

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM SUBSP. *CAROTOVORUM*:
ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΣΗΨΗΣ ΤΟΥ
ΖΑΜΙΟΚΟΥΛΚΑΣ (*ZAMIOCULCAS ZAMIIFOLIA*)

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ANNA ΝΙΚΟΥ
ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: Δρ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΚΟΥΜΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Zamioculcas zamiifolia* είναι ένα νέο γλαστρικό φυτό, που εισήχθη στην επιχειρηματική ανθοκομία τα τελευταία χρόνια. Πρόκειται για αυτοφυές, τροπικό, μονοκοτυλήδονο, ποώδες, πολυετές, ριζωματικό φυτό των ανατολικών αφρικανικών χωρών και αποτελεί μέλος της οικογένειας *Araceae*. Πρόσφατα, σε αναπτυσσόμενα φυτά παρατηρήθηκαν συμπτώματα στους μίσχους των φύλλων που σχετίζονταν με πιθανή μόλυνση από βακτήρια, όπως η παρουσία υδατώδους κηλίδας στην περιοχή που έρχονται σε επαφή με το εδαφικό υπόστρωμα, τήξη, σήψη, αποσύνθεση και πτώση των προσβεβλημένων ιστών, που συχνά μετατρέπονται σε άμορφη μάζα δύσοσμων ιστών. Παρόμοια συμπτώματα παρατηρήθηκαν στα ριζώματα του φυτού. Σε παρατήρηση στο μικροσκόπιο από τους προσβεβλημένους ιστούς διαπιστώθηκε η έξοδος βακτηρίων σε μορφή νεφελώματος. Από τα προσβεβλημένα φυτά απομονώθηκαν βακτήρια τα οποία με βάση το μορφολογικό, φυσιολογικό και βιοχημικό τους προφίλ και τις δοκιμές παθογένειας ταυτοποιήθηκαν ως μέλη του βακτηρίου *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Σύμφωνα με τα δεδομένα μας, το βακτήριο πολύ πιθανά απομονώνεται για πρώτη φορά στην Ευρώπη και στην Ελλάδα από το φυτό *Zamioculcas zamiifolia*, αν και πρόκειται για φυτοπαθογόνο με μεγάλο εύρος ξενιστών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	4
1.1. Το φυτό Ζαμιόκουκας (<i>Zamioculcas zamiifolia</i>)	4
1.2. Καλλιέργεια του φυτού	7
1.3. Ασθένειες του φυτού <i>Zamioculcas zamiifolia</i>	9
1.3.1. Σήψη της βάσης του μίσχου από τον ωομύκητα <i>Phytophthora nicotianae</i>	9
1.3.2. Προσβολή από βακτήρια του γένους <i>Erwinia</i> spp	9
1.3.3. Σκοπός της εργασίας	9
2. Υλικά και μέθοδοι	10
2.1. Απομόνωση του παθογόνου	10
2.2. Προκαταρκτικές δοκιμές ταυτοποίησης των απομονώσεων	11
2.3. Ταυτοποίηση του παθογόνου. Εξέταση βιοχημικού και φυσιολογικού φαινοτύπου των απομονώσεων	11
2.4. Δοκιμές παθογένειας	12
2.4.1. Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού.	12
2.4.2. Μόλυνση σε ροδέλες πατάτας	12
2.4.3. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά <i>Zamioculcas zamiifolia</i>	13
2.4.4. Μόλυνση σε φυτά τομάτας	13
3. Αποτελέσματα	14
3.1. Συμπτώματα της ασθένειας	14
3.2. Απομόνωση παθογόνου	14
3.3. Προσδιορισμός του παθογόνου	15
3.4. Δοκιμές παθογένειας	18
4. Συζήτηση - Συμπεράσματα	22
5. Φωτογραφικό υλικό	24
6. Βιβλιογραφία	31

***Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*:**
Παθογόνο αίτιο της βακτηριακής σήψης του φυτού
Ζαμιόκουκας (*Zamioculcas zamiifolia*)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το φυτό Ζαμιόκουκας (*Zamioculcas zamiifolia*)

Zamioculcas zamiifolia

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Kingdom: Plantae

(unranked): Angiosperms

(unranked): Monocots

Order: Alismatales

Family: Araceae

Subfamily: Zamioculcadoideae

Genus: *Zamioculcas* Schott

Species: *Z. zamiifolia*

Zamioculcas zamiifolia (Lodd.) Engl.

Σήμερα το πιο κοινό όνομα για το φυτό είναι το ZZ, το οποίο πιθανώς προέρχεται από τα δύο πρώτα γράμματα του βοτανικού του ονόματος *Zamioculcas zamiifolia*, το οποίο είναι το μοναδικό είδος που υπάγεται στο γένος *Zamioculcas*. Το όνομα του είδους *zamiifolia* αναφέρεται στην ομοιότητα εμφάνισης του φυλλώματος του φυτού με φυτά που ανήκουν στα μη βοτανικά συνδεδεμένα φυτά *cycad* (Κυκαδώδη) του γένους *Zamia*. Έτσι, το βοτανικό όνομα προέρχεται από την επιφανειακή ομοιότητα του φυλλώματος του φυτού με εκείνα του γένους *Zamia* (Ζαμία) των *cycad* (Κυκαδώδη). Βοτανικά συνώνυμα του φυτού είναι τα είδη *Caladium zamiaefolium*,

Zamioculcas loddigesii και *Z. lanceolata*. Το φυτό συχνά είναι πιο γνωστό με τις ονομασίες "ZZ plant", "aroid palm", "fat boy", "eternity plant", "Zanzibar Gem", "Arum Fern", "Zu Zu Plant", "timbuktu tree" και "Money Tree".

