ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ΑΠΟ ΕΛΑΙΩΝΕΣ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ

Μεταπτυχιακή διατριβή στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου με τίτλο «Εφαρμοσμένη Επιστήμη και Τεχνολογία στην Γεωπονία»

Ελευθέριος Αλεξανδρίδης

Ηράκλειο, Μάιος 2024

HELLENIC MEDITERRANEAN UNIVERSITY
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF AGRICULTURE

Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* isolates from olive trees in Crete

Postgraduate thesis in the postgraduate program of Hellenic Mediterranean University entitled as «Applied Science and Technology in Agricultural Production»

Eleftherios Alexandridis

Heraklion, May 2024

Πρόλογος

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας- Βακτηριολογίας του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου Κρήτης. Ευχαριστώ τον ομότιμο καθηγητή μου Δημήτριο Γκούμα για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου άσκηση στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας- Βακτηριολογίας, την καθοδήγηση, τις συμβουλές του και την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την πρώτη μου συμμετοχή με προφορική παρουσία σε συνέδριο. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ευαγγελία Μπαλαντινάκη και την Μαριάνθη Παγουλάτου για την πολύτιμη συμβολή τους σε όλα τα στάδια της μεταπτυχιακής μου διατριβής και τα αμέτρητα γέλια.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, την κοπέλα μου και τους φίλους μου για την στήριξη τους.

Η εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΚΗΣ ΣΥΜΒΑΣΗΣ μεταξύ της «Περιφέρειας Κρήτης», του «Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστήμιου», του «Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας» και του «Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού - ΔΗΜΗΤΡΑ» για την εκπόνηση του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο: «Εξειδικευμένη επιστημονική υποστήριξη και καινοτόμες δράσεις για τη φυτοπροστασία της ελιάς στην Περιφέρεια Κρήτης 2022–2023», χρηματοδότησή: Περιφέρεια Κρήτης, Αρ.Πρωτ.: 33869/01-02-2023.

Πρόλογος ... 3
Περίληψη ... 3
ABSTRUCT ... 6
1 Εισαγωγή ... 8
1.1 Ασθένειες και φυτοπαθογόνα ... 9
1.2 Χαλκούχα σκευάσματα στην φυτοπροστασία ... 11
1.3 Ανθεκτικότητα παθογόνων ... 13
1.4 *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ... 13
1.4.1 Ταυτοποίηση ... 17
1.4.2 Αλληλεπιδράσεις του *Pseudomonas savastanoi* με άλλα βακτήρια ... 19
1.4.3 Μέτρα αντιμετώπισης ... 22
2 Υλικά και Μέθοδοι ... 25
2.1 Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών ... 26
2.1.1 Απομόνωση στελεχών ... 26
2.1.2 Βιοχημική ταυτοποίηση των απομονώσεων ... 31
2.1.3 Μοριακή ταυτοποίηση ... 32
2.1.4 Δοκιμές παθογένειας σε ελιά ... 38
2.2 Ευαισθησία των απομονώσεων στον θειικό χαλκό ... 39
2.2.1 Προσδιορισμός της συσχέτισης των τιμών της οπτικής πυκνότητας με την συγκέντρωση βακτηριακού αιωρήματος του *Pseudomonas savastanoi* ... 39
2.2.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* στον θειικό χαλκό ($CuSO_4$ $5H_2O$), σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar Glucose με κατά θέση εμβολιασμό του βακτηριακού αιωρήματος (spot inoculation) ... 39
2.2.3 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* στον θειικό χαλκό ($CuSO_4$ $5H_2O$), σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Broth σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA ... 40
2.3 Αποτελεσματικότητα εγκεκριμένων χαλκούχων σκευασμάτων έναντι απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ... 41
2.3.1 Διερεύνηση αποτελεσματικότητας εγκεκριμένων χαλκούχων σκευασμάτων έναντι απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Broth σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA ... 41
3 Αποτελέσματα ... 43
3.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση στελεχών ... 44
3.1.1 Απομόνωση και φαινοτυπική ταυτοποίηση ... 44
3.1.2 Μοριακή ταυτοποίηση ... 54
3.1.3 Δοκιμές παθογένειας σε κλάδους ελιάς ... 62
3.2 Ευαισθησία των απομονώσεων στον θειικό χαλκό ... 63
3.2.1 Προσδιορισμός της συσχέτιση των τιμών της οπτικής πυκνότητας με την συγκέντρωση βακτηριακού αιωρήματος του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ... 63

3.2.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* στον θειικό χαλκό ($CuSO_4$ $5H_2O$), σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar Glucose με κατά θέση εμβολιασμό του βακτηριακού αιωρήματος (spot inoculation) 63

3.2.3 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* στον θειικό χαλκό ($CuSO_4$ $5H_2O$), σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Broth σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA 67

3.3 Αποτελεσματικότητα εγκεκριμένων χαλκούχων σκευασμάτων έναντι απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* 73

3.3.1 Διερεύνηση αποτελεσματικότητας εγκεκριμένων χαλκούχων σκευασμάτων έναντι των απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Broth σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA 73

4 Συμπεράσματα- Συζήτηση 80

5 Βιβλιογραφία 87

Παράρτημα: 93

Περίληψη

Η ελαιοκαλλιέργεια αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές καλλιέργειες για τις χώρες της Μεσογείου, καταλαμβάνοντας 5.052.216 ha το 2021. Στην Ελλάδα αντιστοιχεί το 16,36% της παραπάνω έκτασης (826.390 ha) με τη χώρα μας να κατέχει την δεύτερη θέση στην παραγωγή ελαιοκομικών προϊόντων στην Ευρώπη (FAO, 2021). Το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv), προκαλεί την ασθένεια φυματίωση ή καρκίνωση της ελιάς, προκαλώντας τον σχηματισμό υπερπλασιών σε κλαδιά, βραχίονες, βλαστούς και σπανιότερα σε φύλλα ελιάς (*Olea europaea*). Στελέχη του *Pseudomonas savastanoi* (Psav) προσβάλουν και άλλα ξυλώδη φυτά εκτός από την ελιά, όπως την πικροδάφνη (*Nerium oleander*), τον φράξινο (*Fraxinus excelsior*), το γιασεμί (*Jasminum officinalis*), το λιγούστρο (*Ligustrum japonicum*), την φορσύθια (*Forsythia* spp.), την φιλλυρέα (*Phillyrea* spp.), το σπάρτο (*Retama sphaerocarpa*), την μυρτιά (*Myrtus communis*), τον ράμνο (*Rhamnus alaternus*), την διπλαδένια (*Mandevilla sanderi*) και την ροδιά (*Punica granatum*) (Moretti et al, 2017). Με βάση τις διαφοροποιήσεις στο εύρος των ξενιστών και στα φαινοτυπικά και γενετικά χαρακτηριστικά, τα στελέχη στο είδος *Pseudomonas savastanoi* ομαδοποιούνται σε παθοποικιλίες (pathovars): pv. *savastanoi* (που περιλαμβάνει βακτηριακά στελέχη από ελιά, γιασεμί, λιγούστρο, ροδιά, *Forsythia* spp., *Phillyrea* spp.); pv. *nerii* (απομονωμένο από, και παθογόνο στην πικροδάφνη); pv. *fraxini* (απομονωμένο από, και παθογόνο στον φράξινο); pv. *retacarpa* (απομονωμένο από, και παθογόνο στο *R. sphaerocarpa*) και pv. *mandevillae* (απομονωμένο από, και παθογόνο στον *M. sanderi*) (Caballo-Ponce et al, 2017; Moretti et al, 2017; Caballo-Ponce et al, 2021). Στην φύση απαντάται στην φυτική επιφάνεια των φυτών ξενιστών, όπως και στο εσωτερικό των φυματίων που προκαλεί, όπου επιβιώνει και πολλαπλασιάζεται. Διασπείρεται με τον άνεμο, την βροχή και τις ανθρώπινες δραστηριότητες (Ramos et al, 2012). Μετά από την προσβολή ενός φυτικού ιστού από το φυτοπαθογόνο, προκαλείται αύξηση του μεγέθους και του αριθμού των κυττάρων του, όπως και ανωμαλίες στην διαδικασία της κυτταρικής του διαίρεσης, που οφείλονται στην σύνθεση ινδολοξικού οξέος (IAA) και κυτοκινίνων από το βακτήριο (Buonaurio et al, 2015). Το μέγεθος του πληθυσμού του βακτηρίου στην επιφάνεια, αλλά και στο εσωτερικό των φυτικών ιστών, φαίνεται να

επηρεάζεται από τα βακτήρια *Erwinia toletana* και *Pantoea agglomerans*, που δεν αποτελούν παθογόνα, αλλά συχνά συναπομονώνονται με το Psav από τους προσβεβλημένους φυτικούς ιστούς (Ramos et al, 2012). Τα συνιστάμενα μέτρα για την αντιμετώπιση του Psav είναι κυρίως προληπτικά καλλιεργητικά μέτρα και η εφαρμογή χαλκούχων σκευασμάτων (Ramos et al, 2012). Όμως, η συνεχής και αλόγιστη χρήση τους, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τα παθογόνα σε αρκετές χώρες (Nguyen et al, 2018). Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η διερεύνηση της φαινοτυπικής, βιοχημικής και γενετικής παραλλακτικότητας στελεχών του βακτηρίου που απομονώθηκαν τα τελευταία έξι έτη από τις τέσσερεις Περιφερειακές Ενότητες της Κρήτης, της διαπίστωσης πιθανής παρουσίας ανθεκτικών στελεχών του Psav στο χαλκό ($CuSO_4$ $5H_2O$) και ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας, *in vitro*, πέντε εγκεκριμένων εμπορικών χαλκούχων σκευασμάτων έναντι στελεχών του βακτηρίου. Η βιοχημική ταυτοποίηση των στελεχών του παθογόνου πραγματοποιήθηκε μέσω των κλασσικών για τις ψευδομονάδες δοκιμών LOPAT. Οι βακτηριακές απομονώσεις εμφανίστηκαν αρνητικές στην παραγωγή levan, οξειδάσης και αργινίνης και στην πηκτινόλυση κονδύλων πατάτας, ενώ ήταν ικανές να προκαλέσουν αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού. Ακόμη, δεν ήταν ικανές να παράγουν φθορισμό στο θρεπτικό υπόστρωμα King's B. Με την χρήση της PCR (Polymerase Chain Reaction), οι εξειδικευμένοι εκκινητές IAALF και IAALR, προκάλεσαν την ενίσχυση του γονιδίου *iaaL* (Penyalver et al, 2000). Μέσω της φυλογενετικής ανάλυσης MLSA (Multi Locus Sequence Analysis) των τεσσάρων συντηρημένων γονιδίων *gapA, gltA, gyrB* και *rpoD*, δείχθηκε η γενετική ομοιομορφία των στελεχών του Psav, που απομονώθηκαν από Κρητικούς ελαιώνες (Moretti et al, 2017). Μέσω του *in vitro* ελέγχου της ανθεκτικότητας των στελεχών στον $CuSO_4$ $5H_2O$, διαπιστώθηκε ότι το 92,3% των απομονώσεων από ελαιώνες είναι ανεκτικά στον πενταένυδρο θειικό χαλκό. Έπειτα, ορισμένων στελεχών η ευαισθησία ελέγχθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, διαπιστώνοντας την ανθεκτικότητα τους (Nguyen et al., 2018). Ακόμη αξιολογήθηκε, *in vitro*, η αποτελεσματικότητα πέντε χαλκούχων σκευασμάτων του εμπορίου σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Διαπιστώθηκε ότι ο τριβασικός θειικούς χαλκός ήταν πιο αποτελεσματικός εναντίων των βακτηρίων, με τον βορδιγάλειο πολτό να έχει παρόμοια αποτελέσματα,

σε αντιδιαστολή με το οξείδιο του χαλκού και οξυχλωριούχο χαλκό. Το υδροξείδιο του χαλκού μπορούσε να παρεμποδίσει την ανάπτυξη των στελεχών του Psav στην υψηλή συγκέντρωση, των 400μg/ml. Αυτή η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA με εκτίμηση των τιμών οπτικής πυκνότητας (Balouiri et al, 2016). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής πιστεύεται ότι συμβάλουν στον χαρακτηρισμό των στελεχών του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στην Κρήτη και στη σύγκρισή τους με στελέχη από άλλες χώρες, με στόχο την διαμόρφωση ενός σχεδίου αντιμετώπισης του, μέσω της ορθολογικής εφαρμογής χαλκούχων σκευασμάτων.

ABSTRUCT

Olive tree cultivation is one of the most important cultivations for the Mediterranean countries, occupying 5,052,216 ha in 2021. Greece accounts for 16.36% of this area (826,390 ha), with our country ranking second in the production of olive products in Europe (FAO, 2021). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) is the causal agent of olive knot disease, causing the formation of hyperplasia on branches, stems, shoots and rarely on leaves of olive trees (*Olea europaea*). Strains of *Pseudomonas savastanoi* (Psav) infect woody plants other than olive, such as oleander (*Nerium oleander*), *Fraxinus excelsior*, jasmine (*Jasminum officinalis*), ligustrum (*Ligustrum japonicum*), forsythia (*Forsythia spp*.), phillyrea (*Phillyrea spp*.), sphagnum (*Retama sphaerocarpa*), myrtle (*Myrtus communis*), rhamnus (*Rhamnus alaternus*), mandevilla (*Mandevilla sanderi*) and pomegranate (*Punica granatum*) (Moretti et al, 2017). Based on the variations in host range and phenotypic and genetic characteristics, the strains of Psav are grouped into pathovars: pv. *savastanoi* (which includes bacterial strains from olive, jasmine, ligustrum, pomegranate, *Forsythia spp*., *Phillyrea spp*.); pv. *nerii* (isolated from, and pathogenic to oleander); pv. *fraxini* (isolated from and pathogenic to ash); pv. *retacarpa* (isolated from and pathogenic to *R. sphaerocarpa*); and pv. *mandevillae* (isolated from and pathogenic to *M. sanderi*) (Caballo-Ponce et al, 2017; Moretti et al, 2017; Caballo-Ponce et al, 2021). Psv is normally found as an epiphyte and endophytically inside the knots, where it survives and multiplies. It can be dispersed by wind, rain and human activities (Ramos et al, 2012). After the infection, the plant tissue's number and size gets increased, followed by an abnormal cell division, that is caused by the formation of indol-3-acetic acid (IAA) and cytokinins by the bacterium (Buonaurio et al., 2015). The population size of the bacterium on the surface and inside plant tissues seems to be influenced by the bacteria *Erwinia toletana* and *Pantoea agglomerans*, which are not pathogens but often coexist with Psav from affected plant tissues (Ramos et al, 2012). The control of the disease is consisted of preventive measures. and the application of copper formulations (Ramos et al, 2012). However, their continuous and indiscriminate use has led to the development of resistance from the pathogens in several countries (Nguyen et al, 2018). The aim of this study was the investigation of the phenotypic,

biochemical and genetic variability of bacterial strains isolated during the last six years from the four Regional Units of Crete, to determine the possible presence of copper ($CuSO_4$ $5H_2O$) resistant Psav strains and to test the in vitro efficacy of five approved commercial copper formulations against bacterial strains. Biochemical identification of the strains of the pathogen was carried out using LOPAT tests. The bacterial isolates were found to be negative for levan, oxidase and arginine production and for pectinolysis of potato tubers and were able to induce a hypersensitivity reaction in the leaves of tobacco plants. Furthermore, they were not able to produce fluorescence in the nutrient substrate King's B. Using Polymerase Chain Reaction (PCR), the specific primers IAALF and IAALR induced amplification of the *iaaL* gene (Penyalver et al., 2000). MLSA (Multi Locus Sequence Analysis) phylogenetic analysis of the four conserved genes *gapA*, *gltA*, *gyrB* and *rpoD*, revealed the similarity inbetween the isolations of Psav from Crete (Moretti et al, 2017). Through the *in vitro* evaluation of the strain's resistance in $CuSO_4$ $5H_2O$, it was found that the 92,3% of them have developed moderate resistance to it. Then, the susceptibility of some strains was tested in liquid nutrient substrate, establishing their resistance (Nguyen et al., 2018). Assessing the efficacy of five commercial copper formulations was evaluated, in vitro, in liquid nutrient substrate, it was found that tribasic copper sulphate and bordeaux mitrure was more effective against bacteria, followed by copper hydroxide. Copper oxide and copper oxychloride had the least efficiency against the strains of Psav. This study was carried out on ELISA plates with estimation of optical density values (Balouiri et al, 2016). The results of this study are believed to contribute to the characterization of the strains of the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Crete and their comparison with strains from other countries, with the aim of formulating a control plan through the rational application of copper formulations.

1 Εισαγωγή

1 Εισαγωγή

1.1 Ασθένειες και φυτοπαθογόνα

Η ελιά, με επιστημονική ονομασία *Olea europaea* L., αποτελεί ένα αειθαλές υποτροπικό φυτό, που αναπτύσσεται ως δένδρο ή θάμνος. Στην περιοχή την Μεσογείου υπάρχουν ελαιόδεντρα, των οποίων η ζωή ξεπερνά τα χίλια έτη. Στα χαρακτηριστικά του, περιλαμβάνεται η μακροζωία και η ικανότητα του να αναγεννιέται με την καινούργια βλάστηση (Γιαννοπολίτης, 2009). Η πλειοψηφία των συγγραφέων, συμφωνεί ότι προέρχεται από την Μικρά Ασία. Πλέον, έχει εξαπλωθεί σε ολόκληρο τον κόσμο. Από τους ελαιώνες της Μεσογείου, προέρχεται το 70% του ελαιόλαδου, παγκοσμίως. Το 95% αυτού, έχει ως χώρες προέλευσης την Ισπανία, την Ιταλία και την Ελλάδα (Guerrero Maldonado et al, 2016). Πολλές είναι οι ασθένειες που απειλούν την φυσιολογική λειτουργεία των ελαιώνων. Από τις σπουδαιότερες που υπάρχουν στην Ελλάδα είναι η βερτισιλλίωση που προκαλεί ο παθογόνος μύκητας *Verticillium dahliae*, η βούλα που προκαλεί ο μύκητας *Camarosporium dalmaticum*, η καρκίνωση ή φυματίωση που προκαλεί το *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, το γλοιοσπόριο που οφείλεται στον μύκητα *Colletotrichum gleosporiovoles C. acutatum* και η αλτερνάρια που οφείλεται στον μύκητα *Alternaria spp.*. Ακόμη, η κερκοσπορίωση (*Pseudocercospora cladosporioides*), το κυκλοκόνιο (*Cycloconium oleaginum*) και η ίσκα (*Fomitiporia mediterranea*) (Καλομοίρα & Αλιβιζάτος, 2009; ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΚΡΗΤΗΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ, 2020).

Οι ασθένειες των καλλιεργειών αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα, το οποίο οι καλλιεργητές καλούνται να αντιμετωπίσουν. Οι απώλειες, στον τομέα της παραγωγής, σε παγκόσμιο επίπεδο ξεπερνούν ετησίως το 10%. Οι ασθένειες οφείλονται σε παρασιτικούς και μη παρασιτικούς παράγοντες. Οι μη παρασιτικοί, προκαλούν αλλοίωση της φυσιολογικής λειτουργίας του φυτού, μέσω της έλλειψης μικροστοιχείων ή και μακροστοιχείων, της πρόκλησης τοξικότητας και της επίδρασης δυσμενών συνθηκών του περιβάλλοντος. Αντίθετα, οι παρασιτικές οφείλονται στην δράση ζωντανών οργανισμών, όπως μύκητες, βακτήρια, ιοί, ιοειδή (Θανασουλόπουλος, 1986).

Οι ασθένειες που οφείλονται σε φυτοπαθογόνα βακτήρια υπολογίζεται ότι προκαλούν την απώλεια ενός δισεκατομμυρίου δολαρίων στον κλάδο την παραγωγής

τροφίμων (Martins et al, 2018). Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι προκαρυωτικοί οργανισμοί διαμέτρου 1 έως 3mm. Απαντώνται σε σφαιρικό, ραβδοειδές ή σπειροειδές σχήμα, κάτι που εξαρτάται από το κυτταρικό τοίχωμα που διαθέτουν. Αρκετά είναι αυτά που επιβιώνουν ως επίφυτα, δηλαδή πάνω στην φυτική επιφάνεια απορροφώντας εκκρίσεις των φυτών, και όταν οι συνθήκες που επικρατούν ευνοούν την μόλυνση, μετατρέπονται σε παθογόνα. Από το σύνολο των βακτηρίων μονάχα 30 είναι τα γένη που περιλαμβάνουν φυτοπαθογόνα. Ακόμη, σε κάποια εξ αυτών αναγράφεται και η παθοποικιλία τους (pathovar ή pv.), βοηθώντας στον διαχωρισμό των παθογόνων του ίδιου είδους που μολύνουν διαφορετικούς ξενιστές. Ο τρόπος εξάπλωσης τους είναι μέσω των εντόμων- φορέων, του νερού, της βροχής και των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων. Η μόλυνση των φυτών από τα βακτήρια πραγματοποιείται μέσω των φυσικών ανοιγμάτων που προϋπάρχουν, όπως είναι τα υδατώδια, τα στομάτια και τα φακίδια, και τις πληγές που προκύπτουν από καλλιεργητικές διεργασίες, τα καιρικά φαινόμενα (άνεμος, βροχόπτωση, χαλαζόπτωση), έντομα- φορείς και άλλα παθογόνα (Shcumann & D'Arcy, 2023).

Για την απομόνωση τους, πραγματοποιείται τεμαχισμός του μολυσμένου φυτικού ιστού σε νερό και ακολουθεί άπλωμα του σε τρυβλίο που περιέχει θρεπτικό υπόστρωμα, σε διάφορες αραιώσεις, μέχρι την εμφάνιση καθαρών και μεμονωμένων αποικιών. Επίσης, δύναται η γραμμωτή διασπορά, του νερού όπου τεμαχίζεται το μόλυσμα, σε τρυβλίο με την χρήση βακτηριολογικού κρίκου (Shcumann & D'Arcy, 2023).

Η αντιμετώπιση των ασθενειών που οφείλονται σε βακτήρια, περιλαμβάνει την εφαρμογή καραντίνας σε μία χωρική περιοχή που παράγει πολλαπλασιαστικό υλικό στην περίπτωση εμφάνισης μολυσμάτων σε αυτό, την καταστροφή μολυσμένων φυτικών υπολειμμάτων, την απολύμανση του φυτικών ιστών και σπόρων με την αξιοποίηση της θερμότητας, την εξάλειψη εντόμων φορέων και την επιλογή και πραγματοποίηση κατάλληλων καλλιεργητικών πρακτικών. Τέλος, με σκοπό την προστασία των καλλιεργειών από τα φυτοπαθογόνα βακτήρια αξιοποιούνται χημικές ενώσεις, με κύριο συστατικό τον χαλκό. Το σημαντικό για την επιτυχία ενός ψεκασμού με χαλκούχο σκεύασμα, είναι η εφαρμογή του πριν την μόλυνση του φυτού, καθώς δρα μόνο στην φυτική επιφάνεια (Shcumann & D'Arcy, 2023).

1.2 Χαλκούχα σκευάσματα στην φυτοπροστασία

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, που έχουν ως βάση τον χαλκό, αποτελούν μία κατηγορία σκευασμάτων που έχουν ως δραστική ουσία μία ή περισσότερες χημικές ενώσεις του. Τα σκευάσματα αυτά είναι αποτελεσματικά εναντίων πληθώρας βακτηρίων, μυκήτων και ωομυκήτων που προκαλούν ασθένειες σε φυτικούς οργανισμούς (Pscheidt et al, 2022). Ο χαλκός χρησιμοποιήθηκε στον αγρό το 1880, με την ανακάλυψη του βορδιγάλειου πολτού από την Pierre-Marie-Alexis Millardet. Λόγω του μεγάλου εύρους των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών που επηρεάζει, ο χαλκός θεωρείται ένα εκ των πιο διαδεδομένων συστατικών στην σύνθεση μυκητοκτόνων και βακτηριοκτόνων. Το ενεργό του στοιχείο είναι το ιόν του χαλκού (Cu^{++}), που όμως απαιτεί την ύπαρξη άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων για την αντιμικροβιακή του δράση. Τα ιόντα του χαλκού δραστηριοποιούνται στην κυτταρική μεμβράνη των μικροοργανισμών, όπου προκαλούν λύση των ενζυμικών και δομικών πρωτεϊνών, διαταράσσοντας την ημιπερατότητα της. Αρχικά, τα ιόντα διαλύονται στο νερό που βρίσκεται στην επιφάνεια των φυτικών ιστών και έτσι αποκτούν την ικανότητα να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα των παθογόνων και να παρέμβουν σε διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις, όπως είναι η κυτταρική αναπνοή. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των παθογόνων στον χαλκό είναι δύσκολη, καθώς ο χαλκός επιδράει σε πολλές και διαφορετικές λειτουργείες. Πάρα ταύτα, συνεχώς παρατηρούνται διάφορες μορφές ανθεκτικότητας σε παθογόνα (La Torre et al, 2018). Το 1983 καταγράφηκε ανθεκτικότητα του *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Marco and Stall, 1983) και το 1986 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Bender and Cooksey, 1986), ακολουθούμενο από άλλες καταγραφές ανθεκτικότητας (La Torre et al, 2018).

Ο βορδιγάλειος πολτός προκύπτει από την ανάμειξη θειικού χαλκού και υδροξειδίου του ασβεστίου σε νερό. Αξιοσημείωτο είναι ότι έχει την δυνατότητα να προσκολλάται στην επιφάνεια των φυτών, διατηρώντας την αποτελεσματικότητα του, ακόμη και κατά τους χειμώνες με υψηλά ποσοστά βροχόπτωσης. Αντίθετα, η εφαρμογή του αποφεύγεται κατά την περίοδο ανάπτυξης των φυτών, καθώς μπορεί να προκαλέσει εγκαύματα στους νεαρούς ιστούς. Ακόμη, πρέπει να τοποθετείται στο ψεκαστικό δοχείο και να εφαρμόζεται αμέσως, καθώς αλλοιώνεται εύκολα (Pscheidt et al, 2023).

Ο σταθερός θειικός χαλκός εμπεριέχει τον θειικό χαλκό ή τον πενταένυδρο θειικό χαλκό ως δραστική ουσία. Η χρήση του συστήνεται για την αντιμετώπιση μυκήτων, ωομυκήτων και βακτηρίων. Η αλόγιστη εφαρμογή του δύναται να προκαλέσει διάφορες μορφές τοξικότητας στα φυτά. Για την αποφυγή του φαινομένου αυτού, η εφαρμογή αυτής της κατηγορίας σκευασμάτων συστήνεται να πραγματοποιείται προγενέστερα του σταδίου της άνθισης ή μετά το πέρας της συγκομιδής, κατά την διάρκεια ξηρασίας. Ορισμένα φυτοπροστατευτικά σκευάσματα σταθερού θειικού χαλκού χαρακτηρίζονται ως διασυστηματικά, δηλαδή έχουν την ικανότητα να εξαπλώνονται σε όλα τα σημεία του φυτού εσωτερικά (Pscheidt et al, 2023). Σύμφωνα με έρευνα των Ge et al, 2020, κατά την εφαρμογή νερού με θειικό χαλκό σε φυτά καπνού, παρατηρήθηκε η παρουσία του σε χυμούς και φύλλα, σε συγκέντρωση όμως μη επαρκή για την καταπολέμηση του βακτηρίου *Xylella fastidiosa*.

Το υδροξείδιο του χαλκού αποτελεί μία δραστική μορφή του χαλκού με παρόμοια αποτελεσματικότητα με τον βορδιγάλειο πολτό, χωρίς όμως την ύπαρξη των προβλημάτων κατά την ανάμειξη. Τα διάφορα σκευάσματα του εμπορίου δύναται να διαφέρουν ως προς την συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων χαλκού, κάτι που επηρεάζει και την αποτελεσματικότητα έναντι των φυτοπαθογόνων. Στην υγρή του μορφή παρατηρείται η ύπαρξη μικρότερου αριθμού ελεύθερων ιόντων χαλκού, σε σύγκριση με την στερεή του μορφή (Pscheidt et al, 2023).

Το οξείδιο του χαλκού αξιοποιήθηκε για πρώτη φορά για την επικάλυψη σπόρων, ενώ μεταγενέστερα ως διαφυλλικό μυκητοκτόνο. Έχει εφαρμογή σε πληθώρα καλλιεργειών με στόχο την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών. Λόγω του ότι δύναται να προκαλέσει φυτοτοξικότητα, συστήνονται τα ίδια μέτρα με τον σταθερό θειικό χαλκό (Pscheidt et al, 2023).

Ακόμη στα χαλκούχα σκευάσματα που διατίθενται στο εμπόριο, συγκαταλέγεται και ο οξυχλωριούχος χαλκός. Μία πράσινο- μπλε ένωση, που συνήθως είναι αναμεμειγμένη με άλλες χαλκούχες ενώσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το Badge που αποτελείται από οξυχλωριούχο χαλκό και υδροξείδιο του χαλκού, αλλά και το C-O-C-S WDG που εμπεριέχει οξυχλωριούχο χαλκό και θειικό χαλκό (Pscheidt et al, 2023).

Ο οκτανοϊκός χαλκός αποτελεί ένα χαλκούχο άλας, που σχηματίζεται από την αλληλεπίδραση του χαλκού με λιπαρά οξέα. Τέλος, υπάρχει το ανθρακικό αμμώνιο του χαλκού που προέρχεται από ανάμειξη θειικού χαλκού με ανθρακικό νάτριο. Κατά την εφαρμογή του στο αγρό, εξατμίζεται η αμμωνία, συντελώντας στην μακροχρόνια παραμονή του χαλκού επί του φυτικού ιστού. Επίσης προτείνονται οι ίδιες επιφυλάξεις με τα άλλα χαλκούχα σκευάσματα, ώστε να αποφευχθεί η πρόκληση τοξικότητας (Pscheidt et al, 2023).

1.3 Ανθεκτικότητα παθογόνων

Η ανθεκτικότητα ενός βακτηρίου στον χαλκό οφείλεται στην έκφραση πολλών γονιδίων των πλασμιδίων και των τρανζοσπονίων. Οι μηχανισμοί που συμμετέχουν στην απόκτηση ανθεκτικότητας περιλαμβάνουν, την αντλία εκροής της ΑΤΡασης που κωδικοποιείται από το *copA* και έχει ως ρόλο την προώθηση των ιόντων χαλκού από το κυτταρόπλασμα στον περιπλασματικό χώρο, το σύστημα cas, που το γονίδιο *cusA* κωδικοποιεί την παραγωγή μιας πρωτεΐνης που δυσκολεύει την μεταφορά του χαλκού δια μέσου του κυτταρικού τοιχώματος. Επίσης, συμμετέχει και το σύστημα pco, που σε αυτό οφείλεται η παραγωγή μιας πρωτεΐνης που οξειδώνει τον χαλκό στον περιπλασματικό χώρο. Το σύστημα cue, όπου το γονίδιο *cueO* κωδικοποιεί την σύνθεση μίας περιπλασματικής πολυχαλκοοξειδάσης (αυτός ο μηχανισμός προκαλεί τον σχηματισμό ανθεκτικότητας του *Escherichia coli* στον χαλκό) και το tcrB που υπάγεται στην οικογένεια CPX-τύπου των ΑΤΡασών και αποτελούν μεταφορείς βαρέων μετάλλων (La Torre et al, 2018).

1.4 *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Τα βακτήρια που κατατάσσονται στο σύμπλεγμα του *Pseudomonas syringae* (PSSC), αποτελούν υψηλής οικονομικής σημασίας φυτοπαθογόνα, καθώς οι πιο σημαντικές καλλιέργειες τροφίμων αποτελούν ξενιστές τους. Παρά την ύπαρξη πολλών διαφορετικών ειδών, τα μέλη του συμπλέγματος, διαθέτουν έναν κοινό τρόπο μόλυνσης που σχετίζεται με τον κύκλο του νερού. Με την εξέλιξη της επιστήμης, έγινε δυνατή η κατανόηση της οικολογίας και της συμπεριφοράς των μελών του, βοηθώντας στην

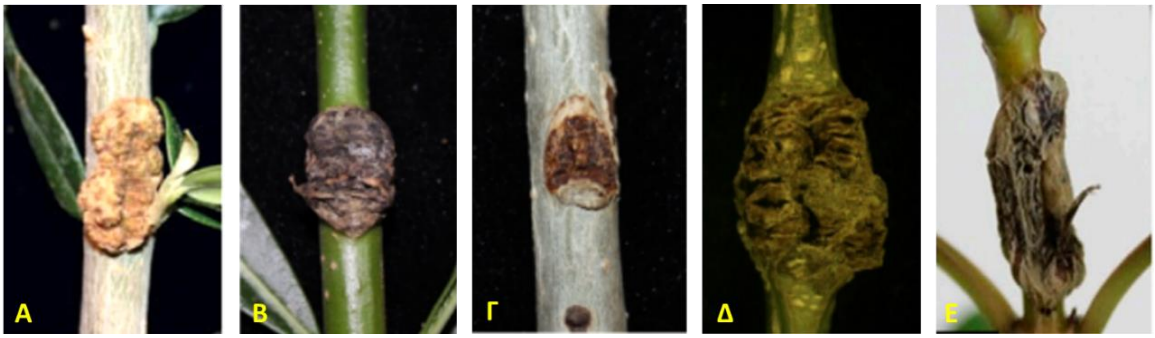
ταχεία ταυτοποίηση τους, όμως δεν είναι ευκολότερη η κατηγοριοποίηση νέων παθογόνων, ως μέλη του PSSC (Fautt et al, 2022). Ακόμη το PSSC περιλαμβάνει 15 διαφορετικά είδη του γένους *Pseudomonas*, που αλληλοεπιδρούν με φυτικούς οργανισμούς και τον κύκλο του νερού, τα οποία χωρίζονται σε 13 φυλογενετικές ομάδες. Το *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ανήκει στην φυλογενετική ομάδα 3, στην οποία κατατάσσονται μονάχα βακτήρια που προκαλούν τον σχηματισμό υπερπλασιών (Pintado at al, 2023).

