastanoi* στο αντιβιοτικό πενικιλίνη

Στο προκαταρκτικό πείραμα για τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων PSS1, PSS6, PSS10 του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από τα δισκία που περιείχαν 1, 10 μg δεν σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης σε καμία απομόνωση. Στα δισκία με 50 μg πενικιλίνης, ζώνη παρεμπόδισης σχηματίστηκε μόνο στην απομόνωση PSS6 (Εικόνα 14). Στις απομονώσεις PSS1 (Εικόνα 15) και PSS10 (Εικόνα 16) δεν σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης.



Εικόνα 14. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* PSS6, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 μg.

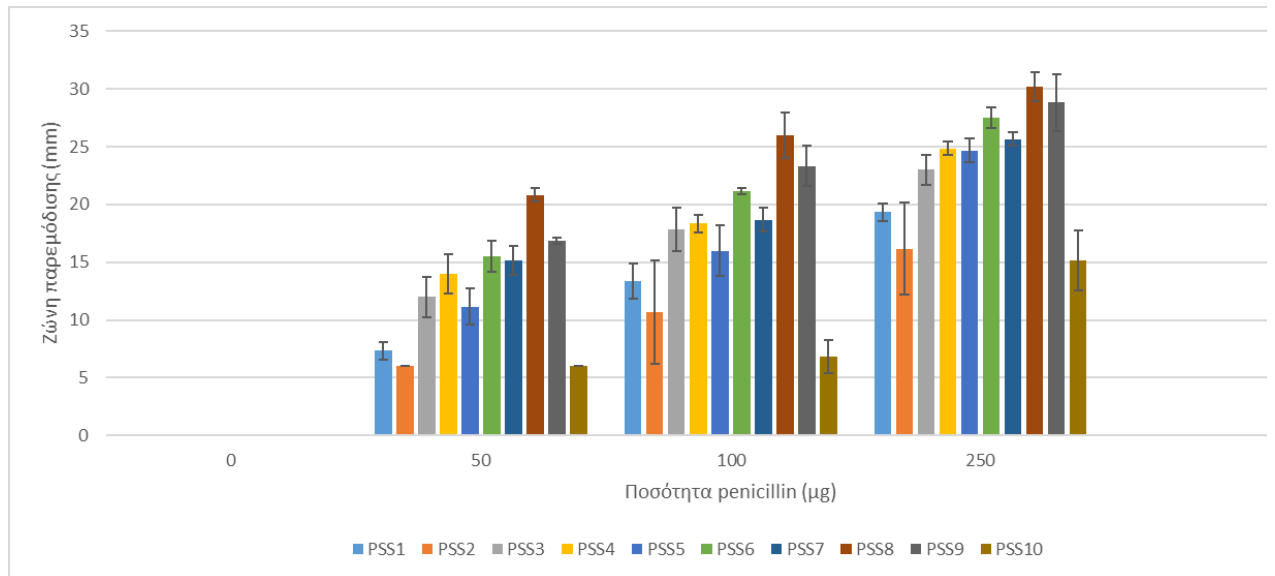


Εικόνα 15. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* PSS1, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.

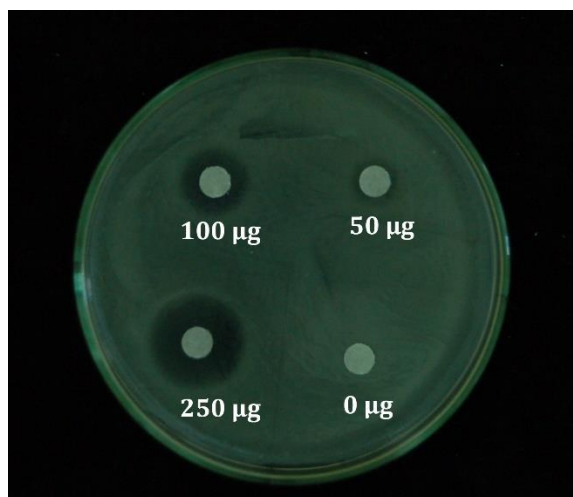


Εικόνα 16. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* PSS10, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.

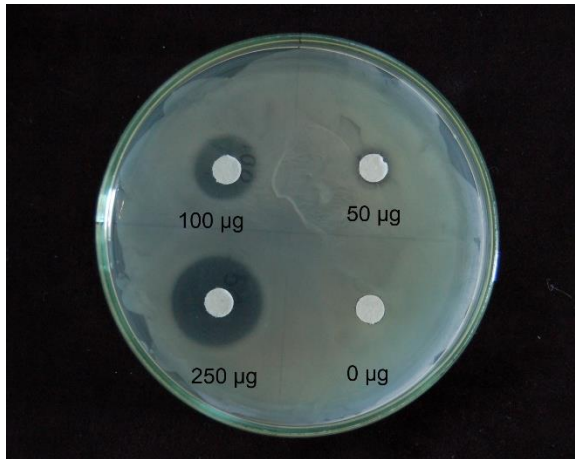
Στο κυρίως πείραμα, ο έλεγχος ευαισθησίας των δέκα απομονώσεων πραγματοποιήθηκε με δισκία στα οποία τοποθετήθηκαν 50 µg, 100 µg και 250 µg πενικιλίνης (Εικόνες 17-26). Στο διάγραμμα 2 παρουσιάζεται για την κάθε απομόνωση, ο μέσος όρος των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψε από τις 3 επαναλήψεις, για κάθε ποσότητα πενικιλίνης.



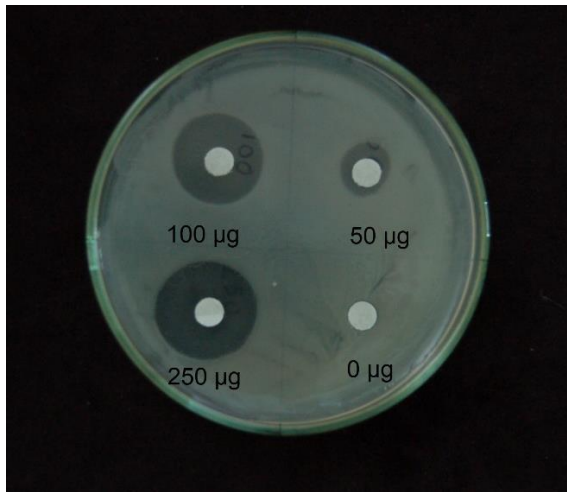
Διάγραμμα 2: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση ζωνών παρεμπόδισης (mm) των απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, στις διάφορες ποσότητες πενικιλίνης.



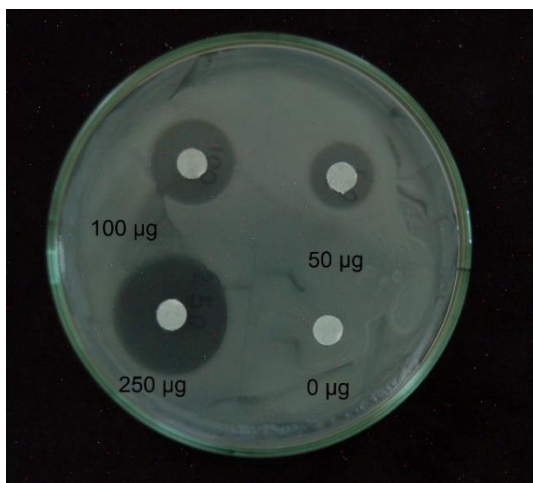
Εικόνα 17. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS1, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



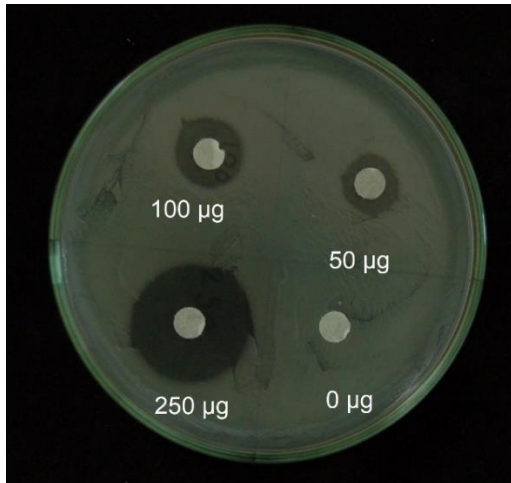
Εικόνα 18. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS2, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



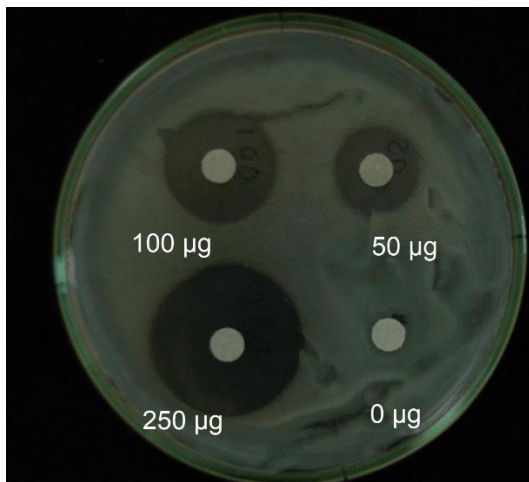
Εικόνα 19. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS3, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



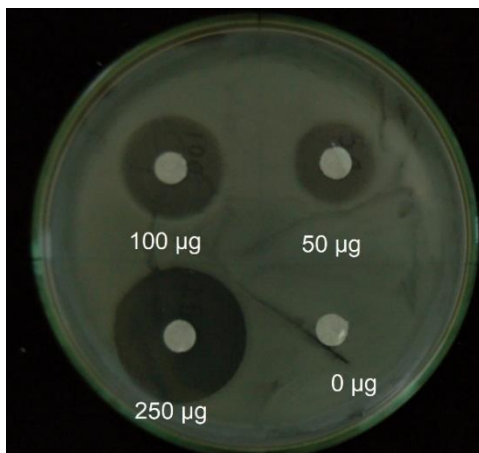
Εικόνα 20. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS4, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



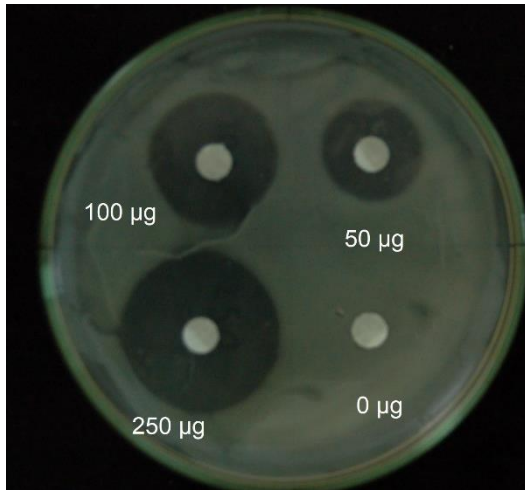
Εικόνα 21. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS5, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



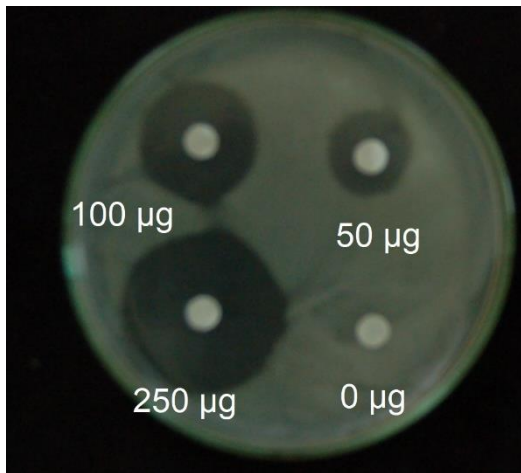
Εικόνα 22. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS6, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



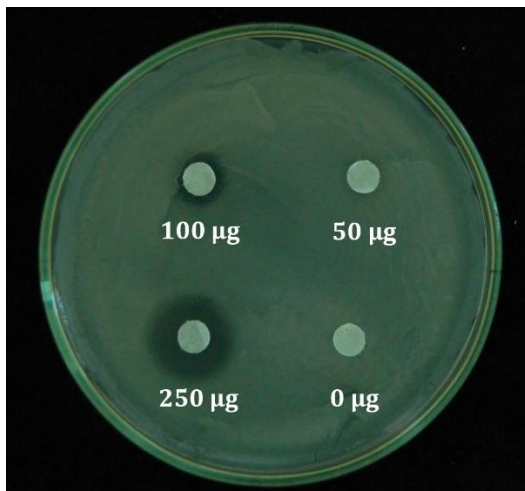
Εικόνα 23. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS7, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



Εικόνα 24. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS8, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



Εικόνα 25. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS9, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



Εικόνα 26. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* PSS10, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.

### 5.2.6 Έλεγχος ευαισθησίας *P. savastanoi* πν. *savastanoi* σε ποσότητα πενικιλίνης 50 µg

Στο Πίνακα 17 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης σε mm των δέκα απομονώσεων του βακτηρίου, παρουσία 50 µg πενικιλίνης. Στις απομονώσεις PSS2 και PSS10 δεν σχηματίστηκαν ζώνες παρεμπόδισης. Με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, προέκυψε ότι μεταξύ όλων ή κάποιων μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 18).