Πρόκειται για ένα τροπικό, μονοκοτυλήδονο, ποώδες, πολυετές, ριζωματικό φυτό το οποίο κατάγεται από την ανατολική Αφρική. Είναι μέλος των αρωδών (*Araceae*). Σε πρώτη εντύπωση το γεγονός αυτό μπορεί να αποτελεί έκπληξη, επειδή έχει διακριτή εμφάνιση από τα άλλα φυτά εσωτερικών χώρων της οικογένειας των αρωδών, στα οποία το σχήμα των φύλλων είναι ασπιδοειδές ή/και καρδιοειδές (*peltate - cordate*). Καλλιεργείται ως επιχειρηματικό, ανθοκομικό φυτό από το 2000, αν και το είδος έχει περιγραφεί βοτανικά από το 1905. Το *Zamioculcas zamiifolia* είναι αυτοφυές φυτό των ανατολικών χωρών της Αφρικανικής Ηπείρου όπως Zanzibar, Tanzania, Kenya, Zimbabwe, Mozambique, South Africa. Φύεται σε βραχώδη, σκιερά εδάφη, αλλά σπάνια σε εδάφη με έντονη σκίαση. Επιβιώνει, όμως και σε περιόδους βροχοπτώσεων που επικρατούν στις ίδιες περιοχές. Στην οικογένεια των αρωδών συμπεριλαμβάνονται και τα γνωστότερα γένη *Philodendron* sp., *Anthurium* sp., *Alocasia* sp., και πολλά φυτά εξωτικών χωρών. Η ταξινόμηση του φυτού στην οικογένεια *Araceae* γίνεται αντιληπτή όταν το φυτό ανθίζει. Τα άνθη του χαρακτηρίζονται από μία πράσινη σπάθη την οποία καλύπτει περιφερειακά ένα μικρό σκούρο κίτρινο, καστανό ή αργυρό σπάδικα. Παράγονται περιοδικά από ώριμα φυτά κοντά στη βάση των φύλλων και στο επίπεδο του εδάφους. Η άνθηση του φυτού που συνήθως γίνεται από τα μέσα καλοκαιριού μέχρι το φθινόπωρο θεωρείται από μερικούς ως καλοτυχία και ευτυχία.

Καλλιεργείται επιχειρηματικά ως ανθοκομικό φυτό κυρίως για το ελκυστικά, γυαλιστερά, λεία και πτεροειδή φύλλα του. Θεωρείται ένα ανθεκτικό φυτό το οποίο διατηρείται πράσινο στη διάρκεια όλου του χρόνου, κατάλληλο για

ανάπτυξη στις οριακές συνθήκες διαμερισμάτων και γραφείων, που αντέχει την χαμηλή υγρασία, το δυνατό άνεμο, το χαμηλό φωτισμό και επίσης εμφανίζει αντοχή στην ξηρασία. Όλα τα μέρη του φυτού θεωρούνται δηλητηριώδη αν φαγωθούν. Θεωρείται ως ένα φυτό που διακρίνεται από την ικανότητά του να καθαρίζει τον αέρα στο εσωτερικό των σπιτιών (<http://www.avianweb.com/zamioculcas.html>).

Με τα χαρακτηριστικά που διαθέτει το φυτό μπορεί να αποτελέσει μια καλή επιλογή για διακόσμηση εσωτερικών χώρων και ένα τέλειο φυτό για το σύγχρονο κάτοικο των πόλεων που επιθυμεί να έχει ένα ανθεκτικό φυτό στο σπίτι ή στην εργασία. Μπορεί να διατηρηθεί σε εξωτερικό χώρο όσο η θερμοκρασία δεν είναι χαμηλότερη από 15 °C. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ 18 °C και 26 °C. Σε υψηλές θερμοκρασίες παρατηρείται αύξηση στην παραγωγή φυλλώματος. Σε εύκρατες περιοχές το φυτό συνήθως αναπτύσσεται ως φυτό εσωτερικού χώρου. Χαρακτηρίζεται από αργή ανάπτυξη. Αποκτά ύψος μέχρι περίπου 60 cm, οι νέοι βλαστοί εξέρχονται από το ριζώμα που βρίσκεται μέσα στο έδαφος. Στο επίπεδο του εδάφους παράγει μεγάλα στρογγυλού σχήματος ριζώματα τα οποία βοηθούν στην διατήρηση του νερού και της τροφής. Οι νέοι βλαστοί διατάσσονται πολύ κοντά ενωμένοι και σχηματίζουν συστάδα στελεχών (φύλλα). Τα σκληρά, σκούρα, πράσινα, λαμπερά φυλλάρια είναι πολύ ελκυστικά έχουν σχήμα οβάλ με αιχμηρή κορυφή. Όπως και σε άλλα φυτά της οικογένειας *Araceae*, τμήματά τους μπορεί να προκαλέσουν δηλητηρίαση αν καταναλωθούν, αφού περιέχουν μικρούς διάφανους κρυστάλλους σε σχήμα καρφίτσας, οι οποίοι συχνά περιέχονται στους ιστούς των φυτών (rhabdides) και άλατα από οξαλικό ασβέστιο (calcium oxalate).