Η ασθένεια φυματίωση ή καρκίνωση της ελιάς χαρακτηρίζεται ως μία από τις πιο σημαντικές ασθένειες της ελιάς (*Olea europaea* L.), με εξάπλωση σε ελαιώνες ολόκληρου του κόσμου (Buonaurio et al. 2015). Η πρώτη καταγραφή της ασθένειας έγινε τον 4^{ο} αιώνα π.Χ. από τον Θεόφραστο (Moretti et al. 2017). Το φυτοπαθογόνο βακτήριο που την προκαλεί είναι το *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, δημιουργώντας υπερπλασίες σε κλαδιά, βραχίονες, βλαστούς, ενώ σπανιότερα σε φύλλα και καρπούς (Ramos et al, 2012). Οι ξενιστές του περιλαμβάνουν και άλλα ξυλώδη φυτά εκτός την ελιά, όπως την πικροδάφνη, (*Nerium oleander*), τον φράξινο (*Fraxinus excelsior*), το γιασεμί (*Jasminum officinalis*), το λιγούστρο (*Ligustrum japonicum*), την φορσύθια (*Forsythia spp*.), τη φιλλυρέα (*Phillyrea spp*.), το σπάρτο (*Retama sphaerocarpa*), την μυρτιά (*Myrtus communis*), το ράμνο (*Rhamnus alaternus*), την διπλαδένια (*Mandevilla sanderi*) και τη ροδιά (*Punica granatum*) (Moretti et al, 2017; Bozkurt et al, 2014).

Το συγκριμένο βακτήριο έχει ραβδοειδή μορφή, είναι αερόβιο και οι διαστάσεις του είναι από 0,4 έως 0,8 x 1 έως 3 μm. Την κίνηση του βακτηρίου υποστηρίζουν τα τέσσερα μαστίγια που διαθέτει. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες που ευνοείται η ανάπτυξη του είναι από 25 έως 30^{o}C. Όσον αφορά τις βιοχημικές του ιδιότητες, είναι αρνητικό στην παραγωγή οξειδάσης και αργινίνης και στην πηκτινόλυση της πατάτας, ενώ προκαλεί αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού. Όμως, είναι δυνατή η παραγωγή levan και ο φθορισμός σε θρεπτικό υπόστρωμα από ορισμένα στελέχη του παθογόνου (Ramos et al, 2012).

Κατατάσσεται ως μέλος του συμπλέγματος του *Pseudomonas syringae* και ανήκει στο βασίλειο των βακτηρίων, στο φύλλο Proteobacteria, στην τάξη *Gammaproteobacteria*, στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*, στο γένος *Pseudomonas*.

Ακόμη, έχει συμπεριληφθεί στο γονιδιωματικό είδος ΙΙ μαζί με τουλάχιστον άλλους 19 παθότυπους (εκ των οποίων είναι το *P. amygdali, το P. ficuserectae και το P. meliae*) (Ramos et al, 2012). Στο παρελθόν για το εν λόγο βακτήριο χρησιμοποιούταν η ονομασία *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, κάτι που άλλαξε το 1992 και μετονομάστηκε σε *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Gardan et al., 1992). Με βάση τους ξενιστές που προσβάλλει διαμορφώνονται και οι παθοποικιλίες του. Η παθοποικιλία *savastanoi* (Psv), προσβάλλει και απομονώνεται κυρίως στην ελιά, στο γιασεμί, στο λιγούστρο, στη ροδιά, στη *Forsythia* spp. και στη *Phillyrea* spp., η *fraxini* (Psf) στον φράξινο, η *nerii* (Psn) στην πικροδάφνη, η *retacarpa* (Psr) στο *R. sphaerocarpa* και η *mandevillae* (Psm) στο *Mandevilla spp*. (Εικ. 1)(Caballo-Ponce et al, 2017; Moretti et al, 2017; Caballo-Ponce et al, 2021; Bozkurt et al, 2014). Το Psv προκαλεί τον σχηματισμό φυματίων στην ελιά και τον φράξινο, αλλά όχι στην πικροδάφνη, στο σπάρτο και την διπλαδένια. Το Psn στην πικροδάφνη, στον φράξινο και στην ελιά, ενώ το Psf στην ελιά (σε ορισμένες περιπτώσεις) και στον φράξινο. Το Psr αποτελεί παθοποικιλία που επιφέρει τον σχηματισμό καρκινωμάτων μόνο στον φράξινο και στο σπάρτο (Moreno-Perez et al., 2020; Caballo-Ponce et al, 2021). Ακόμη, στελέχη της ίδια παθοποικιλίας δύναται να διαθέτουν διαφορετικούς ξενιστές (Cinelli et al., 2014; Morris et al., 2019). Σε αντίθεση, φυλογενετικές και φαινοτυπικές αναλύσεις αδυνατούν να διαφοροποιήσουν σαφώς τις παθοποικιλίες του Psav μεταξύ τους, κάτι που οφείλεται στην έλλειψη γενετικής ποικιλομορφίας και στην ύπαρξη κοινών ξενιστών (Moreno-Perez et al., 2020).



Εικόνα 1. (Α) Συμπτώματα του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε φυτά ελιάς (Moreno Pérez et al, 2020), (Β) του *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* σε φυτά πικροδάφνης (Moreno Pérez et al, 2020), (Γ) του *Pseudomonas savastanoi* pv. *fraxini* σε φυτά φράξινου (Moreno Pérez et al, 2020), (Δ) του *Pseudomonas savastanoi* pv. *retacarpa* στο σπάρτο (Moreno Pérez et al, 2020) και του (Ε) *Pseudomonas savastanoi* pv. *mandevillae* σε φυτά διπλαδένιας (Caballo-Ponce et al, 2021).

Το *Pseudomonas savastanoi* επιβιώνει ως επίφυτο στην φυλλόσφαιρα ή εντός των φυματίων. Το μέγεθος του πληθυσμού του εμφανίζει διαφορά εντός του έτους, καθώς είναι υψηλότερος κατά την άνοιξη και το φθινόπωρο και μειωμένος το καλοκαίρι και τον χειμώνα. Έπειτα μολύνει τα φυτά μέσω των πληγών που δημιουργούνται από την ανθρώπινη δραστηριότητα (συγκομιδή, κλάδευμα) και τις δυσμενείς, για τα φυτά, περιβαλλοντικές συνθήκες (χαλάζι, παγετός, βροχή). Αφού εισέλθουν εντός των φυτών αποικίζουν τους ιστούς στην περιοχή πλησίον της πληγής και είτε με την αξιοποίηση ημικυτταρινολυτικών και πηκτινολυτικών ενζύμων διασπούν την συνοχή των κυττάρων του ξενιστή, δημιουργώντας κοιλότητες με τον πληθυσμό του βακτηρίου, είτε έχουν την ικανότητα να εισβάλλουν απευθείας στα αγγεία του ξυλώματος.

Παράγοντες μολυσματικότητας του φυτοπαθογόνου αποτελούν το ινδολοξικό οξύ (IAA) και οι κυτοκινίνες, που προκαλούν την υπερτροφία και την υπερπλασία των κυττάρων του ξενιστή. Ακόμη, διαθέτει το εκκριτικό σύστημα τύπου ΙΙΙ, που χρησιμοποιεί ώστε να εναποθέσει πάνω από 30 τελεστές εντός των κυττάρων του ξενιστή. Το ινδολοξικό οξύ που παράγεται από το φυτοπαθογόνο διαφέρει από αυτό που παράγουν οι φυτικοί οργανισμοί, ως προς το μονοπάτι που ακολουθείται από την τρυπτοφάνη για την σύνθεση του. Για την σύνθεση του βακτηριακού IAA, χρησιμοποιούνται τα γονίδια *iaaM* και *iaaH* από τα οποία κωδικοποιούνται η μονοοξυγενάση της τρυπτοφάνης και η υδρολάση του ινδολοακεταμιδίου, αντίστοιχα (Buonaurio et al, 2015). Επιπροσθέτως, η παθοποικιλία *nerii* μετατρέπει το IAA σε λυσίνη

του ινδολοξικού οξέος, με την κωδικοποίηση του γονιδίου *iaaL*. Ακόμη στην παθοποικιλία *savastanoi* έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη δύο αλληλομόρφων του γονιδίου *iaaL*, χωρίς όμως την παραγωγή της λυσίνης του ινδολοξικού οξέος. Τα γονίδια από τα οποία προκύπτει η παραγωγή των κυτοκινινών, βρίσκονται σε πλασμίδια της οικογένειας των pPT23A. Ακόμη, από κωδικοποίηση του γονιδίου *ptz*, που βρίσκεται στο πλασμίδιο pPsv48A, παράγεται η ισοπεντενυλική τρανσφεράση. Τα φυμάτια που παράγονται από μόλυνση με το *Pseudomonas savastanoi* με σίγαση του γονιδίου *ptz*, είναι μικρότερου μεγέθους, σε σύγκριση με αυτά που προκύπτουν από την μόλυνση με μη τροποποιημένα στελέχη (Ramos et al, 2012).

Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση του *iaaL*, εμφανίζουν σημαντική διαφοροποίηση ανά παθοποικιλία. Οι παθοποικιλίες του Psav διαθέτουν στο γονιδίωμα τους δύο αλληλόμορφα, εκτός από το Psr που διαθέτει ένα. Τα γνωστά αλληλόμορφα για την κωδικοποίηση του *iaaL*, είναι το $iaaL_{Psv}$, το $iaaL_{Psn}$, το $iaaL_{Pto}$ (εμφανίζεται στο φυτοπαθογόνο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) και το $iaaL_{Psf}$. Στο Psv παρατηρείται το $iaaL_{Psn}$, που είναι όμοιο με αυτό στο πλασμίδιο pIAA1 του Psn, και το $iaaL_{Psv}$ που εμφανίζει ομοιομορφία σε ποσοστό 93%, με το $iaaL_{Pto}$. Στην παθοποικιλία *nerii* έχουν ταυτοποιηθεί μόνο τα αλληλόμορφα $iaaL_{Psv}$ και $iaaL_{Psn}$. Το $iaaL_{Psf}$ έχει παρατηρηθεί μόνο στην παθοποικιλία *fraxini*, στην οποία απαντάται και το $iaaL_{Psv}$. Τέλος, στο Psr και στο Psm έχουν βρεθεί τα γονίδια $iaaL_{Psn}$ και $iaaL_{Psv}$, αντίστοιχα. Ακόμη για την παραγωγή της λυσίνης του ινδολοξικού οξέος στο Psv και στο Psn είναι απαραίτητη η παρουσία του $iaaL_{Psn}$, ενώ στο Psf αυτή του $iaaL_{Psf}$ (Pintado et al., 2023). Σύμφωνα με τους Pintado et al. (2023), η ικανότητα των παθοποικιλιών να παράγουν την λυσίνη του ινδολοξικού οξέος, οφείλεται στην έκφραση του γονιδίου $iaaL_{Psn}$ και $iaaL_{Psf}$, ενώ με την έκφραση του γονιδίου $iaaL_{Psv}$ απουσιάζει το μόριο αυτό (Pintado et al, 2023).

1.4.1 Ταυτοποίηση

Για την ταυτοποίηση του *Pseudomonas savastanoi* αξιοποιούνται οι κλασσικές μέθοδοι, όπως η καλλιέργεια του βακτηρίου σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο, η παραγωγή φθορισμού σε αυτά και οι βιοχημικές δοκιμές LOPAT, που περιλαμβάνουν την

παραγωγή levan, οξειδάσης και αργινίνης, την πηκτινόλυση κονδύλων πατάτας και την πρόκληση αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού (Lelliott and Stead, 1987). Τα θρεπτικά υποστρώματα που συστήνονται είναι το PVF-1, που αποτρέπει την ανάπτυξη άλλων σαπροφυτικών βακτηρίων, αλλά και το King's B και το NSA. Στο PVF-1 οι αποικίες του βακτηρίου αναπτύσσονται με αργό ρυθμό, είναι μικρές και έχουν λευκό- γκρι χρωματισμό (Surico & Lavermicocca, 1989). Ακόμη στις δοκιμές LOPAT, οι απομονώσεις του βακτηρίου εμφανίζονται αρνητικές, εκτός στην πρόκληση αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού, όπου είναι θετικές (Lelliott and Stead, 1987). Αξιοσημείωτο είναι ότι το 1990 στην Ιταλία απομονώθηκαν στελέχη Psav που είχαν την ικανότητα να παράγουν λεβάνη. Τα στελέχη αυτά είναι δυνατό να επιβιώνουν ταυτόχρονα στο ίδιο φυτό. Η παραγωγή levan ελέγχεται με την παραγωγή λεβάνης σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει σουκρόζη σε ποσοστό 5%, όπου οπτικά μεταφράζεται σε διαφοροποίηση της μορφής της αποικίας σε μουκώδης (Marchi et al, 2005).

Επιπλέον, για την ταυτοποίηση των απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* χρησιμοποιείται η μοριακή μέθοδος ανάλυσης της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), η οποία παρέχει την δυνατότητα ανίχνευσης των στελεχών ακόμη και κατά την απουσία συμπτωμάτων στους φυτικούς ιστούς (Tegli et al, 2010). Η μέθοδος αυτή ανακαλύφθηκε από τον Kary Mullis το 1983, κάτι που οδήγησε στην διάκριση του με το Νόμπελ Ιατρικής δέκα χρόνια αργότερα. Συγκεκριμένα, αξιοποιεί το ένζυμο DNA πολυμεράση και εξειδικευμένους εκκινητές, που συνθέτονται με βάση τα άκρα του τμήματος του οποίου η αντιγραφή είναι επιθυμητή. Η DNA πολυμεράση, με βάση την μία προϋπάρχουσα αλυσίδα του DNA, τοποθετεί νουκλεοτίδια στο 3' άκρο της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας, δημιουργώντας μία αλυσίδα DNA, συμπληρωματική της παλαιάς. Προϋπόθεση για την διαδικασία αυτή είναι η ύπαρξη ενός δίκλωνου τμήματος στο 3' άκρο. Οι δίκλωνες αυτές περιοχές μπορούν να δημιουργηθούν με την χρήση εκκινητών, που αποτελούν μικρά τμήματα μονόκλωνου DNA, μεγέθους 15-30 νουκλεοτιδίων με αλληλουχία συμπληρωματική με το 3΄ της αλυσίδας που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Για τον πολλαπλασιασμό μιας δίκλωνης περιοχής DNA απαιτούνται δύο εκκινητές, ένας για το 3΄ άκρο της κάθε

παλαιάς αλυσίδας. Τα βήματα που ακολουθεί αυτή η μέθοδος γίνονται σε αυτοματοποιημένο θερμικό κυκλοποιητή και αποτελούνται από την αρχική αποδιάταξη του DNA, ακολουθεί η αποδιάταξη του στους 94^{o}C (denaturation), έπειτα η σύνθεση των εκκινητών (annealing) και η επιμήκυνση (elongation). Τα τρία τελευταία βήματα (αποδιάταξη, σύνδεση, επιμήκυνση) επαναλαμβάνονται για 30 έως 40 φορές με σκοπό την αντιγραφή ή ενίσχυση του τμήματος στόχου.

Οι Penyalver et al (2000) συνέθεσαν τους εξειδικευμένους εκκινητές IAALF (5'-GGCACCAGCGGCAACATCAA-3') και IAALR (5'-CGCCCTCGGAACTGCCATAC-3'), με μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος του γονιδίου 454bp, που κωδικοποιεί το ένζυμο συνθετάση της λυσίνης του ινδολοξικού οξέος. Το γονίδιο αυτό απαντάται στο γονιδίωμα του πλασμιδίου pIAA1 και έχει μήκος 52kb. Ακόμη για την ταυτοποίηση των διαφορετικών παθοποικιλιών του *Pseudomonas savastanoi*, οι Tegli et a (2010), προχώρησαν στην σύνθεση τριών εξειδικευμένων εκκινητών: 1) PsvF (5'-GGCGATGTTCTCAGCGGATTTG-3')/R (5'-GATCAAGTGTCCAAGGAAGTGAAGG-3') για την ταυτοποίηση της παθοποικιλίας *savastanoi* (με μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος 388bp), 2) PsnF (5'-ACCCCTCATTGTAACGGATG-3')/R (5'-TCCCCGGAATTCAACACTTA-3') για την ταυτοποίηση της παθοποικιλίας *nerii* (με μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος 349bp) και 3) PsfF (5'-CGCCTGCTGTACTCCTCGG-3')/R (5'-TCGACCTGTCTAAGGCCC-3') για την ταυτοποίηση της παθοποικιλίας *fraxini* (με μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος 412bp) (Tegli et al, 2010).

Με στόχο την πιο εξειδικευμένη και ευαίσθητη ταυτοποίηση των απομονώσεων πραγματοποιείται φυλογενετική ανάλυση Multi-Locus Sequence Analysis (MLSA). Η ανάλυση αυτή περιλαμβάνει τη χρήση εκκινητών για την ενίσχυση συντηρημένων γονιδίων που είναι παρόντα στην υπό μελέτη ταξινομική ομάδα. Μετά το πέρας της ανάλυσης, τα αποτελέσματα μπορούν να συγκριθούν με αυτά άλλων ερευνών, που διατηρούνται σε διεθνείς βάσεις δεδομένων (Moretti et al, 2017).

1.4.2 Αλληλεπιδράσεις του *Pseudomonas savastanoi* με άλλα βακτήρια

Ο Savastano το 1886, κατά την μελέτη της ασθένειας «φυματίωση της ελιάς», απομόνωσε ένα βακτήριο κίτρινου χρώματος, που θεωρήθηκε το παθογόνο που την προκαλεί. Το 1907, ο Petri το χαρακτήρισε ως *Ascobacterium luteum*, που σήμερα

ονομάζεται *Pantoea agglomerans* (Pa). Ακόμη, τα *Erwinia oleae* (Eo) και *Erwinia toletana* (Et) αποτελούν βακτήρια που επιβιώνουν εντός των καρκινωμάτων. Έχει παρατηρηθεί ότι η ταυτόχρονη παρουσία του Pa με το *Pseudomonas savastanoi*, οδηγεί στον σχηματισμό φυματίων μεγαλύτερου μεγέθους και αυξημένο πληθυσμό των βακτηρίων. Πιθανός λόγος που συμβαίνει αυτό είναι ότι το Pa έχει την ικανότητα να παράγει IAA. Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και με τα Eo και Et (Buonaurio et al, 2015).

Οι βακτηριακοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να επικοινωνούν και να συνεργάζονται μέσω ανταλλαγής θρεπτικών και παραγωγής χημικών μορίων σηματοδότησης. Τα Pa, Eo και Et, φαίνεται ότι σχηματίζουν σταθερή κοινότητα με το *Pseudomonas savastanoi* και επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω των QS (Quorum sensing) N-AHL (N-acyl homoserine lactones) σημάτων. Η Et και το *P. savastanoi* παράγουν τα C6-3-oxo-HSL και C8-3-oxo-HSL, η Pa C4-HSL και C6-HSL, ενώ η Eo C6-HSL και C8-HSL (Buonaurio et al, 2015). Σύμφωνα με τους Hosni et al (2011), το φυτοπαθογόνο βακτήριο αλληλοεπιδρά με τα Et και Pa σε επίπεδο παθογένειας. Αφού προηγήθηκε σίγαση του γονιδίου που κωδικοποιεί την συνθάση του AHL στο Psav, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη μόλυνση του με το Et, σε φυτά ελιάς. Τα συμπτώματα που προκλήθηκαν ήταν πανομοιότυπα με του μάρτυρα. Έτσι συμπεράθηκε ότι το Et δύναται να καλύψει την έλλειψη μολυσματικότητας του Psav που οφείλεται στην μη παραγωγή των AHL. Ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία, κατά την πραγματοποίηση μολύνσεων με το μεταλλαγμένο Psav και το Pa, προέκυψε ο σχηματισμός φυματίων μικρότερου μεγέθους. Αυτό αποδίδεται στην παραγωγή διαφορετικών QS AHL στο Pa, σε σύγκριση με τα Psav και Et. Τέλος, η αλληλεπίδραση μεταξύ του Psav και του Eo δεν έχει μελετηθεί, αλλά εικάζεται ότι θα έχει παρόμοια συμπεριφορά με το Pa, λόγω του ότι κωδικοποιεί την παραγωγή C6-HSL (Hosni et al, 2011).

Στην φύση τα βακτήρια συχνά αλληλοεπιδρούν με τα AHL, επειδή διαθέτουν την πρωτεΐνη LuxR, που έχει τον ρόλο του ρυθμιστή και του υποδοχέα και έχουν υψηλή ποικιλομορφία, κάτι που τις καθιστά ικανές να λαμβάνουν μεγάλο εύρος AHL. Με βάση αυτό, το Psav μπορεί να έχει δύο τρόπους να αλληλεπιδρά με το Pa, το Eo και το Et. Το Psav με το Et μπορούν και τα δύο να αξιοποιήσουν τα ίδια AHL και θρεπτικά στοιχεία. Αντίθετα, για την σύνθεση αμοιβαίας σχέσης με τα Pa και Eo, το Psav χρησιμοποιεί τα

AHL που παράγουν και αυτά με την σειρά τους αυτά του παθογόνου (Buonaurio et al, 2015).

Στην φύση, η μόλυνση ενός φυτικού οργανισμού από ένα παθογόνο μικροοργανισμό, σηματοδοτεί την έναρξη μιας σειράς αντιδράσεων που αποσκοπούν στην προστασία του. Τα δύο επίπεδα προστασίας που διαθέτει αποτελούνται από την προϋπάρχουσα και την επαγόμενη άμυνα (Buonaurio et al, 2015). Σύμφωνα με τους Temsah et al (2008), μετά από μόλυνση ελιάς από το Psav, παρατηρήθηκε εναπόθεση λιγνίνης στο κυτταρικό τοίχωμα των παρεγχυματικών κυττάρων πλησίον των πληγών. Ένας πολύ συχνός αμυντικός μηχανισμός των φυτών περιλαμβάνει την εναπόθεση φαινολικών ενώσεων, κάτι που εντοπίζεται και κατά την μόλυνση με το Psav. Συγκεκριμένα, οι ενώσεις που εντοπίζονται είναι η σεκοϊριδοειδή ελαιοευρωπαΐνη και βερβασκοσίδη. Η πρώτη αποτελεί έναν εστέρα ελενολικού οξέος και υδροξυτυροσόλη συνδεδεμένη στην γλυκόζη και εμφανίζει τοξικότητα στο Psav σε συγκεντρώσεις 0,1 έως 1 mM. Η δεύτερη αποτελεί έναν ετεροσιδικό εστέρα του καφεϊκού οξέος και της υδροξυτυροσόλης συνδεδεμένος με γλυκόζη και ραμνόζη. Η έκκληση αυτών των ενώσεων παρατηρείται κατά τα αρχικά στάδια της μόλυνσης, όπου το παθογόνο συνθέτει ημικυτταρινολυτικά και πηκτινολυτικά ένζυμα, και όταν ξεκινάει ο σχηματισμός κοιλοτήτων από κατάρρευση των κυττάρων. Το Psav σε συνδυασμό με το Eo και το Et, διαθέτουν γονίδια υπεύθυνα για την παραγωγή της βήτα-γλυκοσιδάσης, ενός ενζύμου που προκαλεί λύση των γλυκοζιτικών μορίων, άρα και των γλυκοζιτικών φαινολικών (Buonaurio et al, 2015).

Επιπροσθέτως, τα φυτοπαθογόνα βακτήρια έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν τελεστές τύπου ΙΙΙ εντός των κυττάρων των ξενιστών τους, με στόχο την καταστολή της φυτικής άμυνας (PAMP-triggered immunity και effector- triggered immunity). Ο τρόπος δράσης αυτών των μορίων είναι πολλαπλός. Μπορούν να προκαλέσουν παρεμπόδιση στους υποδοχείς σηματοδότησης και στα μονοπάτια RNA ή να προωθήσουν την μεταφορά φυματίων ή να προκαλέσουν δυσλειτουργία των οργανιδίων των κυττάρων. Το Psv διαθέτει επτά τέτοιους τελεστές (HopA1, AvrRpm2, HopAA1, HopAZ1, HopBK1, HopBL1, και HopBL2) για την καταστολή της PTI και δύο (HopAZ1 και HopBL1) για την καταστολή της ETI. Εκτός από το Psav, τελεστές παράγουν και τα Pa και Eo, αλλά δεν

διαθέτουν το εκκριτικό σύστημα τύπου ΙΙΙ για να τις τοποθετήσουν εντός των κυττάρων του ξενιστή (Buonaurio et al, 2015).

1.4.3 Μέτρα αντιμετώπισης

Τα συνιστάμενα μέτρα, για την αντιμετώπιση του *Pseudomonas savastanoi*, που συστήνονται από το Ελληνικό Κράτος αποτελούνται από προληπτικά καλλιεργητικά μέτρα και την χρήση χαλκούχων σκευασμάτων. Τα προληπτικά μέτρα περιλαμβάνουν το κλάδευμα με ξηρό καιρό και την εφαρμογή ενδεδειγμένου κλαδεύματος, όσο επικρατούν χαμηλές τιμές σχετικής υγρασίας. Ακόμη εφίσταται η προσοχή των παραγωγών κατά την αγορά νεαρών δενδρυλλίων για να αποφευχθεί η διασπορά της ασθένειας σε περιοχές που δεν υπάρχει και η εφαρμογή χαλκούχων σκευασμάτων δύο με τρεις φορές κατά τις βροχερές περιόδους. Τέλος, πρέπει να παρακολουθούνται οι γειτονικοί ελαιώνες, με σκοπό την έγκαιρη διαπίστωση της παρουσίας του παθογόνου, η απολύμανση των καλλιεργητικών εργαλείων πριν την χρήση τους, η αφαίρεση, η απομάκρυνση και το κάψιμο των προσβεβλημένων κλάδων και στις πληγές η εφαρμογή βορδιγάλειου πάστας (Παναγόπουλος, 2007). Αναφορικά με τους ψεκασμούς με χαλκούχα σκευάσματα, αυτοί συστήνεται να πραγματοποιούνται μετά την συγκομιδή το φθινόπωρο και την άνοιξη (Nguyen et al, 2018). Τα εγκεκριμένα σκευάσματα, από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, για την καταπολέμηση του Psav έχουν ως δραστική ουσία τον οξυχλωριούχο χαλκό, το υδροξείδιο του χαλκού, τον βορδιγάλειο πολτό, τον τριβασικό θειικό χαλκό και τον ασβεστούχο θειικό χαλκό σε συνδυασμό με το 6-benzyladenine (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2023).

Σύμφωνα με την μελέτη των Quesada et al (2010), έπειτα από εφαρμογή οξυχλωριούχου χαλκού και βορδιγάλειου πολτού σε συνδυασμό με mancozeb, παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του Psav σε σύγκριση με τις ελιές όπου εφαρμόστηκε ψεκασμός με νερό, με την μεγαλύτερη διαφορά να εντοπίζεται κατά το 3^{ο} έτος όπου προηγήθηκαν πέντε ψεκασμοί. Τέλος, το acibenzolar-S-methyl δεν επηρέασε τους πληθυσμούς του βακτηρίου, ενώ δεν εντοπίστηκε κάποια μορφή ανθεκτικότητας στους εναπομείναντες επιφυτικούς πληθυσμούς του Psav (Quesada et al; 2010).

Οι Nguyen et al. (2018), εξέτασαν την ικανότητα του θειικού χαλκού ($CuSO_4$ $5H_2O$), αλλά και άλλων βακτηριοκτόνων ενώσεων για την καταστολή του Psav, *in vitro*. Ο θειικός χαλκός εφαρμόστηκε σε συγκεντρώσεις 10 μg/ml, 20 μg/ml, 30 μg/ml, 50 μg/ml και 150 μg/ml, ισοδύναμου μεταλλικού χαλκού, με σκοπό τον χαρακτηρισμό των στελεχών ως ευαίσθητα, ανεκτικά και ανθεκτικά, ανάλογα με την συγκέντρωση που αναπτυσσόταν. Το 95,3% εμφάνισε ευαισθησία στον χαλκό, το 2,7% ανεκτικότητα και το 2% χαρακτηρίστηκε ως ανθεκτικό. Έπειτα, ελέγχθηκε η ικανότητα του υπεροξειδίου του χαλκού να καταστέλλει την ανάπτυξη του Psav, *in planta*. Παρατηρήθηκε μείωση του σχηματισμού συμπτωμάτων κατά την εφαρμογή του χαλκού πριν την μόλυνση με το παθογόνο. Υψηλότερη μείωση των συμπτωμάτων παρατηρήθηκε κατά την εφαρμογή του χαλκούχου σκευάσματος 24h μετά την μόλυνση με το παθογόνο. Κάτι που μειωνόταν όσο καθυστερούσε η εφαρμογή του χαλκού (Nguyen et al, 2018).

Στην επιφάνεια ή εντός των φυτικών ιστών ζουν και επιβιώνουν πολλοί ωφέλιμοι μικροοργανισμοί που καταφέρνουν να μειώσουν την δραστηριότητα και το μέγεθος των συμπτωμάτων που προκαλούν τα φυτοπαθογόνα. Βακτηριακές απομονώσεις από υγιείς ελαιώνες εμφανίζουν την ικανότητα να περιορίσουν την ανάπτυξη του *Pseudomonas savastanoi*, *in vitro*. Τα στελέχη αυτά αποτελούν απομονώσεις του *Bacillus spp*. και *Pseudomonas fluorecsens* και αξιοποιούν τους δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγουν. Επίσης, το *Bacillus subtillis* 2515-1, φαίνεται να έχει την ικανότητα να μειώνει το μέγεθος των καρκινωμάτων, που σχηματίζει το Psav κατά 50%, ενώ τα *B. megaterium, P. koreensis* και *B. Pumilus* ως και 65%. Το *B. amyloliquefaciens* προκαλεί τον περιορισμό την ανάπτυξης του παθογόνου κατά 26,8% και μείωση των συμπτωμάτων κατά 43,7%, ενώ παράλληλα βοήθησε στην αύξηση του βάρους των βλαστών κατά 55% και του νερού εντός των ριζών κατά 39,6% (Košćak et al, 2023).

Επίσης, τα λύματα των ελαιοτριβείων περιέχουν σε υψηλή συγκέντρωση φαινολικές ενώσεις, όπως τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, καφεϊκό οξύ και ελευρωπαΐνη. Τα λύματα αυτά δύναται να έχουν βακτηριοκτόνο δράση, έναντι του Psav και του *Corynebacterium michiganense*, δίχως να δεχθούν επεξεργασία. Από το σύνολο των φαινολικών που ελέγχθηκαν η μέθυλ-κατεχόλη εμφανίστηκε τοξική, εναντίων του φυτοπαθογόνου Psav σε συγκέντρωση 10^{-4} mol 1^{-1}, ενώ η κατεχόλη, η υδροξυτυροσόλη

και η τυροσόλη και τα ισομερή της δεν είχαν κάποια επίδραση (Capasso et al, 1995). Επίσης αιθέρια έλαια απομονωμένα από φυτά του είδους *Origanum syriacum* και *Thymus serpyllum,* και περιέχουν ως κύριο συστατικό την καρβακρόλη και την θυμόλη, αντίστοιχα, προκαλούν παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, *in vitro* (Bozkurt et al, 2020).

2 Υλικά και Μέθοδοι

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

2.1.1 Απομόνωση στελεχών

Η απομόνωση των βακτηρίων έγινε από συμπτωματικά φυτικά δείγματα ελιάς, πικροδάφνης, γιασεμιού και μυρτιάς (Εικ. 2), που συλλέχτηκαν από το 2011 ως το 2023, από το νησί της Κρήτης και άλλες περιοχές της Ελλάδας και διατηρούταν στην συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας- Βακτηριολογίας του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν ως στελέχη αναφοράς βακτηριακά στελέχη από την γαλλική συλλογή φυτοπαθογόνων βακτηρίων Collection Francaise de Bacteries Phytopathogenes (CFBP) και άλλες συλλογές. Για την απομόνωση, τα φυμάτια αποστειρώθηκαν εξωτερικά με εμβάπτιση τους σε διάλυμα αιθανόλης 10% για 30 δευτερόλεπτα, ξεπλυθήκαν δύο φορές σε αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό, και στη συνέχεια οι φυτικοί ιστοί που λήφθηκαν ασηπτικά από το εσωτερικό τους, τεμαχίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο νερό. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε διασπορά του εκχυλίσματος σε τρυβλίο, που περιείχε θρεπτικό υπόστρωμα King's B, με την χρήση βακτηριολογικού κρίκου (10μl). Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης στους 26 ± 0,5^{o}C, για 48h. Τέλος, μεμονωμένες αποικίες μεταφυτεύονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B, πραγματοποιούταν έλεγχος της καθαρότητας τους και διατηρούνταν σε Nutrient agar (NA) με 1% γλυκόζη στους 6^{o}C ή σε αποστειρωμένο νερό με 15% γλυκερόλη στους -80^{o}C. Στον Πίνακα 1 καταγράφεται το σύνολο των βακτηριακών απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες.