Πίνακας 17. Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων παρουσία 50 µg πενικιλίνης/δισκίο.

	50 µg penicillin
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ	ΖΩΝΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (mm)
PSS1	7,333333333
PSS2	6
PSS3	12
PSS4	14
PSS5	11,16666667
PSS6	15,5
PSS7	15,16666667
PSS8	20,83333333
PSS9	16,83333333
PSS10	6

Πίνακας 18. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 50 µg πενικιλίνης/δισκίο, για τις δέκα απομονώσεις PSS.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	659,4083333	9	73,26759259	56,72329749	2,808E-12	2,392814108
Within Groups	25,83333333	20	1,291666667			
Total	685,2416667	29				

Με Tukey HSD test βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 19). Στη συνέχεια με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις PSS1, PSS2 και PSS10. Στη δοκιμή ANOVA προέκυψε ότι  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 20), όμως με Tukey HSD test,  $q < q_{critical}$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 21). Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν οι



απομονώσεις PSS6, PSS7 και PSS9, καθώς σε δοκιμή ANOVA των μέσων όρων τους, το  $F < F_{critical}$  (Πίνακας 22) και στη τρίτη οι απομονώσεις PSS3, PSS4, PSS5 (Πίνακας 23). Η απομόνωση PSS8 δεν ανήκει σε καμία ομάδα.

Πίνακας 19. Tukey HSD test μεταξύ των δέκα απομονώσεων για ποσότητα πενικιλίνης 50 μg/δισκίο. Ζεύγη με  $q > q_{critical}$ , όπου  $q_{critical}$  5,008, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και σημειώνονται με κίτρινο χρώμα.

q	PSS1	PSS2	PSS3	PSS4	PSS5	PSS6	PSS7	PSS8	PSS9	PSS10
PSS1	x									
PSS2	2,032002032 x									
PSS3	7,112007112	9,144009 x								
PSS4	10,16001016	12,19201	3,048003048 x							
PSS5	5,842005842	7,874008	1,27000127	4,318004318 x						
PSS6	12,44601245	14,47801	5,334005334	2,286002286	6,6040066 x					
PSS7	11,93801194	13,97001	4,826004826	1,778001778	6,0960061	0,50800051 x				
PSS8	20,57402057	22,60602	13,46201346	10,41401041	14,732015	8,12800813	8,636009 x			
PSS9	14,47801448	16,51002	7,366007366	4,318004318	8,6360086	2,03200203	2,540003	6,096006 x		
PSS10	2,032002032	0	9,144009144	12,19201219	7,8740079	14,4780145	13,97001	22,60602	16,51002 x	
$q_{critical}=5,008$										

Πίνακας 20. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS1, PSS2 και PSS10 παρουσία 50 μg πενικιλίνης/δισκίο.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	3,555555556	2	1,777777778	9,14285714	0,01508	5,14325285
Within Groups	1,166666667	6	0,194444444			
Total	4,722222222	8				

Πίνακας 21. Tukey HSD test μεταξύ των απομονώσεων PSS1, PSS2 και PSS10 για ποσότητα πενικιλίνης 50 μg/δισκίο.

q	PSS1	PSS2	PSS10
PSS1	x		
PSS2	0,444444444 x		
PSS10	0,444444444	0 x	
$q_{critical}=4,339$			

Πίνακας 22. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS6, PSS7 και PSS9 παρουσία 50 μg πενικιλίνης/δισκίο.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	4,666666667	2	2,333333333	2,048780488	0,209799427	5,14325285
Within Groups	6,833333333	6	1,138888889			
Total	11,5	8				

Πίνακας 23. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS3, PSS4 και PSS5 παρουσία 50 µg πενικιλίνης/δισκίο.

ANOVA						
<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>Fcrit</i>
Between Groups	12,72222222	2	6,36111	2,22330097	0,189465	5,14325285
Within Groups	17,16666667	6	2,86111			
Total	29,88888889	8				

### 5.2.7 Έλεγχος ευαισθησίας *P. savastanoi* πν. *savastanoi* σε ποσότητα πενικιλίνης 100 µg

Στο Πίνακα 24 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων του βακτηρίου, στα 100 µg πενικιλίνης. Στην απομόνωση PSS10 σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης στη μία από τις 3 επαναλήψεις. Με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, προέκυψε ότι μεταξύ των μέσων όρων υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 25). Με Tukey HSD test βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων των οποίων οι μέσοι όροι διαφέρουν μεταξύ τους (Πίνακας 26) και με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις PSS2, PSS10, καθώς με t-test, προέκυψε  $P \text{ two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 27). Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν οι PSS3, PSS4, PSS5 και PSS7, όπου σε δοκιμή ANOVA,  $F < F_{critical}$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 28). Στην τρίτη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις PSS6 και PSS9 καθώς με t-test, προέκυψε  $P \text{ two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 29). Οι PSS1 και PSS8 δεν ανήκουν σε καμία ομάδα.

Πίνακας 24. Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων παρουσία 100μg πενικιλίνης/δισκίο.

	100 μg penicillin
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ	ΖΩΝΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (mm)
PSS1	13,33333333
PSS2	10,66666667
PSS3	17,83333333
PSS4	18,33333333
PSS5	16
PSS6	21,16666667
PSS7	18,66666667
PSS8	26
PSS9	23,33333333
PSS10	6,833333333

Πίνακας 25. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 100 μg πενικιλίνης/δισκίο, για τις δέκα απομονώσεις PSS.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	903,5083333	9	100,3898148	23,94985642	8,05E-09	2,392814108
Within Groups	83,83333333	20	4,191666667			
Total	987,3416667	29				

Πίνακας 26. Tukey HSD test μεταξύ των δέκα απομονώσεων για ποσότητα πενικιλίνης 100 μg/δισκίο. Ζεύγη με  $q > q_{critical}$ , όπου  $q_{critical} = 5,008$ , διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και σημειώνονται με κίτρινο χρώμα

q	PSS1	PSS2	PSS3	PSS4	PSS5	PSS6	PSS7	PSS8	PSS9	PSS10
PSS1	x									
PSS2	2,25598387	x								
PSS3	3,80697278	6,06295665	x							
PSS4	4,22996976	6,48595363	0,42299698	x						
PSS5	2,25598387	4,51196774	1,55098891	1,973985886	x					
PSS6	6,62695262	8,88293649	2,81997984	2,396982862	4,370969	x				
PSS7	4,51196774	6,76795161	0,70499496	0,281997984	2,255984	2,114985	x			
PSS8	10,7159234	12,9719073	6,9089506	6,485953626	8,45994	4,088971	6,203956	x		
PSS9	8,45993951	10,7159234	4,65296673	4,229969756	6,203956	1,832987	3,947972	2,255984	x	
PSS10	5,49896068	3,24297681	9,30593346	9,728930438	7,754945	12,12591	10,01093	16,21488	13,9589	x
$q_{critical}=5,008$										

Πίνακας 27. T-test των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS2 και PSS10, παρουσία 100 µg πενικιλίνης/δισκίο.

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	PSS2	PSS10
Mean	10,66666667	6,833333333
Variance	20,33333333	2,083333333
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	2	
t	1,40233475	
P(T<=t) one-tail	0,147940854	
t Critical one- tail	2,91998558	
P(T<=t) two-tail	0,295881709	
t critical two-tail	4,30265273	

Πίνακας 28. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS3, PSS4, PSS5 και PSS7 παρουσία 100 µg πενικιλίνης/δισκίο.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	12,72917	3	4,243056	1,697222	0,244241	4,066181
Within Groups	20	8	2,5			
Total	32,72917	11				

Πίνακας 29. T-test των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS6 και PSS9 παρουσία 100 µg πενικιλίνης/δισκίο.

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	PSS6	PSS9
Mean	21,166667	23,33333333
Variance	0,0833333	3,083333333
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	2	
t	-2,108878	
P(T<=t) one-tail	0,0847302	
t Critical one- tail	2,9199856	
P(T<=t) two-tail	0,1694605	
t critical two-tail	4,3026527	

### 5.2.8 Έλεγχος ευαισθησίας *P. savastanoi* pv. *savastanoi* σε ποσότητα πενικιλίνης 250 μg

Ζώνες παρεμπόδισης σχηματίστηκαν σε όλες τις απομονώσεις κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στα 250 μg πενικιλίνης (Πίνακας 30). Με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα προέκυψε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 31). Με Tukey HSD test βρέθηκαν τα ζεύγη των οποίων οι μέσοι όροι διαφέρουν (Πίνακας 32) και με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις PSS1, PSS2 και PSS10 (Πίνακας 33). Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν οι PSS4, PSS5 και PSS7 (Πίνακας 34) και στην τρίτη οι απομονώσεις PSS6, PSS8 και PSS9 (Πίνακας 35). Η απομόνωση PSS3 δεν ανήκει σε καμία ομάδα.

Πίνακας 30. Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων παρουσία 250μg πενικιλίνης/δισκίο.

	250 μg penicillin
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ	ΖΩΝΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (mm)
PSS1	19,33333333
PSS2	16,16666667
PSS3	23
PSS4	24,83333333
PSS5	24,66666667
PSS6	27,5
PSS7	25,66666667
PSS8	30,16666667
PSS9	28,83333333
PSS10	15,16666667

Πίνακας 31. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 250 μg πενικιλίνης/δισκίο, για τις δέκα απομονώσεις PSS.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	712,6333333	9	79,1814815	22,51606108	1,38955E-08	2,392814108
Within Groups	70,33333333	20	3,51666667			
Total	782,9666667	29				

Πίνακας 32. Tukey HSD test μεταξύ των δέκα απομονώσεων για ποσότητα πενικιλίνης 100 µg/δισκίο. Ζεύγη με  $q > q_{critical}$ , όπου  $q_{critical}$  5,008, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και σημειώνονται με κίτρινο χρώμα.

q	PSS1	PSS2	PSS3	PSS4	PSS5	PSS6	PSS7	PSS8	PSS9	PSS10
PSS1	x									
PSS2	2,924808 x									
PSS3	3,38662	6,311428 x								
PSS4	5,07993	8,004738	1,69331 x							
PSS5	4,925993	7,850801	1,539373	0,153937 x						
PSS6	7,542926	10,46773	4,156306	2,462996	2,616934 x					
PSS7	5,849616	8,774424	2,462996	0,769686	0,923624	2,616934 x				
PSS8	10,00592	10,00592	6,619303	4,925993	5,07993	2,462996	4,156306 x			
PSS9	8,774424	11,69923	5,387804	3,694494	3,848432	1,231498	2,924808	1,231498 x		
PSS10	3,848432	0,923624	7,235052	8,928362	8,774424	11,39136	9,698048	13,85435	12,62286 x	
$q_{critical}=5,008$										

Πίνακας 33. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS1, PSS2 και PSS10 παρουσία 250 µg πενικιλίνης/δισκίο.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	28,38889	2	14,19444	1,831541219	0,23939	5,143253
Within Groups	46,5	6	7,75			
Total	74,88889	8				

Πίνακας 34. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS4, PSS5 και PSS7 παρουσία 250 µg πενικιλίνης/δισκίο.

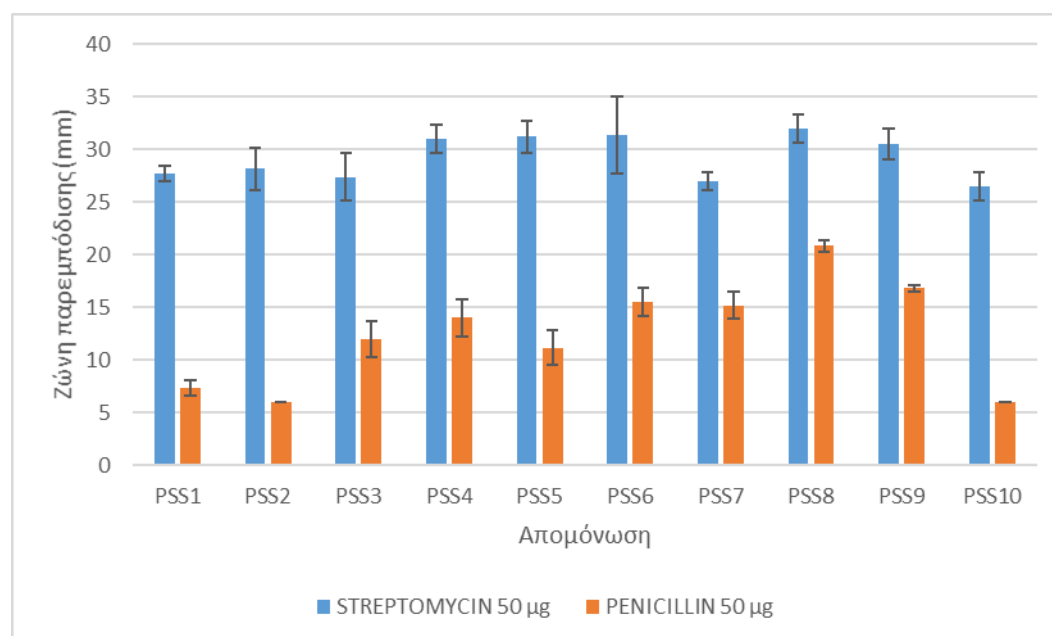
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	1,722222	2	0,861111	1,47619	0,30105	5,143253
Within Groups	3,5	6	0,583333			
Total	5,222222	8				

Πίνακας 35. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων PSS6, PSS8 και PSS9 παρουσία 250 µg πενικιλίνης/δισκίο.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	10,66667	2	5,333333	1,90099	0,229357	5,143253
Within Groups	16,83333	6	2,805556			
Total	27,5	8				

### 5.2.9 Σύγκριση αποτελεσματικότητας στρεπτομυκίνης και πενικιλίνης έναντι των απομονώσεων του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi*

Οι ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν γύρω από τα δισκία με 50 µg στρεπτομυκίνης ήταν πολύ μεγαλύτερες σε όλες τις απομονώσεις του βακτηρίου, από τις αντίστοιχες στα δισκία με 50 µg πενικιλίνης (Διάγραμμα 3). Στην απομόνωση PSS1, στα 50 µg πενικιλίνης η ζώνη παρεμπόδισης που σχηματίστηκε ήταν 7,33 mm, ενώ στα 50 µg στρεπτομυκίνης 27,66 mm . Στα 50 µg στρεπτομυκίνης ζώνη παρεμπόδισης σχηματίστηκε και στις απομονώσεις PSS2 και PSS10, οι οποίες στην αντίστοιχη ποσότητα πενικιλίνης αναπτύχθηκαν κανονικά και δεν σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης (6 mm).