1.2. Καλλιέργεια του φυτού

Το *Zamioculcas zamiifolia* αποτελεί ένα ανθεκτικό φυτό. Μπορεί να αντέχει να αναπτύσσεται σ' ένα περιορισμένο χώρο για μεγάλο χρονικό διάστημα. Όμως, όταν αναπτύσσεται σε χαμηλό φωτισμό ή σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού για μεγάλες χρονικές περιόδους, η ανάπτυξή του σταματάει και γίνεται εμφανής με την απουσία νέας βλάστησης. Τα φυτά κατά γενικό κανόνα αναπτύσσονται καλύτερα και είναι πιο εύρωστα όταν τους παρέχεται έντονο αλλά έμμεσο ηλιακό φως ή το πρωινό και απογευματινό ηλιακό φως για 4 - 6 h ημερησίως. Η περιστροφή της γλάστρας κατά διαστήματα συμβάλλει στην συμμετρική ανάπτυξη του φυτού. Πρέπει να αποφεύγεται η έκθεση σε άμεσο ηλιακό φως γιατί μπορεί να προκληθεί ηλιόκαυμα στα φύλλα. Τα φυτά αναπτύσσονται σε ποικίλα αλλά καλά αποστραγγιζόμενα εδάφη.

Το φυτό είναι ικανό να ξεπερνάει μικρές περιόδους ξηρασίας αλλά το κανονικό πότισμα θα κρατήσει το υπόστρωμα ανάπτυξης υγρό σε όλες τις περιόδους, που αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την ανάπτυξη ενός υγιούς φυτού. Λιπάσματα αργής απελευθέρωσης μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε συχνότητα και σε ποσότητα τέτοια που να ευνοούν την ανάπτυξη των φυτών. Υδατοδιαλυτά λιπάσματα μπορεί να χρησιμοποιηθούν αραιωμένα στο 1/4 της κανονικής δόσης, μία φορά το μήνα. Τα φυτά σπάνια προσβάλλονται από έντομα και ασθένειες. Τα κοκκοειδή αποτελούν ένα κοινό εχθρό των φυτών εσωτερικών χώρων που ευκαιριακά μπορεί να προσβάλλει τα *Zamioculcas*. Αναφέρεται ότι κατάρρευση και νέκρωση των φυτών μπορεί να προέλθει από σήψεις των φυτών στην περιοχή του λαιμού και των ριζών με αρχική αιτία συνήθως, την υπερβολική υγρασία του εδαφικού υποστρώματος.

Το φυτό μπορεί να πολλαπλασιαστεί με μοσχεύματα φύλλων (Εικ. 7) αν αυτά κοπούν και μετά τη φελλοποίηση του κομμένου άκρου βυθιστούν σ' ένα υπόστρωμα ριζοβολίας. Τα μοσχεύματα φύλλα και το υπόστρωμα πρέπει να διατηρούνται υγρά συνεχώς και να τοποθετούνται σ' ένα υγρό μέρος. Η

διατήρηση της υγρασίας στο υπέργειο τμήμα μπορεί να γίνει με την κάλυψή τους με πλαστική σακούλα. Η εμφάνιση νέων φυταρίων μπορεί να πάρει μεγάλο χρονικό διάστημα και το νέο φύλλο να ξεραθεί. Ριζώματα θα σχηματισθούν μεταξύ του εδάφους και του νέου φυτού και τα οποία μπορεί να φυτευτούν στην συνέχεια μόνα τους.



Εικόνα 7. Πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα φύλλου

1.3. Ασθένειες του φυτού *Zamioculcas zamiifolia*

1.3.1. Σήψη της βάσης του μίσχου από τον ωμούκητα *Phytophthora nicotianae*

Το 2003 σε επιχειρηματική ανθοκομική καλλιέργεια της Ταϊβαν σε φυτά ZZ, διαπιστώθηκε σήψη των μίσχων, που προκαλούσε τη σταδιακή νέκρωση των φυτών, σε ποσοστό 18%. Διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για μια νέα ασθένεια για το ZZ, η οποία προκαλείται από τον ωμούκητα *Phytophthora nicotianae*. Τα πρώτα συμπτώματα εκδηλώνονται με σχηματισμό υδαρούς κηλίδας στη βάση του μίσχου που συνοδεύεται με ελαφρύ κιτρίνισμα των φυλλαρίων του φυτού και ακολουθείται από καστανό μεταχρωματισμό. Καθώς η προσβολή εξελίσσεται, η βάση του μίσχου αποκτά χρώμα σκούρο καστανό - μαύρο, συρρικνώνεται, καταρρέει και συχνά σήπεται. Η επιφάνεια των ριζών και των ριζωμάτων των προσβεβλημένων φυτών στην αρχή της προσβολής εμφανίζουν καστανόμαυρο μεταχρωματισμό ενώ ακολουθεί σήψη των ριζών και τελικά τη νέκρωση των φυτών (Feng *et al.*, 2006).

1.3.2. Προσβολή από βακτήρια του γένους *Erwinia* spp

Το *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* έχει απομονωθεί από φυτά *Zamioculcas zamiifolia* το 2000 στην Costa Rica όπως, έμμεσα, προκύπτει από το στέλεχος (PD 3882) του βακτηρίου που χρησιμοποιήθηκε σε πρόσφατη μελέτη (Costa *et al.*, 2006). Δεν υπάρχουν άλλες σχετικές αναφορές για το συγκεκριμένο στέλεχος ή γενικότερα για την περιγραφή της ασθένειας. Γενικά, το φυτό θεωρείται ανθεκτικό σε παθογόνα και εχθρούς.