Εικόνα 2. Συμπτώματα φυματίωσης σε δένδρα ελιάς, μυρτιάς, γιασεμιού, πικροδάφνης, φράξινου και σπάρτου που προκαλεί το φυτοπαθογόνο *Pseudomonas savastanoi*.

Πίνακας 1. (Α) Βακτηριακά στελέχη και (Β) Στελέχη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη.

Α.

Βακτηριακά στελέχη	**Περιοχή απομόνωσης**	**Ξενιστής**	**Έτος συλλογής**
Στελέχη *Pseudomonas savastanoi*			
HMUPsav1	ΑΘΗΝΑ	*Jasminum nudiflorum*	1996
HMUPsav2	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2011
HMUPsav3	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Nerium oleander*	2011
HMUPsav4	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Nerium oleander*	2011
HMUPsav5	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Nerium oleander*	2011

HMUPsav6	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Myrtus communis*	2016
HMUPsav7	ΛΑΣΙΘΙ	*Olea europaea*	2016
HMUPsav8	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2016
HMUPsav9	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2016
HMUPsav10	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2016
HMUPsav11	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2016
HMUPsav12	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2016
HMUPsav13	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2016
HMUPsav14	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2016
HMUPsav15	ΕΥΒΟΙΑ	*Olea europaea*	2017
HMUPsav16	ΕΥΒΟΙΑ	*Olea europaea*	2017
HMUPsav17	ΕΥΒΟΙΑ	*Olea europaea*	2017
HMUPsav18	ΛΑΣΙΘΙ	*Nerium oleander*	2017
HMUPsav19	ΛΑΣΙΘΙ	*Nerium oleander*	2017
HMUPsav20	ΛΑΣΙΘΙ	*Nerium oleander*	2017
HMUPsav21	ΛΑΣΙΘΙ	*Nerium oleander*	2017
HMUPsav22	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2017
HMUPsav28	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2017
HMUPsav31	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Nerium oleander*	2017
HMUPsav32	ΡΟΔΟΣ	*Olea europaea*	2017
HMUPsav33	ΛΑΣΙΘΙ	*Olea europaea*	2018
HMUPsav33 b	ΛΑΣΙΘΙ	*Olea europaea*	2018
HMUPsav34	ΛΑΣΙΘΙ	*Olea europaea*	2018
HMUPsav35	ΛΑΣΙΘΙ	*Olea europaea*	2018
HMUPsav36	ΛΑΣΙΘΙ	*Olea europaea*	2018
HMUPsav37	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2022
HMUPsav38	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2022
HMUPsav39	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2022
HMUPsav40	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2022
HMUPsav41	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2022
HMUPsav42	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2022
HMUPsav43	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2022
HMUPsav44	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2022
HMUPsav45	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2022
HMUPsav46	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2022
HMUPsav47	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Olea europaea*	2022
HMUPsav48	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Myrtus communis*	2023
HMUPsav49	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Myrtus communis*	2023
HMUPsav52	ΧΑΝΙΑ	*Olea europaea*	2023

HMUPsav54	ΧΑΝΙΑ	*Olea europaea*	2023
HMUPsav56	ΧΑΝΙΑ	*Olea europaea*	2023
HMUPsav58	ΧΑΝΙΑ	*Olea europaea*	2023
HMUPsav60	ΧΑΝΙΑ	*Olea europaea*	2023
HMUPsav62	ΧΑΝΙΑ	*Olea europaea*	2023
HMUPsav64	ΧΑΝΙΑ	*Olea europaea*	2023
HMUPsav66	ΧΑΝΙΑ	*Olea europaea*	2023
HMUPsav68	ΧΑΝΙΑ	*Olea europaea*	2023
HMUPsav70	ΧΑΝΙΑ	*Olea europaea*	2023
HMUPsav74	ΡΕΘΥΜΝΟ	*Olea europaea*	2023
HMUPsav75	ΡΕΘΥΜΝΟ	*Olea europaea*	2023

Β.

Στελέχη αναφοράς				**Βακτηριακό στέλεχος**
CFBP1670^{T}	ΠΡΩΗΝ ΓΙΟΥΓΚΟΣΛΑΒΙΑ	*Olea europaea.*	1959	*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*
CFBP 5062^{P}	ΟΛΛΑΝΔΙΑ	*Fraxinus excelsior*	1978	*Pseudomonas savastanoi* pv. *fraxini*
CFBP 5067	ΙΣΠΑΝΙΑ	*Nerium oleander*	1979	*Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*
CFBP 5512^{P}	ΙΣΠΑΝΙΑ	*Retama sphaerocarpa*	1996	*Pseudomonas savastanoi* pv. *retacarpa*
CFBP 1751	ΕΛΛΑΔΑ	*Jasminum sp.*	1968	*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*
CFBP 5058	ΙΤΑΛΙΑ	*Ligustrum japonicum*	1968	*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*
CFBP 6043	ΣΥΡΙΑ	*Myrtus sp.*	1987	*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*
CFBP 6024	ΣΥΡΙΑ	*Myrtus sp.*	1987	*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*
CFBP 8832^{P}	ΓΑΛΛΙΑ	*Mandevilla sanderi*	2008	*Pseudomonas savastanoi* pv. *mandevillae*
PD2777	ΟΛΛΑΝΔΙΑ	*Phaseolus vulgaris*	1995	*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*

HMUXv8138	ΒΟΙΩΤΙΑ	*Solanum lycopersicum*	2018	*Xanthomonas vesicatoria*
HMUPss289	ΧΑΝΙΑ	*Mangifera indica L*	2016	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*
HMUPst240	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	*Solanum lycopersicum*	2018	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
HMUPst241	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	*Solanum lycopersicum*	2018	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
HMUPss31001	ΒΟΙΩΤΙΑ	*Citrullus lanatus*	2022	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*
HMUAg20	ΜΠΕΝΑΚΕΙΟ	-	2009	*Agrobacterium tumefaciens*
HMU282	ΧΑΝΙΑ	*Mangifera indica*	2016	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*
HMU910	ΤΥΡΝΑΒΟΣ	*Pyrus communis*	2016	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*
HMU704	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Zamioculcas zamiifolia*	2009	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*
HMU50556	ΗΜΑΘΙΑ	*Solanum lycopersicum*	2019	*Acidovorax citrulli*
AAC00-1	ΙΣΡΑΗΛ	*Citrullus lanatus*	2018	*Acidovorax citrulli*
HMU20000	ΛΑΣΙΘΙ	*Solanum lycopersicum*	2020	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
HMU20011	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Solanum lycopersicum*	2020	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
HMU725	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Zamioculcas zamiifolia*	2017	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*
HMUPss269	ΧΑΝΙΑ	*Mangifera indica*	-	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*
HMUPss279	ΧΑΝΙΑ	*Mangifera indica*	-	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*
HMUPss301	ΧΑΝΙΑ	*Mangifera indica*	2016	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*
HMUPss308	ΧΑΝΙΑ	*Mangifera indica*	2018	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*
HMU30009	ΚΕΡΚΥΡΑ	*Lactuca sativa*	2020	*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*
HMU30012	ΚΕΡΚΥΡΑ	*Lactuca sativa*	2020	*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*

HMU30000β	ΑΡΙΔΑΙΑ	*Actinidia chinensis*	2020	*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*
HMU30003	ΑΡΙΔΑΙΑ	*Actinidia chinensis*	2020	*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*
HMUPsa801	ΠΕΛΛΑ	*Actinidia chinensis*	2017	*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*
HMUPsa842	ΠΕΛΛΑ	*Actinidia chinensis*	2018	*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*
HMUPsa866	ΗΡΑΚΛΕΙΟ	*Actinidia chinensis*	2020	*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*
HMUPsa834	ΠΕΛΛΑ	*Actinidia chinensis*	2018	*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*
HMUPsa836	ΠΕΛΛΑ	*Actinidia chinensis*	2018	*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*
HMUPsa873	ΠΕΛΛΑ	*Actinidia chinensis*	2020	*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

2.1.2 Βιοχημική ταυτοποίηση των απομονώσεων

Αρχικά, όλες οι απομονώσεις ελέγχθηκαν με την δοκιμή Hugh and Leifson (1953) για τον τρόπο χρησιμοποίησης της γλυκόζης (αερόβια/προαιρετικά αναερόβια) και την ικανότητα φθορισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B. Με στόχο την ταυτοποίηση των απομονώσεων, εφαρμόστηκαν οι βιοχημικές δοκιμές LOPAT, που έχουν καθιερωθεί για την ταυτοποίηση των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* και περιλαμβάνουν την παραγωγή Levan (L), την παραγωγή οξειδάσης (O), την πηκτινόλυση κονδύλων πατάτας (P), την αναερόβια διάσπαση αργινίνης (A) και την πρόκληση αντίδρασης υπερευαισθησίας καπνού (T), με βάση την μεθοδολογία των Lelliott and Stead (1987). Σε επιλεγμένες απομονώσεις του παθογόνου ελέγχθηκε το βιοχημικό τους προφίλ, συγκριτικά με στελέχη αναφοράς, με τις τυποποιημένες δοκιμές API 20NE (Πίν. 8), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (bioMérieux, France). Επιπλέον, σε επιλεγμένες απομονώσεις ελέγχθηκε το βιοχημικό τους προφίλ, συγκριτικά με στελέχη αναφοράς, σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που προτείνεται από τους Trantas et al, 2022 (Πίν. 9). Για την ταυτοποίηση των

απομονώσεων ελέγχθηκε η χρησιμοποίηση τριάντα οκτώ σακχάρων. Τα σάκχαρα ενσωματώθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Ayer's σε τελική συγκέντρωση 0,1%. Στη συνέχεια, 150 μl τοποθετήθηκαν σε κάθε κυψελίδα της πλάκας μικροτιτλοδότησης και εμβολιάστηκαν με 10 μl από αιώρημα συγκέντρωσης περίπου 10^7 CFU/ml, του αντίστοιχου βακτηριακού στελέχους. Ακολούθησε επώαση σε θάλαμο στους 26 ± 0,5^{o}C. Παρατηρήσεις σχετικά με την αλλαγή του χρώματος και της θολερότητας καταγράφηκαν για τουλάχιστον 10 ημέρες. Σε όλες τις παραπάνω δοκιμές πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο επαναλήψεις ανά στέλεχος.

2.1.3 Μοριακή ταυτοποίηση

2.1.3.1 Απομόνωση γενετικού υλικού από τις βακτηριακές απομονώσεις

Για την απομόνωση ολικού DNA από το σύνολο των βακτηριακών απομονώσεων, χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρείας Qiagen, DNeasy® Blood & Tissue Kit (2006).Τα στελέχη αρχικά επωάστηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB για 48h στους 26 ± 0,5^{o}C με συνεχή ανακίνηση. Από τα 4 ml της υγρής καλλιέργειας, πάρθηκαν 2 ml και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία τύπου eppendorf αντίστοιχης χωρητικότητας. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 7.500 rpm για 10 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 180 μl ρυθμιστικού διαλύματος ATL, καθώς και 20 μl πρωτεϊνάση Κ. Αφού έγινε ανάδευση σε αυτόματο αναδευτήρα (vortex), τα δείγματα επωάστηκαν σε υδατόλουτρο στους 56 ºC για δύο περίπου ώρες, μέχρι να ολοκληρωθεί η λύση των βακτηριακών κυττάρων. Κατά την διάρκεια της επώασης, γινόταν ανάδευση των δειγμάτων κάθε 15 περίπου λεπτά, για να βοηθηθεί η λύση τους. Μετά το τέλος της επώασης, τα δείγματα αναδεύτηκαν για 15 δευτερόλεπτα περίπου και προστέθηκαν 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος AL και αναδεύτηκαν ξανά. Μετά την προσθήκη 200 μl αιθανόλης (καθαρότητας 99%) και αφού ακολούθησε εκ νέου ανάδευση, το περιεχόμενο των δοχείων τοποθετήθηκε στα κολωνάκια (DNeasy Mini spin column), τα οποία τοποθετήθηκαν μέσα σε δοχεία συλλογής και φυγοκεντρήθηκαν στις 8.000 rpm για ένα λεπτό. Στη συνέχεια, τα δοχεία αφαιρέθηκαν μαζί με το υπερκείμενο και τα κολωνάκια τοποθετήθηκαν σε νέα δοχεία συλλογής των 2 ml. Αφού προστέθηκαν 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος AW1

φυγοκεντρήθηκαν για ένα λεπτό στις 8.000 rpm. Μετά την φυγοκέντρηση, τα δοχεία συλλογής αφαιρέθηκαν και τα κολωνάκια τοποθετήθηκαν σε νέα δοχεία συλλογής των 2 ml. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος AW2 και έγινε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 14.000 rpm, έτσι ώστε τα κολωνάκια να στεγνώσουν καλά. Για τον λόγο αυτό ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 14.000 rpm. Στη συνέχεια τα κολωνάκια τοποθετήθηκαν σε νέα δοχεία των 2 ml και προστέθηκαν 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος ΑΕ. Αφού επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου ένα λεπτό, φυγοκεντρήθηκαν στις 8.000 rpm για ένα λεπτό. Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης DNA των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε νανοφωτόμετρο (Nanodrop, ThermoScientific) και στη συνέχεια τα δείγματα αραιώθηκαν, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση όλων των δειγμάτων να είναι ίδια και ίση με 50 ng/μl.

2.1.3.2 Εξειδικευμένοι εκκινητές σε επίπεδο είδους και παθοποικιλίας

Για την μοριακή ταυτοποίηση των απομονωμένων στελεχών πραγματοποιήθηκε συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (conventional PCR). Ως στελέχη αναφοράς για όλες τις PCR, χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη CFBP1670^{T}, CFBP6043, CFBP6024, CFBP1751, CFBP5058, CFBP5067, CFBP5062^{P}, CFBP5512^{P} και CFBP8832^{P}. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (HMUPss31001), *Agrobacterium tumefaciens* (HMUAg20) και *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (PD2777). Για την ταυτοποίηση του *Pseudomonas savastanoi* σε επίπεδο είδους, χρησιμοποιήθηκαν οι εξειδικευμένοι εκκινητές IAALF/R (Penyalver et al, 2000) για το σύνολο των 55 απομονώσεων.

Για την ταυτοποίηση σε επίπεδο παθοποικιλίας χρησιμοποιήθηκαν οι εξειδικευμένοι εκκινητές PsvF/R, PsnF/R και PsfF/R για τις παθοποικιλίες *savastanoi*, *nerii* και *fraxini*, αντίστοιχα (Tegli et al, 2010). Για την πραγματοποίηση PCR με τους συγκεκριμένους εκκινητές, από το σύνολο των απομονώσεων, επιλέχθηκαν είκοσι πέντε (είκοσι από ελιά, δύο από μυρτιά, δύο από πικροδάφνη και ένα από γιασεμί), με βάση την ημερομηνία απομόνωσης και τον ξενιστή τους. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις αναφέρονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR.

Εξειδίκευση	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Αναφορές
Pseudomonas savastanoi	IAALF	GGCACCAGCGGCAACATCAA	454	Penyalver et al, 2000
	IAALR	CGCCCTCGGAACTGCCATAC		
Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi	PsvF	GGCGATGTTCTCAGCGGATTTG	388	Tegli et al, 2010
	PsvR	GATCAAGTGTCCAAGGAAGTGAAGG		
Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii	PsnF	ACCCCTCATTGTAACGGATG	349	
	PsnR	TCCCCGGAATTCAACACTTA		
Pseudomonas savastanoi* pv. *fraxini	PsfF	CGCCTGCTGTACTCCTCGG	412	
	PsfR	TCGACCTGTCTAAGGCCC		

Οι αντιδράσεις PCR έγιναν στην συσκευή T100™ Thermal Cycler της Bio-Rad με την χρήση του kit 2X KAPA Taq ReadyMix with dye (KK1024) της KAPABIOSYSTEMS σε τελικό όγκο 20 μl. Το υπόστρωμα σε όλες τις αντιδράσεις ήταν 100 ng καθαρισμένου ολικού DNA από κάθε στέλεχος. Για την αντίδραση με τους IAALF/R ακολουθήθηκε το πρόγραμμα: αρχική αποδιάταξη στους 94 ^{o}C για 5 λεπτά, 35 κύκλους με αποδιάταξη στους 94^{o}C, υβριδοποίηση στους 62^{o}C και επιμήκυνση στους 72^{o}C για 30 δευτερόλεπτα αντίστοιχα και τελική επιμήκυνση στους 72^{o}C για 5 λεπτά (Penyalver et al, 2000). Η ανάλυση των PCR προϊόντων έγινε με 1,0% w/v πήκτωμα αγαρόζης σε 1X Tris-acetate-EDTA (TAE). Το πήκτωμα περιείχε 5% v/v χρωστικής Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Germany) για την χρώση του DNA. Ο δείκτης μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 100bp DNA Ladder της Enzyquest.

Για τις αντιδράσεις με τους εκκινητές PsvF/R, PsnF/R και PsfF/R ακολουθήθηκε το πρόγραμμα: αρχική αποδιάταξη στους 95^{o}C για 3 λεπτά, 40 κύκλους με αποδιάταξη στους 95^{o}C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 56^{o}C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72^{o}C για 60 δευτερόλεπτα και τελική επιμήκυνση στους 72^{o}C για 10 λεπτά (Tegli et al, 2010). Η ανάλυση των PCR προϊόντων έγινε όπως παραπάνω σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v. Τα προϊόντα και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR με τους εκκινητές IAAL, Psv, Psn και Psf.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	2 μl	100 ng
Εκκινητές	0,8 μl	8 pmol
KAPA Taq ReadyMix with dye (2X)	12,5 μl	1X
H_2O	3,9 μl	
Τελικός όγκος	20 μl	

2.1.3.3 Φυλογενετική ανάλυση

2.1.3.3.1 Ανάλυση με γενετικούς δείκτες BOX

Με στόχο τη φυλογενετική ανάλυση των απομονώσεων του παθογόνου εφαρμόστηκε PCR με τον εκκινητή BOXA1R (5′-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3′) (Basim et al, 2019). Από το σύνολο των απομονώσεων, επιλέχθηκαν εννέα, με βάση την ημερομηνία απομόνωσης και τον ξενιστή τους. Ως στελέχη αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη CFBP1670^T, CFBP6043, CFBP1751, CFBP5058, CFBP5067, CFBP5062^P, CFBP5512^P και CFBP8832^P. Οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν με το εξής πρόγραμμα: αρχική αποδιάταξη στους 95^{o}C για 7 λεπτά, 30 κύκλοι με αποδιάταξη στους 94^{o}C για 1 λεπτό, υβριδοποίηση στους 53^{o}C για 1 λεπτό και επιμήκυνση στους 65^{o}C για 8 λεπτά και τελική επιμήκυνση στους 65^{o}C για 15 λεπτά. Στον πίνακα 4 αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις. Η ανάλυση των PCR προϊόντων (10μl από 25μl αντίδραση) έγινε με 1,0% w/v πήκτωμα αγαρόζης σε 1X Tris-acetate-EDTA (TAE). Το πήκτωμα περιείχε 5% v/v χρωστικής Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Germany) για την χρώση του DNA. Οι δείκτες μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι λPstI της εταιρείας Minotech και 100bp DNA Ladder της Enzyquest. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε για 7h, σε τάση 75 V.

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση PCR με τους εκκινητές BOXA1R.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	2 μl	100 ng
KAPA Taq ReadyMix with dye (2X)	12,5 μl	1X

BOXA1R	0,5 μl	5 pmol
H_2O	10 μl	
Τελικός όγκος	25 μl	

2.1.3.3.2 Αλληλούχηση πολλαπλών γενετικών τόπων (Multi Locus Sequence Analysis, MLSA)

Για την φυλογενετική ανάλυση των απομονώσεων, εφαρμόστηκε αλληλούχηση πολλαπλών γενετικών τόπων (Multi Locus Sequence Analysis, MLSA). Οι αντιδράσεις PCR για την ανάλυση MLSA, έγιναν στην συσκευή T100™ Thermal Cycler της Bio-Rad σε τελικό όγκο 50 μl. Το υπόστρωμα σε όλες τις αντιδράσεις ήταν 200 ng ολικού DNA από κάθε στέλεχος. Από το σύνολο των απομονώσεων, επιλέχθηκαν είκοσι έξι (είκοσι ένα από ελιά, δύο από μυρτιά, δύο από πικροδάφνη και ένα από γιασεμί), με βάση την ημερομηνία απομόνωσης και τον ξενιστή τους, καθώς και το στέλεχος αναφοράς CFBP1670^T. Η φυλογενετική ανάλυση MLSA πραγματοποιήθηκε με βάση το σχήμα MLSA των τεσσάρων συντηρημένων γονιδίων glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A (*gapA*), *citrate synthase* (*gltA*), DNA gyrase subunit B (*gyrB*) και RNA polymerase sigma factor (*rpoD*).

Για την ενίσχυση του γονιδίου *gapA*, οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν με εξής το πρόγραμμα: αρχική αποδιάταξη στους 95^{o}C για 3 λεπτά, 35 κύκλοι με αποδιάταξη στους 95^{o}C για 45 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 52^{o}C για 45 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72^{o}C για 60 δευτερόλεπτα και τελική επιμήκυνση στους 72^{o}C για 5 λεπτά. Για την ενίσχυση του γονιδίου *gltA*, οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν με εξής το πρόγραμμα: αρχική αποδιάταξη στους 95^{o}C για 3 λεπτά, 35 κύκλοι με αποδιάταξη στους 95^{o}C για 45 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 60^{o}C για 45 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72^{o}C για 60 δευτερόλεπτα και τελική επιμήκυνση στους 72^{o}C για 5 λεπτά. Για την ενίσχυση του γονιδίου *gyrB*, οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν με εξής το πρόγραμμα: αρχική αποδιάταξη στους 95^{o}C για 5 λεπτά, 35 κύκλοι με αποδιάταξη στους 95^{o}C για 45 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 50^{o}C για 45 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72^{o}C για 60 δευτερόλεπτα και τελική επιμήκυνση στους 72^{o}C για 5 λεπτά. Για την ενίσχυση του γονιδίου *rpoD*, οι συνθήκες της αντίδρασης ρυθμίστηκαν με εξής το πρόγραμμα: αρχική αποδιάταξη στους 95^{o}C για

3 λεπτά, 35 κύκλοι με αποδιάταξη στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 53°C για 45 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72°C για 60 δευτερόλεπτα και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 λεπτά. Τα προϊόντα και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις αναγράφονται στον πίνακα 5 και οι αλληλουχίες των γονιδίων αναγράφονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR με τους εκκινητές gapA_312s/gapA_874ps, gltA_513s/gltA_1130s, gyrB_271ps/gyrB_1022ps και rpoD_364s/rpoD_1222ps.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
DNA template	4 μl	200 ng
10X KAPA Taq buffer B	5 μl	1X
KAPA dNTPs Mix (10mM)	1 μl	10mM
Εκκινητές	1 μl	10 pmol
KAPA Taq (5U/μl)	0,2 μl	1U
H_2O	37,8 ml	
Τελικός όγκος	50 μl	

Πίνακας 6. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR για την ανάλυση MLSA.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Αναφορές
gapA_312s	TCGARTGCACSGGBCTSTTCACC	Moretti et al, 2017; Hwang et al., 2005
gapA_874ps	GTGTGRTTGGCRTCGAARATCGA	
gltA_513s	CCTGRTCGCCAAGATGCCGAC	
gltA_1130s	CGAAGATCACGGTGAACATGCTGG	
gyrB_271ps	TCBGCRGCVGARGTSATCATGAC	
gyrB_1022ps	TTGTCYTTGGTCTGSGAGCTGAA	
rpoD_364s	GYGAAGGCGARATYGRAATCG	
rpoD_1222ps	CCGATGTTGCCTTCCTGGATCAG	

Ο καθαρισμός και η αλληλούχηση με τη μέθοδο Sanger των ενισχυμένων τμημάτων έγινε από την εταιρεία Eurofins (Eurofins Genomics Germany, GmbH Anzinger Str. 7a, 85560, Ebersberg, Germany). Η επεξεργασία των ακατέργαστων δεδομένων (raw data) από την forward και reverse αλληλούχηση των τμημάτων DNA έγινε με το πρόγραμμα SnapGene (from Insightful Science; available at snapgene.com). Οι επεξεργασμένες αλληλουχίες (consensus sequences) του κάθε γονιδίου στοιχίστηκαν

(alignment) με τον αλγόριθμο MUSCLE (Edgar 2004) και τα τέσσερα γονίδια ενοποιήθηκαν σε ένα μεγάλο τμήμα (concatenation) με αλφαβητική σειρά χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA version X (Kumar et al. 2018). Η φυλογενετική ανάλυση των απομονωμένων στελεχών έγινε στην ενοποιημένη αλληλουχία (concatenated sequence) *gapA-gltA-gyrB-rpoD* και στην αλληλουχία του κάθε γονιδίου χωριστά με τη μέθοδο Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood, ML). Τα συγγενικά υποείδη *Pseudomonas amygdali* pv. *photiniae* ICMP3023, *Pseudomonas syringae* pv. *cerasicola* CFBP6109 και *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* KN86 χρησιμοποιήθηκαν ως έξω-ομάδα (outgroup) του δέντρου. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης MLSA συγκρίθηκαν με δεδομένα των Newberry & Babu, (2018) και Hwang et al. (2005), που αποκτήθηκαν από την βάση δεδομένων Genbank. Το δενδρόγραμμα οπτικοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος MEGA version X, χρησιμοποιώντας την μέθοδο Maximum Likehood και η αξιοπιστία του με δοκιμασία bootstrap στις 1000 επαναλήψεις (Kumar et al, 2018). Μόνο οι τιμές bootstrap πάνω από 80% παρουσιάζονται στους κόμβους των κλάδων.

2.1.4 Δοκιμές παθογένειας σε ελιά

Οι τεχνητές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε νεαρά δενδρύλλια ελιάς ενός έτους, με την δημιουργία πληγών στις θέσεις πρόσφυσης των φύλλων στον βλαστό μετά την αφαίρεση τους. Έγινε απευθείας εναπόθεση καλλιέργειας 24h με τη μέθοδο της οδοντογλυφίδας του αντίστοιχου βακτηριακού στελέχους. Ανά στέλεχος πραγματοποιήθηκαν τρεις μολύνσεις σε διαφορετικές θέσεις. Οι θέσεις μόλυνσης καλύφθηκαν με parafilm με στόχο την διατήρηση της υγρασίας. Τα μολυσμένα δενδρύλλια ελιάς διατηρήθηκαν υπό σκιά σε συνθήκες υπαίθρου (Μέγιστη θερμοκρασία ημέρας 25^{o}C και νύκτας 17^{o}C). Παρατηρήσεις λήφθηκαν μετά την πάροδο δύο μηνών.

2.2 Ευαισθησία των απομονώσεων στον θειικό χαλκό

2.2.1 Προσδιορισμός της συσχέτισης των τιμών της οπτικής πυκνότητας με την συγκέντρωση βακτηριακού αιωρήματος του *Pseudomonas savastanoi*

Από βακτηριακά αιωρήματα του βακτηρίου με συγκεκριμένες τιμές οπτικής πυκνότητας στα 600nm πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις. Ανάλογα με την οπτική πυκνότητα και των αριθμό αραιώσεων πραγματοποιήθηκαν επιστρώσεις με την μέθοδο του plating, σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα King's B (KBM) με ποσότητες 50 μl, 100 μl, 200 μl από την κατάλληλη αραίωση έτσι ώστε ο εκτιμώμενος αριθμός αποικιών που θα αναπτυχθεί να κυμαίνεται από 50 μέχρι 150. Η μέτρηση του αριθμού των αποικιών που αναπτύχθηκε έγινε μετά την επώαση για 48-72h στους 26 ± 0,5^{o}C και υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση από τρεις επαναλήψεις.

2.2.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* στον θειικό χαλκό ($CuSO_4$ $5H_2O$), σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar Glucose με κατά θέση εμβολιασμό του βακτηριακού αιωρήματος (spot inoculation)

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας των απομονώσεων στον πενταένυδρο θειικό χαλκό ($CuSO_4$ $5H_2O$), τα βακτήρια, αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B σε θερμοκρασία 26^{o}C για 48h και εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar Glucose (NAG), στις συγκεντρώσεις των 0, 12,5, 25, 50 και 100 μg/ml, ισοδύναμου μεταλλικού χαλκού. Προετοιμάστηκε υδατικό διάλυμα (stock solution) του $CuSO_4$ $5H_2O$ σε αποστειρωμένο/απεσταγμένο νερό συγκέντρωσης 100.000 ppm ή 100.000 μg/ml. Στη συνέχεια, σε αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar Glucose θερμοκρασίας 50-55°C προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα από το εκάστοτε υδατικό διάλυμα (μικρότερη του 1% της ποσότητας του υλικού) και ακολούθησε ανάδευση για ομοιόμορφη κατανομή της δραστικής ένωσης εντός του θρεπτικού υποστρώματος. Ακολούθως, το υλικό με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της δραστικής ένωσης επιστρώθηκε σε τετράγωνα τρυβλία διαστάσεων 100x100 mm. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν πενήντα απομονώσεις του *Pseudomonas savastanoi* (39 από ελιά, 3 από μυρτιά, 7 από πικροδάφνη και 1 από γιασεμί). Τα βακτηριακά αιωρήματα που

σχηματίστηκαν είχαν οπτική πυκνότητα OD_{600nm}= 0,1, που ισοδυναμεί περίπου με 3,4 x 10^7 CFU/ml, για τα στελέχη του Psav. Δέκα (10 μl) του αντίστοιχου αιωρήματος εμβολιάστηκαν σε κάθε θέση/κυψελίδα. Ανά βακτηριακό στέλεχος πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις και ανάπτυξη τους αξιολογήθηκε μετά από επώαση 48h, σε θερμοκρασία 26 ± 0,5^{o}C. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν οκτώ στελέχη των οποίων η αντοχή/ευαισθησία στον χαλκό ήταν γνωστή, αφού είχε διερευνηθεί σε προγενέστερα πειράματα στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας- Βακτηριολογίας του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου, δηλαδή τρία *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (HMUPss301, HMUPss289, HMUPss308), δύο *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (HMUPsa834, HMUPsa836), δύο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (HMUPst240, HMUPst241) και ένα *Xanthomonas vesicatoria* (HMUXv8138), Η εκτίμηση της ευαισθησίας στον χαλκό προσδιορίστηκε σύμφωνα με τους Nguyen et al. (2018). Τα στελέχη του *Pseudomonas savastanoi* pv*. savastanoi* που αναπτύσσονται από 0 έως 10 μg/ml, ισοδύναμου μεταλλικού χαλκού, χαρακτηρίζονται ευαίσθητα, από 20 έως 30 μg/ml ανεκτικά και σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 50 μg/ml ανθεκτικά. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν οι τιμές των MIC και MBC για τα 59 υπό μελέτη στελέχη. Η εκτίμηση των MIC και MBC έγινε με παρατήρηση της παρουσίας ή απουσίας ανάπτυξης της καλλιέργειας του βακτηρίου μετά από επώαση 72h.

2.2.3 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* στον θειικό χαλκό ($CuSO_4$ $5H_2O$), σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Broth σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας των απομονώσεων του Psav στον πενταένυδρο θειικό χαλκό, έγινε προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration, MIC) και ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (minimum bactericidal concentration, MBC) και χρησιμοποιήθηκαν δεκαέξι ταυτοποιημένα στελέχη ως *Pseudomonas savastanoi* από διάφορους ξενιστές (9 από ελιά, 3 από πικροδάφνη, 3 από μυρτιά και 1 από γιασεμί), το στέλεχος αναφοράς CFBP1670^T από ελιά, ένα στέλεχος του *Xanthomonas vesicatoria* (HMUXv8138), το *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (HMUPss289) και το *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (HMUPst241). Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B, για

48h, σε θερμοκρασία 26 ± 0,5°C. Η πειραματική διαδικασία διεξάχθηκε σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA, με μέτρηση των τιμών οπτικής πυκνότητας (OD_{595nm}), μετά από επώαση για 48h. Σε κάθε συγκέντρωση και για κάθε βακτήριο διενεργήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Οι συγκεντρώσεις του χαλκού ($CuSO_4$ $5H_2O$) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0, 25, 50 ,100, 200, 400 και 800 μg/ml. Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στην ενσωμάτωση του χαλκού και την σύνθεση των βακτηριακών αιωρημάτων ήταν το Tryptone Soy Broth (TSB). Τα βακτηριακά αιωρήματα που σχηματίστηκαν είχαν όλα οπτική πυκνότητα OD_{600nm}= 0,1, που αντιστοιχεί σε περίπου 3,4 x 10^7 CFU/ml, για τα στελέχη του Psav. Ανά κυψελίδα της πλάκας μικροτιτλοδότησης τοποθετήθηκαν 50 μl του βακτηριακού αιωρήματος και 50 μl TSB με ενσωματωμένο το χαλκούχο σκεύασμα, έτσι ώστε να προκύπτουν οι προαναφερθείσες συγκεντρώσεις και η τελική συγκέντρωση του εμβολιασμού να αντιστοιχεί σε 5 x 10^4 CFU/ml. Η καταγραφή της ελάχιστης συγκέντρωσης παρεμπόδισης (MIC) της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών έγινε οπτικά με εκτίμηση της θολερότητας. Με στόχο τον προσδιορισμό της ελάχιστης βακτηριοκτόνου δράσης (MBC) του θειικού χαλκού, από κάθε κυψελίδα με ενσωματωμένο $CuSO_4 5H_2O$ σε συγκεντρώσεις 200, 400 και 800 μg/ml, 50 μl επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα King's B και εκτιμήθηκε η ανάπτυξη του βακτηρίου.