Διάγραμμα 3. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση ζωνών παρεμπόδισης για την κάθε απομόνωση του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, γύρω από δισκία με 50 µg πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης.

## 5.3 Έλεγχος ευαισθησίας *Erwinia amylovora* στα αντιβιοτικά

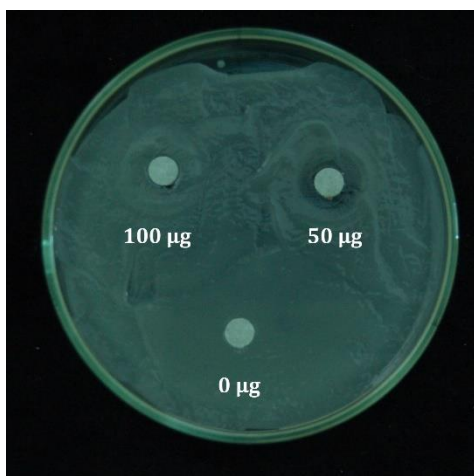
### 5.3.1 Δοκιμή ποσότητας μολύσματος

Όσον αφορά την απομόνωση Eam10 στο πρώτο πείραμα, κατά το οποίο έγινε διασπορά 200 µL από την υγρή καλλιέργεια για τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, ζώνες παρεμπόδισης σχηματίστηκαν κανονικά. Στο δεύτερο πείραμα για την ίδια απομόνωση, σε όλες τις αραιώσεις η ανάπτυξη

των βακτηρίων ήταν πολύ μεγάλη και δεν διακρίνονταν ζώνη παρεμπόδισης ανάπτυξης. Με δυσκολία διακρίνονταν δακτύλιοι, εσωτερικά των οποίων υπήρχε ανάπτυξη βακτηρίου (Εικόνες 27-29). Στην απομόνωση Eam3, σε όλες τις αραιώσεις σχηματίστηκαν καθαρές ζώνες παρεμπόδισης, ο μέσος όρος των οποίων για την ίδια ποσότητα αντιβιοτικού διέφερε. Ο μέσος όρος της ζώνης παρεμπόδισης που σχηματίστηκε με 200  $\mu$ L από την υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου για ποσότητα penicillin 50  $\mu$ g, ήταν 12,33 mm (Εικόνα 30). Στην αραιώση 1:1, ο μέσος όρος της ζώνης παρεμπόδισης ήταν 13,5 mm (Εικόνα 31) και στην αραιώση 1:4, 16,66 mm (Εικόνα 32).

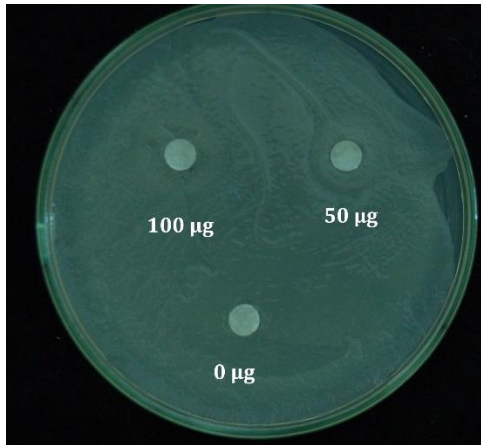


Εικόνα 27. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam10, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50 και 100  $\mu$ g και ποσότητα μολύσματος 50  $\mu$ L.

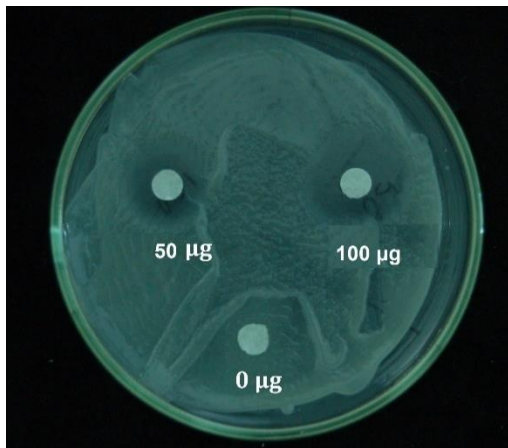


Εικόνα 28. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam10, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50 και 100  $\mu$ g και ποσότητα μολύσματος 100  $\mu$ L.

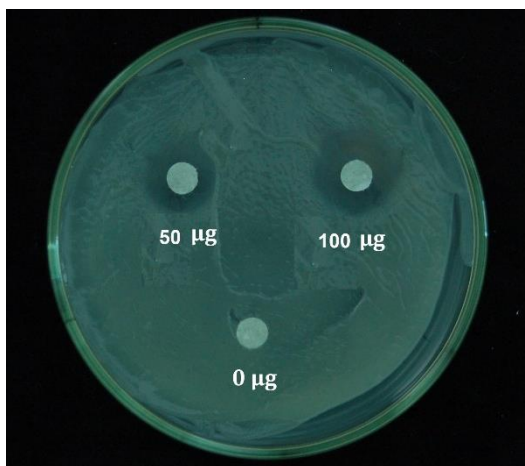




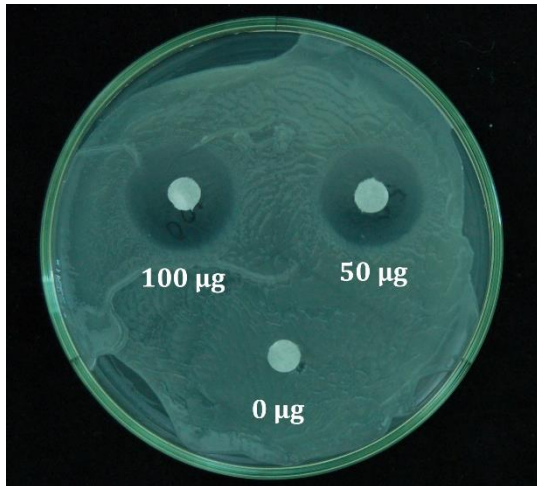
Εικόνα 29. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam10, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50 και 100 µg και ποσότητα μολύσματος 200 µL.



Εικόνα 30. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam3, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50 και 100 µg και ποσότητα μολύσματος 200 µL.



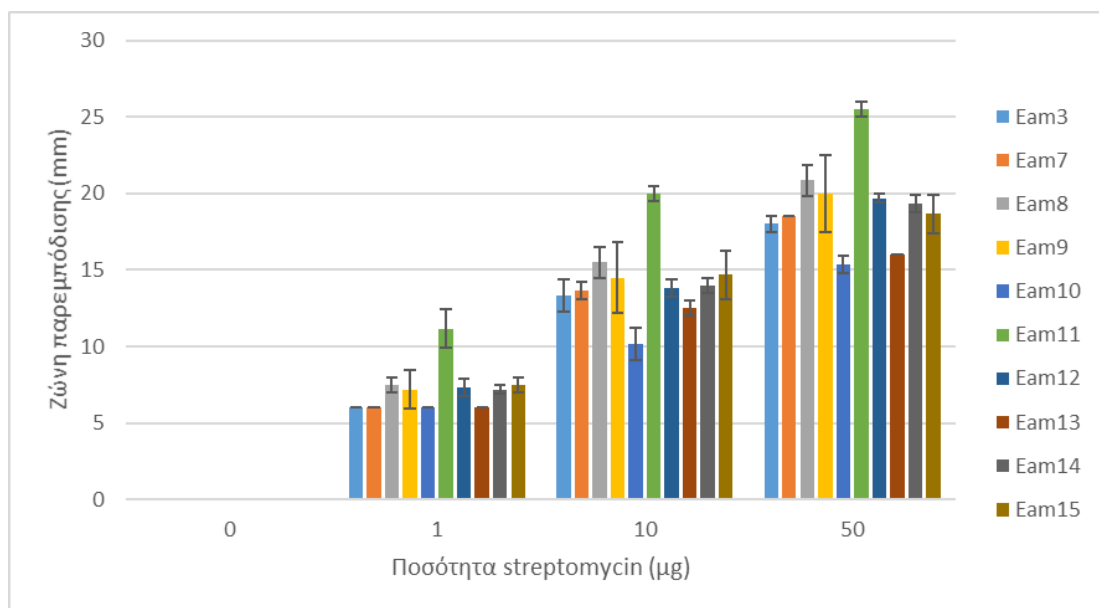
Εικόνα 31. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam3, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50 και 100 µg και ποσότητα μολύσματος 100 µL.



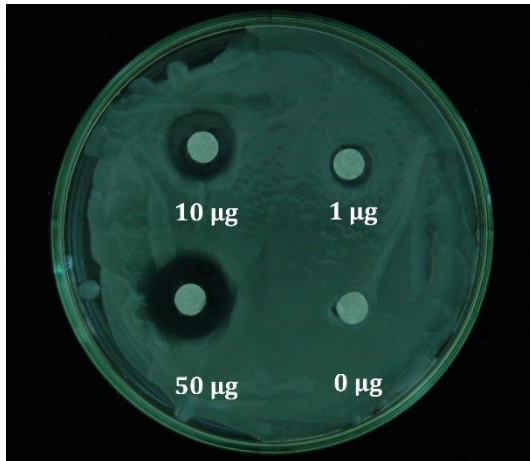
Εικόνα 32. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam3, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm, με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50 και 100 µg και ποσότητα μολύσματος 50 µL.

### 5.3.2 Έλεγχος ευαισθησίας *Erwinia amylovora* στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη

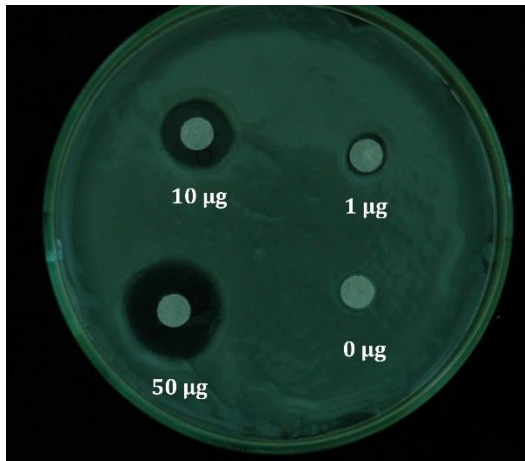
Στις εικόνες 33-42 παρουσιάζονται οι ζώνες παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν κατά των έλεγχο ευαισθησίας των δέκα απομονώσεων του βακτηρίου *Erwinia amylovora* στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη. Οι μέσοι όροι τους (mm) και η τυπική απόκλιση παρουσιάζονται στο διάγραμμα 4



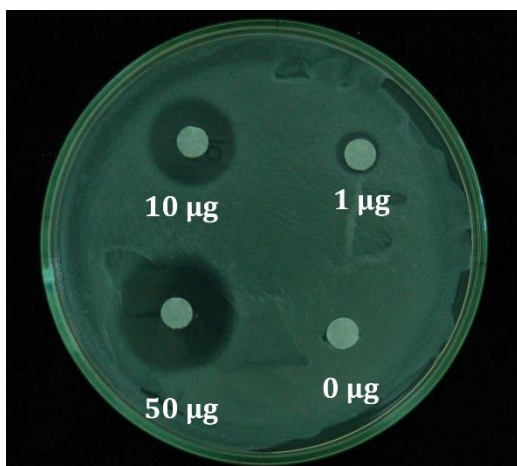
Διάγραμμα 4: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση ζωνών παρεμπόδισης (mm) των απομονώσεων του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, στις διάφορες ποσότητες στρεπτομυκίνης.