1.3.3. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός και η ταυτοποίηση του παθογόνου αιτίου της βακτηριακής σήψης του φυτού *Zamioculcas zamiifolia*, με εξέταση των βιοχημικών, φυσιολογικών, ορολογικών και παθολογικών χαρακτήρων των απομονώσεων του παθογόνου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Απομόνωση του παθογόνου

Η απομόνωση του παθογόνου πραγματοποιήθηκε από συμπτωματικά φυτά *Zamioculcas zamiifolia* που προσκομίστηκαν στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας - Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης. Τμήματα φυτικών ιστών από τα όρια της προσβολής, από τους προσβεβλημένους μίσχους του φυτού, από τα φυλλάρια και από τα ριζώματα αφαιρέθηκαν ασηπτικά, τεμαχίστηκαν σε περίπου 2 ml απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού.

Η διασπορά του εκχυλίσματος έγινε σε θρεπτικά υποστρώματα Nutrient Agar Glucose (NAG) και King's medium B (Εικ. 1.5 - 1.7). Μετά από επώαση 24 - 48 h μεμονωμένες αποικίες μεταφυτεύθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα King's medium B για τον έλεγχο της ικανότητας φθορισμού. Ακολούθησε έλεγχος της καθαρότητας των απομονώσεων, με διαδοχικές διασπορές σε θρεπτικά υποστρώματα με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Αφού επιβεβαιώθηκε η καθαρότητα των απομονώσεων με τον έλεγχο των μορφολογικών χαρακτηριστικών των αποικιών, επιλέχθηκαν μεμονωμένες, με όμοιο μορφολογικό φαινότυπο αποικίες και μεταφυτεύτηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG. Οι απομονώσεις κατά τη διάρκεια του πειράματος διατηρήθηκαν στη συλλογή του εργαστηρίου σε θερμοκρασία 4 °C, μέσα σε σωλήνες με θρεπτικό υπόστρωμα *Gelose profonde*. Για τις διάφορες δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες βακτηρίων 24 - 48 ωρών προερχόμενες από καλλιέργειες σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG. Το σύνολο των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην διάρκεια της εργασίας εμφανίζεται στον Πίνακα 1.

2.2. Προκαταρτικές δοκιμές ταυτοποίησης των απομονώσεων

Αρχικά, εξετάσθηκε η ικανότητα φθορισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα King's medium B, ο αερόβιος ή αναερόβιος μεταβολισμός της γλυκόζης, η κατάταξη κατά Gram με τη δοκιμή σε 3% KOH (Εικ. 1.3), η ικανότητα σήψης κονδύλων πατάτας (Εικ. 1.8) και η εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φύλλα φυτών καπνού ποικιλίας Χανθί (Εικ. 1.9). Με βάση τις παραπάνω δοκιμές μεγάλος αριθμός απομονώσεων από τα προσβεβλημένα φυτά *Zamioculcas zamiifolia*, προσδιορίστηκαν προκαταρκτικά ότι ανήκαν στο γένος *Pectobacterium* spp. (*Erwinia* spp.).

2.3. Ταυτοποίηση του παθογόνου. Εξέταση βιοχημικού και φυσιολογικού φαινοτύπου των απομονώσεων

Περαιτέρω ταυτοποίηση επιλεγμένων απομονώσεων του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που ακολουθείται στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας - Βακτηριολογίας του ΤΕΙ Κρήτης και περιγράφεται από τους Schaad *et al.*, 2001, Γκούμας, 2005 και Γουμας, 1999. Συμπληρωματικά για το προσδιορισμό των βιοχημικών χαρακτηριστικών χρησιμοποιήθηκε η σειρά των αρί 20Ε δοκιμών (Εικ. 1.2 & 1.4). Επιπλέον οι απομονώσεις από *Zamioculcas zamiifolia* δοκιμάστηκαν με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού (IF) ως προς την αντίδρασή τους με το Test Fluoriscan IF για το *Erwinia chrysanthemi* (ADGEN 1080-17) και με αντιορούς του εργαστηρίου έναντι του *Erwinia chrysanthemi* (αντι-Di4 & αντι-Echr1871) και του *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (αντι-Ecc 30101). Συγκριτικά σε όλες τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν ταυτοποιημένα στελέχη από διάφορα είδη του γένους *Erwinia* spp., προερχόμενα από τη συλλογή του εργαστηρίου. Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των απομονώσεων σε επίπεδο είδους και υποείδους αναφέρονται στον Πίνακα 7.

2.4. Δοκιμές παθογένειας

2.4.1. Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού.

Η αντίδραση υπερευαισθησίας πραγματοποιήθηκε σε φυτά καπνού ποικιλίας Xanthi με σκοπό τον προκαταρκτικό έλεγχο της παθογένειας των βακτηριακών απομονώσεων. Σχηματίσθηκαν αιωρήματα, συγκέντρωσης 10^8 c.f.u./ml σε απεσταγμένο νερό με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Έπειτα, με τη χρήση σύριγγας εμβολιάστηκαν φύλλα καπνού με το παραπάνω αιώρημα. Μετά τη διαβροχή του με νερό το φυτό διατηρήθηκε σε πλαστική σακούλα και σε θερμοκρασία περίπου 25°C ώστε να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες υψηλής υγρασίας για την εκδήλωση της αντίδρασης, η οποία εκτιμήθηκε σε διάστημα 24 - 48 ωρών. Παρατηρήθηκε η εκδήλωση τυπικής αντίδρασης υπερευαισθησίας ή η εξέλιξή της, σε διασυστηματική μόλυνση του καπνού.