2.3 Αποτελεσματικότητα εγκεκριμένων χαλκούχων σκευασμάτων έναντι απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

2.3.1 Διερεύνηση αποτελεσματικότητας εγκεκριμένων χαλκούχων σκευασμάτων έναντι απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Broth σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν εννέα στελέχη Psav από την Κρήτη, ένα ανθεκτικό στο χαλκό στέλεχος του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (HMUPst240) και δύο στελέχη ανθεκτικά στον χαλκό (HMUPfl498 και Unknown bacterial strain). Τα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B σε θερμοκρασία 26 ± 0,5°C για 48h. Η πειραματική διαδικασία διεξάχθηκε σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA, εκτιμώντας την αύξηση των βακτηριακών στελεχών, με μέτρηση των τιμών

οπτικής πυκνότητας OD_{595nm}, μετά από επώαση για τουλάχιστον 48h. Σε κάθε συγκέντρωση και για κάθε βακτήριο πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Οι τελικές συγκεντρώσεις των χαλκούχων σκευασμάτων ήταν 0, 50 ,100, 200 και 400 μg/ml, δραστικής ουσίας. Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στην ενσωμάτωση του χαλκού και την σύνθεση των βακτηριακών αιωρημάτων ήταν το Tryptone Soy Broth (TSB). Τα βακτηριακά αιωρήματα που σχηματίστηκαν προσαρμόστηκαν όλα σε οπτική πυκνότητα OD_{600nm}= 0,1, που αντιστοιχεί σε 3,4 x 10^7 CFU/ml, για τα στελέχη του Psav. Ανά κυψελίδα της πλάκας μικροτιτλοδότησης τοποθετήθηκαν 50 μl του βακτηριακού αιωρήματος και 50 μl TSB με ενσωματωμένο το αντίστοιχο χαλκούχο σκεύασμα, έτσι ώστε να προκύπτουν οι προαναφερθείσες συγκεντρώσεις και η τελική συγκέντρωση του εμβολιασμού να αντιστοιχεί σε 5 x 10^4 CFU/ml. Η *in vitro* αντιβακτηριακή δράση των χαλκούχων σκευασμάτων εκτιμήθηκε ως το ποσοστό (%) παρεμπόδισης της ανάπτυξης του κάθε βακτηριακού στελέχους, στην εκάστοτε συγκέντρωση του αντίστοιχου χαλκούχου σκευάσματος, σύμφωνα με τον σχέση (Le et al., 2020):

$$Παρεμπόδιση\ ανάπτυξης\ (\%) = \frac{(Τιμές\ OD\ Μάρτυρα\ -\ Τιμές\ OD\ Επέμβασης)}{Τιμές\ OD\ Μάρτυρα} X100$$

όπου τιμές OD μάρτυρα είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων των τιμών της οπτικής πυκνότητας του μάρτυρα (Θρεπτικό υπόστρωμα + βακτήριο) και τιμές OD επέμβασης είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων των τιμών της οπτικής πυκνότητας της επέμβασης (Θρεπτικό υπόστρωμα + βακτήριο + χαλκός). Όταν η παρεμπόδιση ήταν ≤20% τότε η χημική ένωση θεωρήθηκε ως μη αποτελεσματική έναντι του αντίστοιχου βακτηριακού στελέχους (Non Effective=NE), όταν η παρεμπόδιση ήταν 21-50% τότε η ένωση θεωρήθηκε ως χαμηλής αποτελεσματικότητας (Lowly Effective=LE), όταν η παρεμπόδιση ήταν 51-75%, τότε η ένωση θεωρήθηκε ως μέτριας αποτελεσματικότητας (Moderately Effective=ME), και τέλος όταν η παρεμπόδιση ήταν 76-100% η ένωση θεωρήθηκε ως υψηλής αποτελεσματικότητας έναντι του συγκεκριμένου στελέχους (Highly Effective=HE), στην συγκεκριμένη συγκέντρωση (Μαρκάκης, 2020).

3 Αποτελέσματα

3 Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση στελεχών

3.1.1 Απομόνωση και φαινοτυπική ταυτοποίηση

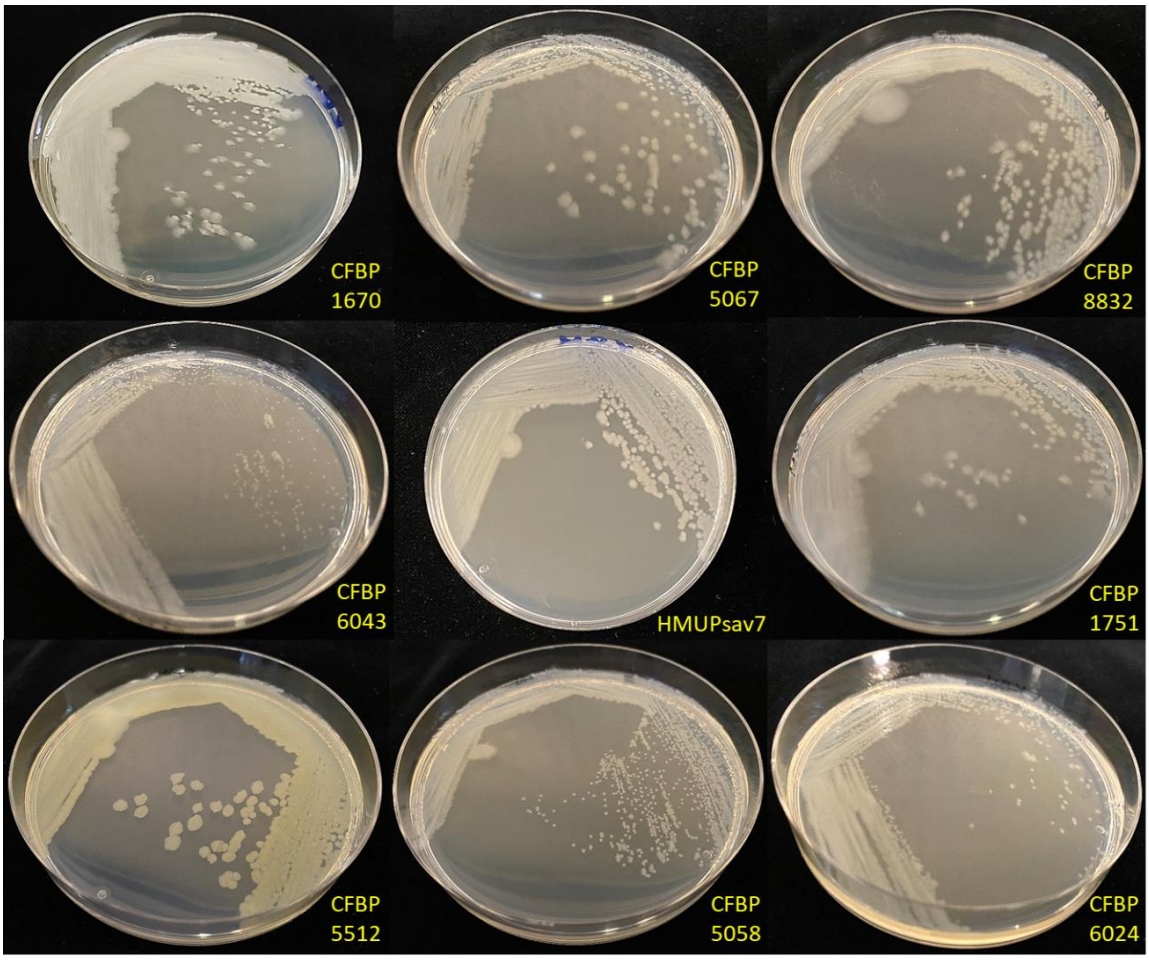
Το σύνολο των απομονώσεων σχημάτισαν υπόλευκες αποικίες σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα το King's B (Εικ. 3). Όλες οι αποικίες των απομονώσεων από ελιά εμφάνισαν παρόμοια μορφολογία αποικιών, με κυρίως στρογγυλεμένο ή ελαφρώς οβάλ σχήμα. Τα περιθώρια ήταν λεία ή κυματοειδή και πιο διαυγή από το κέντρο της αποικίας (Εικ. 3 Α και Β). Συχνά στα τρυβλία εντοπιζόταν η παρουσία βακτηρίων με κίτρινες μουκώδεις αποικίες που ανήκουν στα είδη *Erwinia* spp. και *Pantoea* spp. (Εικ. 3Γ). Στην Εικόνα 4 εμφανίζεται συγκριτικά ο μορφολογικός φαινότυπος των αποικιών της απομόνωσης HMUPsav7 από ελιά στην Κρήτη, σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B, σε σχέση με τον φαινότυπο των αποικιών των παθοποικιλιών των στελεχών αναφοράς του *Pseudomonas savastanoi*, μετά από επώαση 48 ωρών. Παρατηρείται σημαντική απόκλιση ως προς το μέγεθος (ρυθμός ανάπτυξης), τον τύπο και το χρώμα των αποικιών ανάμεσα στις παθοποικιλίες του βακτηρίου. Οι αποικίες της απομόνωσης του βακτηρίου από ελιά στην Κρήτη (HMUPsav7) εμφανίζονται όμοιες με αυτές του στελέχους αναφοράς (CFBP1670^T).



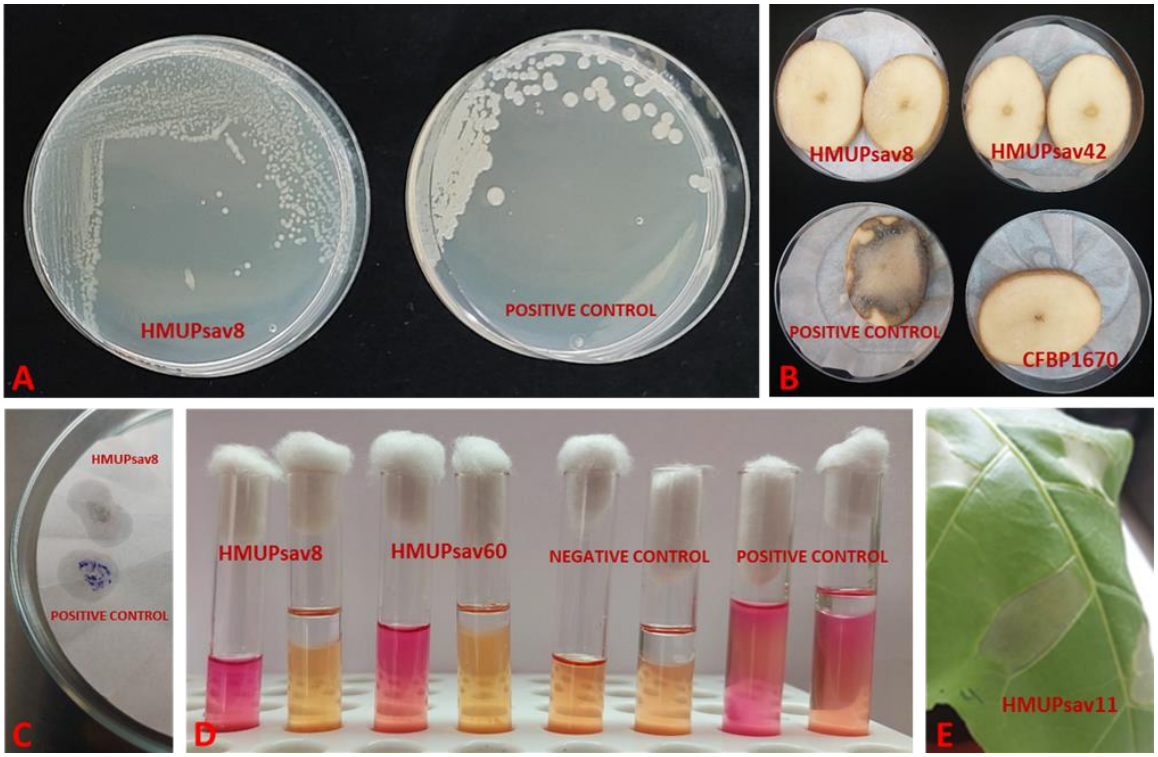
Εικόνα 3. Απομόνωση του παθογόνου από καρκινώματα ελιάς σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα King's B. Αποικίες του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Α και Β); Ταυτόχρονη παρουσία των *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* και *Erwinia toletana* κατά την απομόνωση (Γ).

Κατά την εξέταση των απομονώσεων με τις δοκιμές LOPAT, σε καμία από τις απομονώσεις δεν παρατηρήθηκε παραγωγή levan, αργινίνης και οξειδάσης. Ακόμη τα βακτήρια δεν ήταν ικανά να προκαλέσουν πηκτινόλυση σε κονδύλους πατάτας. Αντίθετα, όλες οι απομονώσεις προκάλεσαν αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλα φυτών καπνού (Εικ. 5). Τα αναλυτικά αποτελέσματα των δοκιμών ταυτοποίησης LOPAT,

για τις 55 απομονώσεις του βακτηρίου που ελέγχθηκαν εμφανίζονται στον Πίνακα 7 συγκριτικά με τα χρησιμοποιηθέντα στελέχη αναφοράς (CFBP 1670^{T}, HMU50556, AAC00-1, HMU20000, HMU20011). Έτσι, με βάση τις δοκιμές LOPAT όλες οι βακτηριακές απομονώσεις της ελιάς, ομαδοποιούνται ως μέλη της ομάδας Ib που περιλαμβάνει στελέχη του *Pseudomonas savastanoi*, σύμφωνα με την μεθοδολογία των Lelliott and Stead (1987).



Εικόνα 4. Μορφολογικός φαίνότυπος αποικιών, των παθοποικιλιών των στελεχών αναφοράς του *Pseudomonas savastanoi* και της απομόνωσης HMUPsav7 από ελιά στην Κρήτη, σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B, μετά από επώαση 48 ωρών. CFBP 1670^{T}: *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*; CFBP 5067: *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*; CFBP 8832^{P}: *Pseudomonas savastanoi* pv. *mandevillae*; CFBP 6043: *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*; CFBP 1751: *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*; CFBP 5512^{P}: *Pseudomonas savastanoi* pv. *retacarpa*; CFBP 5058: *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*; CFBP 6024: *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.



Εικόνα 5. Δοκιμές LOPAT: (A) Απουσία ανάπτυξης αποικιών τύπου Levan θετικού (+) της απομόνωσης HMUPsav8, μετά από επώαση 48h σε θρεπτικό υπόστρωμα Levan, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (-) μάρτυρα. (B) Αδυναμία πηκτινόλυσης κονδύλων πατάτας από τις απομονώσεις του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* και του αρνητικού μάρτυρα σε σχέση με τον θετικό. (C) Αδυναμία παραγωγής οξειδάσης της απομόνωσης HMUPsav8 σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (+). (D) Παραγωγή αργινίνης σε αερόβιες συνθήκες (κόκκινο χρώμα) και αδυναμία παραγωγής σε αναερόβιες συνθήκες (κίτρινο χρώμα). (E) Πρόκληση τυπικής αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φύλλο φυτού καπνού, μετά από 24-48h.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα των δοκιμών ταυτοποίησης LOPAT σε 55 απομονώσεις του *Pseudomonas savastanoi*.

Βακτηριακές απομονώσεις	**Φυτικό είδος**	**ΔΟΚΙΜΕΣ LOPAT**				
		Levan	**Oxidase**	**Potato rot**	**Arginine**	**HR**
Pseudomonas savastanoi						
HMUPsav1	Γιασεμί	-	-	-	-	+
HMUPsav2	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav3	Πικροδάφνη	-	-	-	-	+
HMUPsav4	Πικροδάφνη	-	-	-	-	+
HMUPsav5	Μυρτιά	-	-	-	-	+
HMUPsav6	Μυρτιά	-	-	-	-	+
HMUPsav7	Ελιά	-	-	-	-	+

HMUPsav8	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav9	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav10	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav11	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav12	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav13	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav14	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav15	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav16	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav17	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav18	Πικροδάφνη	-	-	-	-	+
HMUPsav19	Πικροδάφνη	-	-	-	-	+
HMUPsav20	Πικροδάφνη	-	-	-	-	+
HMUPsav21	Πικροδάφνη	-	-	-	-	+
HMUPsav22	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav28	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav31	Πικροδάφνη	-	-	-	-	+
HMUPsav32	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav33	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav33 b	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav34	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav35	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav36	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav37	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav38	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav39	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav40	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav41	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav42	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav43	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav44	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav45	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav46	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav47	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav48	Μυρτιά	-	-	-	-	+
HMUPsav49	Μυρτιά	-	-	-	-	+

HMUPsav52	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav54	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav56	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav58	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav60	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav62	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav64	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav66	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav68	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav70	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav74	Ελιά	-	-	-	-	+
HMUPsav75	Ελιά	-	-	-	-	+
Στελέχη αναφοράς						
Pseudomonas savastanoi						
CFBP1670^{T}	Ελιά	-	-	-	-	+
Acidovorax citrulli						
HMU50556	Τομάτα	**-**	**+**	**-**	**-**	**+**
AAC00-1	Καρπούζι	**-**	**+**	**-**	**-**	**+**
Pseudomonas syringae* pv. *tomato						
HMU20000	Τομάτα	**+**	**-**	**-**	**-**	**+**
HMU20011	Τομάτα	**+**	**-**	**-**	**-**	**+**

Στον Πίνακα 8 και στην Εικόνα 6 εμφανίζονται αποτελέσματα των δοκιμών API 20NE σε οκτώ απομονώσεις του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* με σύγκριση με τα στελέχη αναφοράς CFBP170^{T} (ελιά), CFBP5067 (πικροδάφνη), CFBP6043 (μυρτιά), CFBP5062^{P} (φράξινο), CFBP5512^{P} (σπάρτο) και CFBP8832^{P} (διπλαδένια), από πέντε παθοποικιλίες του *Pseudomonas savastanoi* αλλά και στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (μάνγκο και αχλαδιά) και του *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (φασολιά). Διαπιστώνεται: η απόλυτη ομοιότητα (100%) στις είκοσι δύο API 20NE δοκιμές μεταξύ βακτηρίου αναφοράς CFBP1670^{T} *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* με απομονώσεις της ελιάς από την Κρήτη, η υψηλή συσχέτιση των δοκιμών μεταξύ των τεσσάρων παθοποικιλιών του *Pseudomonas savastanoi* και απομονώσεων της ελιάς από την Κρήτη και στελέχους αναφοράς CFBP1670^{T} η οποία κυμαίνεται από 86-100%; Η χαμηλότερη συσχέτιση των δοκιμών μεταξύ των στελεχών του *Pseudomonas*

syringae pv. *syringae* (86%) και του *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (82%). Τα αποτελέσματα δεν επιτρέπουν την αξιόπιστη διαφοροποίηση των παθοποικιλιών του *Pseudomonas savastanoi.*

Πίνακας 8. Συγκριτικά αποτελέσματα δοκιμών API 20NE απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* από ελαιώνες στην Κρήτη με στελέχη αναφοράς του *Pseudomonas savastanoi* από διάφορους ξενιστές.

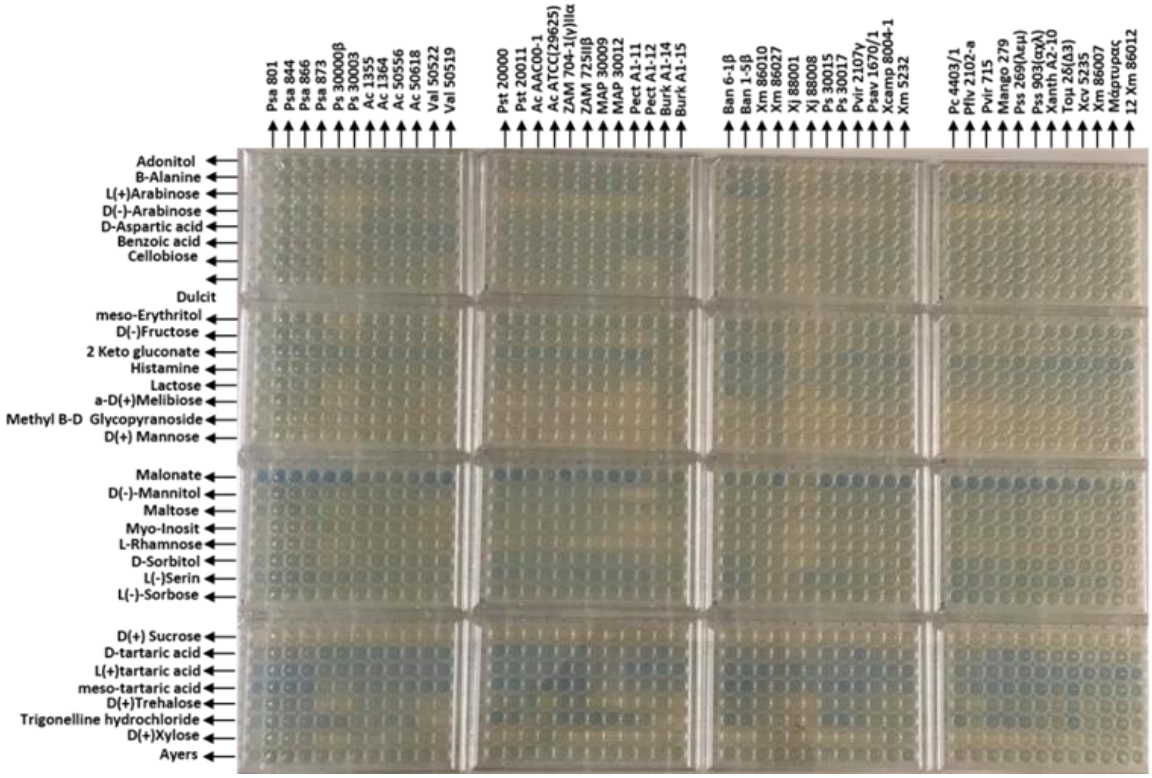
Bacterial species	***Pseudomonas***								
	***savastanoi* pv.**								***syringae* pv.**
Pathovars	***savastanoi***			***nerii***	***fraxini***	***retacarpa***	***mandevillae***	***phaseolicola***	***syringae***
Host	***Olea europea***		***Myrtus communis***	***Nerium oleander***	***Fraxinus excelsior***	***Retama sphaerocarpa***	***Mandevilla sanderi***	***Phaseolus* sp.**	***Citrullus lanatus* *Mangifera* sp. *Pyrus communis***
Bacterial isolates and strains	**CFBP1670^{T}**	**HMUPsav52/ HMUPsav7 / HMUPsav28 / HMUPsav46/ HMUPsav70/ HMUPsav37/ HMUPsav74/ HMUPsav32**	**HMUPsav48/ CFBP6043**	**CFBP5067/ HMUPsav31**	**CFBP5062^{P}**	**CFBP5512^{P}**	**CFBP8832^{P}**	**PD2777**	**HMUPss31001/ HMU282 / HMU910**
API 20NE Tests									
KNO_3 -> NO_2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KNO_3 -> N_2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-tryptophane	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin ferric citrate	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Gelatin (bovine origin)	-	-	-	-	-	+	-	-	+
4-nitrophenyl-βDgalactopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glucose (Assimilation)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	-	-	+	-	-	+	-	+	+
D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+
N-acetyl-glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
potassium gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Capric acid	+	+	-	+	-	+	+	-	+
Adipic acid	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Malic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trisodium citrate	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Phenylacetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Όμοιες δοκιμές με CFBP1670^{T} / σύνολο - (% ομοιότητα)		**22/22 (100%)**	**20/22 (91%)**	**22/22 (100%)**	**21/22 (96%)**	**19/22 (86%)**	**21/22 (96%)**	**18/22 (82%)**	**19/22 (86%)**



Εικόνα 6. Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών με τις δοκιμές API 20NE.

Στον Πίνακα 9 και στην Εικόνα 7, εμφανίζονται τα αποτελέσματα τριάντα οκτώ επιλεγμένων φαινοτυπικών δοκιμών που χρησιμοποιήθηκαν για την αναλυτική ταυτοποίηση οκτώ απομονώσεων της ελιάς. Συγκριτικά, στην ίδια ομάδα δοκιμών χρησιμοποιήθηκε και το CFBP1670^{T} από ελιά, τέσσερα στελέχη του *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, τέσσερα στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* και τέσσερα στελέχη *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Οι δοκιμές ολοκληρώθηκαν σύμφωνα με τις μεθοδολογίες που περιγράφονται προηγούμενα στα υλικά & μέθοδοι. Από τα αποτελέσματα διαπιστώνεται η ταύτιση σε ποσοστό 100% των τριάντα πέντε φαινοτυπικών δοκιμών ανάμεσα στα στελέχη της ελιάς από την Κρήτη και με το στέλεχος αναφοράς CFBP1670^{T} επίσης από ελιά. Αντίθετα τα στελέχη της ελιάς διαφοροποιούνται λιγότερο ή περισσότερο από τα στελέχη του *Pseudomonas syringae* complex με την ομοιότητα στις δοκιμές να είναι στο 74,3% και 77,1% για τα στελέχη *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* από ζάμια και του *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* της ακτινιδιάς. Η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε ήταν ακόμη μεγαλύτερη με τα στελέχη του *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 51,4% και 66% από ακτινιδιά και μαρούλι αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα επιτρέπουν την διαφοροποίηση των

στελεχών του *Pseudomonas savastanoi* (Psav) από ελιά από στελέχη του *Pseudomonas syringae* complex.



Εικόνα 7. Δοκιμές χρησιμοποίησης σακχάρων σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA σε υπόστρωμα Ayer's και με ενσωμάτωση της αντίστοιχης ένωσης σε τελική συγκέντρωση 0,1%, από 72h μετά τον εμβολιασμό. Η αλλαγή χρώματος από πράσινο σε κίτρινο ή μπλε σε συνδυασμό με την ανάπτυξη θολερότητας υποδεικνύει τη χρησιμοποίηση της αντίστοιχης ένωσης από το αντίστοιχο βακτηριακό στέλεχος.

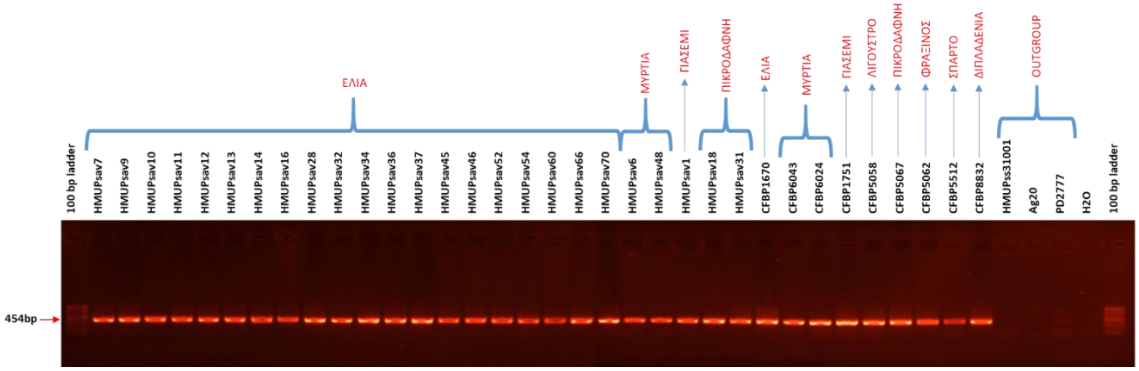
Πίνακας 9. Συγκριτικά αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμών απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas*

Απομονώσεις & βακτηριακά στελέχη αναφοράς	*Pseudomonas*				
	savastanoi pv. *savastanoi*	*marginalis* pv. *marginalis*		*syringae* pv. *syringae*	*syringae* pv. *actinidiae*
	Ελιά	Μαρούλι	Ακτινιδιά	Ζάμια	Ακτινιδιά
	CFBP1670^T/HMUPsav52/ HMUPsav7/HMUPsav28/HMUPsav46/HMUPsav70/HMUPsav37/HMUPsav74/HMUPsav32	HMU30009 HMU30012	HMU30000β HMU30003	HMU704 HMU725	HMUPsa801 HMUPsa842 HMUPsa866 HMUPsa873
Δοκιμές/αριθμός στελεχών					
Levan	-	-	+	-	+
Oxidase	-	+	+	-	-
Pectolytic Activity	-	+	+	-	-
Arginine dihydrolase	-	+	+	-	-
Tobacco HR	+	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	+	-
Starch	-	-	-	-	-
Adonitol	-	+	-	+	-
B-Alanine	-	+	-	+	-
D(-)-Arabinose	-	-	+	-	-
D-Aspartic acid	-	-	+	-	-
Benzoic acid	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	+	-	-
Dulcit	-	-	-	-	-
meso-Erythritol	-	-	+	+	-
D(-)Fructose	-	+	+	+	-(+866)
2 Keto gluconate	+	+	+	-	-
Histamine	-	-	+	-	-
Lactose	-	+	+	-	-
D(+)Melibiose	+	+	+	+	-
D(+) Mannose	+	+	+	+	+
Malonate	+	+	+	+	+
D(-)-Mannitol	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	+	-	-(+873)
myo-Inosit	-	+	+	-	-
L-Rhamnose	+	+	+	+	-
D-Sorbitol	+	+	+	+	+
L(-)Serin	-	+	+	+	+
L(-)-Sorbose	+	+	-	+	+
D-tartaric acid	+	+	+	+	+
L(+)tartaric acid	-	-	+	-	-
meso-tartaric acid	+	-	+	+	+
D(+)Trehalose	+	+	+	-	-
Trigonelline hydrochloride	-	+	+	+	+
D(+)Xylose	+	+	+	+	-
Όμοιες δοκιμές με CFBP1670^T/ Σύνολο (% ομοιότητα)	35/35 (100%)	23/35 (66%)	18/35 (51,4%)	26/35 (74,3%)	27/35 (77,1%)

3.1.2 Μοριακή ταυτοποίηση

3.1.2.1 Εξειδικευμένοι εκκινητές σε επίπεδο είδους (*Pseudomonas savastanoi*)

Τα αποτελέσματα της συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με εξειδικευμένους εκκινητές για την ταυτοποίηση των απομονώσεων σε επίπεδο είδους (*Pseudomonas savastanoi*), παρουσιάζονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1,0%. Οι εξειδικευμένοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις, ήταν οι IAALF/R, όπου οι πενήντα πέντε βακτηριακές απομονώσεις εμφάνισαν το αναμενόμενο ενισχυόμενο τμήμα αντίδρασης στα 454bp. Στην εικόνα 8 εμφανίζεται ενδεικτικά η ενίσχυση του τμήματος αυτού σε είκοσι πέντε βακτηριακές απομονώσεις, καθώς και στα στελέχη αναφοράς (CFBP1670^{T}, CFBP6043, CFBP6024, CFBP1751, CFBP5058, CFBP5067, CFBP5062^{P}, CFBP5512^{P} και CFBP8832^{P}), ενώ τα στελέχη HMUAg20, HMUPss31001 και PD2777, που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, δεν παρουσίασαν ενίσχυση (Εικ. 8). Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, όλες οι βακτηριακές απομονώσεις (55) χαρακτηρίζονται ως *Pseudomonas savastanoi*, επιβεβαιώνοντας τις δοκιμές LOPAT (Penyalver et al, 2000).

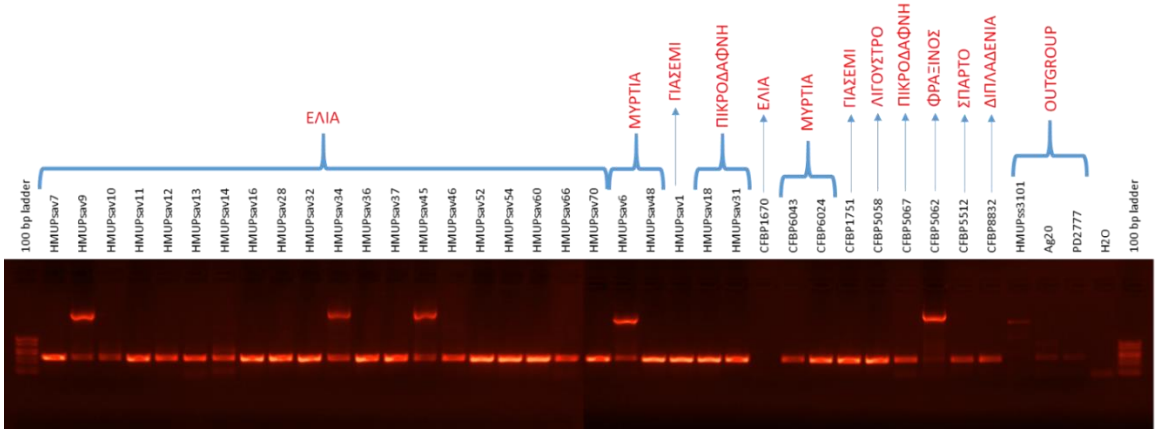


Εικόνα 8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης απομονωμένων στελεχών με τους εξειδικευμένους εκκινητές IAALF/R (ενισχυόμενο τμήμα DNA μεγέθους 454bp) για την ταυτοποίηση τους σε επίπεδο είδους. Τα στελέχη αναφοράς CFBP1670^{T}, CFBP6043, CFBP6024, CFBP1751, CFBP5058, CFBP5067, CFBP5062^{P}, CFBP5512^{P} και CFBP8832^{P}, που χρησιμοποιήθηκαν για θετικό (+) έλεγχο της αντίδρασης, ενώ το H_2O και τα στελέχη *Agrobacterium tumefaciens* (HMUAg20), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (HMUPss31001) και *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (PD2777), για αρνητικό (-) έλεγχο. Ο δείκτης μοριακών μεγεθών (ladder) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 100bp DNA Ladder της EnzyQuest.