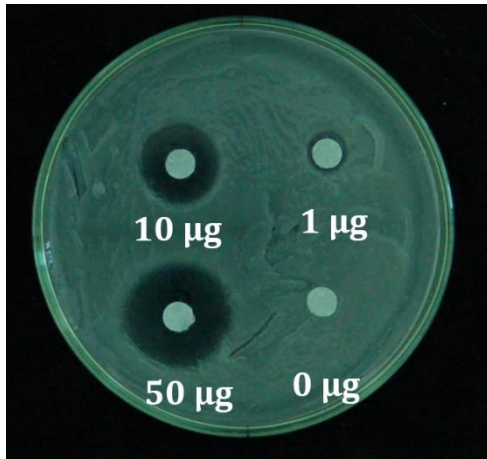
Εικόνα 33. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam3, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



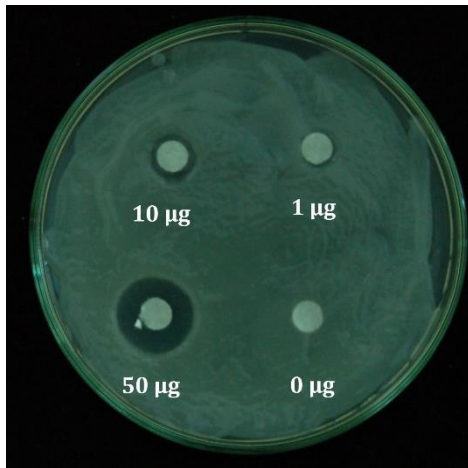
Εικόνα 34. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam7, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



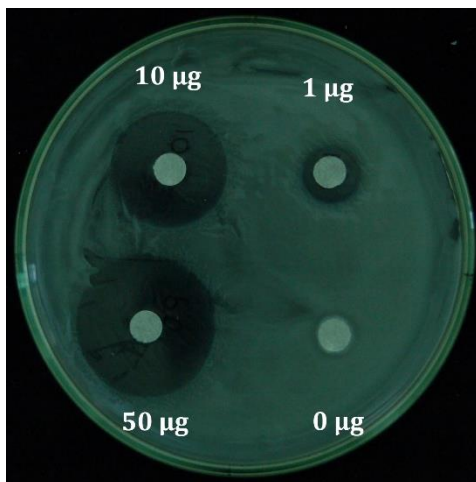
Εικόνα 35. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam8, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



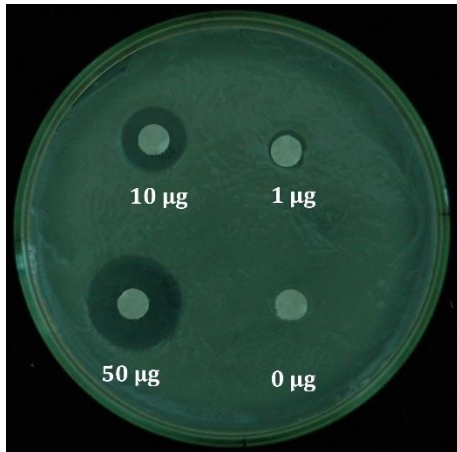
Εικόνα 36. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam9, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



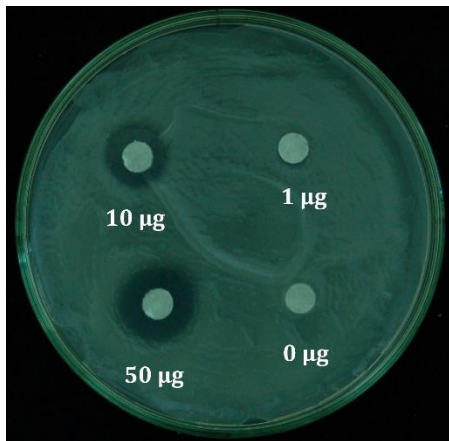
Εικόνα 37. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam10, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



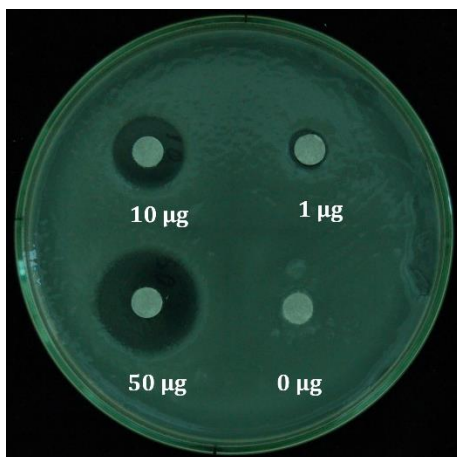
Εικόνα 38. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam11, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



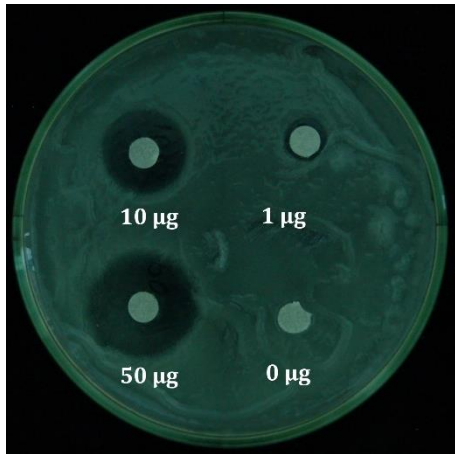
Εικόνα 39. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam12, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



Εικόνα 40. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam13, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



Εικόνα 41. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam14, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.



Εικόνα 42. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam15, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 1, 10 και 50 µg.

### 5.3.3 Έλεγχος ευαισθησίας *Erwinia amylovora* σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 1 µg

Στο Πίνακα 36 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, που σχηματίστηκαν κατά τον έλεγχο ευαισθησίας παρουσία 1 µg στρεπτομυκίνης/δισκίο. Οι απομονώσεις Eam3, Eam7, Eam10 και Eam13 αναπτύχθηκαν κανονικά στην ποσότητα αυτή, καθώς δε σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης. Με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα προέκυψε ότι  $F > F_{critical}$ , δηλαδή κάποιοι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 37). Με Tukey HSD test, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων των οποίων οι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 38) και με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις Eam3, Eam7, Eam10 και Eam13 οι οποίες δεν έδωσαν ζώνη παρεμπόδισης στο 1 µg στρεπτομυκίνης. Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις Eam8, Eam9, Eam12, Eam14 και Eam15 (Πίνακας 39). Η απομόνωση Eam11 δεν ανήκει σε καμία ομάδα.

Πίνακας 36. Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων παρουσία 1 µg στρεπτομικίνης/δισκίο

	1 µg streptomycin
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ	ΖΩΝΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (mm)
Eam3	6
Eam7	6
Eam8	7,5
Eam9	7,166666667
Eam10	6
Eam11	11,16666667
Eam12	7,333333333
Eam13	6
Eam14	7,166666667
Eam15	7,5

Πίνακας 37. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 10 µg στρεπτομικίνης/δισκίο, για τις δέκα απομονώσεις Eam.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	65,075	9	7,230555556	17,70748299	1,12E-07	2,392814108
Within Groups	8,166666667	20	0,408333333			
Total	73,24166667	29				

Πίνακας 38. Tukey HSD test μεταξύ των δέκα απομονώσεων για ποσότητα στρεπτομικίνης 1 µg/δισκίο. Ζεύγη με  $q > q_{critical}$ , όπου  $q_{critical}$  5,008, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και σημειώνονται με κίτρινο χρώμα.

q	Eam3	Eam7	Eam8	Eam9	Eam10	Eam11	Eam12	Eam13	Eam14	Eam15
Eam3	x									
Eam7	0	x								
Eam8	4,065786	4,065786	x							
Eam9	3,162278	3,162278	0,903508	x						
Eam10	0	0	4,065786	3,162278	x					
Eam11	14,00437	14,00437	9,938587	10,84209	14,00437	x				
Eam12	3,614032	3,614032	0,451754	0,451754	3,614032	10,39034	x			
Eam13	0	0	4,065786	3,162278	0	14,00437	3,614032	x		
Eam14	3,162278	3,162278	0,903508	0	3,162278	10,84209	0,451754	3,162278	x	
Eam15	4,065786	4,065786	0	0,903508	4,065786	9,938587	0,451754	4,065786	0,903508	x
$q_{critical}=5,008$										

Πίνακας 39. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων Eam8, Eam9, Eam12, Eam14 και Eam15 παρουσία 1 µg στρεπτομικίνης/δισκίο.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	0,333333	4	0,083333	0,166667	0,950508	3,47805
Within Groups	5	10	0,5			
Total	5,333333	14				

### 5.3.4 Έλεγχος ευαισθησίας *Erwinia amylovora* σε ποσότητα στρεπτομικίνης 10 µg

Κατά τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, παρουσία 10 µg στρεπτομικίνης, σχηματίστηκαν ζώνες παρεμπόδισης από όλες τις απομονώσεις (Πίνακας 40). Με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα προέκυψε  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 41), συνεπώς κάποιοι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη των απομονώσεων των οποίων οι μέσοι όροι διαφέρουν, βρέθηκαν με Tukey HSD test (Πίνακας 42) και με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις Eam3, Eam7, Eam12, Eam13 και Eam14 (Πίνακας 43) και στη δεύτερη οι απομονώσεις Eam8, Eam9 και Eam15 (Πίνακας 44). Η απομόνωση Eam10 είναι η λιγότερο ευαίσθητη και η Eam11 η πιο ευαίσθητη. Οι απομονώσεις αυτές δεν ανήκουν σε καμία ομάδα.

Πίνακας 40. Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων παρουσία 10 µg στρεπτομικίνης/δισκίο.

	10 µg streptomycin
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ	ΖΩΝΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (mm)
Eam3	13,33333333
Eam7	13,66666667
Eam8	15,5
Eam9	14,5
Eam10	10,16666667
Eam11	20
Eam12	13,83333333
Eam13	12,5
Eam14	14
Eam15	14,66666667

Πίνακας 41. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 10 µg στρεπτομικίνης/δισκίο, για τις δέκα απομονώσεις Eam.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	168,0083333	9	18,66759259	15,03430276	4,4404E-07	2,392814108
Within Groups	24,83333333	20	1,241666667			
Total	192,8416667	29				



Πίνακας 42. Tukey HSD test μεταξύ των δέκα απομονώσεων για ποσότητα στρεπτομυκίνης 10 µg/δισκίο. Ζεύγη με  $q > q_{critical}$ , όπου  $q_{critical}$  5,008, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και σημειώνονται με κίτρινο χρώμα.

q	Eam3	Eam7	Eam8	Eam9	Eam10	Eam11	Eam12	Eam13	Eam14	Eam15
Eam3	x									
Eam7	0,8588975 x									
Eam8	4,8670858	4,00818834 x								
Eam9	3,43559	2,5766925	1,431496 x							
Eam10	4,5807867	5,43968418	9,447873	8,01637668 x						
Eam11	12,883463	12,024565	8,016377	9,447872516	17,4642492 x					
Eam12	2,8629917	2,00409417	2,004094	0,572598334	7,44377835	10,02047 x				
Eam13	3,43559	4,29448751	8,302676	6,871180012	1,14519667	16,31905	6,29858168 x			
Eam14	2,2903933	1,43149584	2,576693	1,145196669	6,87118001	10,59307	0,57259833	5,72598334 x		
Eam15	1,1451967	0,28629917	3,721889	2,290393337	5,72598334	11,73827	1,717795	4,58078667	1,1452 x	
$q_{critical}=5,008$										

Πίνακας 43. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων Eam3, Eam7, Eam12, Eam13 και Eam14, παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης/δισκίο.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	4,233333	4	1,05833333	2,35185	0,124352	3,47805
Within Groups	4,5	10	0,45			
Total	8,733333	14				

Πίνακας 44. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων Eam8, Eam9 και Eam15 παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης/δισκίο.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	1,72222222	2	0,861111	0,29245283	0,75649	5,143253
Within Groups	17,66666667	6	2,944444			
Total	19,38888889	8				

### 5.3.5 Έλεγχος ευαισθησίας *Erwinia amylovora* σε ποσότητα στρεπτομυκίνης 50 µg

Κατά τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, παρουσία 50 µg στρεπτομυκίνης, σχηματίστηκαν ζώνες παρεμπόδισης από όλες τις απομονώσεις (Πίνακας 45). Με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα προέκυψε  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 46), συνεπώς κάποιιοι μέσοι όροι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Τα ζεύγη των απομονώσεων των οποίων οι μέσοι όροι διαφέρουν, βρέθηκαν με Tukey HSD

test (Πίνακας 47) και με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις Eam3, Eam7, Eam8, Eam9, Eam12, Eam14 και Eam15, όπου με δοκιμή ANOVA των μέσων όρων τους,  $F < F_{critical}$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 48). Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις Eam10 και Eam13 καθώς με t-test,  $P_{two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 49). Η Eam11, η οποία σχημάτισε τη μεγαλύτερη ζώνη παρεμπόδισης δεν ανήκει σε καμία ομάδα.

Πίνακας 45. Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων παρουσία 50 µg στρεπτομικίνης/δισκίο.