2.4.2. Μόλυνση σε ροδέλες πατάτας

Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε σε ροδέλες πατάτας με σκοπό την προκαταρκτική διαπίστωση της παραγωγής πηκτινολυτικών ενζύμων. Αφού έγινε εξωτερική απολύμανση των κονδύλων της πατάτας με οινόπνευμα και αφαίρεση του φλοιού ασηπτικά, οι κόνδυλοι τεμαχίστηκαν σε ροδέλες και τοποθετήθηκαν σε τριβλία Petri, στα οποία είχε τοποθετηθεί αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί. Σε κάθε ροδέλα πατάτας με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα καλλιέργειας βακτηρίου από τα διάφορα στελέχη, προκαλώντας ταυτόχρονα μικρές πληγές στην επιφάνεια της ροδέλας της πατάτας. Αφού προσθέσαμε αποστειρωμένο νερό κλείσαμε τα τριβλία και τα αφήσαμε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για την εκδήλωση της μόλυνσης (σήψη), η οποία εκτιμήθηκε σε διάστημα 48 h. Παρόμοια μολύνθηκαν στο εργαστήριο κομμένοι καρποί κολοκυθιού.

2.4.3. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά *Zamioculcas zamiifolia*

Μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε μίσχους και σε φύλλα ανεπτυγμένων φυτών *Zamioculcas zamiifolia*. Η μόλυνση των ιστών του φυτού έγινε είτε με την εναπόθεση βακτηριακού αιωρήματος (20μl, συγκέντρωσης 10^6 cfu/ml) στους μίσχους καλά ανεπτυγμένων φυτών είτε με την είσοδο οδοντογλυφίδας στους φυτικούς ιστούς (Εικ. 4.1), η οποία προηγουμένα είχε έλθει σε επαφή με καλλιέργεια του αντίστοιχου βακτηρίου. Ο εμβολιασμός στα φύλλα πραγματοποιήθηκε με την έκχυση βακτηριακού αιωρήματος στα φυλλάρια του φυτού με την βοήθεια σύριγγας, με την ίδια διαδικασία που ακολουθείται κατά την εκτέλεση της αντίδρασης υπερευαισθησίας. Παρατηρήσεις πάρθηκαν για διάστημα μίας εβδομάδας. Με παρόμοια μεθοδολογία εξετάστηκε η ικανότητα μόλυνσης φυτών *Zamioculcas zamiifolia* από στελέχη του γένους *Erwinia* spp. της συλλογής του εργαστηρίου Βακτηριολογίας τα οποία αναφέρονται στον Πίνακα 2.

2.4.4. Μόλυνση σε φυτά τομάτας

Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε σε φυτά τομάτας με σκοπό τη διαπίστωση της παθογένειας των απομονώσεων. Με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα, μικρή ποσότητα της καλλιέργειας από τις απομονώσεις της *Zamioculcas zamiifolia* εισήχθη στο στέλεχος φυτών τομάτας (στάδιο των 3-4 πραγματικών φύλλων). Το σημείο της μόλυνσης καλύφτηκε με μεμβράνη parafilm και τα φυτά διατηρήθηκαν στο θερμοκήπιο σε κατάλληλες συνθήκες υγρασίας (85% Σ.Υ.) και θερμοκρασίας (25°C) για την εκδήλωση των συμπτωμάτων της μόλυνσης (σήψη, μάρανση), η εκτίμηση των οποίων έγινε για διάστημα μίας εβδομάδας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Συμπτώματα της ασθένειας

Η μόλυνση αρχικά εκδηλώνεται με την δημιουργία υδατώδους κηλίδας στους μίσχους των φύλλων του φυτού, συχνά στην περιοχή που έρχονται σε επαφή με το εδαφικό υπόστρωμα (Εικ. 2). Σε περίπτωση έντονης μόλυνσης, η σήψη του μίσχου είναι γρήγορη προκαλώντας την αποσύνθεση των προσβεβλημένων ιστών και την πτώση τους και συχνά τη μετατροπή τους σε άμορφη μάζα δύσοσμων ιστών (Εικ. 2). Εντούτοις, συχνά, όταν η μόλυνση εξελίσσεται με αργότερο ρυθμό, τότε τα συμπτώματα εκδηλώνονται σταδιακά και παρατηρείται διαδοχικά, λέπτυνση - τήξη των ιστών στην αρχική θέση προσβολής (Εικ. 2), καστανός μέχρι μαύρος μεταχρωματισμός τόσο εξωτερικά όσο και εσωτερικά των ιστών, σε απόσταση τουλάχιστον 6-7 cm εκατέρωθεν από το αρχικό σημείο εκδήλωσης της προσβολής (Εικ. 5.3). Εξωτερικά, οι προσβεβλημένοι ιστοί εμφανίζονται ενυδατωμένοι, σαν "βρασμένοι", με εντονότερο πράσινο χρωματισμό, διατηρούν όμως την δομή τους για αρκετό χρονικό διάστημα πριν την οριστική τους κατάρρευση (Εικ. 3.1 - 3.3). Η μόλυνση στα ριζώματα του φυτού εκδηλώνεται με υγρή σήψη (Εικ. 3.4), που συνοδεύεται συχνά από έντονη δυσσομία. Οι προσβεβλημένοι ιστοί εμφανίζονται έντονα υδαρείς και κατά την αποσύνθεσή τους το εσωτερικό σήπεται και συχνά παραμένει μόνο ο φλοιός του ριζώματος (Εικ. 3.5 & 3.6). Μικροσκοπική παρατήρηση ιστών από τα όρια της προσβολής έκανε ορατή την παρουσία βακτηρίων σε μορφή νεφελώματος (Εικ. 1.1).