3.1.2.2 Εξειδικευμένοι εκκινητές σε επίπεδο παθοποικιλίας *(Pseudomonas savastanoi* pv*. savastanoi, Pseudomonas savastanoi* pv*. nerii, Pseudomonas savastanoi* pv*. fraxini)*

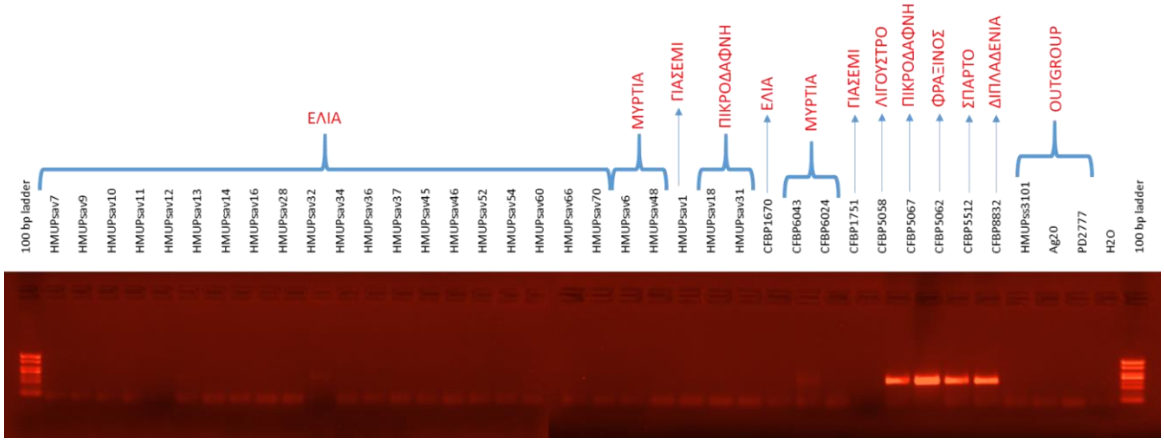
Τα αποτελέσματα της συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με εξειδικευμένους εκκινητές για την ταυτοποίηση των απομονώσεων σε επίπεδο παθοποικιλίας (pv. *savastanoi*, *nerii*, *fraxini*), παρουσιάζονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Οι εξειδικευμένοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις, ήταν οι PsvF/R (ενισχυόμενο τμήμα αντίδρασης 388bp), PsfF/R (ενισχυόμενο τμήμα αντίδρασης 412bp) και PsnF/R (ενισχυόμενο τμήμα αντίδρασης 349bp) για τις παθοποικιλίες *savastanoi*, *nerii* και *fraxini*, αντίστοιχα. Για αυτή την ταυτοποίηση χρησιμοποιήθηκαν είκοσι στελέχη από ελιά, δύο από μυρτιά, ένα από γιασεμί, δύο από πικροδάφνη, ένα στέλεχος αναφοράς από ελιά (CFBP1670^{T}), γιασεμί (CFBP1751), λιγούστρο (CFBP5058), πικροδάφνη (CFBP5067), φράξινο (CFBP5062^{P}), σπάρτο (CFBP5512^{P}), διπλαδένια (CFBP8832^{P}) και δύο από μυρτιά (CFBP6043, CFBP6024). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη HMUPss31001, HMUAg20 και PD2777.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά την PCR με την χρήση των εξειδικευμένων εκκινητών PsvF/R (παθοποικιλία *savastanoi*) παρατηρήθηκε η ενίσχυση του επιθυμητού μεγέθους (388bp) στην πλειονότητα των απομονώσεων, με εξαίρεση το στέλεχος αναφοράς CFBP1670^{T} από ελιά, το CFBP5062^{P} από φράξινο και το HMUPss31001. Ακόμη, παρατηρήθηκε η ύπαρξη ζώνης μεγάλου μήκους βάσεων στα στελέχη HMUPsav9, HMUPsav34 και HMUPsav45 από ελιά, HMUPsav6 από μυρτιά και CFBP5062^{P} από φράξινο (Εικ. 9). Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, δεν παρατηρήθηκε εξειδίκευση όσον αφορά την ταυτοποίηση της παθοποικιλίας *savastanoi* τόσο στα απομονωμένα στελέχη, όσο και στα στελέχη αναφοράς.



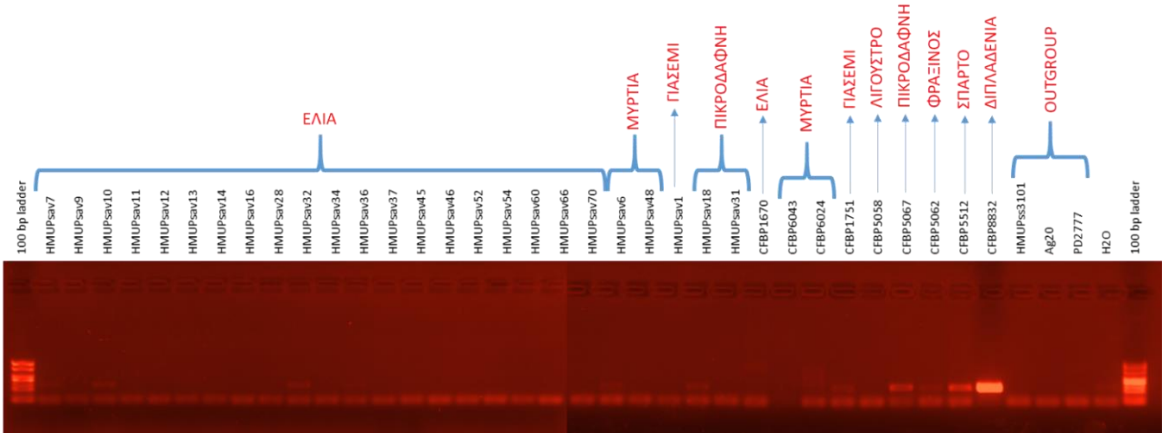
Εικόνα 9. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης απομονωμένων στελεχών με τους εξειδικευμένους εκκινητές PsvF/R (ενισχυόμενο τμήμα DNA μεγέθους 388bp) για την ταυτοποίηση της παθοποικιλίας *savastanoi*. Τα στελέχη αναφοράς του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* CFBP1670^{T}, CFBP6043, CFBP6024, CFBP1751, CFBP5058, χρησιμοποιήθηκαν για θετικό (+) έλεγχο της αντίδρασης, ενώ το H_2O και τα στελέχη CFBP5067, CFBP5062^{P}, CFBP5512^{P}, CFBP8832^{P}, *Agrobacterium tumefaciens* (HMUAg20), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (HMUPss31001) και *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (PD2777), για αρνητικό (-) έλεγχο. Ο δείκτης μοριακών μεγεθών (ladder) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 100bp DNA Ladder της EnzyQuest.

Όσον αφορά την PCR με την χρήση των εξειδικευμένων εκκινητών PsfF/R (παθοποικιλία *fraxini*) παρατηρήθηκε η μη εξειδικευμένη ενίσχυση του επιθυμητού μεγέθους (412bp) από τα τέσσερα στελέχη αναφοράς των παθοποικιλιών *nerii*, *fraxini*, *retacarpa, mandevillae* δηλαδή των CFBP5067 από πικροδάφνη, CFBP5062^{P} από φράξινο, CFBP5512^{P} από σπάρτο και CFBP8832^{P} από διπλαδένια, ενώ δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση σε καμία από τις 23 κρητικές απομονώσεις ή τα στελέχη αναφοράς της παθοποικιλίας *savastanoi* από μυρτιά (CFBP6043, CFBP6024) γιασεμί (CFBP1751), λιγούστρο (CFBP5058) και ελιά (CFBP1670^{T}), όπως και τα δύο κρητικά στελέχη από πικροδάφνη (Εικ. 10).



Εικόνα 10. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης απομονωμένων στελεχών με τους εξειδικευμένους εκκινητές PsfF/R (ενισχυόμενο τμήμα DNA μεγέθους 412bp) για την ταυτοποίηση της παθοποικιλίας *fraxini*. Το στέλεχος αναφοράς του *Pseudomonas savastanoi* pv. *fraxini* CFBP5062^{P}, χρησιμοποιήθηκε για θετικό (+) έλεγχο της αντίδρασης, ενώ το H_2O και τα στελέχη CFBP1670^{T}, CFBP6043, CFBP6024, CFBP1751, CFBP5058, CFBP5067, CFBP5512^{P}, CFBP8832^{P}, *Agrobacterium tumefaciens* (HMUAg20), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (HMUPss31001) και *Pseudomonas syringae pv*. *phaseolicola* (PD2777), για αρνητικό (-) έλεγχο. Ο δείκτης μοριακών μεγεθών (ladder) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 100bp DNA Ladder της EnzyQuest.

Τέλος, όσον αφορά την PCR με την χρήση των εξειδικευμένων εκκινητών PsnF/R, (παθοποικιλία *nerii*) παρατηρήθηκε η μη εξειδικευμένη ενίσχυση του επιθυμητού μεγέθους (349bp) μόνο στις απομονώσεις HMUPsav7, HMUPsav10 και HMUPsav32 από ελιά, HMUPsav6 και HMUPsav48 από μυρτιά, HMUPsav18 από πικροδάφνη και στα στελέχη αναφοράς CFBP1751 από γιασεμί, CFBP5067 από πικροδάφνη, CFBP5062^{P} από φράξινο, CFBP5512^{P} από σπάρτο και CFBP8832^{P} από διπλαδένια (Εικ. 11).

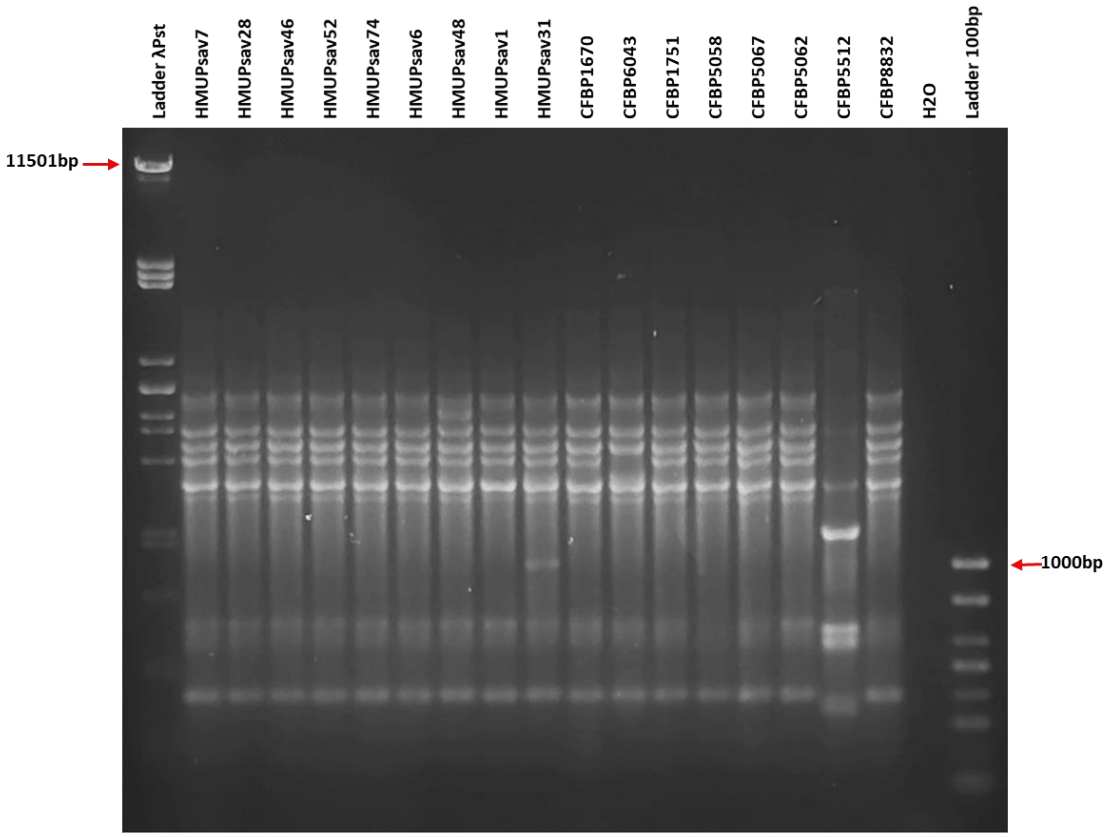


Εικόνα 11. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης απομονωμένων στελεχών με τους εξειδικευμένους εκκινητές PsnF/R (ενισχυόμενο τμήμα DNA μεγέθους 349bp) για την ταυτοποίηση της παθοποικιλίας *nerii.* Το στέλεχος αναφοράς του *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* CFBP5067*,* χρησιμοποιήθηκε για θετικό (+) έλεγχο της αντίδρασης, ενώ το H_2O και τα στελέχη CFBP1670^T, CFBP6043, CFBP6024, CFBP1751, CFBP5058*,* CFBP5062^P, CFBP5512^P, CFBP8832^P, *Agrobacterium tumefaciens* (HMUAg20), *Pseudomonas syringae pv. syringae* (HMUPss31001) *και Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (PD2777), για αρνητικό (-) έλεγχο. Ο δείκτης μοριακών μεγεθών (ladder) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 100bp DNA Ladder της EnzyQuest.

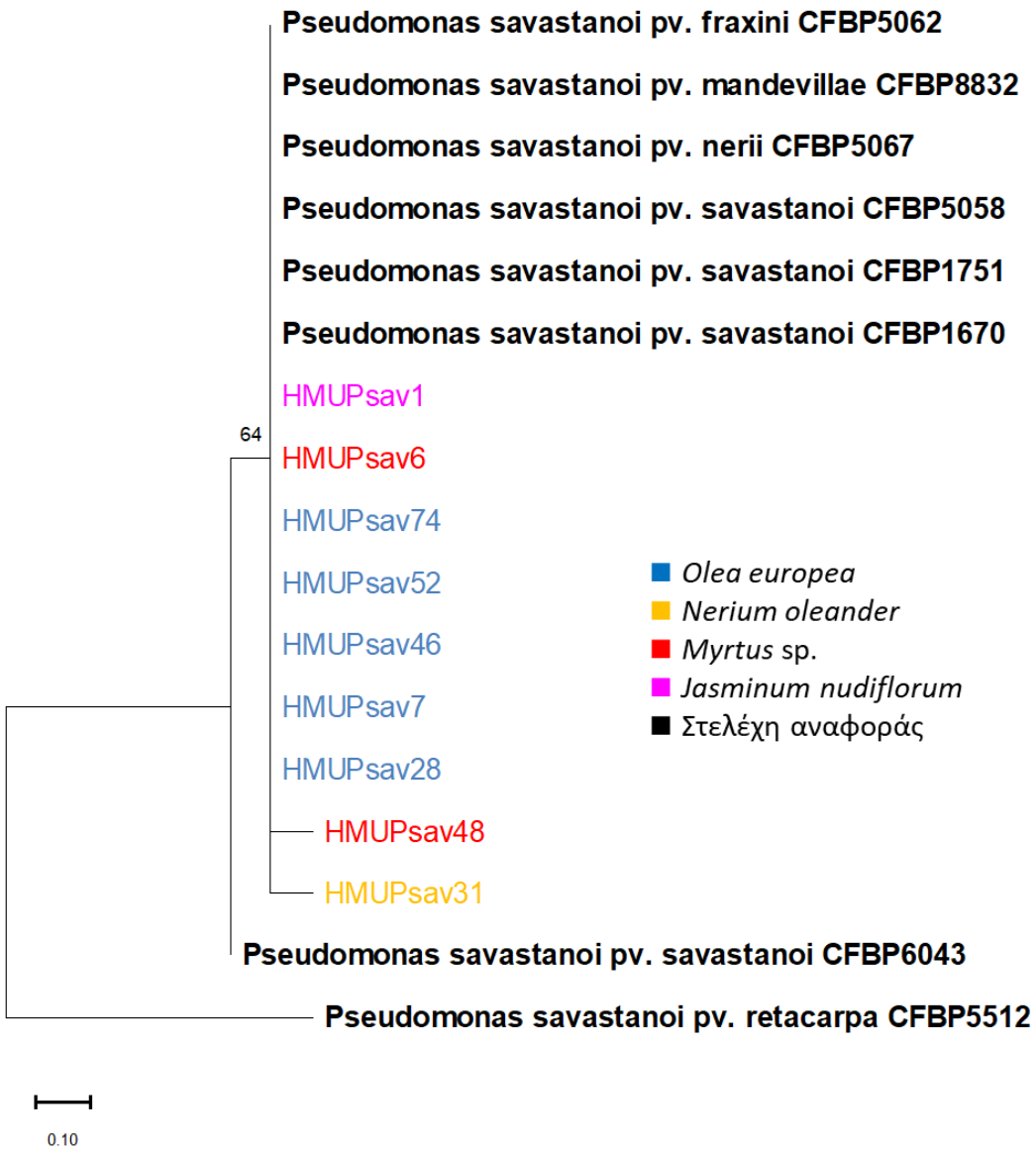
3.1.2.3 Φυλογενετική ανάλυση

3.1.2.3.1 Φυλογενετική ανάλυση με γενετικούς δείκτες BOX

Κατά την εφαρμογή των μοριακών δεικτών BOX οι 13 από 17 απομονώσεις (εννέα κρητικές απομονώσεις από 4 ξενιστές και 6 στελέχη αναφοράς), εμφάνισαν πανομοιότυπο πρότυπο ζώνωσης (μοριακό αποτύπωμα, Εικ. 12), ενώ διαφοροποιήθηκαν στα στελέχη αναφοράς CFBP6043 από μυρτιά και CFBP5512^P από σπάρτο. Ακόμη τα στελέχη HMUPsav48 από μυρτιά και HMUPsav31 από πικροδάφνη διαφοροποιήθηκαν ελάχιστα από τα υπόλοιπα στελέχη του *Pseudomonas savastanoi*. Το πρότυπο ζωνών των βακτηριακών απομονώσεων, εμφανίζεται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (Εικ. 12), ενώ τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν και σε δενδρόγραμμα (Εικ. 13) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGAX (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Συμπεραίνεται η αδυναμία διαφοροποίησης με τους μοριακούς δείκτες BOX των στελεχών του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* σε επίπεδο παθοποικιλίας.



Εικόνα 12. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης απομονωμένων στελεχών με τον εκκινητή BOXA1R, για την φυλογενετική ανάλυση των απομονώσεων. Χρησιμοποιήθηκαν οι απομονώσεις HMUPsav7, HMUPsav28, HMUPsav46, HMUPsav52 και HMUPsav74 από ελιά, HMUPsav31 από πικροδάφνη, HMUPsav6 και HMUPsav48 από μυρτιά, HMUPsav1 από γιασεμί καθώς και τα στελέχη αναφοράς CFBP1670^{T} από ελιά, CFBP6043 από μυρτιά, CFBP1751 από γιασεμί, CFBP5058 από λιγούστρο, CFBP5067 από πικροδάφνη, CFBP5062^{P} από φράξινο, CFBP5512^{P} από σπάρτο και CFBP8832^{P} από διπλαδένια. Το H_2O χρησιμοποιήθηκε για αρνητικό (-) έλεγχο της αντίδρασης. Οι δείκτες μοριακών μεγεθών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι λPstI της εταιρείας Minotech και 100bp DNA Ladder της Enzyquest.

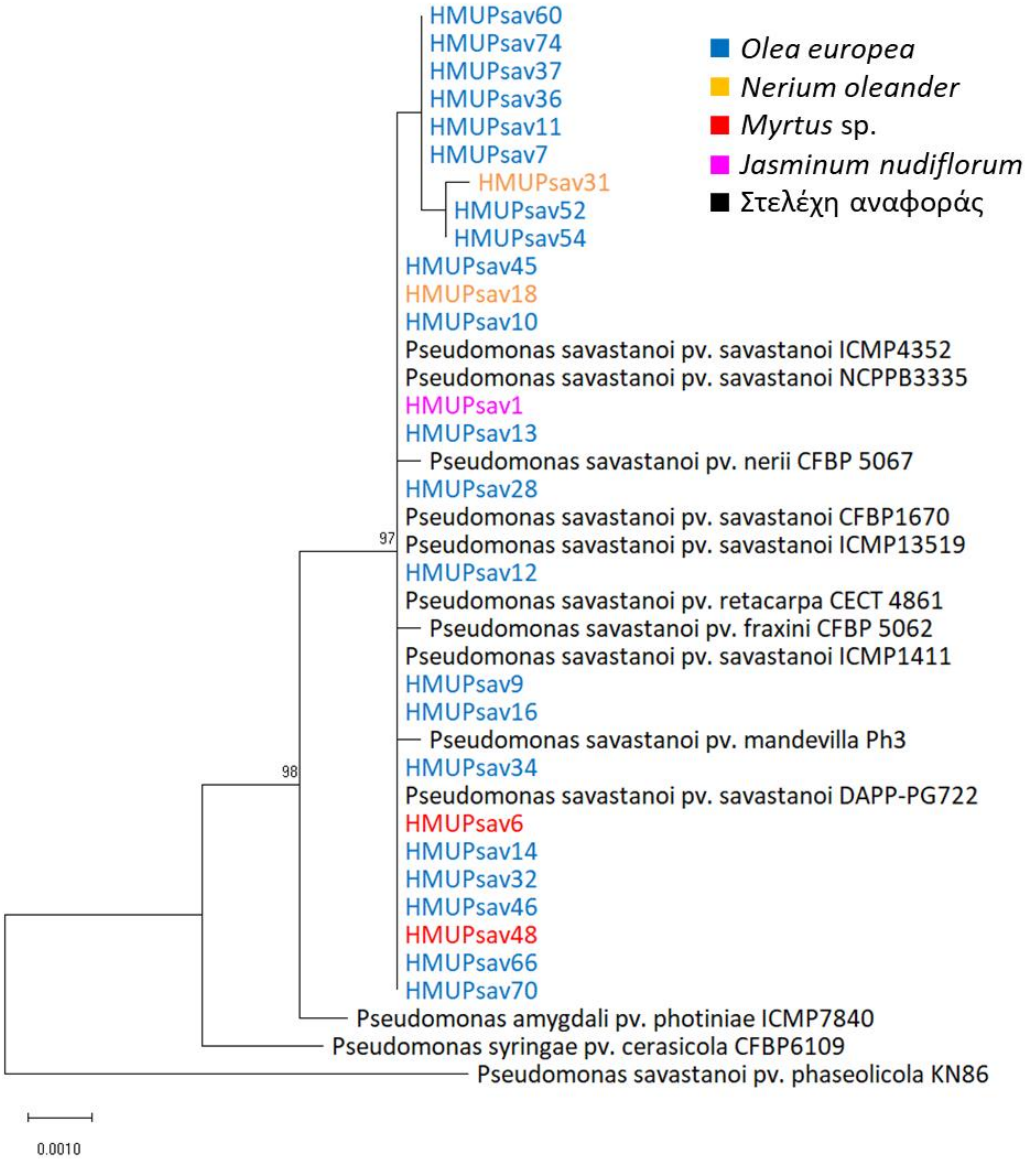


Εικόνα 13. Δενδρόγραμμα με βάση τα αποτελέσματα της BOX PCR, που παρουσιάζει την ομαδοποίηση των φυτοπαθογόνων βακτηριακών απομονώσεων και στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν.

3.1.2.3.2 Φυλογενετική ανάλυση– Ανάλυση Αλληλουχίας Πολλαπλών Τόπων (MLSA)

Η γενετική παραλλακτικότητα είκοσι έξι (είκοσι ένα από ελιά, δύο από μυρτιά, δύο από πικροδάφνη και ένα από γιασεμί) επιλεγμένων απομονώσεων καθώς και του στελέχους αναφοράς CFBP1670^{T}, μελετήθηκε με την ανάλυση MLSA (Multi Locus Sequence Analysis). Το σχήμα MLSA που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από τα γονίδια

gapA, *gyrB*, *gltA* και *rpoD* τα οποία αλληλουχήθηκαν μερικώς. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης MLSA συγκρίθηκαν με άλλα συγγενικά στελέχη από την βάση δεδομένων Genbank και δημιουργήθηκε δενδρόγραμμα Μέγιστης Πιθανοφάνειας. Η φυλογενετική ανάλυση των απομονώσεων, επέτρεψε την ομαδοποίησή τους με άλλα στελέχη του *Pseudomonas savastanoi* σε ποσοστό 97%, ενώ τα διαφοροποίησε σαφώς από άλλα συγγενικά είδη του γένους *Pseudomonas* (*Pseudomonas amygdali* pv. *photiniae*, *Pseudomonas syringae* pv. *cerasicola*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Εικ. 14). Επιπλέον, παρατηρήθηκαν ελάχιστες διαφοροποιήσεις μεταξύ των στελεχών *Pseudomonas savastanoi,* δίχως αυτές να θεωρούνται σημαντικές, καθώς αφορούν ποσοστά κάτω του 80% και δεν επιτρέπουν την ομαδοποίηση των στελεχών σε επίπεδο παθοποικιλίας.



Εικόνα 14. Φυλογενετικό δέντρο με βάση την ενοποιημένη αλληλουχία των γονιδίων *gapA*, *gltA*, *gyrB* και *rpoD* από 26 απομονώσεις σε σύγκριση με άλλα συγγενικά στελέχη από την βάση δεδομένων Genbank. Μόνο οι τιμές bootstrap (1000 επαναλήψεις) πάνω από 80% παρουσιάζονται στους κόμβους των κλάδων.

3.1.3 Δοκιμές παθογένειας σε κλάδους ελιάς

Τα στελέχη που απομονώθηκαν από ελιά προκάλεσαν 100% σχηματισμό συμπτωμάτων. Τα στελέχη *Pseudomonas savastanoi* από μυρτιές προκάλεσαν τον σχηματισμό καρκινωμάτων στις δύο από τις τρεις θέσεις μόλυνσης, ενώ δεν

παρατηρήθηκαν συμπτώματα της ασθένειας κατά την μόλυνση με στελέχη που απομονώθηκαν από το γιασεμί, την πικροδάφνη και τον φράξινο.

3.2 Ευαισθησία των απομονώσεων στον θειικό χαλκό

3.2.1 Προσδιορισμός της συσχέτιση των τιμών της οπτικής πυκνότητας με την συγκέντρωση βακτηριακού αιωρήματος του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

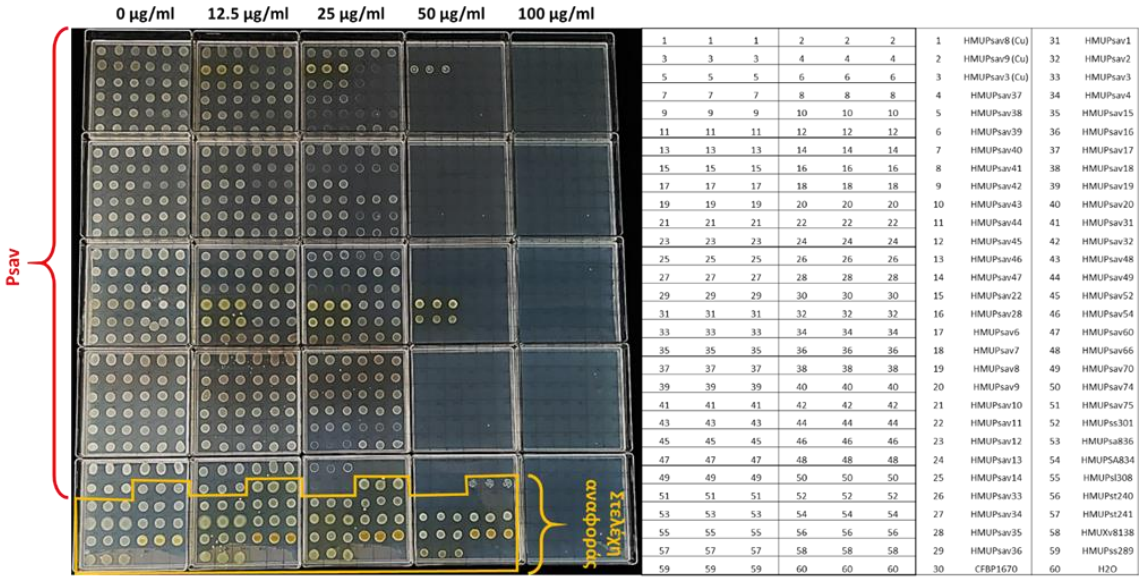
Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων που λήφθηκαν, με τη διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων, για την συσχέτιση των τιμών της οπτικής πυκνότητας (OD_{600nm} = 0,1) με τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's B σε διάστημα 48h. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι σε τιμή οπτικής πυκνότητας OD_{600} = 0,1 αντιστοιχεί συγκέντρωση 3,4 x 10^7 CFU/ml.

Πίνακας 10. Μετρήσεις για την συσχέτιση της οπτικής πυκνότητας με τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ΚΒΜ σε διάστημα 48 ωρών.

Δοκιμές καταμέτρησης	Οπτική πυκνότητα (OD_{600nm})	Αριθμός αποικιών (CFU/ml)			
		Επαναλήψεις			
		A	B	C	M.O
Πρώτη	0,1	4,5 x 10^7	3,7 x 10^7	1,4 x 10^7	**3,2 x 10^7**
Δεύτερη	0,1	3,15 x 10^7	3,45 x 10^7	4,05 x 10^7	**3,55 x 10^7**

3.2.2 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* στον θειικό χαλκό ($CuSO_4$ $5H_2O$), σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar Glucose με κατά θέση εμβολιασμό του βακτηριακού αιωρήματος (spot inoculation)

Πενήντα στελέχη του *Pseudomonas savastanoi* από διάφορους ξενιστές από την Κρήτη εξετάστηκαν συγκριτικά με εννέα βακτηριακά στελέχη αναφοράς. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 15 και στους Πίνακες 11 και 12. Διαπιστώνεται ότι οι τιμές των MIC και MBC είναι όμοιες στα αντίστοιχα βακτηριακά στελέχη.



1	1	1	2	2	2	1	HMUPsav8 (Cu)	31	HMUPsav1
3	3	3	4	4	4	2	HMUPsav9 (Cu)	32	HMUPsav2
5	5	5	6	6	6	3	HMUPsav3 (Cu)	33	HMUPsav3
7	7	7	8	8	8	4	HMUPsav37	34	HMUPsav4
9	9	9	10	10	10	5	HMUPsav38	35	HMUPsav15
11	11	11	12	12	12	6	HMUPsav39	36	HMUPsav16
13	13	13	14	14	14	7	HMUPsav40	37	HMUPsav17
15	15	15	16	16	16	8	HMUPsav41	38	HMUPsav18
17	17	17	18	18	18	9	HMUPsav42	39	HMUPsav19
19	19	19	20	20	20	10	HMUPsav43	40	HMUPsav20
21	21	21	22	22	22	11	HMUPsav44	41	HMUPsav31
23	23	23	24	24	24	12	HMUPsav45	42	HMUPsav32
25	25	25	26	26	26	13	HMUPsav46	43	HMUPsav48
27	27	27	28	28	28	14	HMUPsav47	44	HMUPsav49
29	29	29	30	30	30	15	HMUPsav22	45	HMUPsav52
31	31	31	32	32	32	16	HMUPsav28	46	HMUPsav54
33	33	33	34	34	34	17	HMUPsav6	47	HMUPsav60
35	35	35	36	36	36	18	HMUPsav7	48	HMUPsav66
37	37	37	38	38	38	19	HMUPsav8	49	HMUPsav70
39	39	39	40	40	40	20	HMUPsav9	50	HMUPsav74
41	41	41	42	42	42	21	HMUPsav10	51	HMUPsav75
43	43	43	44	44	44	22	HMUPsav11	52	HMUPss301
45	45	45	46	46	46	23	HMUPsav12	53	HMUPsa836
47	47	47	48	48	48	24	HMUPsav13	54	HMUPSA834
49	49	49	50	50	50	25	HMUPsav14	55	HMUPsl308
51	51	51	52	52	52	26	HMUPsav33	56	HMUPst240
53	53	53	54	54	54	27	HMUPsav34	57	HMUPst241
55	55	55	56	56	56	28	HMUPsav35	58	HMUXv8138
57	57	57	58	58	58	29	HMUPsav36	59	HMUPss289
59	59	59	60	60	60	30	CFBP1670	60	H2O

Εικόνα 15. Απεικόνιση της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar Glucose με διάφορες συγκεντρώσεις ισοδύναμου μεταλλικού χαλκού μετά από 48h.