	50 µg streptomycin
ΑΠΟΜΟΝ	ΖΩΝΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (mm)
Eam3	18
Eam7	18,5
Eam8	20,83333333
Eam9	20
Eam10	15,33333333
Eam11	25,5
Eam12	19,66666667
Eam13	16
Eam14	19,33333333
Eam15	18,66666667

Πίνακας 46. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 50 µg στρεπτομικίνης/δισκίο, για τις δέκα απομονώσεις Eam.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	211,908333	9	23,54537	23,159381	1,083E-08	2,3928141
Within Groups	20,3333333	20	1,0166667			
Total	232,241667	29				

Πίνακας 47. Tukey HSD test μεταξύ των δέκα απομονώσεων για ποσότητα στρεπτομυκίνης 50 µg/δισκίο. Ζεύγη με  $q > q_{critical}$ , όπου  $q_{critical}$  5,008, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και σημειώνονται με κίτρινο χρώμα.

q	Eam3	Eam7	Eam8	Eam9	Eam10	Eam11	Eam12	Eam13	Eam14	Eam15
Eam3	x									
Eam7	0,858898 x									
Eam8	4,867086	4,008188 x								
Eam9	3,43559	2,576693	1,431496 x							
Eam10	4,580787	5,439684	9,447873	8,01637668 x						
Eam11	12,88346	12,02457	8,016377	9,447872516	17,4642492 x					
Eam12	2,862992	2,004094	2,004094	0,572598334	7,443778346	10,02047085 x				
Eam13	3,43559	4,294488	8,302676	6,871180012	1,145196669	16,31905253	6,298582 x			
Eam14	2,290393	1,431496	2,576693	1,145196669	6,871180012	10,59306918	0,572598	5,725983343 x		
Eam15	1,145197	0,286299	3,721889	2,290393337	5,725983343	11,73826585	1,717795	4,580786675	1,145196669 x	
$q_{critical}=5,008$										

Πίνακας 48. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων Eam3, Eam7, Eam8, Eam9, Eam14 και Eam15 παρουσία 50 µg στρεπτομυκίνης/δισκίο.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	17,11905	6	2,853175	2,084058	0,120865	2,847726
Within Groups	19,16667	14	1,369048			
Total	36,28571	20				

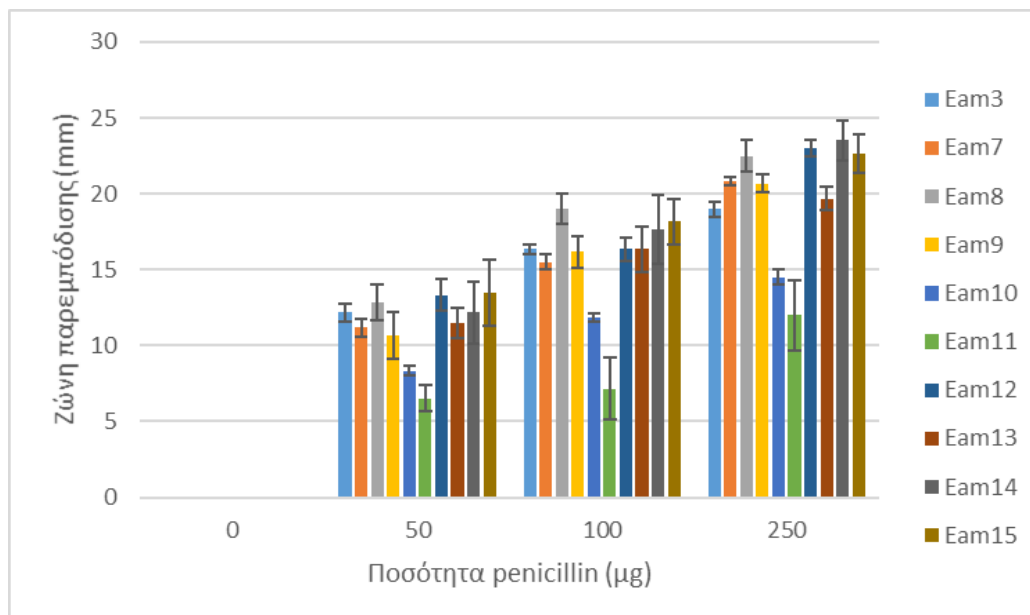
Πίνακας 49. T-test των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων Eam10 και Eam13 παρουσία 50 µg στρεπτομυκίνης/δισκίο.

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	Eam10	Eam13
Mean	15,33333333	16
Variance	0,333333333	0
Observations		3
Hypothesized Mean Difference		0
df		2
t		-2
P(T<=t) one-tail		0,09175171
t Critical one- tail		2,91998558
P(T<=t) two-tail		0,183503419
t critical two-tail		4,30265273

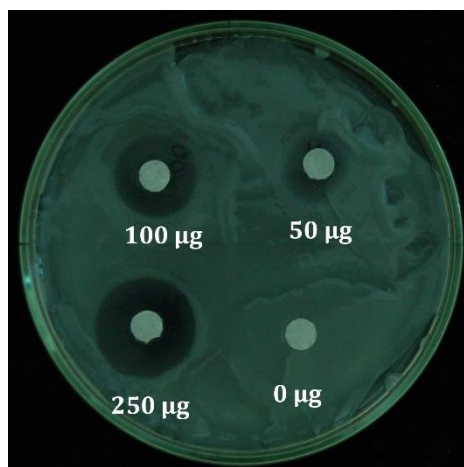
### 5.3.6 Έλεγχος ευαισθησίας *Erwinia amylovora* στο αντιβιοτικό πενικιλίνη

Στις εικόνες 43-52 παρουσιάζονται οι ζώνες παρεμπόδισης των απομονώσεων του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, στις διάφορες ποσότητες του αντιβιοτικού

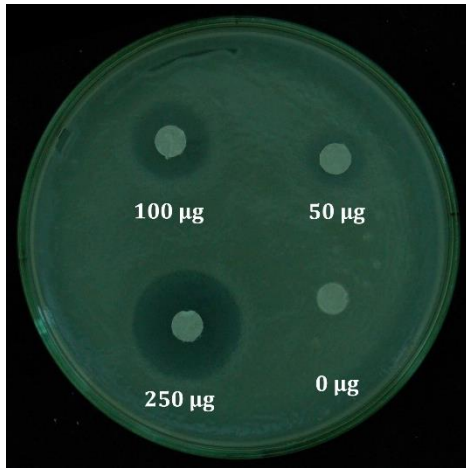
πενικιλίνη. Στο διάγραμμα 5 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι και η τυπική απόκλιση των ζωνών παρεμπόδισης που προέκυψαν από τις 3 επαναλήψεις για κάθε ποσότητα αντιβιοτικού και απομόνωση.



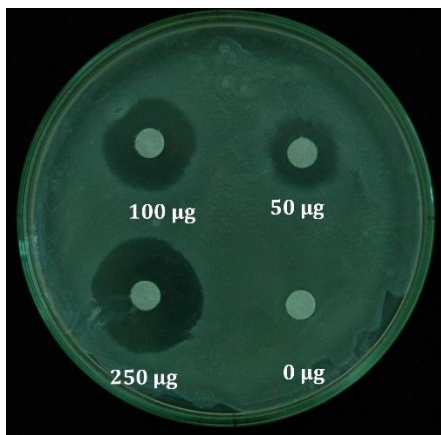
Διάγραμμα 5. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση ζωνών παρεμπόδισης (mm) των απομονώσεων του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, στις διάφορες ποσότητες πενικιλίνης.



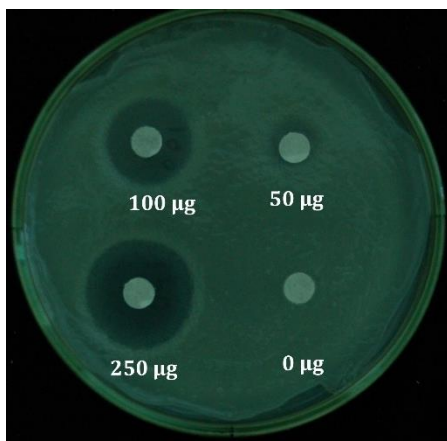
Εικόνα 43. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam3, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



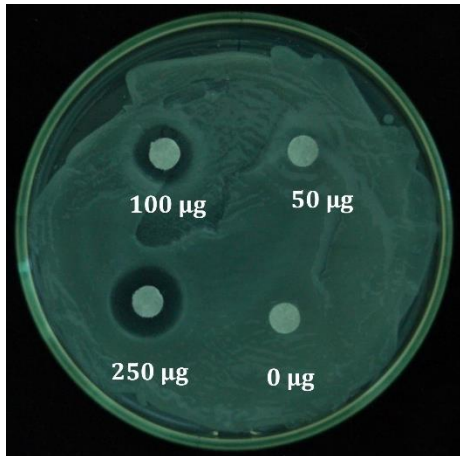
Εικόνα 44. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam7, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



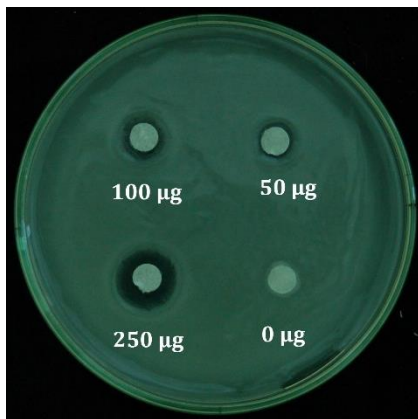
Εικόνα 45. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam8, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



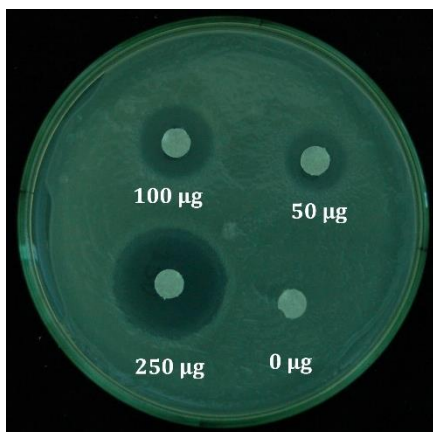
Εικόνα 46. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam9, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



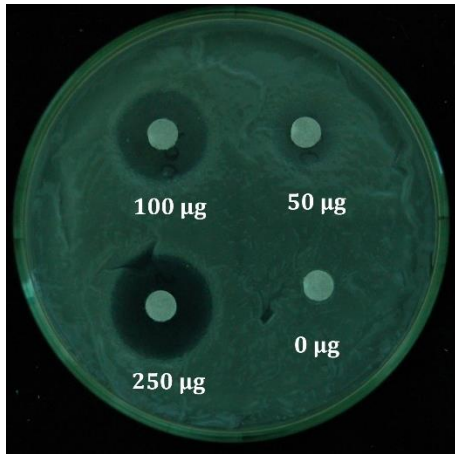
Εικόνα 47. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam10, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



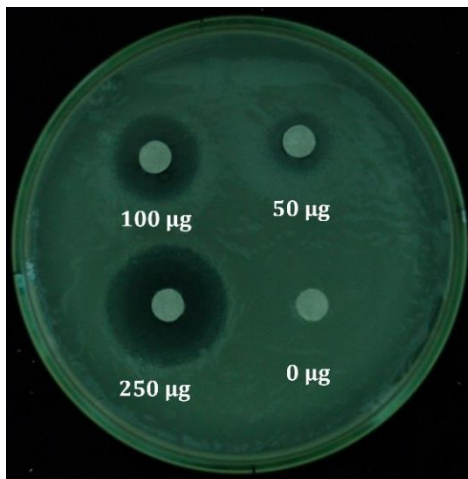
Εικόνα 48. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam11, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



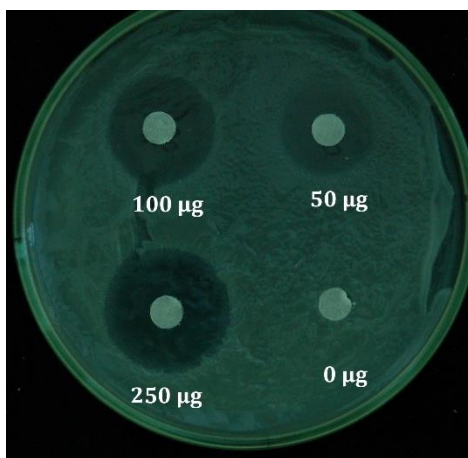
Εικόνα 49. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam12, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



Εικόνα 50. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam13, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



Εικόνα 51. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam14, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.



Εικόνα 52. Ζώνες παρεμπόδισης της απομόνωσης του βακτηρίου *Erwinia amylovora* Eam15, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, γύρω από δισκία διηθητικού χαρτιού διαμέτρου 6 mm με ποσότητα αντιβιοτικού 0, 50, 100 και 250 µg.

### 5.3.7 Έλεγχος ευαισθησίας *Erwinia amylovora* σε ποσότητα πενικιλίνης 50 µg

Στο Πίνακα 50 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν παρουσία 50 µg πενικιλίνης. Στην απομόνωση Eam11 δεν υπήρξε παρεμπόδιση ανάπτυξης στις δύο από τις τρεις επαναλήψεις. Με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, προέκυψε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 51). Με Tukey HSD test, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων τα οποία διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $q > q_{critical}$ ) (Πίνακας 52) και με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Οι απομονώσεις Eam3, Eam7, Eam8, Eam9, Eam12, Eam13, Eam14 και Eam15 ανήκουν στην πρώτη ομάδα (Πίνακας 53). Οι απομονώσεις Eam10 και Eam11 ανήκουν στην δεύτερη ομάδα, καθώς με t-test προέκυψε ότι  $P\text{-two tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 54).