3.2. Απομόνωση παθογόνου

Από τις απομονώσεις που πραγματοποιήθηκαν από προσβεβλημένα μέρη (μίσχοι, φύλλα, ριζώματα) φυτών *Zamioculcas zamiifolia*, απομονώνονταν σταθερά βακτήρια σε καθαρή καλλιέργεια. Προσπάθειες που έγιναν για τυχόν

απομόνωση μυκήτων και ιδιαίτερα του ωομύκητα *Phytophthora* spp. που έχει αναφερθεί ως αίτιο ασθένειας στο φυτό δεν ήταν επιτυχείς. Οι αποικίες των βακτηριακών στελεχών στο θρεπτικό υλικό Nutrient Agar Glucose (NAG) μετά από χρονικό διάστημα 24 - 48 ωρών παρουσίασαν τα εξής μορφολογικά χαρακτηριστικά: ήταν κυκλικές, κρεμώδεις, άσπρες και ελαφρά υπερυψωμένες.

3.3. Προσδιορισμός του παθογόνου

Προκαταρκτικά, οι απομονώσεις κατατάχθηκαν ως αρνητικά κατά Gram βακτήρια, σύμφωνα με τη δοκιμή σε διάλυμα ΚΟΗ 3%. Σε θρεπτικό υλικό King's medium Β (ΑF) δεν εμφάνισαν φθορισμό. Στο θρεπτικό υλικό Hugh & Leifson (H+L) όλες οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως προαιρετικά αναερόβιες. Επιπλέον, όλες οι απομονώσεις έδωσαν σε 24 ώρες θετική αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) σε φύλλα καπνού. Καμία απομόνωση δεν παράγει οξειδάση. Κανένα από τα βακτηριακά στελέχη δεν αντέδρασε στη δοκιμή του ανοσοφθορισμού (IF) με τούς ειδικούς αντιορούς έναντι του *Erwinia chrysanthemi*, σε αντίθεση με τη θετική αντίδρασή τους με τον αντιορό αντι-30101 του *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, πιστοποιώντας ότι κανένα από τα απομονωθέντα βακτηριακά στελέχη δεν ανήκει στο είδος *Erwinia chrysanthemi*.

Δεκατέσσερα βακτηριακά στελέχη από τα φυτά *Zamioculcas zamiifolia* ταυτοποιήθηκαν με βάση το φαινότυπο, των μορφολογικών, φυσιολογικών, βιοχημικών (κλασικές βακτηριολογικές δοκιμές) και ορολογικών τους χαρακτήρων (Πίνακας 2) και τις τυποποιημένες δοκιμές αρ1 20Ε, ως στελέχη του βακτηρίου *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (συν. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*). Με το πρόγραμμα API LAB PLUS ο χαρακτηρισμός σε επίπεδο υποείδους επιβεβαιώθηκε με ποσοστό ταύτισης 99,9% για δύο στελέχη του παθογόνου, σύμφωνα με τα δεδομένα

του προγράμματος. Τα στελέχη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των δοκιμών ταυτοποίησης εμφάνισαν τον αναμενόμενο κατά περίπτωση βακτηριακού στελέχους φαινότυπο, επιβεβαιώνοντας την αρχική τους ταυτοποίηση .

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 : Ταυτοποίηση βακτηριακών απομονώσεων από το φυτό *Zamioculcas zamiifolia*

ΔΟΚΙΜΕΣ	ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ <i>Zamioculcas zamiifolia</i>	<i>Erwinia</i> <i>chrysanthemi</i>	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>
Αριθμός στελεχών	14	4	6	2
Ανάπτυξη σε 37 ° C	-	+	-	+
Αναγωγικές ουσίες από σακχαρόζη	-	-	-	+
Παραγωγή φωσφατάση	-	+	-	-
Ευαισθησία στην ερυθρομικίνη	-	+	-	-
Παραγωγή ινδόλης	-	+	-	-
Παραγωγή οξέος από:				
σορβιτόλη	-	-	-	-
μελιβιόζη	+	+	+	+
κιτρικό Na	+	+	+	+
ραφινόζη	+	+	+	+
αραβιτόλη	-	-	-	-
λακτόζη	+	+	+	+
Χρησιμοποίηση: Κέτο-μεθυλγλυκοζιδίου	-	-	-	+