Πίνακας 11. Ανάπτυξη *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* και στελεχών αναφοράς σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG με ενσωματωμένο θειικό χαλκό ($CuSO_4$ $5H_2O$) σε διάφορες συγκεντρώσεις

Βακτηριακά στελέχη	**Ανάπτυξη βακτηρίων διάφορες σε συγκεντρώσεις**				
(CuSO4 5H2O) (μg/ml)	**0**	**50**	**100**	**200**	**400**
Cu^{++} (μg/ml)	**0**	**12.5**	**25**	**50**	**100**
(CuSO4 5H2O) mM	**0**	**0.2**	**0.4**	**0.8**	**1.6**
Pseudomonas savastanoi					
***Olea europaea* (39)**	+*	+	+ 36/39 (92,3%)	-**	-
***Nerium oleander* (7)**	+	+	+	+ (28,6%)	-
***Myrtus communis* (3)**	+	+	+	-	-
***Jasminum nudiflorum* (1)**	+	+	+	+	-
Στελέχη Αναφοράς					
CFBP1670^T	+	+	+	-	-
***P. syringae* HMU (289, 301, 308)**	+	+	+	+	-
***P.s. actinidiae* HMU (834 & 836)**	+	+	+	-	-
***P.s. tomato* HMU (240 & 241)**	+	+	+	+	-
***X. vesicatoria* HMU (8138)**	+	+	+	+	-

*+: ανάπτυξη στο σύνολο των στελεχών (100%); **-: απουσία ανάπτυξης στο σύνολο των στελεχών (100%); ομαδοποίηση βακτηριακών στελεχών: Κίτρινο = ευαίσθητα στο Cu; Πράσινο = ανεκτικά στο Cu; Κόκκινο = ανθεκτικά στο Cu, σύμφωνα με την μεθοδολογία των Nguyen et al., 2018.

Με βάση την ανάπτυξη στο θρεπτικό υπόστρωμα NAG, η MIC και η MBC προσδιορίστηκαν στα 50 μg/ml ισοδύναμου μεταλλικού χαλκού (MCE), δηλαδή στα 200 μg/ml $CuSO_4$ $5H_2O$, στα 36 από 39 στελέχη της ελιάς (92,3%), στα πέντε από τα επτά στελέχη της πικροδάφνης, στα τρία από μυρτιά και το στέλεχος αναφοράς CFBP1670^T. Επίσης, σε τρία μόνο στελέχη από ελιά στελέχη (HMUPsav7, HMUPsav74 και HMUPsav75) προσδιορίστηκε στα 25 μg/ml, δηλαδή στα 100 μg/ml $CuSO_4$ $5H_2O$. Σε δύο στελέχη της πικροδάφνης (HMUPsav3 και HMUPsav3(Cu)), σε ένα από γιασεμί (HMUPsav1) και στα έξι από τα οκτώ ανθεκτικά στελέχη αναφοράς η MIC και η MBC προσδιορίστηκε στα 100 μg/ml (MCE), δηλαδή στα 400 μg/ml $CuSO_4$ $5H_2O$, (ανώτερη

τιμή), ενώ σε δύο ανθεκτικά στελέχη αναφοράς (HMUPsa834 και HMUPsa836) στα 50 μg/ml, δηλαδή στα 400 μg/ml $CuSO_4$ $5H_2O$. Με βάση την μεθοδολογία των Nguyen et al. (2018) προκύπτει ότι, το 92,3% των στελεχών του βακτηρίου από ελαιώνες στην Κρήτη είναι ανεκτικά στον θειικό χαλκό, ενώ μόνο το 7,7% ευαίσθητα. Ανεκτικά χαρακτηρίστηκαν επίσης το στέλεχος αναφοράς του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* CFBP1670^T από ελιά από τη Γαλλία, οι τρεις απομονώσεις από μυρτιά (HMUPsav6, HMUPsav48 και HMUPsav49), και οι πέντε (HMUPsav4, HMUPsav18, HMUPsav19, HMUPsav20 και HMUPsav31) από τις επτά απομονώσεις της πικροδάφνης από την Κρήτη, όπως και τα δύο στελέχη *P.s. actinidiae* (HMUPsa834 και HMUPsa836) από ακτινιδιά από την Πέλλα. Στη συγκέντρωση των 50 μg/mL ισοδύναμου μεταλλικού χαλκού αναπτύχθηκαν τα δύο (HMUPsav3 και HMUPsav3 (Cu)) από τα επτά στελέχη από πικροδάφνης (28,6%), το ένα στέλεχος από το γιασεμί (HMUPsav1) τα τρία στελέχη του *P. syringae* (HMUPss289, HMUPss301 και HMUPss308), τα δύο του *P.s. tomato* (HMUPst240 και HMUPst241) και το ένα του *Xanthomonas vesicatoria* (HMUXv8138), τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά στο θειικό χαλκό.

Πίνακας 12. Καθορισμός της ελάχιστης συγκέντρωσης παρεμπόδισης ανάπτυξης (MIC) και ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης του σκευάσματος (MBC).

Τιμές MIC και MBC σε ισοδύναμο μεταλλικού Cu^{++} (μg/ml)								
1	HMUPsav8 (Cu)	50	21	HMUPsav10	50	41	HMUPsav31	50
2	HMUPsav9 (Cu)	50	22	HMUPsav11	50	42	HMUPsav32	50
3	HMUPsav3 (Cu)	100	23	HMUPsav12	50	43	HMUPsav48	50
4	HMUPsav37	50	24	HMUPsav13	50	44	HMUPsav49	50
5	HMUPsav38	50	25	HMUPsav14	50	45	HMUPsav52	50
6	HMUPsav39	50	26	HMUPsav33	50	46	HMUPsav54	50
7	HMUPsav40	50	27	HMUPsav34	50	47	HMUPsav60	50
8	HMUPsav41	50	28	HMUPsav35	50	48	HMUPsav66	50
9	HMUPsav42	50	29	HMUPsav36	50	49	HMUPsav70	50
10	HMUPsav43	50	30	$CFBP1670^T$	50	50	HMUPsav74	25
11	HMUPsav44	50	31	HMUPsav1	100	51	HMUPsav75	25
12	HMUPsav45	50	32	HMUPsav2	50	52	HMUPss301	100
13	HMUPsav46	50	33	HMUPsav3	100	53	HMUPsa836	50
14	HMUPsav47	50	34	HMUPsav4	50	54	HMUPsa834	50
15	HMUPsav22	50	35	HMUPsav15	50	55	HMUPss308	100
16	HMUPsav28	50	36	HMUPsav16	50	56	HMUPst240	100
17	HMUPsav6	50	37	HMUPsav17	50	57	HMUPst241	100
18	HMUPsav7	25	38	HMUPsav18	50	58	HMUXv8138	100
19	HMUPsav8	50	39	HMUPsav19	50	59	HMUPss289	100
20	HMUPsav9	50	40	HMUPsav20	50	60	H_2O	-

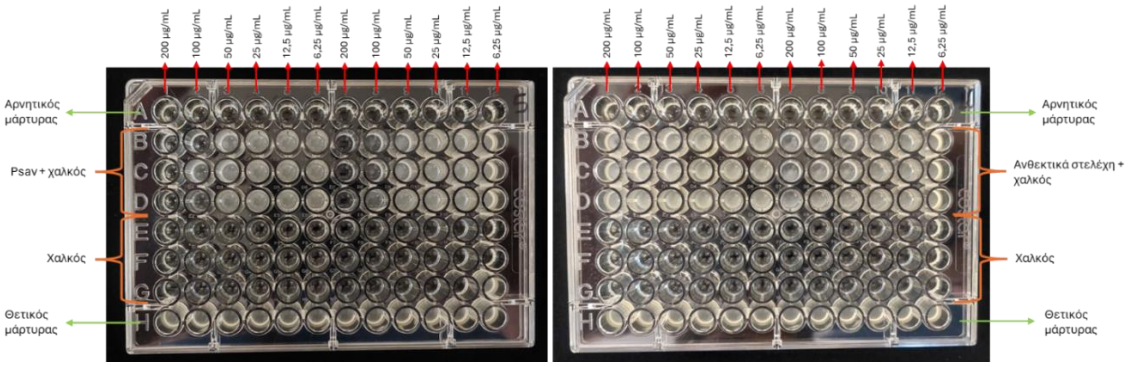
3.2.3 Έλεγχος ευαισθησίας απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* στον θειικό χαλκό ($CuSO_4$ $5H_2O$), σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Broth σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν δεκαέξι στελέχη *Pseudomonas savastanoi* και τέσσερα στελέχη αναφοράς. Τα στελέχη επιλέχθηκαν με βάση τα αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στους Πίνακες 13 και 14 και στις Εικόνες 16, 17, 18 και 19. Στον Πίνακα 13 εμφανίζονται οι τιμές των MIC και MBC για τα 16 Psav και τα 4 ανθεκτικά στο χαλκό στελέχη αναφοράς. Τα αποτελέσματα που εμφανίζονται, καταγράφηκαν με βάση τη θολερότητα/ανάπτυξη, για την MIC, που παρατηρήθηκε στις κυψελίδες των πλακών μικριτιτλοδότησης (Εικ. 16) και την ανάπτυξη καλλιέργειας ή/και αποικιών, για την MBC, κατά τον έλεγχο της βακτηριοκτόνου δράσης

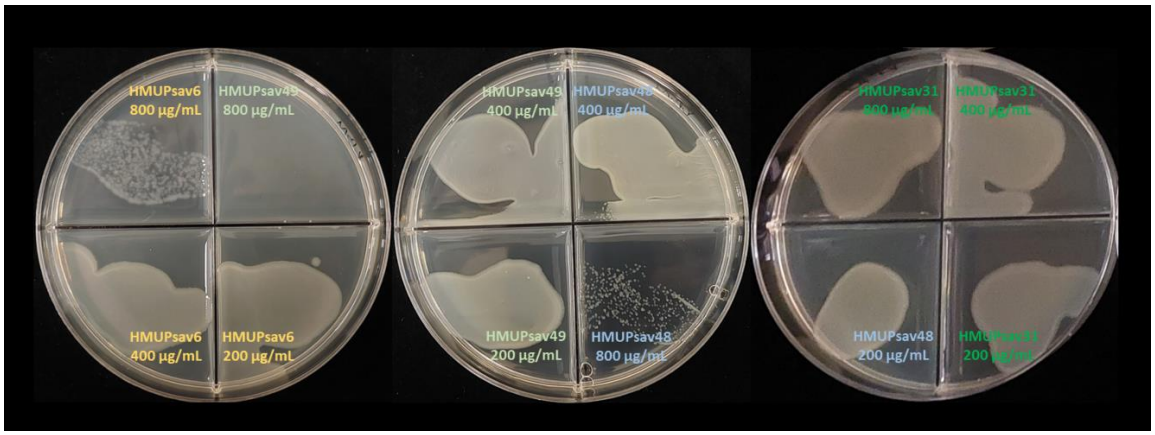
του πενταένυδρου θειικού χαλκού σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα King's B, μετά από επώαση 48h (Εικ. 17). Για το σκοπό αυτό, 50μl από κάθε κυψελίδα των 200, 400, και 800 μg/ml απλώθηκε σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα King΄s B. Διαπιστώνεται ότι, σε 12 από τα 16 στελέχη του *P. savastanoi,* αλλά και στο στέλεχος αναφοράς CFBP1670^{T} οι τιμές της MIC προσδιορίστηκαν στα 800 μg/ml, σε δύο στελέχη (HMUPsav74 και HMUPsav7) στα 400 μg/ml, ενώ σε δύο στελέχη (HMUPsav1 και HMUPsav31) και σε τρία (HMUXv8138, HMUPss289 και HMUPst241) η MIC εκτιμήθηκε ως >800 μg/ml. Η MBC εκτιμήθηκε, από την απουσία ανάπτυξης, στα 800 μg/ml για 4 μόνο στελέχη (HMUPsav46, HMUPsav74, HMUPsav49 και CFBP1670^{T}). Αντίθετα, η MBC εκτιμήθηκε μεγαλύτερη των 800 μg/ml για 10 από τα 16 στελέχη του *P. savastanoi*, στα οποία παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών που κυμαινόταν από 10 μέχρι 320 CFU/50μl, και τα τρία στελέχη του Psav (HMUPsav32, HMUPsav1 και HMUPsav31) όπως και για τα τρία στελέχη αναφοράς (HMUXv8138, HMUPss289 και HMUPst241) που εμφάνισαν συμπαγή ανάπτυξη της καλλιέργειας των βακτηρίων κατά τον έλεγχο της βακτηριοκτόνου δράσης του θειικού χαλκού.

Πίνακας 13. Ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (MIC) της ανάπτυξης των βακτηρίων και ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC), σε επιλεγμένες απομονώσεις του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* μετά από επώαση 48h σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB με πενταένυδρο θειικό χαλκό.

	Συγκέντρωση θειικού χαλκού ($CuSO_4$ $5H_2O$)	
Βακτηριακά στελέχη	**MIC (μg/ml) Απουσία θολερότητας**	**MBC (μg/ml)**
Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi		
HMUPsav46 / Ελιά	800	800 Απουσία ανάπτυξης
HMUPsav32 / Ελιά	800	>800 Συμπαγής ανάπτυξη
HMUPsav8 / Ελιά	800	>800 (>300 CFU/100μl)
HMUPsav16 / Ελιά	800	>800 (>200 CFU /100μl)
HMUPsav60 / Ελιά	800	>800 (>250 CFU /100μl)
HMUPsav74 / Ελιά	400	800 Απουσία ανάπτυξης
HMUPsav7 / Ελιά	400	>800 (>220 CFU /100μl)
HMUPsav14 / Ελιά	800	>800 (>230 CFU /100μl)
HMUPsav2 / Ελιά	800	>800 (>320 αποικίες/100μl)
HMUPsav48 / Μυρτιά	800	>800 (>250 CFU /100μl)
HMUPsav49 / Μυρτιά	800	800 Απουσία ανάπτυξης
HMUPsav6 / Μυρτιά	800	>800 (>320 CFU /100μl)
HMUPsav1 / Γιασεμί	>800	>800 Συμπαγής ανάπτυξη
HMUPsav4 / Πικροδάφνη	800	>800 (19 CFU / 100μl)
HMUPsav18 / Πικροδάφνη	800	>800 (10 CFU /100μl)
HMUPsav31 / Πικροδάφνη	>800	>800 Συμπαγής ανάπτυξη
Στελέχη αναφοράς		
CFBP1670^T / Ελιά	800	800 Απουσία ανάπτυξης
HMUXv8138 / Τομάτα	>800	>800 Συμπαγής ανάπτυξη
HMUPss289 / Μάνγκο	>800	>800 Συμπαγής ανάπτυξη
HMUPst241 / Τομάτα	>800	>800 Συμπαγής ανάπτυξη



Εικόνα 16. Ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών, με εκτίμηση της θολερότητας (ανάπτυξης), σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA με θρεπτικό υπόστρωμα TSB με ενσωματωμένο πενταένυδρο θειικό χαλκό σε διάφορες συγκεντρώσεις.



Εικόνα 17. Έλεγχος βακτηριοκτόνου δράσης πενταένυδρου θειικού χαλκού σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα King's B, μετά από επώαση 48h. Απεικονίζονται ενδεικτικά οι περιπτώσεις που καταγράφηκαν. Σε κάθε θέση έχουν απλωθεί 50μl από το θρεπτικό υπόστρωμα TSB με ενσωματωμένο πενταένυδρο θειικό χαλκό σε διάφορες συγκεντρώσεις μετά από επώαση για 48h στις πλάκες μικροτιτλοδότησης (Εικ. 16) Απουσία ανάπτυξης υποδηλώνει τη βακτηριοκτόνο δράση του χαλκού στην αντίστοιχη συγκέντρωση (HMUPsav49- 800 μg/ml), σε αντίθεση με την ανάπτυξη να εμφανίζεται ως συμπαγής καλλιέργεια (HMUPsav31- 800 μg/ml) ή/και ως αποικίες (HMUPsav48- 800 μg/ml).

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ομαδοποιημένα ανά ξενιστή. Επίσης οι συγκεντρώσεις σε χαλκό που χρησιμοποιήθηκαν έχουν εκφραστεί σε μg/ml και mM $CuSO_4$ $5H_2O$ και σε ισοδύναμο μεταλλικού Cu^{++} (μg/ml). Στο θρεπτικό υπόστρωμα TSB με ενσωμάτωση 400 μg/ml θειικού χαλκού αναπτύχθηκαν όλα τα στελέχη. Στα 800 μg/ml $CuSO_4$ $5H_2O$, αναπτύχθηκαν τα επτά (HMUPsav2, HMUPsav7, HMUPsav8, HMUPsav14, HMUPsav16, HMUPsav32 και HMUPsav60) από τα εννέα

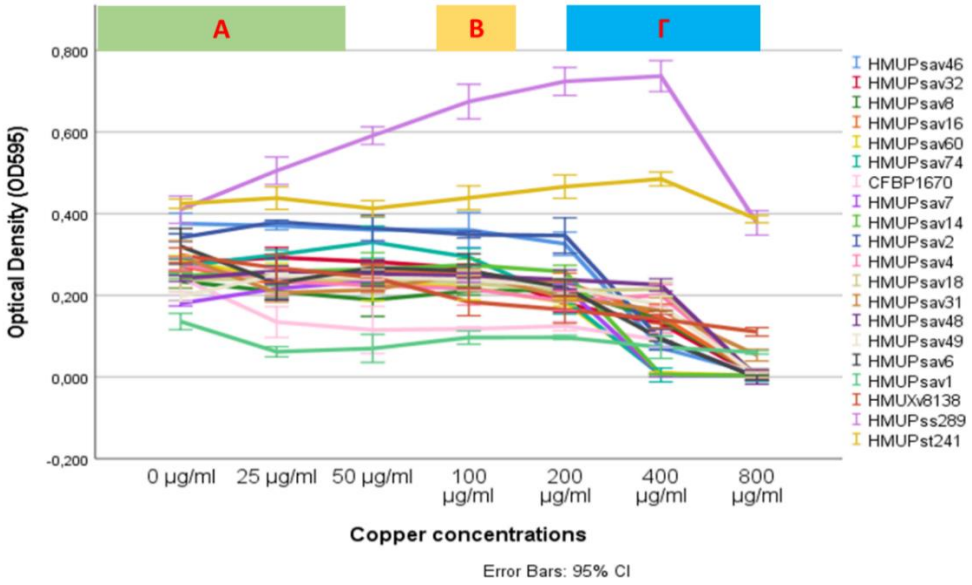
στελέχη του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* από ελιά (77,77%.), τα τρία στελέχη από πικροδάφνη (HMUPsav4, HMUPsav18 και HMUPsav31) και τα δύο (HMUPsav6 και HMUPsav48) από τα τρία της μυρτιάς και το ένα από γιασεμί (HMUPsav1). Το στέλεχος αναφοράς CFBP1670^T, αναπτύχθηκε μέχρι τα 400 μg/ml. Ακόμη, τα ανθεκτικά στελέχη αναφοράς *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (HMUPss289), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (HMUPst241) και *Xanthomonas vesicatoria* (HMUXv8138), αναπτύχθηκαν μέχρι και την συγκέντρωση των 800 μg/ml.

Στις Εικόνες 18 και 19 παρουσιάζεται η ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών στις συγκεντρώσεις των 0, 25, 50, 100, 200, 400 και 800 μg/ml, θειικού χαλκού ($CuSO_4$ $5H_2O$). Παρατηρείται ότι οι τιμές της οπτικής πυκνότητας (OD_{595nm}) παραμένουν με μικρές αυξομειώσεις σταθερές κατά το μάλλον ή ήττον και είναι παρόμοιες με τις τιμές της οπτικής πυκνότητας του μάρτυρα (χωρίς χαλκό), μέχρι και την συγκέντρωση των 200 μg/ml θειικού χαλκού ($CuSO_4$ $5H_2O$) και προφανώς δεν επηρεάζονται άμεσα από την ενσωμάτωση του χαλκού στις επιμέρους συγκεντρώσεις. Στις εικόνες των γραφημάτων, οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα των τιμών τις οπτικής πυκνότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%. Στη συγκέντρωση των 400 μg/ml θειικού χαλκού ($CuSO_4$ $5H_2O$) η μείωση των τιμών της οπτικής πυκνότητας είναι μικρότερη ή ίση για τα περισσότερα στελέχη του Psav σε σχέση με τον μάρτυρα και μηδενίζεται μόνο για τα στελέχη HMUPsav14, HMUPsav48, HMUPsav60 και HMUPsav74. Αντίθετα, διαπιστώνεται σημαντική και μικρότερη αύξηση στις τιμές της οπτικής πυκνότητας για τα ανθεκτικά στελέχη αναφοράς στο χαλκό HMUPss289 και HMUPst241 αντίστοιχα (Eagle's effect, Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021). Στη συγκέντρωση των 800 μg/ml θειικού χαλκού παρατηρείται περαιτέρω μείωση της ανάπτυξης (HMUPsav1 και HMUPsav31) ή/και μηδενισμός (HMUPsav2, HMUPsav4, HMUPsav6, HMUPsav7, HMUPsav8, HMUPsav16, HMUPsav18, HMUPsav32, HMUPsav46 και HMUPsav49) της, ενώ στα ανθεκτικά στελέχη HMUPss289 και HMUPst241 σημειώθηκαν τιμές οπτικής πυκνότητας παρόμοιες με αυτές του μάρτυρα χωρίς Cu, σε αντίθεση με το στέλεχος HMUXv8138 του οποίου οι τιμές μειώθηκαν δίχως να μηδενίζονται.

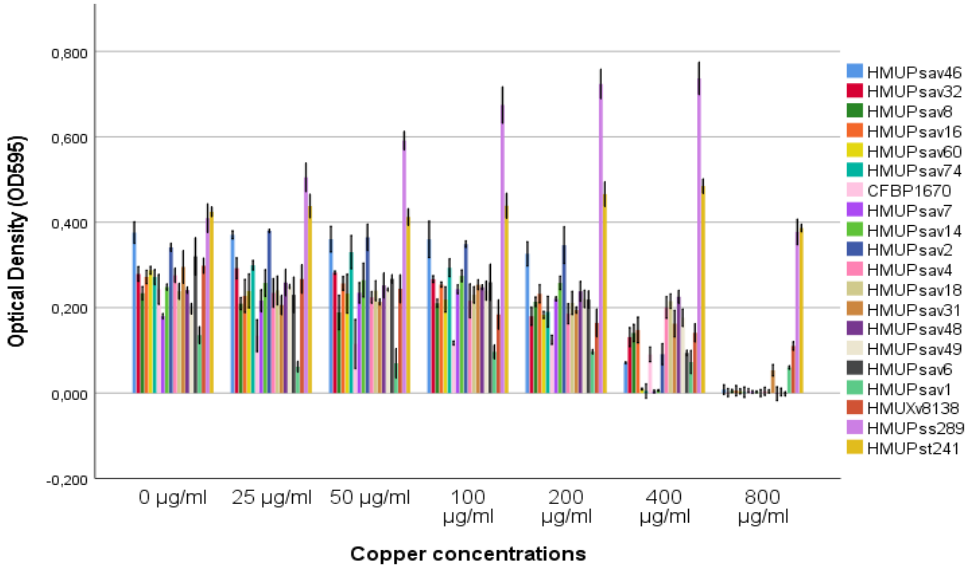
Πίνακας 14. Ανάπτυξη των στελεχών του *Pseudomonas savastanoi* συγκριτικά με ανθεκτικά στελέχη σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Broth με ενσωματωμένο θειικό χαλκό, μετά από επώαση 48h.

	Ανάπτυξη βακτηρίων σε συγκεντρώσεις χαλκού						
CuSO4 5H2O (μg/ml)	0	25	50	100	200	400	800
Cu^{++} (μg/ml)	0	6,25	12,5	25	50	100	200
CuSO4 5H2O (mM)	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3,2
Βακτηριακά στελέχη							
Pseudomonas savastanoi							
***Olea europaea* (9)**	+*	+	+	+	+	+	+77,8%
***Nerium oleander* (3)**	+	+	+	+	+	+	+
***Myrtus communis*(3)**	+	+	+	+	+	+	+66,7%
***Jasminum nudiflorum* (1)**	+	+	+	+	+	+	+
Στελέχη Αναφοράς							
CFBP1670^{T}	+	+	+	+	+	+	-**
***Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (HMU289)**	+	+	+	+	+	+	+
***Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (HMU241)**	+	+	+	+	+	+	+
***Xanthomonas vesicatoria* (HMU8138)**	+	+	+	+	+	+	+

*Ανάπτυξη; **Απουσία ανάπτυξης



Εικόνα 18. Ανάπτυξη βακτηριακών απομονώσεων σε διάφορες συγκεντρώσεις θειικού χαλκού μετά από 48h. Τα στελέχη που αναπτύσσονται μεταξύ 0-40 μg/ml (A) δραστικής ουσίας χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα, από 80-120 μg/ml ανεκτικά (Β) και τουλάχιστον στα 200 μg/ml ανθεκτικά (Γ), σύμφωνα με την μεθοδολογία των Nguyen et al, 2018.



Εικόνα 19. Τιμές οπτικής πυκνότητας (OD_{595nm}) των βακτηριακών απομονώσεων στις συγκεντρώσεις των 0, 25, 50, 100, 200, 400 και 800 μg/ml, θειικού χαλκού, μετά από 48h. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα των τιμών τις οπτικής πυκνότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.

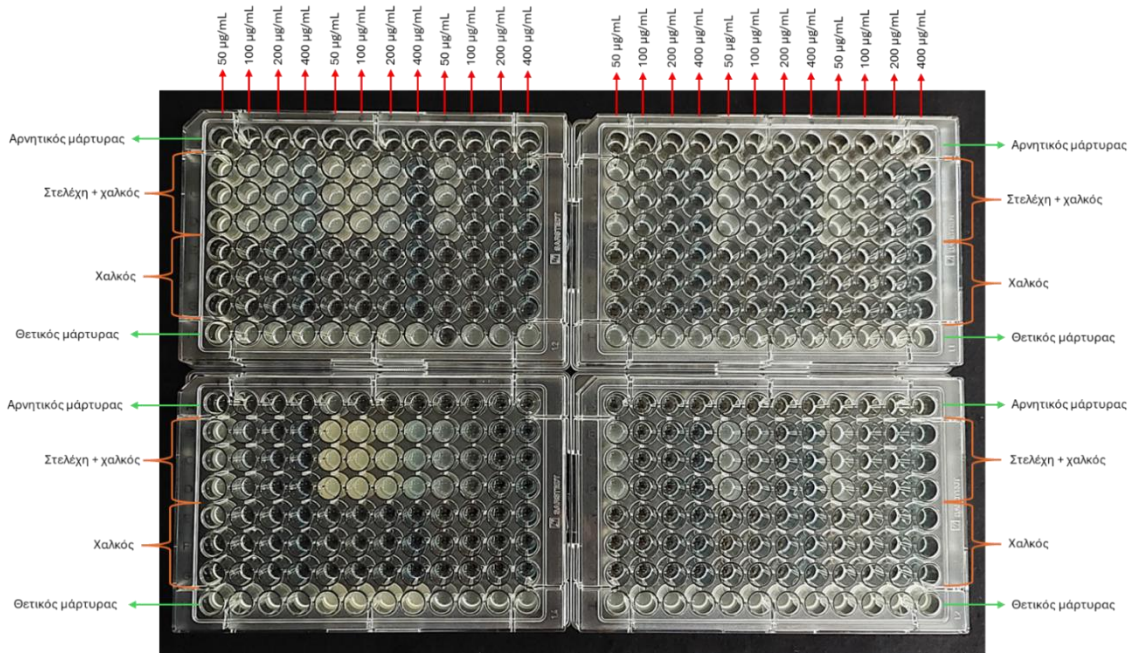
3.3 Αποτελεσματικότητα εγκεκριμένων χαλκούχων σκευασμάτων έναντι απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

3.3.1 Διερεύνηση αποτελεσματικότητας εγκεκριμένων χαλκούχων σκευασμάτων έναντι των απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Broth σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάζονται στις Εικόνες 20 μέχρι 26. Στην εργασία χρησιμοποιήθηκαν εννέα στελέχη του Psav HMUPsav54, HMUPsav66, HMUPsav10, HMUPsav14, HMUPsav2, HMUPsav45, HMUPsav74, HMUPsav34, HMUPsav7, όπως και τρία στελέχη ανθεκτικά στο χαλκό (HMUPst240, HMUPfl498, Unknown bacterial strain). Οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν με το Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (έκδοση 26), και οι μπάρες αποτυπώνουν την διακύμανση των τιμών των τριών επαναλήψεων ανά επέμβαση και βακτήριο. Στην Εικόνα 20 απεικονίζεται η ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών σε κυψελίδες πλακών μικροτιτλοδότησης ELISA με θρεπτικό υπόστρωμα TSB και ενσωμάτωση χαλκούχου σκευάσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις, μετά από επώαση 48h, των εμβολιασμένων

στελεχών. Οι συγκεντρώσεις των χαλκούχων σκευασμάτων είναι σε μg/ml δραστικής ουσίας.

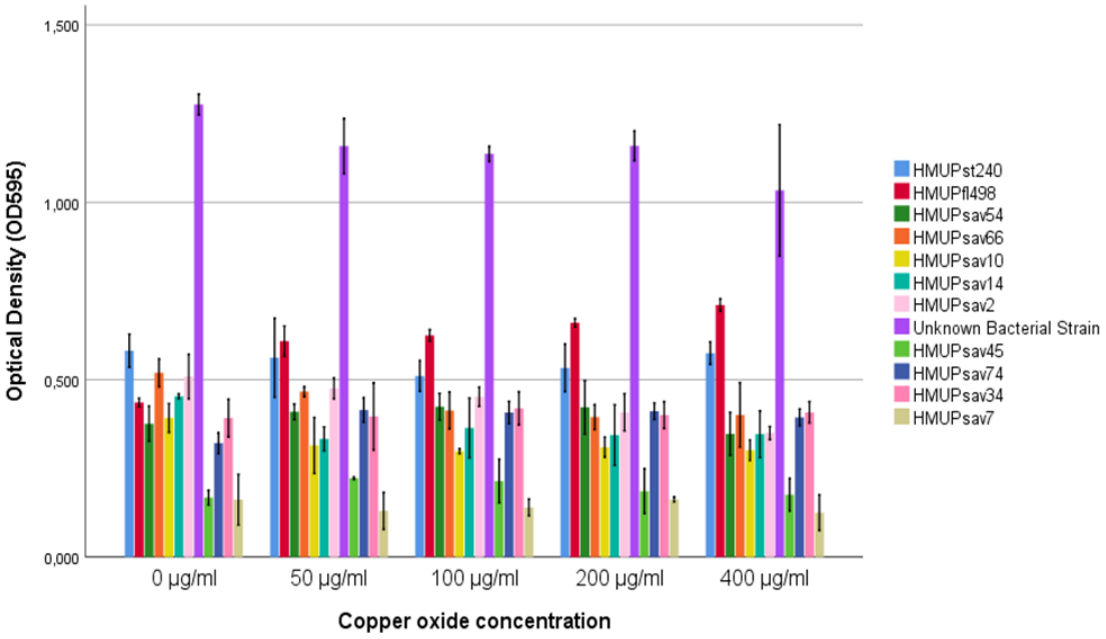
Παρατηρείται ότι σε όλα τα γραφήματα ανάπτυξης (Εικ. 21 μέχρι 25) των βακτηριακών στελεχών, η ανάπτυξη για τα τρία ανθεκτικά στελέχη δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τα χαλκούχα σκευάσματα και σε καμία από τις συγκεντρώσεις τους, εκτός από το στέλεχος HMUPfl498 του οποίου η ανάπτυξη μηδενίστηκε μόνο στα 400μg/ml τριβασικού θεικού χαλκού. Αντίστοιχα η παρεμποδιστική δράση (%) των ενώσεων οξειδίου του χαλκού, υδροξειδίου του χαλκού, οξυχλωριούχου χαλκού, βορδιγάλειου πολτού και τριβασικού θειικού χαλκού με τα ανθεκτικά στελέχη εμφανίζεται αντιστρόφως ανάλογη σε σχέση με την ανάπτυξη των αντίστοιχων στελεχών (Εικ. 26).