Πίνακας 50. Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων παρουσία 50 µg πενικιλίνης/δισκίο.

	50 µg penicillin
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ	ΖΩΝΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (mm)
Eam3	12,16666667
Eam7	11,16666667
Eam8	12,83333333
Eam9	10,66666667
Eam10	8,33333333
Eam11	6,5
Eam12	13,33333333
Eam13	11,5
Eam14	12,16666667
Eam15	13,5

Πίνακας 51. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 50 µg πενικιλίνης/δισκίο, για τις δέκα απομονώσεις Eam.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	135,175	9	15,01944	9,3385147	1,93E-05	2,392814
Within Groups	32,16667	20	1,608333			
Total	167,3417	29				



Πίνακας 52. Tukey HSD test μεταξύ των δέκα απομονώσεων για ποσότητα πενικιλίνης 50 µg/δισκίο. Ζεύγη με  $q > q_{critical}$ , όπου  $q_{critical}$  5,008, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και σημειώνονται με κίτρινο χρώμα.

q	Eam3	Eam7	Eam8	Eam9	Eam10	Eam11	Eam12	Eam13	Eam14	Eam15
Eam3	x									
Eam7	1,365754 x									
Eam8	0,910503	2,2762573 x								
Eam9	2,048632	0,6828772	2,95913445 x							
Eam10	5,235392	3,8696374	6,14589462	3,18676018 x						
Eam11	7,739275	6,3735204	8,64977762	5,69064317	2,503883 x					
Eam12	1,59338	2,9591344	0,68287718	3,64201163	6,8287718	9,332655 x				
Eam13	0,910503	0,4525215	1,82100581	1,13812863	4,3248888	6,828772	2,503883 x			
Eam14	0	1,3657544	0,91050291	2,04863154	5,2353917	7,739275	1,59338	0,910503 x		
Eam15	1,821006	3,1867602	0,91050291	3,86963736	7,0563975	9,560281	0,227626	2,731509	1,821006 x	
<b>q<sub>critical</sub>=5,008</b>										

Πίνακας 53. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων Eam3, Eam7, Eam8, Eam9, Eam12, Eam13, Eam14 και Eam15, παρουσία 50 µg πενικιλίνης.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	21,8333	7	3,11905	1,636222	0,195897	2,657197
Within Groups	30,5	16	1,90625			
Total	52,3333	23				

Πίνακας 54. T test για τους μέσους όρους των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων Eam10 και Eam11, παρουσία 50 µg πενικιλίνης/δισκίο.

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	Eam10	Eam11
Mean	8,333333333	6,5
Variance	0,083333333	0,75
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	2	
t	3,478505426	
P(T<=t) one-tail	0,036816443	
t Critical one- tail	2,91998558	
P(T<=t) two-tail	0,073632887	
t critical two-tail	4,30265273	

### 5.3.8 Έλεγχος ευαισθησίας *Erwinia amylovora* σε ποσότητα πενικιλίνης 100 µg

Κατά τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του βακτηρίου *Erwinia amylovora* με ποσότητα πενικιλίνης 100 µg, όλες οι απομονώσεις έδωσαν ζώνη παρεμπόδισης ανάπτυξης με εξαίρεση την απομόνωση Eam11, η οποία

σε δύο από τις τρεις επαναλήψεις αναπτύχθηκε κανονικά και δεν σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης. Οι τιμές των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσιάζονται στο Πίνακα 55. Με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα προέκυψε ότι μεταξύ των μέσων όρων των απομονώσεων υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 56). Με Tukey HSD test, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων στα οποία  $q > q_{critical}$ , δηλαδή διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 57) και με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα προέκυψαν οι ομάδες των απομονώσεων. Στην ίδια ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις Eam3, Eam7, Eam8, Eam9, Eam12, Eam13, Eam14 και Eam15, καθώς σε δοκιμή ANOVA των μέσων όρων τους,  $F < F_{critical}$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (Πίνακας 58). Οι απομονώσεις Eam10 και Eam11 δεν ανήκουν σε ομάδα.

Πίνακας 55. Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων παρουσία 100 µg πενικιλίνης/δισκίο.

	100 µg penicillin
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ	ΖΩΝΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (mm)
Eam3	16,33333333
Eam7	15,5
Eam8	19
Eam9	16,16666667
Eam10	11,83333333
Eam11	7,166666667
Eam12	16,33333333
Eam13	16,33333333
Eam14	17,66666667
Eam15	18,16666667

Πίνακας 56. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 100 µg πενικιλίνης/δισκίο, για τις δέκα απομονώσεις Eam.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	328,3416667	9	36,48240741	20,6504193	2,97E-08	2,392814
Within Groups	35,33333333	20	1,766666667			
Total	363,675	29				

Πίνακας 57. Tukey HSD test μεταξύ των δέκα απομονώσεων για ποσότητα πενικιλίνης 100 µg/δισκίο. Ζεύγη με  $q > q_{critical}$ , όπου  $q_{critical}$  5,008, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και σημειώνονται με κίτρινο χρώμα.

q	Eam3	Eam7	Eam8	Eam9	Eam10	Eam11	Eam12	Eam13	Eam14	Eam15
Eam3	x									
Eam7	1,085931	x								
Eam8	3,474978	4,560909	x							
Eam9	0,217186	0,868744	3,692164	x						
Eam10	5,864025	4,778095	9,339003	5,646839	x					
Eam11	11,94524	10,85931	15,42021	11,72805	6,081211	x				
Eam12	0	1,085931	3,474978	0,217186	5,864025	11,94524	x			
Eam13	0	1,085931	3,474978	0,217186	5,864025	11,94524	0	x		
Eam14	1,737489	2,82342	1,737489	1,954675	7,601514	13,68273	1,737489	1,737489	x	
Eam15	2,389047	3,474978	1,085931	2,606233	8,253073	14,33428	2,389047	2,389047	0,651558	x
$q_{critical}=5,008$										

Πίνακας 58. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων Eam3, Eam7, Eam8, Eam9, Eam12, Eam13, Eam14 και Eam15, παρουσία 100 µg πενικιλίνης.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	30,15625	7	4,308036	2,55291	0,057145	2,657197
Within Groups	27	16	1,6875			
Total	57,15625	23				

### 5.3.9 Έλεγχος ευαισθησίας *Erwinia amylovora* σε ποσότητα πενικιλίνης 250 µg

Στο Πίνακα 59 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων του βακτηρίου παρουσία 250 µg πενικιλίνης/δισκίο. Με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, προέκυψε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης, καθώς  $F > F_{critical}$  (Πίνακας 60). Με Tukey HSD test, βρέθηκαν τα ζεύγη των απομονώσεων τα οποία διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $q > q_{critical}$ ) (Πίνακας 61) και με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα οι απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις Eam7, Eam9 και Eam13, καθώς με δοκιμή ANOVA των μέσων όρων τους προέκυψε ότι  $F < F_{critical}$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 61). Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν οι απομονώσεις Eam8, Eam12, Eam14 και Eam15 όπου σε δοκιμή ANOVA,  $F < F_{critical}$  (Πίνακας 62). Στην τρίτη

ομάδα ανήκουν οι Eam10 και Eam11, όπου με t-test για τους μέσους όρους τους  $P_{two-tail} > \alpha$ , όπου  $\alpha = 0,05$ , άρα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (Πίνακας 63). Η απομόνωση Eam3 δεν ανήκει σε καμία ομάδα.

Πίνακας 59. Μέσοι όροι ζωνών παρεμπόδισης των δέκα απομονώσεων παρουσία 250 µg πενικιλίνης/δισκίο.

	250 µg penicillin
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ	ΖΩΝΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (mm)
Eam3	19
Eam7	20,83333333
Eam8	22,5
Eam9	20,66666667
Eam10	14,5
Eam11	12
Eam12	23
Eam13	19,66666667
Eam14	23,5
Eam15	22,66666667

Πίνακας 60. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 250 µg πενικιλίνης/δισκίο, για τις δέκα απομονώσεις Eam.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	392,5	9	43,61111111	38,4803922	1,08E-10	2,3928141
Within Groups	22,66667	20	1,133333333			
Total	415,1667	29				

Πίνακας 61. Tukey HSD test μεταξύ των δέκα απομονώσεων για ποσότητα πενικιλίνης 250 µg/δισκίο. Ζεύγη με  $q > q_{critical}$ , όπου  $q_{critical} = 5,008$ , διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και σημειώνονται με κίτρινο χρώμα.

q	Eam3	Eam7	Eam8	Eam9	Eam10	Eam11	Eam12	Eam13	Eam14	Eam15
Eam3	x									
Eam7	2,982794 x									
Eam8	5,694425	2,711631 x								
Eam9	2,711631	0,271163	2,982794 x							
Eam10	7,321403	10,3042	13,01583	10,03303 x						
Eam11	11,38885	14,37164	17,08327	14,10048	4,067446 x					
Eam12	6,507914	3,52512	0,813489	3,796283	13,82932	17,89676 x				
Eam13	1,084652	1,898142	4,609772	1,626978	8,406055	12,4735	5,423261 x			
Eam14	7,321403	4,338609	1,626978	4,609772	14,64281	18,71025	0,813489	6,236751 x		
Eam15	5,965588	2,982794	0,271163	3,253957	13,28699	17,35444	0,542326	4,880935	1,355815 x	
$q_{critical} = 5,008$										

Πίνακας 62. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων Eam7, Eam9 και Eam13, παρουσία 250 µg πενικιλίνης.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	2,388889	2	1,194444	3,583333	0,094629	5,143253
Within Groups	2	6	0,333333			
Total	4,388889	8				

Πίνακας 63. Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα των μέσων όρων των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων Eam8, Eam12, Eam14 και Eam15, παρουσία 250 µg πενικιλίνης.

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit
Between Groups	1,75	3	0,583333	0,509091	0,686997	4,066181
Within Groups	9,166667	8	1,145833			
Total	10,91667	11				

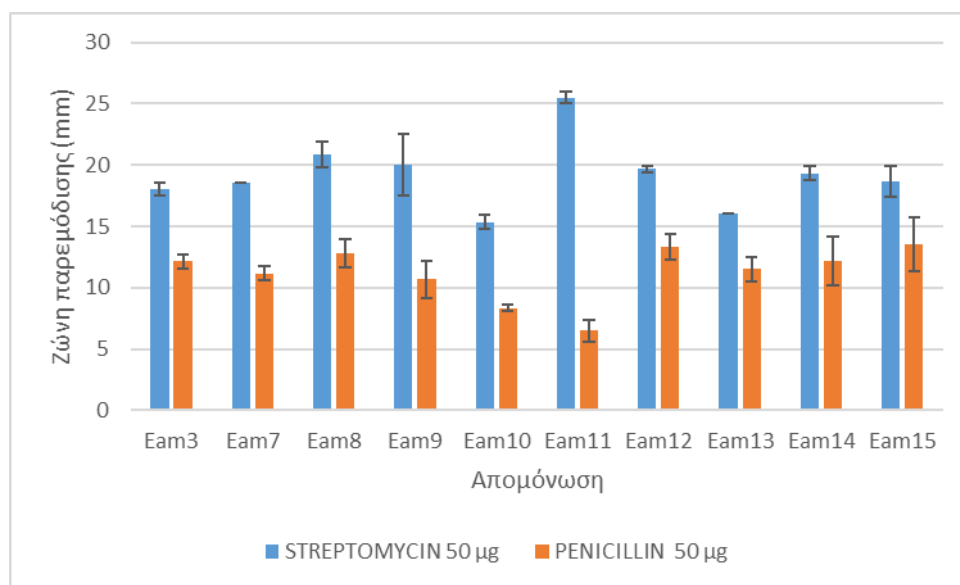
Πίνακας 64. T test για τους μέσους όρους των ζωνών παρεμπόδισης των απομονώσεων Eam10 και Eam11, παρουσία 250 µg πενικιλίνης.

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	Eam10	Eam11
Mean	14,5	12
Variance	0,25	5,25
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	2	
t	1,846372	
P(T<=t) one-tail	0,103058	
t Critical one- tail	2,919986	
P(T<=t) two-tail	0,206116	
t critical two-tail	4,302653	

### 5.3.10 Σύγκριση αποτελεσματικότητας 50 µg στρεπτομυκίνης και πενικιλίνης έναντι των απομονώσεων του βακτηρίου *Erwinia amylovora*

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 6, οι μέσοι όροι των ζωνών παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν κατά των έλεγχο ευαισθησίας των δέκα απομονώσεων του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, παρουσία 50 µg στρεπτομυκίνης είναι

μεγαλύτεροι από τους μέσους όρους των ζωνών παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν παρουσία 50 μg πενικιλίνης. Η απομόνωση Eam11 κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στα 50 μg πενικιλίνης σχημάτισε τη μικρότερη ζώνη παρεμπόδισης (6,5 mm), ενώ στα 50 μg στρεπτομυκίνης τη μεγαλύτερη (25,5 mm).