3.4. Δοκιμές παθογένειας

Οι δεκατέσσερις απομονώσεις από τα φυτά *Zamioculcas zamiifolia* βρέθηκαν θετικές στην αντίδραση υπερευαισθησίας και προκάλεσαν τη σήψη ροδέλας κονδύλων πατάτας, ενώ συγχρόνως ήταν έντονα μολυσματικές σε φυτά του ίδιου είδους. Αρχικά, στα ανεπτυγμένα φυτά *Zamioculcas zamiifolia* παρατηρήθηκε η δημιουργία υδατώδους κηλίδας (Εικ. 5.1 & 5.2), η οποία σταδιακά, αλλά γρήγορα, εξελίσσεται σε μαλακή σήψη, που επεκτείνεται πέρα από το σημείο της αρχικής θέσης εμβολιασμού του παθογόνου (4-5cm). Εσωτερικά, η μόλυνση συνοδεύεται από καστανό μεταχρωματισμό των αγγείων και των εσωτερικών ιστών (Εικ. 5.3). Η σήψη προκαλεί συνήθως την πτώση του μίσχου του φυτού (Εικ. 4.2 & 4.3) σε διάστημα 2-3 ημερών. Οι τεχνητές μολύνσεις στα φύλλα, αρχικά προκάλεσαν τη δημιουργία υδατώδους κηλίδας, η οποία στη συνέχεια εξελίσσεται σε νεκρωτική, με βύθιση των ιστών και σταδιακά την εμφάνιση έντονου χλωρωτικού περιθωρίου, χωρίς όμως να προκαλείται σήψη των μολυσμένων ιστών (Εικ. 6.1 - 6.4). Από τα αποτελέσματα των τεχνητών μολύνσεων προκύπτει ότι η συμπτωματολογία που εκδηλώθηκε ήταν παρόμοια με εκείνη που παρατηρήθηκε στα φυσικά μολυσμένα φυτά.

Από τα αποτελέσματα των δοκιμών παθογένειας, με τα απομονωθέντα στελέχη σε φυτά *Zamioculcas zamiifolia*, την αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού, τη μόλυνση σε φυτά τομάτας, τη μόλυνση σε κονδύλους πατάτας και σε κομμένους καρπούς κολοκυθίου, προκύπτει ότι τα απομονωθέντα στελέχη ήταν έντονα μολυσματικά, με κύριο σύμπτωμα τη σήψη των τεχνητά μολυνθέντων ιστών, ως έκφραση της παθογένειας τους. Τα επιμέρους παρατηρηθέντα συμπτώματα αναφέρονται στον Πίνακα 2.

Σημειώνεται ότι από τα δώδεκα παθογόνα στελέχη της συλλογής του γένους *Erwinia* spp. από διάφορους ξενιστές (θετική αντίδραση υπερευαισθησίας και σήψη των κονδύλων της πατάτας), μόνο δύο στελέχη (Ecc 3733 & Ecc 3080)

μόλυναν κατά τις τεχνητές μολύνσεις τους μίσχους ή τα φύλλα του φυτού *Zamioculcas zamiifolia* (Πίνακας 2). Τα υπόλοιπα δέκα στελέχη δεν προκάλεσαν κανένα σύμπτωμα. Σε όλες τις δοκιμές παθογένειας που πραγματοποιήθηκαν το ίδιο παθογόνο επαναπομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια από κάθε ξενιστή που δοκιμάστηκε. Δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα στα φυτά μάρτυρες.

Πίνακας 2. Δοκιμές παθογένειας: σε φυτά *Zamioculcas zamiifolia*, σε ροδέλες πατάτας, αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) σε φύλλα καπνού

Βακτηριακά στελέχη	Ξενοστής	Πηκτινόλυση πατάτας Σήψη ροδέλας κονδύλου πατάτας	HR (Καπνός)	Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά <i>Zamioculcas zamiifolia</i>	Παρατηρήσεις
3752	Ζαμιόκουκας	+	+	+	+: Σε ροδέλα πατάτας:Μαλακή σήψη +: Σε φυτά <i>Zamioculcas zamiifolia</i> : εκτενής μαλακή σήψη πέρα από το σημείο μόλυνσης, αρχικά υδατώδης κηλίδα, με ή χωρίς πτώση του μίσχου (Μ) του φυτού. Φύλλα (Φ) υδατώδης κηλίδα εξελισσόμενη σε νεκρωτική χωρίς σήψη με χλωρωτικό περιθώριο +: Σε καπνό: Αντίδραση υπερευαισθησίας (HR)
3746	Ζαμιόκουκας	+	+	+ (Μ & Φ)	
3740	Ζαμιόκουκας	+	+	+ (Μ & Φ)	
3743	Ζαμιόκουκας	+	+	+	
3754	Ζαμιόκουκας	+	+	+	
3750	Ζαμιόκουκας	+	+	+	
3742	Ζαμιόκουκας	+	+	+	
3747	Ζαμιόκουκας	+	+	+	
3748	Ζαμιόκουκας	+	+	+ (Μ & Φ)	
3749	Ζαμιόκουκας	+	+	+	
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (Ecc)/ <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroceptica</i> (Eca)/ <i>Erwinia chrysanthemi</i> (Echr)					
3216 Eca	Πατάτα	+	+	-	Μαλακή σήψη
3080 Ecc	Αγκινάρα	+	+	+ (Μ)	Καστανό περιθώριο
3733 Ecc	Κουνουπίδι	+	+	+ (Μ)	Καστανό περιθώριο

Βακτηριακά στελέχη	Ξενοστής	Πηκτινόλυση πατάτας Σήψη ροδέλας κονδύλου πατάτας	HR (Καπνός)	Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά <i>Zamioculcas zamiifolia</i>	Παρατηρήσεις
3082 Ecc	Αγκινάρα	+	+	- (Μ & Φ)	Καστανό περιθώριο
3478 Ecc	Τομάτα	+	+	-	Μαλακή σήψη
3221 Ecc	Πατάτα	+	+	-	Μαλακή σήψη
3357 Echr	Τομάτα	+	+	-	Μαλακή σήψη
3365 Echr	Τομάτα	+	+	-	Καστανό περιθώριο
3213 Ecc	Πατάτα	+	+	-	Μαλακή σήψη
3221 Eca	Πατάτα	+	+	-	Μαλακή σήψη
3371 Echr	Τομάτα	+	+	-	Μαλακή σήψη
3370 Echr	Τομάτα	+	+	-	Μαλακή σήψη
Μάρτυρας		-	-	-	