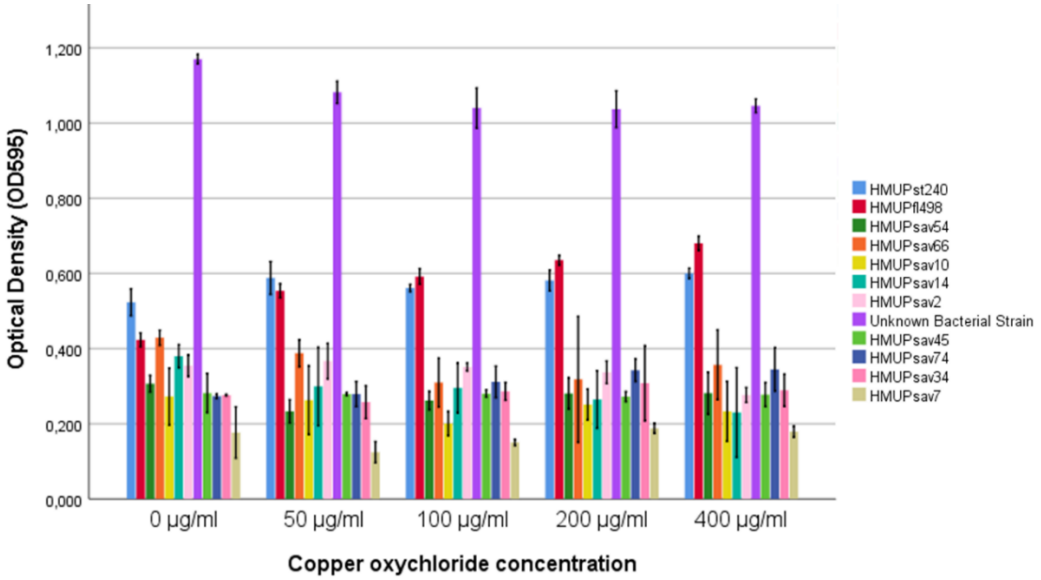
Εικόνα 20. Ανάπτυξη βακτηριακών απομονώσεων σε κυψελίδες πλακών μικροτιτλοδότησης ELISA με θρεπτικό υπόστρωμα TSB, ενσωμάτωση χαλκούχων σκευασμάτων, μετά από επώαση 48h των εμβολιασμένων στελεχών. Οι συγκεντρώσεις των χαλκούχων σκευασμάτων είναι σε μg/ml δραστικής ουσίας.

Το οξείδιο του χαλκού και ο οξυχλωριούχος χαλκός δεν προκάλεσαν σημαντική μείωση των τιμών της οπτικής πυκνότητας, δηλαδή στην ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών σε καμία από τις επεμβάσεις με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των ενώσεων (Εικ. 21 & 22). Οι τιμές της OD αν και εμφανίζουν διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα

στελέχη, κατά γενικό κανόνα παραμένουν όμοιες με τις αντίστοιχες τιμές OD του μάρτυρα και μη στατιστικά σημαντικά διαφορετικές σε επίπεδο σημαντικότητας 95%. Τα ίδια συμπεράσματα προκύπτουν από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 26 σε σχέση με την αποτελεσματικότητα του οξειδίου του χαλκού και του οξυχλωριούχου χαλκού, η οποία κρίνεται ως χαμηλή, αφού παραμένει μικρότερη του 40% ακόμη και στην υψηλότερη συγκέντρωση των 400 μg/ml.

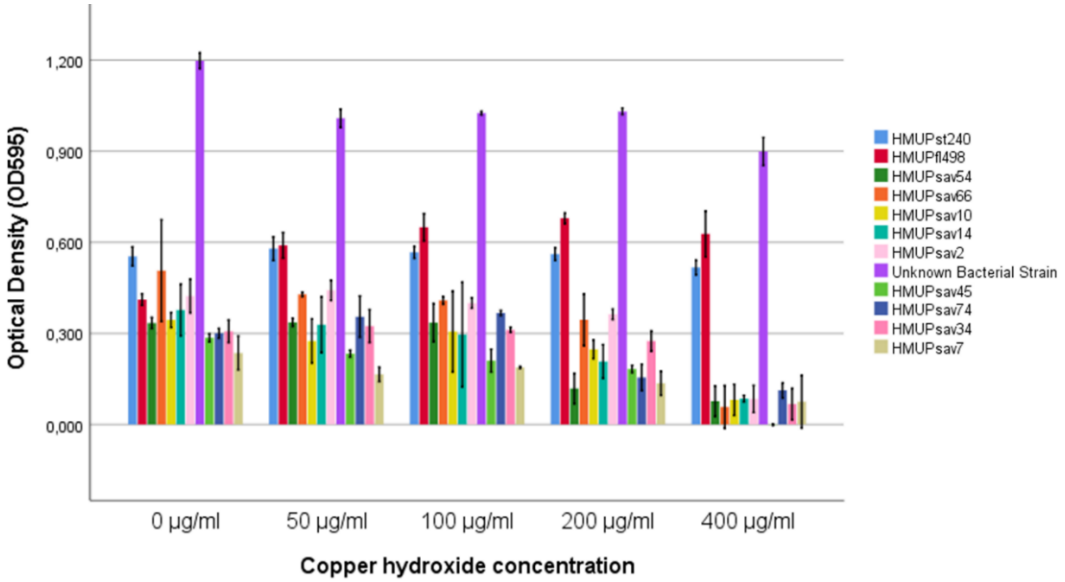


Εικόνα 21. Τιμές οπτικής πυκνότητας διαφορετικών βακτηριακών στελεχών μετά από ανάπτυξη 48h, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB, σε διάφορες συγκεντρώσεις χαλκούχου σκευάσματος με δραστική ουσία το οξείδιο του χαλκού. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα των τιμών οπτικής πυκνότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.



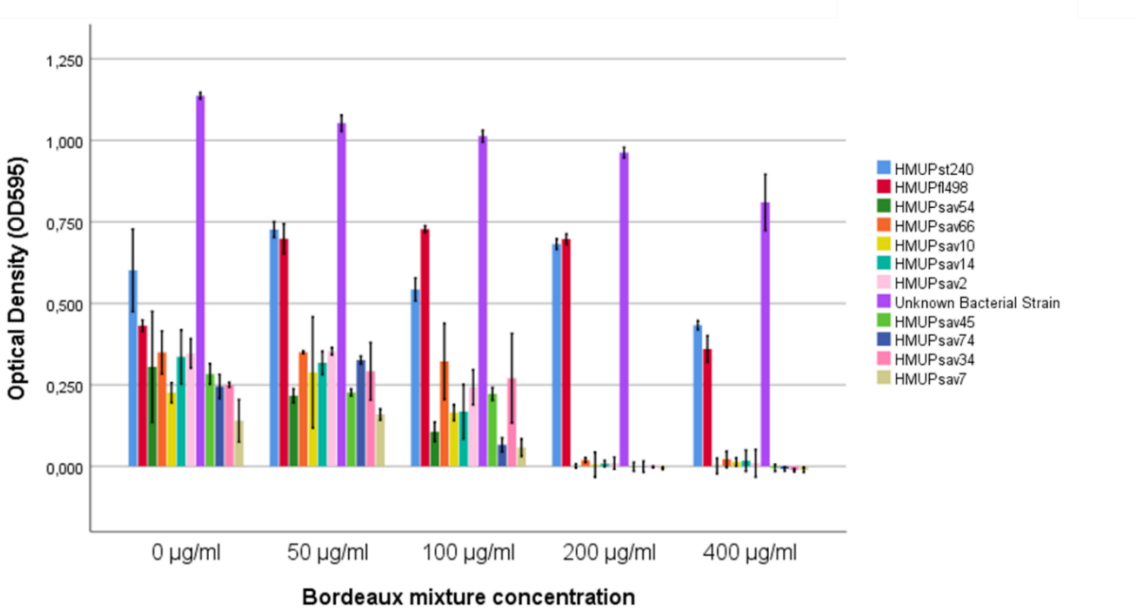
Εικόνα 22. Τιμές οπτικής πυκνότητας διαφορετικών βακτηριακών στελεχών μετά από ανάπτυξη 48h, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB, σε διάφορες συγκεντρώσεις χαλκούχου σκευάσματος με δραστική ουσία τον οξυχλωριούχο χαλκό. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα των τιμών οπτικής πυκνότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.

Σε αντίθεση, το υδροξείδιο του χαλκού προκάλεσε την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των βακτηρίων ήδη από την συγκέντρωση των 200 μg/ml και η οποία ήταν ακόμη μεγαλύτερη στη συγκέντρωση των 400μg/ml, δραστικής ουσίας (Εικ. 23). Διαπιστώνονται σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς την ανάπτυξη των στελεχών και στις δύο συγκεντρώσεις, εντούτοις για κανένα στέλεχος η ανάπτυξη δεν μηδενίζεται σε καμία από αυτές τις συγκεντρώσεις, εκτός από το στέλεχος HMUPsav45 στα 400 μg/ml. Η αποτελεσματικότητα της ένωσης του υδροξειδίου του χαλκού κρίνεται ως μέτρια, αφού ακόμη και στην συγκέντρωση των 400 μg/ml, η παρεμπόδιση που παρατηρήθηκε σε όλα σχεδόν τα στελέχη κυμαινόταν από 60 μέχρι 80% (ενώ στις μικρότερες συγκεντρώσεις εμφανίζεται μικρότερη του 40%), εκτός από το στέλεχος HMUPsav45 που ήταν 100% και τα ανθεκτικά στελέχη HMUPst240, HMUPfl498, Unknown bacterial strain η αποτελεσματικότητα στα οποία κυμάνθηκε από 10 μέχρι 25% στη συγκέντρωση των 400 μg/ml (Εικόνα. 26).

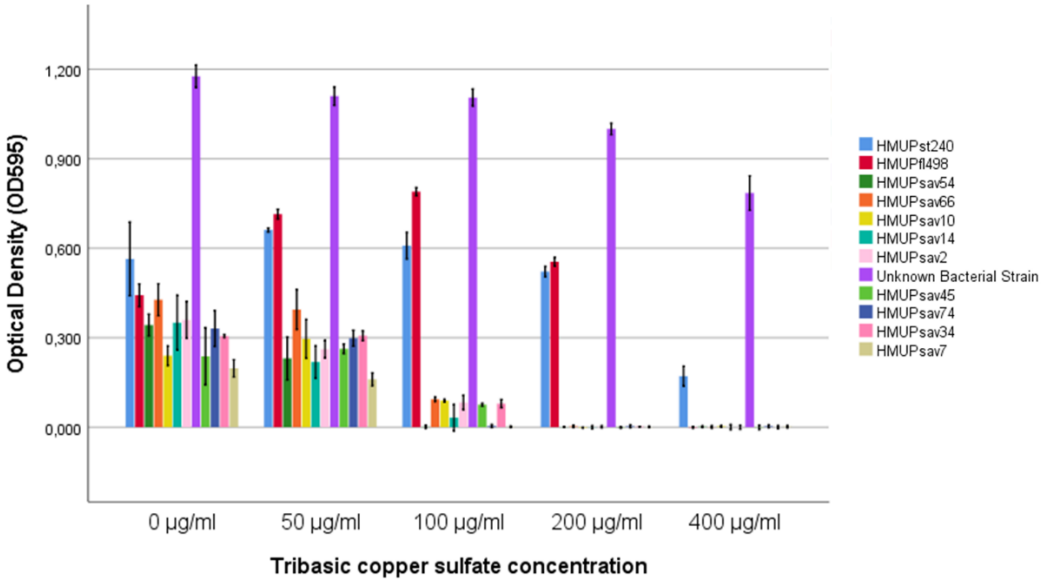


Εικόνα 23. Τιμές οπτικής πυκνότητας διαφορετικών βακτηριακών στελεχών μετά από ανάπτυξη 48h, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB, σε διάφορες συγκεντρώσεις χαλκούχου σκευάσματος με δραστική ουσία το υδροξείδιο του χαλκού. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα των τιμών οπτικής πυκνότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.

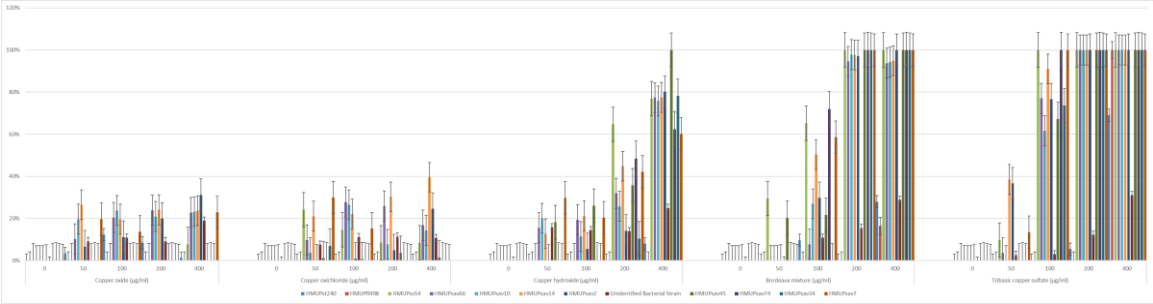
Τέλος, ο βορδιγάλειος πολτός και ο τριβασικός θειικός χαλκός προκάλεσαν σημαντική μείωση στις τιμές της οπτικής πυκνότητας στις καλλιέργειες των βακτηρίων ήδη από την συγκέντρωση των 100 μg/ml, ενώ στις συγκεντρώσεις των 200 μg/ml και 400 μg/ml στον βορδιγάλειο πολτό σημειώθηκε μηδενική μέχρι πολύ μικρή ανάπτυξη (Εικ. 24), ενώ στον τριβασικό θειικό χαλκό η ανάπτυξη των βακτηριών ήταν μηδενική και στις δύο συγκεντρώσεις (Εικ. 25). Παρόμοια συμπεράσματα εξάγονται από την εικόνα 26, σε σχέση με την αποτελεσματικότητα των δύο ενώσεων, όπου διαπιστώνεται ότι η αποτελεσματικότητά τους κρίνεται ως υψηλή και για τις δύο συγκεντρώσεις των 200 μg/ml και 400 μg/ml, δεδομένου ότι η παρεμπόδιση που παρατηρήθηκε σε όλα τα στελέχη (πλην των ανθεκτικών) στον τριβασικό θειικό χαλκό ήταν στο 100% ενώ στον βορδιγάλειο πολτό κυμαινόταν από 95 μέχρι 100%. Από τα ανθεκτικά στελέχη ο τριβασικός θειικός χαλκός εμφανίζεται αποτελεσματικός 100% έναντι του HMUPfl498 στα 400 μg/ml.



Εικόνα 24. Τιμές οπτικής πυκνότητας διαφορετικών βακτηριακών στελεχών μετά από ανάπτυξη 48h, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB, σε διάφορες συγκεντρώσεις χαλκούχου σκευάσματος με δραστική ουσία τον βορδιγάλειο πολτό. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα των τιμών οπτικής πυκνότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.



Εικόνα 25. Τιμές οπτικής πυκνότητας διαφορετικών βακτηριακών στελεχών μετά από ανάπτυξη 48h, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB, σε διάφορες συγκεντρώσεις χαλκούχου σκευάσματος με δραστική ουσία τον τριβασικό θειικό χαλκό. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα των τιμών οπτικής πυκνότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.



Εικόνα 26. Παρεμποδιστική δράση (%) των ενώσεων οξειδίου του χαλκού, υδροξειδίου του χαλκού, οξυχλωριούχου χαλκού, βορδιγάλειου πολτού και τριβασικού χαλκού στις συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 200 και 400 μg/ml, σε σύγκριση με το μάρτυρα (0 μg/ml), έναντι εννέα στελεχών του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* και τριών ανθεκτικών στο χαλκό βακτηριακών στελεχών. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 3 επαναλήψεων ανά απομόνωση και συγκέντρωση.

4 Συμπεράσματα- Συζήτηση

4 Συμπεράσματα- Συζήτηση

Η φαινοτυπική και βιοχημική ταυτοποίηση των απομονώσεων του βακτηρίου από ελαιόδεντρα και άλλους ξενιστές του βακτηρίου από την Κρήτη, υποδεικνύει την απόλυτη ομοιότητα (100%) με το βακτήριο αναφοράς CFBP1670^T του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Εντούτοις, τα αποτελέσματα δεν επιτρέπουν την αξιόπιστη διαφοροποίηση των παθοποικιλιών του *Pseudomonas savastanoi*, λόγω της υψηλής συσχέτισης των δοκιμών μεταξύ των τεσσάρων παθοποικιλιών του βακτηρίου και των απομονώσεων της ελιάς από την Κρήτη, η ομοιότητα των οποίων κυμαίνεται από 86-100% και πιο συγκεκριμένα 100%, 96%, 86% και 96% για τις παθοποικιλίες: *nerii, fraxini, retacarpa και mandevillae* αντίστοιχα. Αντίθετα, επιτρέπουν την διαφοροποίηση των στελεχών του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* από στελέχη του *Pseudomonas syringae* complex, αφού η συσχέτιση των δοκιμών με τα στελέχη του *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ήταν 86% και του *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* 82%. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν, κατά την εξέταση τριάντα πέντε φαινοτυπικών δοκιμών, με την ταύτιση των δοκιμών σε ποσοστό 100%, ανάμεσα στα στελέχη της ελιάς από την Κρήτη και με το στέλεχος αναφοράς CFBP1670^T, αλλά και την ακόμη μεγαλύτερη διαφοροποίησή τους από τα στελέχη του *Pseudomonas syringae* complex με τα ποσοστά ομοιότητας στις δοκιμές να προσδιορίζονται στο 74,3% και 77,1% για τα στελέχη *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* και του *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* αντίστοιχα. Η διαφοροποίηση ήταν ακόμη μεγαλύτερη με τα στελέχη του *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 51,4% και 66% από ακτινιδιά και μαρούλι αντίστοιχα. Συμπερασματικά τα αποτελέσματα των δοκιμών επιτρέψαν την ομαδοποίηση των στελεχών του *Pseudomonas savastanoi* (Psav) από ελιά και την διαφοροποίηση τους από λιγότερο ή περισσότερο συγγενικά στελέχη στο γένος *Pseudomonas*, όμως η χρησιμοποίηση τους για σκοπούς προσδιορισμού και ταυτοποίησης είναι χρονοβόρα και εργώδης και μπορούν να χρησιμοποιούνται μόνο επιβεβαιωτικά σε γρηγορότερες μεθόδους (Bozkurt et al, 2014; Tsuji et al, 2015).

Τα αποτελέσματα της εργασίας για τη μοριακή ταυτοποίηση με τους εξειδικευμένους εκκινητές IAAF/R σε επίπεδο είδους, ταυτίζονται με εκείνα άλλων

ερευνητών (Moretti et al., 2008; Taghavi & Hasani, 2012; Tsuji et al, 2015) και διαπιστώνεται ότι η χρησιμοποίηση τους πράγματι αποτελεί μια γρήγορη και αξιόπιστη μεθοδολογία γρήγορης και έγκυρης ανίχνευσης του βακτηρίου και μπορεί να συνδυαστεί επιβεβαιωτικά με τις γρήγορες δοκιμές LOPAT (Penyalver et al, 2000).

Η προσπάθεια μοριακής ταυτοποίησης με τους προτεινόμενους εξειδικευμένους εκκινητές σε επίπεδο παθοποικιλίας (Tegli et al., 2010), δεν κατέστη δυνατή, πολύ πιθανά λόγω μη εξειδίκευσης των εκκινητών. Εξάλλου, από την βιβλιογραφική ανασκόπηση δεν προέκυψε η γενικευμένη χρήση τους.

Η φυλογενετική ανάλυση των απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* από την Κρήτη με τους γενετικούς δείκτες BOX, επέτρεψε την ομαδοποίησή τους με άλλα στελέχη του *Pseudomonas savastanoi*, αν και δεν κατέστη δυνατή η διαφοροποίηση τους από τις υπόλοιπες παθοποικιλίες του βακτηρίου, κάτι που συμβαδίζει με την μελέτη των Scortichini et al., 2004, όπου στην ανάλυση τους χρησιμοποιήθηκαν τρεις εκκινητές (REP1R-I/REP2-I, ERIC1R/ERIC2 και BOXA1R) με τα στελέχη που εξετάστηκαν να έχουν απομονωθεί από διάφορες περιοχές της Ιταλίας. Σε αντιδιαστολή, από την εργασία των Moretti et al. (2017), στην οποία αναλύθηκαν με rep-PCR, 124 απομονώσεις του βακτηρίου από 15 χώρες της Μεσογείου προέκυψε ομαδοποίηση σε τέσσερεις υποομάδες ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση των απομονώσεων, οι οποίες με τη σειρά τους φαίνεται, σύμφωνα με τους συγγραφείς, να αντιστοιχούν σε ιστορικά γεγονότα ανθρώπινης μετανάστευσης και εμπορικές διαδρομές στη Μεσόγειο θάλασσα. Η φυλογενετική ανάλυση των απομονώσεων του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* από την Κρήτη με τους γενετικούς δείκτες με αλληλούχηση πολλαπλών γενετικών τόπων (Multi Locus Sequence Analysis, MLSA), επέτρεψε την ομαδοποίησή τους με άλλα στελέχη του *Pseudomonas savastanoi* σε υψηλά ποσοστά (97-100%), αλλά δεν κατέστη δυνατή η διαφοροποίηση τους από τις άλλες παθοποικιλίες του βακτηρίου, ενώ τα διαφοροποίησε σαφώς από άλλα συγγενικά είδη του γένους *Pseudomonas* (*Pseudomonas amygdali* pv. *photiniae*, *Pseudomonas syringae* pv. *cerasicola*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*). Επιπλέον, οι ελάχιστες διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των στελεχών *Pseudomonas savastanoi,* δεν θεωρούνται σημαντικές, καθώς αφορούν ποσοστά κάτω του 80% και

δεν επιτρέπουν την ομαδοποίηση των στελεχών σε επίπεδο παθοποικιλίας (Marchi et al., 2005). Τα αποτελέσματα συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα των Moretti et al. (2017), με μοναδική εξαίρεση ότι στην εργασία μας δεν διαφοροποιήθηκε το στέλεχος *Pseudomonas savastanoi* pv. *retacarpa*. Με βάση την φυλογενετική ανάλυση προκύπτει ότι απομονώσεις του *Pseudomonas savastanoi* που προέρχονται από κοντινές περιοχές δεν παρουσιάζουν γενετική ποικιλομορφία, κάτι που πιθανά να οφείλεται στην διασπορά του βακτηρίου κυρίως ως επίφυτο με το ασυμπτωματικό πολλαπλασιαστικό υλικό ή με άλλους τρόπους διασποράς του (αερολύματα, μηχανικά μέσα κ.ά.) (Ramos et al., 2012) .

Από τα αποτελέσματα της εργασίας προκύπτει διαφοροποίηση στις εκτιμώμενες τιμές MIC και MBC για τα στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* ανάλογα αν η εκτίμηση της ανάπτυξης γίνεται σε στερεό ή σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Κατά την εξέταση σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα NAG, η MIC και η MBC προσδιορίστηκε στα 50 μg/ml ισοδύναμου μεταλλικού χαλκού (MCE) στα 36 από τα 39 στελέχη της ελιάς (92,3%), στα 5 από τα 7 στελέχη της πικροδάφνης, στα 3 από μυρτιά και το στέλεχος αναφοράς CFBP1670^{T}. Επίσης, σε τρία μόνο στελέχη από ελιά προσδιορίστηκε στα 25 μg/ml MCE, δηλαδή 100 μg/ml θειικού χαλκού ($CuSO_4$ $5H_2O$). Έτσι, βασιζόμενοι στην μεθοδολογία των Nguyen et al. (2018) προκύπτει ότι, το 92,3% των στελεχών του βακτηρίου από ελαιώνες στην Κρήτη είναι ανεκτικά στον πενταένυδρο θειικό χαλκό, ενώ μόνο το 7,7% ευαίσθητα. Τα παραπάνω ποσοστά ανοχής στον χαλκό είναι πολύ υψηλά και πιθανά ανησυχητικά ως προς την διαχείριση των χαλκούχων σκευασμάτων στην αντιμετώπιση της ασθένειας, μπορεί δε να συνδέονται με την συνήθεια χρήσης των χαλκούχων για την αντιμετώπιση μυκητολογικών ασθενειών της ελιάς όπως το κυκλοκόνιο από την εποχή που κύρια ποικιλία καλλιέργειας ήταν η χονδρολιά. Επίσης, την τελευταία εικοσαετία τουλάχιστον η συστηματική χρήση των χαλκούχων έχει καθιερωθεί από τους επαγγελματίες ελαιοκαλλιεργητές για την αντιμετώπιση στην κορωνέικη των ασθενειών όπως η φυματίωση, η κερκορπορίωση, η ανθράκνωση (γλοιοσπόριο) κ.ά..

Κατά την εξέταση σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB τα 16 επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά αφού όλα αναπτύχθηκαν

τουλάχιστον στη συγκέντρωση των 400 μg/ml θειικού χαλκού ($CuSO_4$ $5H_2O$), ενώ τα επτά από τα εννέα επιλεγμένα στελέχη του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* από ελιά (77,77%.) (HMUPsav2, HMUPsav7, HMUPsav8, HMUPsav14, HMUPsav16, HMUPsav32 και HMUPsav60) αναπτύχθηκαν στα 800 μg/ml. Από τα 16 στελέχη, των οποίων η ανθεκτικότητα στον πενταένυδρο θειικό χαλκό εξετάστηκε, η MIC, προσδιορίστηκε για δύο στα 400 μg/ml $CuSO_4$ $5H_2O$, για δώδεκα στα 800 μg/ml, ενώ σε δύο ήταν >800 μg/ml. Από τα 16 στελέχη, των οποίων η ανθεκτικότητα στον πενταένυδρο θειικό χαλκό εξετάστηκε, η MBC, για τρία στελέχη ορίστηκε στα 800 μg/ml $CuSO_4$ $5H_2O$ και για δεκατρία βρέθηκε να είναι >800 μg/ml (στα δέκα παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών που κυμαινόταν από 10 μέχρι 320 CFU/50μl και στα τρία συμπαγή ανάπτυξη). Από την εργασία των Nguyen et al. (2018) προέκυψε ότι το 95.3% των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη τους, ήταν ευαίσθητα στον πενταένυδρο θειικό χαλκό, ενώ μόνο το 2.7% ανεκτικά και το 2% ανθεκτικά, αποτέλεσμα που δεν συμβαδίζει με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Επιπλέον, οι Quesada et al. (2010), δεν μπόρεσαν να απομονώσουν κάποιο στέλεχος του *Pseudomonas savastanoi*, με MIC μεγαλύτερη του 0,7mM, χαρακτηρίζοντας τα 797 στελέχη που ελέγχθηκαν ευαίσθητα, αποτελέσματα που επίσης δεν συμβαδίζουν με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης. Σε πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου (Μπουμπουραλάκη, 2020) κατά την οποία μελετήθηκαν 51 στελέχη Psav από διάφορες περιοχές της Ελλάδας το 89% των απομονώσεων χαρακτηρίστηκαν ως ανεκτικά και το 23% ως ανθεκτικά στον θειικό χαλκό.

Η διαφοροποίηση όσον αφορά την ανθεκτικότητα των στελεχών του *Pseudomonas savastanoi*, μεταξύ των αναλύσεων σε στερεό και υγρό θρεπτικό υπόστρωμα είναι προφανής. Σύμφωνα με τους Vincent et al (2016), το χημικό περιβάλλον εναιώρησης ή ενσωμάτωσης του χαλκού μπορεί να επηρεάσουν την δραστικότητα των ιόντων του, όπως προτείνεται για την χρήση τους σε νοσοκομειακές μονάδες.

Κατά τη βιβλιογραφική ανασκόπηση δεν εντοπίστηκαν αναφορές για παρουσία ανθεκτικών στον χαλκό παθογόνων στελεχών του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* από ελιά στην Ευρώπη ή αλλού στον κόσμο εκτός από την Καλιφόρνια (Nguyen et al, 2018).

Εφόσον τα αποτελέσματά μας επιβεβαιωθούν στα πειράματα που ήδη βρίσκονται σε εξέλιξη στο εργαστήριο μας και επιπλέον διαπιστωθεί μοριακά η ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας στον χαλκό (La Torre et al, 2018), θα μπορούσε να αποτελέσουν την πρώτη αναφορά ανθεκτικών παθογόνων στελεχών στον χαλκό, του *P. savastanoi* pv. *savastanoi* από ελιά στην χώρα μας και την Ευρώπη.

Η αποτελεσματικότητα των χαλκούχων σκευασμάτων έναντι του βακτηρίου *in vitro* εμφάνισε σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάλογα με την ένωση του χαλκού που περιείχε το σκεύασμα. Η αποτελεσματικότητα του οξειδίου του χαλκού και του οξυχλωριούχου χαλκού, κρίθηκε ως χαμηλή, αφού παραμένει μικρότερη του 40% ακόμη και στην υψηλότερη συγκέντρωση των 400 μg/ml. Η αποτελεσματικότητα της ένωσης του υδροξειδίου του χαλκού κρίνεται ως μέτρια, αφού ακόμη και στην συγκέντρωση των 400 μg/ml, η παρεμπόδιση που παρατηρήθηκε σε όλα σχεδόν τα στελέχη κυμαινόταν από 60 μέχρι 80%. Η αποτελεσματικότητα των δύο ενώσεων (βορδιγάλειος πολτός και τριβασικός θειικός χαλκός), κρίνεται ως υψηλή και για τις δύο συγκεντρώσεις των 200 μg/ml και 400 μg/ml, δεδομένου ότι η παρεμπόδιση που παρατηρήθηκε σε όλα τα στελέχη (πλην των ανθεκτικών) στον τριβασικό θειικό χαλκό ήταν στο 100% ενώ στον βορδιγάλειο πολτό κυμαινόταν από 95 μέχρι 100 %. Επιβεβαιώνοντας, εν μέρει τα ευρήματα αυτής της μελέτης, οι Quesada et al. (2010) έδειξαν σε δοκιμές πεδίου, ότι το σκεύασμα με δραστική ουσία τον οξυχλωριούχο χαλκό δίδει ικανοποιητικά αποτελέσματα στην διαχείριση του παθογόνου επιφυτικά, με τον θειικό χαλκό σε συνδυασμό με mancozeb (το οποίο έχει πλέον αποσυρθεί) να έχει καλύτερα αποτελέσματα. Όταν οι ίδιες ενώσεις του χαλκού χρησιμοποιήθηκαν για την αντιμετώπιση *in vitro* μυκήτων που προσβάλουν τον ελαιόκαρπο (Μαρκάκης, 2020) παρατηρήθηκε υψηλή αποτελεσματικότητα του οξειδίου του χαλκού έναντι του *Fusarium lateritium*, του *Fusarium solani*, του *Alternaria alternata*, του *Colletotrichum gloeosporioides* και του *Botryosphaeria dothidea*. Το υδροξείδιο του χαλκού και ο τριβασικός θειϊκός χαλκός επέδειξαν υψηλή παρεμποδιστική δράση αλλά μόνο εναντίον των στελεχών *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Botryosphaeria* και *Fusarim lateritium*, ο βορδιγάλειος πολτός επέφερε υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι των απομονώσεων *Alternaria* και *Colletotrichum* και ο οξυχλωριούχος χαλκός εναντίον των *Alternaria* και

Botryosphaeria. Έτσι παρατηρείται αδυναμία για την πρόταση μίας δραστικής ουσίας με στόχο την ταυτόχρονη διαχείριση του βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi*, αλλά και άλλων φυτοπαθογόνων μυκήτων του ελαιόκαρπου. Όμως, ο χαλκός αποτελεί την καλύτερη επέμβαση που διατίθεται αυτή τη στιγμή για τον έλεγχο της φυματίωσης της ελιάς. Συνήθως εφαρμόζεται δύο φορές το χρόνο, μία φορά το φθινόπωρο μετά τη συγκομιδή και ξανά την άνοιξη μετά από φυσική πτώση των φύλλων. Είναι γνωστό ότι η υπερβολική χρήση σε άλλες καλλιέργειες, όπως και η εξάρτηση από τον χαλκό ως το μόνο μέσο για τον έλεγχο των φυτοπαθογόνων βακτηρίων έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας του χαλκού στα βακτηριακά παθογόνα και σε μείωση της αποτελεσματικότητάς του (Adaskaveg and Hine 1985; Andersen et al. 1991; Marco και Stall 1983).

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής πιστεύεται ότι συμβάλουν στον χαρακτηρισμό των στελεχών του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* στην Κρήτη και στη σύγκρισή τους με στελέχη από άλλες χώρες, με στόχο την διαμόρφωση ενός σχεδίου αντιμετώπισης του, μέσω της ορθολογικής εφαρμογής των χαλκούχων σκευασμάτων.

5 Βιβλιογραφία

5 Βιβλιογραφία

Adaskaveg, J. E., Hine, R. B. (1985). Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant disease*, *69*(11), 993-996.

Andersen, G. L., Menkissoglou, O., Lindow, S. E. (1991). Occurrence and properties of copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae* isolated from fruit trees in California, *Phytopathology*, *81*, 648-656.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, *6*(2), 71-79.

Bender, C. L., Cooksey, D. A. (1986). Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. *Journal of bacteriology*, *165*(2), 534-541.

Buonaurio, R., Moretti, C., da Silva, D. P., Cortese, C., Ramos, C., Venturi, V. (2015). The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. *Frontiers in plant science*, *6*, 147107.

Bozkurt, I. A., Soylu, S., Mirik, M., Ulubas Serce, C., Baysal, Ö. (2014). Characterization of bacterial knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on pomegranate (*Punica granatum* L.) trees: a new host of the pathogen. *Letters in applied microbiology*, *59*(5), 520-527.

Bozkurt, İ. A., Soylu, S., Merve, K. A. R. A., Soylu, E. M. (2020). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils isolated from medicinal plants against gall forming plant pathogenic bacterial disease agents. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, *23*(6), 1474-1482.

BASIM, H., BASIM, E., ERSOY, A. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causing olive knot disease in Turkey. *Applied Ecology and Environmental Research*, *17*(6).

Caballo-Ponce, E., Murillo, J., Martínez-Gil, M., Moreno-Pérez, A., Pintado, A., Ramos, C. (2017). Knots untie: molecular determinants involved in knot formation induced by *Pseudomonas savastanoi* in woody hosts. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 267575.

Caballo-Ponce, E., Pintado, A., Moreno-Pérez, A., Murillo, J., Smalla, K., Ramos, C. (2021). *Pseudomonas savastanoi* pv. *mandevillae* pv. nov., a Clonal Pathogen Causing an Emerging, Devastating Disease of the Ornamental Plant Mandevilla spp. *Phytopathology*, *111*(8), 1277-1288.

Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcialis, M. A., Cristinzio, G. (1995). Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology*, *79*(4), 393-398.

Cinelli, T., Marchi, G., Cimmino, A., Marongiu, R., Evidente, A., Fiori, M. (2014). Heterogeneity of *Pseudomonas savastanoi* populations infecting *Myrtus communis* in Sardinia (Italy). *Plant pathology*, *63*(2), 277-289.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, *32*(5), 1792-1797.

FAO. 2021. https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize

Fautt, C., Couradeau, E., Hockett, K. L. (2022). *SYRINGAE*: A web-based application for *Pseudomonas syringae* isolate characterization. *Biorxiv*, 2022-11.

Gardan, L., Bollet, C., Abu Ghorrah, M., Grimont, F., 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 and Evolutionary Microbiology*, *42*(4), 606-612.

Ge, Q., Cobine, P. A., De La Fuente, L. (2020). Copper supplementation in watering solution reaches the xylem but does not protect tobacco plants against *Xylella fastidiosa* infection. *Plant disease*, *104*(3), 724-730.

Guerrero Maldonado, N., López, M. J., Caudullo, G., de Rigo, D., (2016). *Olea europaea* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp. e01534b+

Hosni, T., Moretti, C., Devescovi, G., Suarez-Moreno, Z. R., Fatmi, M. B., Guarnaccia, C., Pongor, S., Onofri, Buonaurio, R., Venturi, V. (2011). Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease. *The ISME journal*, *5*(12), 1857-1870.

Hugh, R., Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. Journal of bacteriology, 66(1), 24-26.

Hwang, M. S., Morgan, R. L., Sarkar, S. F., Wang, P. W., & Guttman, D. S. (2005). Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of **Pseudomonas syringae**.*Applied and environmental microbiology*, *71*(9), 5182-5191.

Košćak, L., Lamovšek, J., Đermić, E., Prgomet, I., Godena, S. (2023). Microbial and plant-based compounds as alternatives for the control of phytopathogenic bacteria. *Horticulturae*, *9*(10), 1124.

Kowalska-Krochmal, B., Dudek-Wicher, R. (2021) The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. Pathogens, 10, 165. https://doi.org/10.3390/pathogens10020165.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, *35*(6), 1547.

La Torre, A., Iovino, V., Caradonia, F. (2018). Copper in plant protection: Current situation and prospects. *Phytopathologia Mediterranea*, *57*(2), 201-236.

Le, K. D., Kim, J., Yu, N. H., Kim, B., Lee, C. W., Kim, J. C. (2020). Biological control of tomato bacterial wilt, kimchi cabbage soft rot, and red pepper bacterial leaf spot using *Paenibacillus elgii* JCK-5075. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 543263.

Lelliott, R. A., Stead, D. E. (1987). *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell Scientific Publications.

Marchi, G., Viti, C., Giovannetti, L., Surico, G. (2005). Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy. *European journal of plant pathology*, *112*, 101-112.

Marco, G. M., & Stall, R. E. (1983). Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant disease*.

Martins, P. M., Merfa, M. V., Takita, M. A., De Souza, A. A. (2018). Persistence in phytopathogenic bacteria: do we know enough?. *Frontiers in microbiology*, *9*, 369154.

Moreno-Pérez, A., Pintado, A., Murillo, J., Caballo-Ponce, E., Tegli, S., Moretti, C., Rodriguez-Palenzuela, P., Ramos, C. (2020). Host range determinants of *Pseudomonas savastanoi* pathovars of woody hosts revealed by comparative genomics and cross-pathogenicity tests. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 555338.

Moretti, C., Ferrante, P., Hosni, T., Valentini, F., D'Onghia, A., Fatmi, M. B., Buonaurio, R. (2008). Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains collected from olive trees in different countries. *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens–Identification, Epidemiology and Genomics*, 321-329.

Moretti, C., Vinatzer, B. A., Onofri, A., Valentini, F., Buonaurio, R. (2017). Genetic and phenotypic diversity of Mediterranean populations of the olive knot pathogen, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Plant Pathology*, *66*(4), 595-605.

Morris, C. E., Lamichhane, J. R., Nikolić, I., Stanković, S., Moury, B. (2019). The overlapping continuum of host range among strains in the *Pseudomonas syringae* complex. *Phytopathology Research*, *1*, 1-16.

Newberry, E. A., Babu, B., Roberts, P. D., Dufault, N. S., Goss, E. M., Jones, J. B., Paret, M. L. (2018). Molecular epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial leaf spot of watermelon and squash in Florida. *Plant disease*, *102*(3), 511-518.

Nguyen, K. A., Förster, H., Adaskaveg, J. E. (2018). Efficacy of copper and new bactericides for managing olive knot in California. *Plant disease*, *102*(5), 892-898.

Penyalver, R., García, A., Ferrer, A., Bertolini, E., López, M. M. (2000). Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(6), 2673-2677.

Pintado, A., Domínguez-Cerván, H., Pastor, V., Vincent, M., Lee, S. G., Flors, V., Ramos, C. (2023). Allelic variation in the indoleacetic acid-lysine synthase gene of the bacterial pathogen *Pseudomonas savastanoi* and its role in auxin production. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1176705.

Pscheidt, J. W., Ocamb, C. M. (2022). Copper-based bactericides and fungicides. *Pacific Northwest pest management handbooks. Oregon State University, Corvallis*.

Quesada, J. M., Penyalver, R., Pérez-Panadés, J., Salcedo, C. I., Carbonell, E. A., López, M. M. (2010). Comparison of chemical treatments for reducing epiphytic *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and for improving subsequent control of olive knot disease. *Crop Protection*, *29*(12), 1413-1420.

QIAGEN. (2023). *DNeasy Blood & Tissue Handbook*. QIAGEN. https://www.qiagen.com/se/resources/download.aspx?id=68f29296-5a9f-40fa-8b3d-1c148d0b3030&lang=en.

Ramos, C., Matas, I. M., Bardaji, L., Aragón, I. M., Murillo, J. (2012). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. *Molecular plant pathology*, *13*(9), 998-1009.

Scortichini, M., Rossi, M. P., Salerno, M. (2004). Relationship of genetic structure of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations from Italian olive trees and patterns of host genetic diversity. *Plant pathology*, *53*(4), 491-497.

Schumann, G.L., D'Arcy, C.J. (2023). *Βασικές Αρχές ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ* (2nd ed.). BROKEN HILL PUBLISHERS LTD.

Surico, G., Lavermicocca, P. (1989). A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.

Taghavi, M., Hasani, S. (2012). Occurrence of *Pseudomonas savastanoi* the causal agent of winter jasmine gall in Iran. *Iran Agricultural Research*, *31*(1), 39-48.

Tegli, S., Cerboneschi, M., Libelli, I. M., 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.

Temsah, M., Hanna, L., Saad, A. T. (2008). Anatomical pathogenesis of *Pseudomonas savastanoi* on olive and genesis of knots. *Journal of Plant Pathology*, 225-232.

Trantas, E. A., Malliarakis, D., Mpalantinaki, E. E., Pagoulatou, M. G., Markakis, E. A., Ververidis, F., Goumas, D. E. (2022). Characterization of *Pseudomonas viridiflava* isolates associated with a new leaf spot disease in *Cichorium* species. *Journal of Plant Pathology*, *104*(3), 1061-1070.

Tsuji, M., Ohta, K., Tanaka, K., Takikawa, Y. (2015). First report of knot disease on olive (*Olea europaea*) in Japan caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Plant Disease*, *99*(10), 1445-1445.

Vincent, M., Hartemann, P., Engels-Deutsch, M. (2016). Antimicrobial applications of copper. *International journal of hygiene and environmental health*, *219*(7), 585-591.

Γιαννοπολίτης, Κ.Ν. (2009). Μια πρώτη γνωριμία με την ελιά. Τα βασικά στοιχεία για το φυτό και την καλλιέργεια. *Γεωργία ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ, (6),* 6-10.

Δ/νση Αγροτικής Οικονομίας Περιφέρειας Κρητης, ΕΛΓΟ «Δήμητρα» Ινστιτούτο Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών & Αμπέλου, Ελληνικό Μεσογειακό Πανεπιστήμιο- Τμήμα Γεωπονίας, ΓΕΩ.ΤΕ.Ε- ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΚΡΗΤΗΣ. (2020). *ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΑΝΘΕΝΕΙΕΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ* [Φυλλάδιο]. ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΚΡΗΤΗΣ Δ/ΝΣΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ.

Θανασουλόπουλος, Κ. (1996). *ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΔΕΝΔΡΩΝ ΚΑΙ ΑΜΠΕΛΟΥ* (2ND ed.). ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΖΗΤΗ.

Καλομοίρα, Ε., Αλεβιζάτος, Α. (2009). Ασθένειες της ελιάς. *Γεωργία ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ, (6),* 132-138.

Μαρκάκης Ε. (2020). Αποτελέσματα *in vitro* αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας των εγκεκριμένων ενώσεων χαλκού έναντι των πιο μολυσματικών μυκητολογικών στελεχών. Παραδοτέα έργου: «Εξειδικευμένη επιστημονική υποστήριξη και καινοτόμες δράσεις για την φυτοπροστασία της ελιάς στην Περιφέρεια Κρήτης 2020-2021»

Μπουμπουραλάκη, Χ. (2020). *Διερεύνηση της ανθεκτικότητας στο χαλκό φυτοπαθογόνων βακτηρίων στην Ελλάδα*. Πτυχιακή Διατριβή.

Παναγόπουλος, Χ. (2007). *Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων & Αμπέλου* (4rth ed.). ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΑΘ. ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ.

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. (n.d.). *ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΑ*. https://1click.minagric.gr/oneClickUI/frmFytoPro.zul.

Παράρτημα:

I. Περίληψη της προφορικής παρουσίασης που πραγματοποιήθηκε στο 31ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, Ηράκλειο Κρήτης, 29 Οκτωβρίου 2023-2 Νοεμβρίου 2023.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ *Pseudomonas savastanoi* subsp. *savastanoi* ΑΠΟ ΕΛΑΙΩΝΕΣ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ

Ε. Αλεξανδρίδης[1], Μ. Παγουλάτου[1], Ε. Μπαλαντινάκη[1], Κ. Φωτάκης[2], Δ.Ε. Γκούμας[1] *

[1] Ελληνικό Μεσογειακό Πανεπιστήμιο, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας, Εργαστήριο Βιολογικών και Βιοτεχνολογικών Εφαρμογών, Εσταυρωμένος 71410 Ηράκλειο, Κρήτη
[2] Περιφέρεια Κρήτης, Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας, Ν. Πλαστήρα 100. 71201 Ηράκλειο.
*dgoumas@hmu.gr

Σήμερα στην Κρήτη καλλιεργούνται περισσότερα από 37 εκατ. ελαιόδεντρα. Η ασθένεια φυματίωση (καρκίνωση) της ελιάς που προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pssav) χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη υπερπλασιών σε βλαστούς, κλαδιά, βραχίονες και σπανιότερα σε φύλλα της ελιάς (*Olea europaea L.*) όπως και σε περιορισμένο αριθμό άλλων ξενιστών. Η ασθένεια στην Κρήτη είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στην ποικιλία κορωνέικη, μειώνοντας σημαντικά ποιοτικά και ποσοτικά την παραγωγή. Το ίδιο συμβαίνει σε όλες τις παραμεσόγειες χώρες όπου καλλιεργούνται ευπαθείς ποικιλίες ελιάς. Σκοπός της εργασίας ήταν ο πολυφασικός χαρακτηρισμός απομονώσεων του παθογόνου από τον κρητικό ελαιώνα. Επιλέχθηκαν 47 στελέχη από τη συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας- Βακτηριολογίας του ΕΛΜΕΠΑ (37 ελιά, 3 μυρτιά, 6 πικροδάφνη, 1 γιασεμί), τα οποία απομονώθηκαν στο διάστημα 2011 έως 2023. Για τον χαρακτηρισμό τους μελετήθηκαν η παραλλακτικότητα σε φαινοτυπικό και γενετικό επίπεδο (παρουσία γονιδίου *iaaL*), η παρουσία ανθεκτικών στελεχών του Pssav στο χαλκό με εκτίμηση της MIC και της MBC του χαλκού ($CuSO_4.5H_2O$) και η *in vitro* αποτελεσματικότητα πέντε εγκεκριμένων, χαλκούχων σκευασμάτων. Η φυλογενετική ανάλυση MLSA (Multilocus sequence analysis) του παθογόνου πραγματοποιήθηκε σε 26 επιλεγμένες απομονώσεις, με την αλληλούχηση των τεσσάρων συντηρημένων γονιδίων *gapA*, *gltA*, *gyrB* και *rpoD*. Οι απομονώσεις εμφάνισαν ομοιόμορφο φαινοτυπικό προφίλ, και χαρακτηρίστηκαν ως αερόβιες, κατά Gram (-), αρνητικές στην παραγωγή οξείδωσης, levan και αργινίνης και στην πηκτινόλυση της πατάτας. Ήταν μη φθορίζουν σε θρεπτικά υποστρώματα King's B και PVF-1 και με ποικίλη αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού. Έτσι, σύμφωνα με τις δοκιμές LOPAT τοποθετήθηκαν στην ομάδα Ib του *Pseudomonas syringae* complex. Όλες οι απομονώσεις ταυτοποιήθηκαν ως στελέχη του Pssav αφού ενισχύθηκε με PCR το γονίδιο *iaaL*, με τους εξειδικευμένους εκκινητές IAALF και IAALR. Η MIC και η MBC προσδιορίστηκαν στα 200 μg/ml για τα στελέχη του Pssav από ελιά. Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις χαλκού που δοκιμάστηκαν για την αποτελεσματικότητά τους έναντι του Pssav είχαν ως δραστικές ενώσεις τα: οξείδιο του χαλκού, υδροξείδιο του χαλκού, οξυχλωριούχο χαλκό, βορδιγάλειο πολτό και τριβασικό θειικό χαλκό, με την αποτελεσματικότητα να διαφοροποιείται ανάλογα με τη δραστική ουσία και το στέλεχος του βακτηρίου. Η φυλογενετική ανάλυση MLSA είναι σε εξέλιξη και διαφαίνεται η γενετική ομοιομορφία των απομονώσεων του Pssav από την Κρήτη. Φυτά ελιάς γιασεμιού, μυρτιάς και πικροδάφνης χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της παθογένειας των απομονώσεων, οι οποίες γενικά ήταν περισσότερο μολυσματικές όταν εμβολιάζονταν στον ξενιστή από τον οποίο απομονώθηκαν. Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη αναλυτική μελέτη απομονώσεων του Pssav από την Κρήτη.

Η εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΚΗ ΣΥΜΒΑΣΗ μεταξύ της «Περιφέρειας Κρήτης», του «Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστήμιου», του «Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας» και του «Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού - ΔΗΜΗΤΡΑ» για την εκπόνηση του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο: «Εξειδικευμένη επιστημονική υποστήριξη και καινοτόμες δράσεις για τη φυτοπροστασία της ελιάς στην Περιφέρεια Κρήτης 2022−2023», χρηματοδότησή: Περιφέρεια Κρήτης, Αρ.Πρωτ.: 33869/01-02-2023.

II. Εκτενής εργασία προφορικής παρουσίασης που πραγματοποιήθηκε στο 31ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, Ηράκλειο Κρήτης, 29 Οκτωβρίου 2023-2 Νοεμβρίου 2023 και είναι υπό δημοσίευση.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ΑΠΟ ΕΛΑΙΩΝΕΣ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΗ

Ε. Αλεξανδρίδης[1*], Μ. Παγουλάτου[1], Ε. Μπαλαντινάκη[1], Κ. Φωτάκης[2], Δ.Ε. Γκούμας[1]

[1] Ελληνικό Μεσογειακό Πανεπιστήμιο, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας, Εργαστήριο Βιολογικών και Βιοτεχνολογικών Εφαρμογών, Εσταυρωμένος, 71410 Ηράκλειο, Κρήτη
[2] Περιφέρεια Κρήτης, Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας, Ν. Πλαστήρα 100, 71201 Ηράκλειο.

*E-mail: theleftalexandr@gmail.com

Περίληψη

Σήμερα στην Κρήτη καλλιεργούνται περισσότερα από 37 εκατ. ελαιόδεντρα. Η ασθένεια φυματίωση (καρκίνωση) της ελιάς που προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pssav) χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη υπερπλασιών σε βλαστούς, κλαδιά, βραχίονες και σπανιότερα σε φύλλα και καρπούς ελιάς (*Olea europaea* L.) όπως και σε περιορισμένο αριθμό άλλων ξενιστών. Η ασθένεια στην Κρήτη είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στην ποικιλία Κορωνέικη, μειώνοντας σημαντικά ποιοτικά και ποσοτικά την παραγωγή. Σκοπός της εργασίας ήταν ο πολυφασικός χαρακτηρισμός απομονώσεων του παθογόνου από τον κρητικό ελαιώνα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του μορφολογικού, φυσιολογικού και βιοχημικού φαινότυπου, 50 απομονώσεις τοποθετήθηκαν στην ομάδα Ib ως μέλη του είδους του *Pseudomonas savastanoi*. Ο χαρακτηρισμός επιβεβαιώθηκε, αφού με τη χρήση της PCR ενισχύθηκε το γονίδιο *iaaL*, με τους εξειδικευμένους εκκινητές IAALF/R. Η φυλογενετική ανάλυση MLSA επέτρεψε την ομαδοποίησή των απομονώσεων του Pssav από την Κρήτη με άλλα στελέχη του *Pseudomonas savastanoi* σε ποσοστό 97%, ενώ τα διαφοροποίησε σαφώς από άλλα συγγενικά είδη του γένους *Pseudomonas*. Ο προσδιορισμός των MIC (ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης) και MBC (ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση) του πενταένυδρου θειικού χαλκού προσδιορίστηκαν στα 50 μg/ml ισοδύναμου μεταλλικού χαλκού στο μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών του Pssav από ελιά. Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις χαλκού που δοκιμάστηκαν για την αποτελεσματικότητα τους έναντι του Pssav είχαν ως δραστικές ενώσεις τα: οξείδιο του χαλκού, υδροξείδιο του χαλκού, οξυχλωριούχο χαλκό, βορδιγάλειο πολτό και τριβασικό θειικό χαλκό. Η υψηλότερη αποτελεσματικότητα παρατηρήθηκε στις δύο τελευταίες ενώσεις του χαλκού. Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη αναλυτική μελέτη απομονώσεων του Pssav από την Κρήτη και την χώρα μας.

Λέξεις κλειδιά: Ταυτοποίηση, MLSA, MIC, MBC, χαλκούχες ενώσεις

Εισαγωγή

Η ελαιοκαλλιέργεια αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές καλλιέργειες για τις χώρες της Ευρώπης, καταλαμβάνοντας 5.052.216 ha το 2021. Στην Ελλάδα αντιστοιχεί το 16,36% της παραπάνω έκτασης (826.390 ha) με τη χώρα μας να κατέχει την δεύτερη θέση στην παραγωγή ελαιοκομικών προϊόντων στην Ευρώπη (FAO, 2021). Η ασθένεια φυματίωση ή καρκίνωση της ελιάς χαρακτηρίζεται ως μία από τις πιο σημαντικές ασθένειες της ελιάς (*Olea europaea* L.), με εξάπλωση σε ελαιώνες ολόκληρου του κόσμου (Buonaurio κ.ά., 2015). Το φυτοπαθογόνο βακτήριο που την προκαλεί είναι το *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pssav). Προκαλεί την δημιουργία υπερπλασιών σε βραχίονες, κλαδιά, βλαστούς και σπανιότερα σε φύλλα και καρπούς μειώνοντας

ποιοτικά και ποσοτικά την παραγωγή (Ramos κ.ά., 2012). Το παθογόνο έχει σχετικά περιορισμένο εύρος ξενιστών και προσβάλει πικροδάφνη, φράξινο, σπάρτο, διπλαδένια, μυρτιά, ροδιά, γιασεμί, λιγούστρο, φορσύθια, φιλλυρέα και ράμνο. Σήμερα στον κρητικό ελαιώνα καλλιεργούνται κυρίως οι ποικιλίες Κορωνέικη και Τσουνάτη οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλή και μέτρια ευπάθεια στο παθογόνο, αντίστοιχα. Για την διαχείριση της ασθένειας εφαρμόζονται, κυρίως προληπτικά, καλλιεργητικά μέτρα και επεμβάσεις με χαλκούχα σκευάσματα (Ramos κ.ά., 2012).

Υλικά και Μέθοδοι

Η απομόνωση των βακτηρίων έγινε από συμπωματικά φυτικά δείγματα ελιάς, πικροδάφνης, γιασεμιού και μυρτιάς που συλλέχτηκαν από το 2011 ως το 2023 (Εικ. 1). Οι απομονώσεις διατηρούνταν στη συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας-Βακτηριολογίας του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου ή απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Πενήντα απομονώσεις, ελέγχθηκαν με τις εξειδικευμένες για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, δοκιμές LOPAT (Lelliott & Stead, 1987), δηλαδή την παραγωγή Levan (L), οξειδάσης (O), την πηκτινόλυση σε κονδύλους πατάτας (P), την αναερόβια διάσπαση αργινίνης (A) και την έκλυση αντίδρασης υπερευαισθησίας σε καπνό (T).

Για τη μοριακή ανάλυση και την ταυτοποίηση των απομονώσεων σε επίπεδο είδους, χρησιμοποιήθηκαν οι εξειδικευμένοι εκκινητές IAALF/R, με ενισχυόμενο τμήμα αντίδρασης στα 454bp (Penyalver κ.ά., 2000). Η φυλογενετική ανάλυση με την αλληλούχηση πολλαπλών γενετικών τόπων (Multi Locus Sequence Analysis, MLSA), έγινε με βάση το σχήμα MLSA των τεσσάρων συντηρημένων γονιδίων *gapA*, *gltA*, *gyrB* και *rpoD*. Τα αποτελέσματα της MLSA συγκρίθηκαν με δεδομένα των Newberry & Babu (2018) και Hwang κ.ά. (2005) και με στελέχη από την βάση δεδομένων Genbank.

Ο έλεγχος της ευαισθησίας των απομονώσεων του *Pseudomonas savastanoi* στον πενταένυδρο θειικό χαλκό ($CuSO_4$ $5H_2O$) πραγματοποιήθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα NAG στις συγκεντρώσεις των 0, 12,5, 25, 50 και 100 μg/ml ισοδύναμου μεταλλικού χαλκού. Ο εμβολιασμός κατά θέση του βακτηριακού αιωρήματος, των υποστρωμάτων έγινε με 10μl από βακτηριακό αιώρημα οπτικής πυκνότητας OD_{600nm}= 0,1 (~ 3,4 x 10^7 CFU/ml). Ελέγχθηκαν 50 απομονώσεις του *Pseudomonas savastanoi* (39 από ελιά, 3 από μυρτιά, 7 από πικροδάφνη και 1 από γιασεμί), συγκριτικά με 8 ανθεκτικά στον χαλκό και το στέλεχος αναφοράς CFBP1670^T από ελιά.

Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας πέντε χαλκούχων ενώσεων, διεξάχθηκε σε πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA, σε τελικές συγκεντρώσεις των 0, 50, 100, 200 και 400 μg/ml, δραστικής ουσίας, σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Broth (TSB). Ο εμβολιασμός έγινε με ~10^4 CFU/ml. Η αύξηση των βακτηριακών στελεχών εκτιμήθηκε με μέτρηση των τιμών οπτικής πυκνότητας OD_{595nm}, μετά από επώαση 48h. Η *in vitro* αντιβακτηριακή δράση των χαλκούχων ενώσεων εκτιμήθηκε ως το ποσοστό (%) παρεμπόδισης της ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους, σε σχέση με τον μάρτυρα.

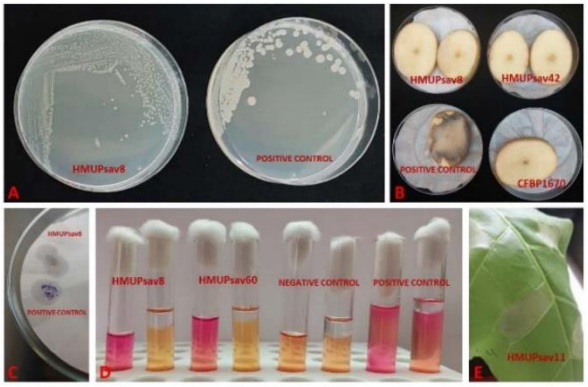
Αποτελέσματα – Συζήτηση

Οι απομονώσεις από την Κρήτη, εμφάνισαν στις δοκιμές LOPAT τον φαινότυπο: [- - - - +] (Εικ. 2) και ομαδοποιούνται στην ομάδα Ib, που περιλαμβάνει στελέχη του είδους *Pseudomonas savastanoi* από διάφορους ξενιστές. Με τους εξειδικευμένους εκκινητές IAALF/R, όλες οι απομονώσεις από την Κρήτη εμφάνισαν ζώνη στα 454bp, όπως και τα στελέχη αναφοράς. Επομένως, με βάση τα παραπάνω επιβεβαιώθηκε ο χαρακτηρισμός τους ως *Pseudomonas savastanoi*. Η φυλογενετική ανάλυση των απομονώσεων, ομαδοποίησε σε ποσοστό 97%, όλα τα στελέχη από την Κρήτη μαζί με τα στελέχη αναφοράς των παθοποικιλιών του βακτηρίου, ενώ τα διαφοροποίησε σαφώς

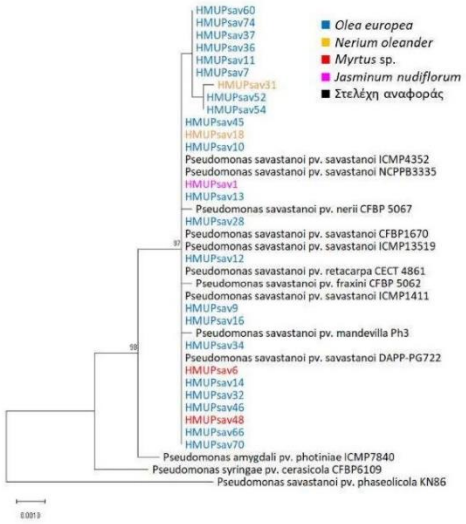
από άλλα είδη του γένους *Pseudomonas* (Εικ. 3). Παρατηρήθηκαν μικρές διαφοροποιήσεις που όμως δεν επετρέψαν περαιτέρω ομαδοποιήσεις ανά ξενιστή και περιοχή απομόνωσης, τόσο για τα κρητικά στελέχη όσο και για τα στελέχη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 1. Συμπτώματα σε φυτά ελιάς, μυρτιάς και γιασεμιού μετά από προσβολή του *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.



Εικόνα 2. Δοκιμές LOPAT: (Α) παραγωγή LEVAN, (Β) πηκτινόλυση σε κονδύλους πατάτας, (Γ) παραγωγή οξειδάσης, (Δ) παραγωγή αργινίνης, (Ε) αντίδρασης υπερευαισθησίας σε καπνό.



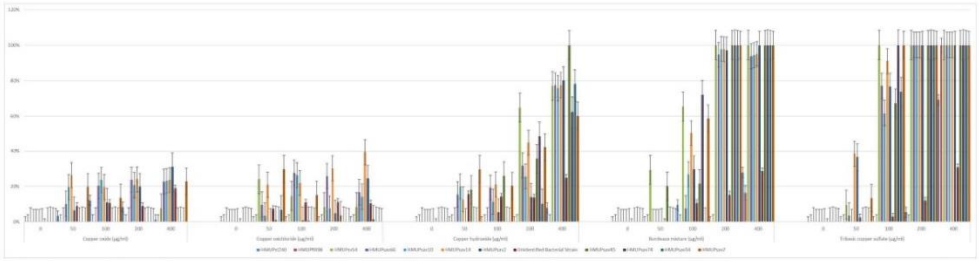
Εικόνα 3. Φυλογενετικό δέντρο με βάση την ενοποιημένη αλληλουχία των γονιδίων *gapA, gltA, gyrB* και *rpoD* με 26 απομονώσεις του *Pseudomonas savastanoi*.

Η ελάχιστη παρεμποδιστική (MIC) και βακτηριοκτόνος (MBC) συγκέντρωση ελέγχθηκε σε πενήντα στελέχη του *Pseudomonas savastanoi* από ελιά (39) και άλλους ξενιστές (11) από την Κρήτη. Η MIC και η MBC προσδιορίστηκε στα 50 μg/ml ισοδύναμου μεταλλικού χαλκού (MCE) στα 36 από 39 στελέχη της ελιάς (92,3%), στα 5 από τα 7 στελέχη της πικροδάφνης, στα 3 από μυρτιά και το στέλεχος αναφοράς CFBP1670^{T}. Επίσης, σε τρία μόνο στελέχη από ελιά προσδιορίστηκε στα 25 μg/ml. Σε δύο στελέχη της πικροδάφνης, σε ένα από γιασεμί και στα 6 από τα 8 ανθεκτικά στελέχη αναφοράς η MIC και η MBC προσδιορίστηκε στα 100 μg/ml (ανώτερη τιμή), ενώ σε 3 στελέχη αναφοράς στα 50 μg/ml. Με βάση την μεθοδολογία των Nguyen κ.ά. (2018) προκύπτει ότι, το 92,3% των στελεχών του βακτηρίου από ελαιώνες στην Κρήτη είναι ανεκτικά στον θειικό χαλκό, ενώ μόνο το 7,7% ευαίσθητα. Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται συγκριτικά η αποτελεσματικότητα πέντε χαλκούχων ενώσεων έναντι εννέα απομονώσεων του βακτηρίου σε συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 200 και 400 μg/ml. Διαπιστώνεται η χαμηλή αποτελεσματικότητα του οξειδίου και του οξυχλωριούχου χαλκού (<40%), η μέτρια του υδροξειδίου του χαλκού (60-80%), και

Πίνακας 1. Ανάπτυξη στελεχών *P. savastanoi* και αναφοράς σε διάφορες συγκεντρώσεις $CuSO_4$ $5H_2O$.

Βακτηριακά στελέχη	Ανάπτυξη βακτηρίων διάφορες σε συγκεντρώσεις				
Cu^{++} (μg/ml)	0	12.5	25	50	100
Pseudomonas savastanoi					
Olea europaea (39)	+*	+	+ 36/39 (92,3%)	-**	-
Nerium oleander (7)	+	+	+	+ 2/7 (28,6%)	-
Myrtus communis (3)	+	+	+	-	-
Jasminum nudiflorum (1)	+	+	+	+	-
Στελέχη Αναφοράς					
CFBP1670	+	+	+	-	-
P. syringae HMU (289, 301, 308)	+	+	+	+	-
P.s. actinidiae HMU (834 & 836)	+	+	+	-	-
P.s. tomato HMU (240 & 241)	+	+	+	+	-
X. vesicatoria HMU (8138)	+	+	+	+	-

η υψηλή του βορδιγάλειου πολτού (95-100%) και του τριβασικού χαλκού (100%). Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, προκύπτει η ομοιομορφία μεταξύ των απομονώσεων του βακτηρίου από την Κρήτη και εκείνων από άλλες χώρες της Μεσογείου (Penyalver κ.ά., 2000; Ramos κ.ά., 2012), η παρουσία υψηλού ποσοστού ανεκτικών στελεχών του στο χαλκό αλλά και η αξιόλογη αποτελεσματικότητα του βορδιγάλειου πολτού και του τριβασικού θειικού χαλκού ως εργαλεία για την διαχείριση της ασθένειας στο νησί.



Εικόνα 4. Παρεμποδιστική δράση (%) των ενώσεων οξειδίου, υδροξειδίου, οξυχλωριούχου του χαλκού, βορδιγάλειου πολτού και τριβασικού χαλκού σε 0, 50, 100, 200 και 400 μg/ml, σε σύγκριση με το μάρτυρα (0 μg/ml), έναντι εννέα στελεχών του *Pseudomonas savastanoi* και τριών ανθεκτικών στο χαλκό βακτηριακών στελεχών. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει το μέσο όρο τριών επαναλήψεων ανά απομόνωση και συγκέντρωση.

Βιβλιογραφία

Buonaurio, R., Moretti, C., da Silva, D.P., Cortese, C., Ramos, C. and Venturi, V. 2015. The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. Front.Plant Sci., 6:434.

FAO. 2021. https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize

Hwang, M.S., Morgan, R.L., Sarkar, S.F., Wang, P.W. and Guttman, D.S. 2005. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. Appl. Environ. Microbiol. 71:5182-5191.

Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

Newberry, E.A., Babu, B., Roberts, P.D., Dufault, N.S., Goss, E.M., Jones, J.B. and Paret, M.L. 2018. Molecular epidemiology of *P. syringae* pv. *syringae* causing bacterial leaf spot of watermelon and squash in Florida. Plant Dis. 102:511-518.

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

Penyalver, R., García, A., Ferrer, A., Bertolini, E. and López, M. M. 2000. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. Appl. and Environ. Microbiol. 66:2673-2677.

Ramos, C., Matas, I.M., Bardaji, L., Aragón, I.M. and Murillo, J. (2012). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. Mol. Plant Pathol., 13:998-1009.