Διάγραμμα 6. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση ζωνών παρεμπόδισης για την κάθε απομόνωση του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, γύρω από δισκία με 50 μg πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης.

## 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για την απομόνωση του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* από όγκους ελιάς, σύμφωνα με το Young (2004), πρέπει να επιλέγονται όγκοι στα αρχικά τους στάδια, καθώς στους παλιούς όγκους υπάρχει η πιθανότητα ανάπτυξης δευτερογενών βακτηρίων. Στην παρούσα εργασία, κατά την απομόνωση από τον παλιό όγκο, παρατηρήθηκε και ανάπτυξη μυκήτων, ενώ από τον μικρό και νεοσχηματισμένο όγκο δεν παρατηρήθηκε.

Σε πείραμά τους οι Samiul et al. (2017), δοκίμασαν την ευαισθησία απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* σε αντιβιοτικά, μεταξύ των οποίων και το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, σε συγκέντρωση 10 µg/δισκίο. Με βάση τη διάμετρο της ζώνης παρεμπόδισης, το βακτήριο χαρακτηρίστηκε ανθεκτικό (5-10mm) ή ευαίσθητο (>16mm). Στην παρούσα εργασία, στη συγκέντρωση 10 µg/δισκίο, όλες οι απομονώσεις του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* έχουν σχηματίσει ζώνη παρεμπόδισης μεγαλύτερη από 16mm, συνεπώς είναι ευαίσθητες στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη. Οι απομονώσεις PSS1, PSS2, PSS3, PSS7 και PSS10 που ανήκουν στην ίδια ομάδα παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης, είναι οι λιγότερο ευαίσθητες, καθώς ο μέσος όρος των ζωνών παρεμπόδισης που σχηματίστηκαν ήταν 19,33-21,6 mm. Οι απομονώσεις PSS4, PSS5, PSS6, PSS8 και PSS9 είναι πιο ευαίσθητες, καθώς ο μέσος όρος των ζωνών παρεμπόδισης παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης ήταν 23,5-25,6 mm. Στην πρώτη ομάδα οι απομονώσεις PSS1, PSS2 και PSS10 προέρχονται από την ίδια γεωγραφική περιοχή και στη δεύτερη από την ίδια γεωγραφική περιοχή είναι οι απομονώσεις PSS6, PSS8 και PSS9. Με αύξηση της ποσότητας του αντιβιοτικού οι ομάδες παρέμειναν οι ίδιες

Σύμφωνα με το CLSI (2015) κατά τον έλεγχο ευαισθησίας βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με χρήση δισκίων διηθητικού χαρτιού εμποτισμένων με αντιβιοτικά, τα βακτήρια χαρακτηρίζονται ευαίσθητα όταν η ζώνη παρεμπόδισης παρουσία 10 µg στρεπτομυκίνης είναι μεγαλύτερη από 15 mm και ανθεκτικά όταν είναι μικρότερη από 11 mm. Στην παρούσα εργασία στην ποσότητα 10 µg, ζώνη μεγαλύτερη από 15 mm έδωσαν οι απομονώσεις Eam8 και Eam11, συνεπώς είναι ευαίσθητες στο αντιβιοτικό. Ζώνη μικρότερη από 11

mm σχηματίστηκε κατά τον έλεγχο της απομόνωσης Eam10, το οποίο είναι ένδειξη ανθεκτικότητας. Στις υπόλοιπες απομονώσεις οι ζώνες παρεμπόδισης που προέκυψαν ήταν μεταξύ των τιμών αυτών, άρα τα βακτήρια δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ανθεκτικά ή ευαίσθητα στο αντιβιοτικό.

Στον έλεγχο ευαισθησίας βακτηρίων στα αντιβιοτικά με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με χρήση δισκίων διηθητικού χαρτιού εμποτισμένων με το αντιβιοτικό, η συνήθης ποσότητα πενικιλίνης και αντιβιοτικών που ανήκουν στις β-λακτάμες είναι 10 units ή 10 µg/δισκίο (Bauer et al. 1966, CLSI 2015). Σύμφωνα με τους Bauer et al. (1966), για ποσότητα πενικιλίνης G 10 units, το βακτήριο χαρακτηρίζεται ανθεκτικό αν η διάμετρος της ζώνης παρεμπόδισης είναι μικρότερη από 20 mm και ευαίσθητο αν είναι μεγαλύτερη από 29 mm. Στην παρούσα εργασία, στις απομονώσεις και των δύο βακτηρίων η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μεγαλύτερη από 10 units.

Στον έλεγχο ευαισθησίας των δέκα απομονώσεων του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, με ποσότητα πενικιλίνης/δισκίο 50 µg, σε όλες οι απομονώσεις εκτός από την PSS8 (20,83 mm), σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης μικρότερη από 20 mm. Στις PSS2 και PSS10 δεν σχηματίστηκε καθόλου ζώνη παρεμπόδισης και στην PSS1 η οποία προέρχεται από την ίδια περιοχή, ο μέσος όρος της ζώνης παρεμπόδισης ήταν μόλις 7,33 mm. Ακόμα και στα 250 µg/δισκίο, μόνο στην απομόνωση PSS8 σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης μεγαλύτερη από 29 mm. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι απομονώσεις του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, είναι πιθανώς ανθεκτικές στο αντιβιοτικό πενικιλίνη. Στον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του βακτηρίου *Erwinia amylovora*, οι ζώνες παρεμπόδισης στα 50 µg καθώς και στα 100 µg πενικιλίνης, οι ζώνες παρεμπόδισης όλων των απομονώσεων ήταν μικρότερες από 20 mm και στα 250 µg δεν υπήρξε ζώνη παρεμπόδισης μεγαλύτερη από 29 mm. Συνεπώς όλες οι απομονώσεις θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ανθεκτικές στο αντιβιοτικό πενικιλίνη.

Στην Ευρώπη η χρήση των αντιβιοτικών στη φυτοπροστασία απαγορεύεται. Ωστόσο ανθεκτικότητα φυτοπαθογόνων βακτηρίων στα αντιβιοτικά έχει παρατηρηθεί και στην Ευρώπη. Οι Alvarez et al. (1998) σε πείραμά τους, εντόπισαν ανθεκτικά στελέχη του βακτηρίου *P. savastanoi* pv. *savastanoi* στο



αντιβιοτικό πενικιλίνη, σε περιοχές της Ισπανίας, όπου η χρήση αντιβιοτικών απαγορεύεται. Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά υπήρχαν πριν την ανακάλυψη και τη χρήση των αντιβιοτικών και αυτό προκύπτει από έρευνες σε απομονωμένα περιβάλλοντα και αρχαία δείγματα DNA. Τα περισσότερα αντιβιοτικά προέρχονται από μικροοργανισμούς του εδάφους. Οι μικροοργανισμοί αυτοί φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά για την προστασία τους. Μέσω της συνεξέλιξης των ειδών και της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων, τα γονίδια αυτά άρχισαν να κυριαρχούν και σε βακτήρια που ήταν ευαίσθητα στα αντιβιοτικά (Sundin and Wang 2018). Το 1940, πριν την χρήση της πενικιλίνης για θεραπευτικούς σκοπούς, υπήρξαν αναφορές για ένα ένζυμο το οποίο παρεμποδίζει τη δράση της (Abraham and Chain 1940). Τα ένζυμα αυτά, ανήκουν στην κατηγορία βήτα-λακταμάσες και είναι ικανά να υδρολύουν ένα δακτύλιο του μορίου του αντιβιοτικού, καθιστώντας το ανενεργό. Βήτα-λακταμάσες συντίθενται από πολλά είδη του γένους *Pseudomonas* και βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae (Bush 2018). Σε πείραμά τους, οι Coleman et al. (1996), απέδειξαν ότι μία απομόνωση του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae*, παράγει βήτα-λακταμάσες. Οι Naae et al. (2004), σε πείραμά τους απέδειξαν ότι στελέχη του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Erwinia rhapsontici*, φέρουν χρωμοσωμικά γονίδια, που είναι υπεύθυνα για την σύνθεση βήτα-λακταμασών. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα μπορεί να βρίσκονται στο χρωμοσωμικό DNA ή σε πλασμίδια. Η ύπαρξή των γονιδίων αυτών στα πλασμίδια είναι σημαντικό πρόβλημα, λόγω της οριζόντιας μετακίνησης των γονιδίων σε ευαίσθητα βακτήρια (Bush 2018). Επιπρόσθετα, η ανθεκτικότητα φυτοπαθογόνων βακτηρίων σε αντιβιοτικά, σε περιοχές όπου η χρήση τους απαγορεύεται, μπορεί να αποδοθεί στη χρήση κοπριάς και λάσπης από βιολογικούς καθαρισμούς και στο νερό της άρδευσης (Skandalis et al. 2021). Συνεπώς η ανθεκτικότητα των απομονώσεων στην παρούσα εργασία στο αντιβιοτικό πενικιλίνη, δεδομένου ότι η χρήση αντιβιοτικών στην Ελλάδα απαγορεύεται, μπορεί να αποδοθεί στα παραπάνω.

Μελλοντικά, προτείνεται ο έλεγχος ευαισθησίας των απομονώσεων των βακτηρίων στα αντιβιοτικά να πραγματοποιηθεί σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Kirby et al. (1966), ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα με την παρούσα

εργασία. Επιπρόσθετα, είναι απαραίτητο να γίνει έλεγχος των απομονώσεων που υπήρξε ένδειξη ανθεκτικότητας, για ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας με μοριακές τεχνικές.

## 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα εργασία είναι τα εξής:

- Για την απομόνωση του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* από όγκους ελιάς να προτιμώνται νέοι, κλειστοί όγκοι, ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη δευτερογενών μυκήτων και βακτηρίων.
- Το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη ήταν πιο αποτελεσματικό έναντι των απομονώσεων και των δύο βακτηρίων, σε σύγκριση με το αντιβιοτικό πενικιλίνη.
- Όλες οι απομονώσεις του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ήταν ευαίσθητες στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, καθώς οι ζώνες παρεμπόδισης ήταν μεγαλύτερες από 15 mm.
- Οι απομονώσεις του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, πιθανώς είναι ανθεκτικές στο αντιβιοτικό πενικιλίνη.
- Το βακτήριο *Erwinia amylovora* αναπτύσσεται πιο γρήγορα από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, για το λόγο αυτό κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, πρέπει να ελέγχεται η οπτική πυκνότητα (OD) της υγρής καλλιέργειας, ώστε να προσαρμοστεί η ποσότητα μολύσματος που πρέπει να τοποθετηθεί ανά τρυβλίο. Διαφορετική ποσότητα μολύσματος από την ίδια απομόνωση δίνει διαφορετική διάμετρο ζώνης παρεμπόδισης.
- Οι απομονώσεις του βακτηρίου *Erwinia amylovora* πιθανώς είναι ανθεκτικές στο αντιβιοτικό πενικιλίνη.
- Οι απομονώσεις Eam8 και Eam11 του βακτηρίου *Erwinia amylovora* είναι ευαίσθητες στο αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη και η απομόνωση Eam10 πιθανώς ανθεκτική. Οι υπόλοιπες απομονώσεις είναι μετρίως ευαίσθητες.

## 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 8.1.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abraham E. P. and Chain E., 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 3713:837.

Acosta-Muniz C., Ponce de Leon Door A. and Romo-Chacon A., 2013. Detection of streptomycin resistance in *Erwinia amylovora* strains isolated from apple orchards in Chihuahua, Mexico. *European Journal of Plant Pathology*, 137:223-229.

Agrios G. N., 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, California.

Allerberger F., Fida P., Grossgut R., Schönbauer M. and Würzner H., 2003. Antibiotics in horticulture and antibiotic feed additives in animal husbandry, Austria 2002. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 115:615–617.

Anadon A., 2006. WS14 The EU ban of antibiotics as feed additives (2006): alternatives and consumer safety. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29:41–44.

Bauer A. W., Kirby M. M., Sherris J. C. and Turck M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of clinical Pathology*, 45:493-496.

Bertolini E., Penyalver R., García A., Olmos A., Quesada J. M., Cambra M. and López M. M., 2003. Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested-PCR in a single closed tube. *Journal of Microbiological Methods*, 52:261–266.

Bouaichi A, Lougramzi H., Ou-zine M., Kotba I., Habbadi K., Benbouazza A., Benkirane R. and Achbani E., 2019. Molecular identification, in vitro copper resistance and antibiotics susceptibility of the causal agent of the olive knot disease in Morocco. *Malaysian Journal of Microbiology*, 15:1-7.

Borruso L., Salomone-Stagni M., Polsinelli I., Schmitt A. O. and Benini S., 2017. Conservation of *Erwinia amylovora* pathogenicity-relevant genes among *Erwinia* genomes. *Archives of Microbiology*, 199:1335–1344.

- Brock T. D., 1961. CHLORAMPHENICOL. *Bacteriological reviews*, 25:32–48.
- Bush K., 2018. Past and present perspectives on  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6:1-20.
- Caballo-Ponce E., Murillo J., Martínez-Gil M., Moreno-Pérez A., Pintado A. and Ramos C., 2017. Knots untie: molecular determinants involved in knot formation induced by *Pseudomonas savastanoi* in woody hosts. *Frontiers in Plant Science*, 8:1-16.
- Castel L., Pina A., Irisarri P. and Errea P., 2020. Sugar content and organic acid profiles of local apple cultivars recovered from mountain zones. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 93:217–224.
- Cesur S. and Demiroz A. P., 2013. Antibiotics and the mechanisms of resistance to antibiotics. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, 21:138-142.
- CLSI 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Coleman H. R., Shaffer J. and True H., 1996. Properties of  $\beta$ -Lactamase from *Pseudomonas syringae*. *Current Microbiology*, 32:147–150.
- Cornille A., Antolín F., Garcia E., Vernesi C., Fietta A., Brinkkemper O. and Roldán-Ruiz I., 2019. A multifaceted overview of apple tree domestication. *Trends in Plant Science*. 24:770-782.
- de Moura R. M., 2010. Pioneer reports of plant bacterial diseases. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, 7:105-118.
- Dowling A., Dwyer J. O. and Adley C.C., 2017. Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance. In: Méndez-Vilas A. (eds). *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs*, Formatex Research Center: Badajoz, Spain, pp. 536-545.

Du Z., Jakovljevic V., Salm H., and Geider K., 2004. Creation and genetic restoration of *Erwinia amylovora* strains with low levan synthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65:115–122.

EPPO Bulletin 2013, PM 7/20 (2) \* *Erwinia amylovora*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 43:21–45

EPPO 2021, *Erwinia amylovora*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. Available online. <https://gd.eppo.int/taxon/ERWIAM/datasheet> (Πρόσβαση 1 Απριλίου 2021).

Fernandes A. and Marcelo M., 2008. Evaluation of the sensitivity of *Pseudomonas savastanoi* to seventeen antibiotics. *Acta Horticulture*, 791:565-568.

Gardan L., Bollet C., Abu Ghorrah M., Grimont F. and Grimont P. A. D., 1992. DNA Relatedness among the Pathovar Strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and Proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42:606–612.

Gardan L., Shafik H., Belouin S., Broch R., Grimont F. and Grimont P. A. D., 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (Ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49:469–478.

Gonzalez-Andujar J. L., 2009. Expert system for pests, diseases, and weeds identification in olive crops. *Expert Systems with Applications*, 36:3278–3283.

Hancock J., Luby J., Brown S. and Lobos G., 2008. Temperate fruit crop breeding: Germplasm to genomics. Springer Science + Business Media B.V, New York.

Haynes E., Ramwell C., Griffiths T., Walker D. and Smith J., 2020. Review of antibiotic use in crops, associated risk of antimicrobial resistance and research gaps. Report to Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA) & The Food Standards Agency (FSA). Available online <https://doi.org/10.46756/sci.fsa.vnq132> (Πρόσβαση, 20 Ιουνίου 2021).

Integrated Taxonomic Information System (ITIS), 2021. On-line database [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=961539#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=961539#null) (Πρόσβαση, 26 Ιουνίου 2021)

Islam M. A., Alam M. D., Urmee S. A., Rahaman M. H. and Razu M. H., 2014. Isolation, identification, in vitro antibiotic resistance and plant extract sensitivity of fire blight causing *Erwinia amylovora*. Journal of Plant Pathology & Microbiology, 5:1-4.

Keck M., Hevesi M., Ruppitsch W., Stoger A. and Richter S., 2002. Spread of fire blight in Austria and Hungary – Variability of *Erwinia amylovora* strains. Plant Protection Science, 38:49-55.

Khlaif H., 2006. Olive Knot Disease in Jordan. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 2:387-400.

Li X., Li X., Wang T. and Gao W., 2016. Nutritional Composition of Pear Cultivars (*Pyrus* spp.). In: Simmonds M. S. J., Preedy V. R. (eds.), Nutritional Composition of Fruit Cultivars, Academic Press, Surrey UK, pp. 573–608.

Malnoy M., Martens S., Norelli J. L., Barny M.-A., Sundin, G. W., Smits T. H. M. and Duffy B., 2012. Fire blight: Applied genomic insights of the pathogen and host. Annual Review of Phytopathology, 50:475–494.

Manyi-Loh C., Mamphweli S., Meyer E. and Okoh A., 2018. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential public health implications. Molecules, 23:1-48.

Marcelletti S. and Scortichini M., 2014. Definition of plant-pathogenic *Pseudomonas* Genomespecies of the *Pseudomonas syringae* Complex through multiple comparative approaches. Phytopathology, 104:1274–1282.

McManus P. and Stockwell V., 2000. Antibiotics for plant diseases control: silver bullets or rusty sabers? APSnet Features. Available online <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/AntibioticsForPlants.aspx> . (Πρόσβαση, 20 Ιουνίου 2021).

McManus P. S., Stockwell V. O., Sundin G. W. and Jones A. L., 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40:443–465.

Mikiciński A., Puławska J., Molzhigitova A. and Sobiczewski P., 2020. Bacterial species recognized for the first time for its biocontrol activity against fire blight (*Erwinia amylovora*). *European Journal of Plant Pathology*, 156:257-272.

Misato T., Ko K. and Yamaguchi I., 1977. Use of Antibiotics in Agriculture. *Advances in Applied Microbiology*, 21:53–88.

Naas T., Aubert D., Vimont S. and Nordmann P., 2004. Identification of a chromosome-borne class C  $\beta$ -lactamase from *Erwinia rhapontici*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54:932–935.

National Center for Biotechnology Information, 2021. PubChem Compound Summary for CID 54704426, Tetracycline hydrochloride. Available online. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetracycline-HCl>. (Πρόσβαση 22 Απριλίου 2021).

Nguyen K.A., Fosrter H. and Adaskaveg J.E., 2018. Efficacy of copper and new bactericides for managing olive knot in California. *Plant disease*, 102:892-898.

O'Neil J., 2015. Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. The review on antimicrobial resistance. <https://amr-review.org/Publications.html> (Πρόσβαση 1 Ιουλίου, 2021).

Palacio-Bielsa A., Roselló M., Llop P. and López M. M., 2012. *Erwinia* spp. from pome fruit trees: similarities and differences among pathogenic and non-pathogenic species. *Trees*, 26:13–29.

Parcey M., Gayder S., Morley-Senkler V., Bakkeren G., Úrbez-Torres J. R., Ali S. and Svircev A. M., 2020. Comparative genomic analysis of *Erwinia amylovora* reveals novel insights in phylogenetic arrangement, plasmid diversity, and streptomycin resistance. *Genomics*, 112:3762-3772.

Paulin J. P., 1996. Control of fireblight in European pome fruits. *Outlook on Agriculture*, 25:49–55.



- Penyalver R., Garcia A., Ferrer A., Bertolini E. and Lopez M. M., 2000. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:2673–2677.
- Pollock K, Barfield D. G. and Shields R., 1983. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell Reports*, 2:36-39.
- Popović T., Jelušić A., Živković L., Živković N., Iličić R., Stanisavljević R. and Stanković S., 2020. Identification, genetic characterization, and virulence of Serbian *Erwinia amylovora* isolates. *European Journal of Plant Pathology*, 157:857–872.
- Powney R., Beer S. V., Plummer K., Luck J., and Rodoni B., 2011. The specificity of PCR-based protocols for detection of *Erwinia amylovora*. *Australasian Plant Pathology*, 40:87–97.
- Quesada J., Penyalver R. and Lopez M., 2012. Epidemiology and control of plant diseases caused by phytopathogenic bacteria: The case of olive knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. In: Cumagun C. J. (eds), *Plant Pathology*, InTech Press, Croatia, pp. 299–326.
- Raina B. L., 2003. OLIVES. In: Caballero B. Finglas P. Toldrá F. (eds), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Academic Press, Netherlands, pp. 4260–4267.
- Ramos C., Matas-Casado I. M., Bardaji L., Aragoni I. M. and Murillo J., 2012. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. *Molecular Plant Pathology*, 13:998-1009.
- Roberts R. G., Hale C. N., van der Zwet T., Miller C. E. and Redlin S. C., 1998. The potential for spread of *Erwinia amylovora* and fire blight via commercial apple fruit, a critical review and risk assessment. *Crop Protection*, 17:19–28.
- Rodríguez-Moreno L., Barceló-Muñoz A. and Ramos C., 2008. In vitro analysis of the interaction of *Pseudomonas savastanoi* pvs. *savastanoi* and *nerii* with micropropagated olive plants. *Phytopathology*, 98:815–822.

Sabtu N., Enoch D. A. and Brown N. M., 2015. Antibiotic resistance: what, why, where when and how? *British Medical Bulletin*, 116:105-113.

Samiul I., Razia S., Saroar J., Biswanath S., Khalekuzzaman, Uzzal K. A., Faruk H. and Asadul I., 2017. Isolation and biochemical characterization of *Pseudomonas syringae* causing citrus blast disease and its sensitivity test against some antibiotics. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 8:1435-1440.

Singh J. and Khan A., 2019. Distinct patterns of natural selection determine sub-population structure in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Scientific Reports*, 9:1-13.

Sisto A., Cipriani M. G., Teglib S., Cerboneschi M., Stea G. and Santilli E., 2007. Genetic characterization by fluorescent AFLP of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated from different host species. *Plant Pathology*, 56:366-372.

Skandalis N., Maeusli M., Papafotis D., Miller S., Lee B., Theologidis I. and Luna B., 2021. Environmental spread of antibiotic resistance. *Antibiotics*, 10:1-14.

Soares G. M. S., Figueiredo L. C., Faveri M., Cortelli S. C., Duarte P. M. and Feres M., 2012. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *Journal of Applied Oral Science*, 20:295–309.

Spinelli F., Speakman J. B., Rademacher W., Halbwirth H., Stich K. and Costa G., 2005. Luteoforol, a flavan 4-ol, is induced in pome fruits by prohexadione-calcium and shows phytoalexin-like properties against *Erwinia amylovora* and other plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 112:133–142.

Stockwell V.O. and Duffy B., 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue scientifique et technique*, 31:199-210.

Sundin G. W. and Wang N., 2018. Antibiotic resistance in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 25:161-180.

Surico G., Iacobellis N. S. and Sisto A., 1985. Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Physiological Plant Pathology*, 26:309–320.

Tancos K. A., Borejsza-Wysocka E. and Kuehne S., 2016. Prevalence of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* in New York apple orchards. *Plant disease*, 100:802-809.

Tancos K. A., Borejsza-Wysocka E. and Kuehne S., 2017. Fire blight symptomatic shoots and the presence of *Erwinia amylovora* in asymptomatic apple budwood. *Plant disease*, 101:186-191.

Taylor P. and Reeder R., 2020. Antibiotic use on crops in low and middle-income countries based on recommendations made by agricultural advisors. *CABI Agriculture and Bioscience*, 1:1-14.

Tegli S., Cerboneschi M., Libelli I. and Santilli E., 2010. Development of a versatile tool for the simultaneous differential detection of *Pseudomonas savastanoi* pathovars by End Point and Real-Time PCR. *BMC Microbiology*, 10:1-14.

Vannuffel P. and Cocito C., 1996. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs*, 51:20–30.

Ventola C. L., 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40:277-283.

Waksman S. A., 1947. What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia*, 39:565-569.

Wallis A. and Cox K., 2019. Management of fire blight using pre-bloom application of prohexadione-calcium. *Plant Disease*, 104:1-31

Wang D., Korban S. S. and Zhao Y., 2010. Molecular signature of differential virulence in natural isolates of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 100:192–198.

WHO, 2020. Antibiotic resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. (Πρόσβαση 23 Ιουλίου, 2021)

Young J. M., 2004. Olive knot and its pathogens. *Australasian Plant Pathology*, 33:33–39.

Young J. M., 2010. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*, 92:1-10.

Zhang J., Li J., Xue C., Wang R., Zhang M. Q. K. and Wu J., 2020. The variation of stone cell content in 236 Germplasms of sand pear (*Pyrus pyrifolia*) and Identification of Related Candidate Genes. *Horticultural Plant Journal*. 7:108-116

Zhao Y., Tian Y., Wang L., Geng G., Zhao W., Hu B. and Zhao Y., 2019. Fire blight disease, a fast-approaching threat to apple and pear production in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 18:815–820.

Zimdahl R. L., 2015. Antibiotics. In: Zimdahl R. L. (eds), *Six Chemicals That Changed Agriculture*, Academic press, Colorado, pp.165–182.

### **8.1.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Ζιώγας Β.Ν. και Μαρκόγλου Α.Ν., 2007. Γεωργική Φαρμακολογία. Εκδόσεις Greenbooks publications, Αθήνα

Βασιλακάκης Μ., 2016. Γενική και Ειδική Δενδροκομία, Α΄ έκδοση, Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη.

Παναγόπουλος Χ., 2007. Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων & Αμπέλου, 4η έκδοση, Εκδόσεις ΑΘ. ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ, Αθήνα.

Τζάμος Ε.Κ. 2004., Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα