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τη μελέτη των βιοχημικών, φυσιολογικών, ορολογικών και παθογενετικών χαρακτηριστικών προκύπτει ότι τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από τα ασθενή φυτά *Zamioculcas zamiifolia* ταυτοποιούνται ως μέλη του βακτηρίου *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (συν. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*). Το βακτήριο πολύ πιθανά απομονώνεται για πρώτη φορά στην Ελλάδα και στην Ευρώπη από το φυτό. Πρόσφατα ένα στέλεχος του παθογόνου (PD 3882, PD: Dutch Plant Protection Service Collection) από το φυτό *Zamioculcas zamiifolia*, προερχόμενο από την Costa Rica, με χρονολογία απομόνωσης το 2000, χρησιμοποιήθηκε στην Πορτογαλία σε μελέτη που σχετίζεται με τα πηκτινολυτικά βακτήρια του γένους *Erwinia* spp. από διάφορους ξενιστές (Costa *et al.*, 2006). Ο φαινότυπος που εμφάνισαν οι ελληνικές απομονώσεις από τα φυτά *Zamioculcas zamiifolia* είναι όμοιος με εκείνον που δίδεται για το στέλεχος PD3882, όπως και για τα υπόλοιπα στελέχη του *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* που χρησιμοποιήθηκαν στην ίδια μελέτη (Costa *et al.*, 2006). Σε προσπάθεια βιβλιογραφικής αναζήτησης σχετικής με την περιγραφή της ασθένειας δεν βρέθηκαν βιβλιογραφικές αναφορές. Ένα σημαντικό στοιχείο που προκύπτει από τη μελέτη είναι ότι κατά τις δοκιμές παθογένειας με δώδεκα παθογόνα στελέχη (HR + και σήψη κονδύλου πατάτας +) από τη συλλογή του εργαστηρίου, που ανήκουν στα *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (6), *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (2) και *Erwinia chrysanthemi* (4), μόνο δύο στελέχη βρέθηκαν να μολύνουν και να αναπαραγάγουν τα συμπτώματα της ασθένειας σε φυτά *Zamioculcas zamiifolia*. Πρόκειται για δύο στελέχη του *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* που απομονώθηκαν από αγκινάρα (3080) και κουνουπίδι (3733). Τα αποτελέσματα αυτά πρέπει να επαναληφθούν και να επιβεβαιωθούν

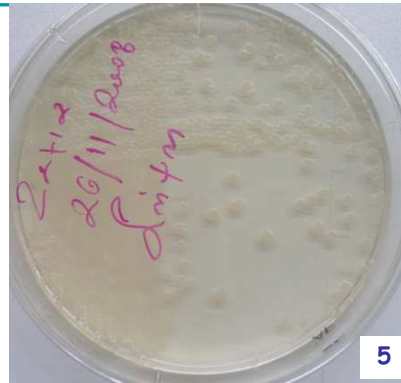
δεδομένου ότι τα βακτήρια του γένους *Erwinia* spp. χαρακτηρίζονται από το μεγάλο εύρος ξενιστών που προσβάλλουν. Παρόμοια με την περιγραφείσα συμπτωματολογία έχει αναφερθεί σε προσβολές του φυτού από τον ωμόκητα *Phytophthora nicotianae* σε επιχειρηματικά φυτώρια στην Ταϊβάν (Feng *et al.*, 2006), με το ποσοστό των μολυσμένων φυτών να κυμαίνεται στο 18%. Σε προσπάθειες που έγιναν στο εργαστήριο σε κανένα από τα δείγματα που απομονώθηκε βακτήριο, δεν απομονώθηκε μύκητας.

5. ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

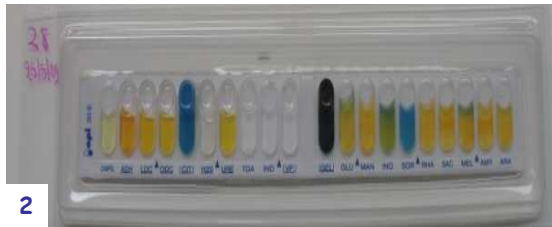
ΕΙΚΟΝΑ 1. Απομόνωση και ταυτοποίηση απομονώσεων του παθογόνου της βακτηριακής σήψης του φυτού *Zamboukas zamifolia*. 1.1.: Νεφέλωμα βακτηρίων από μολυσμένο ιστό. 1.2.: Δοκιμές αρι 20Ε. 1.3.: Δοκιμή 3% KOH (Gram -). 1.4.: Δοκιμή φωσφατάσης. 1.5., 1.6., 1.7.: Απομόνωση σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG, King's B & NAG αντίστοιχα. 1.8.: Σήψη κονδύλων πατάτας. 1.9.: Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού.



1



5



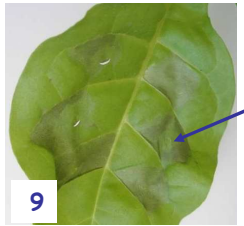
2



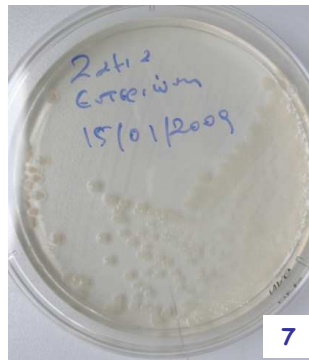
6



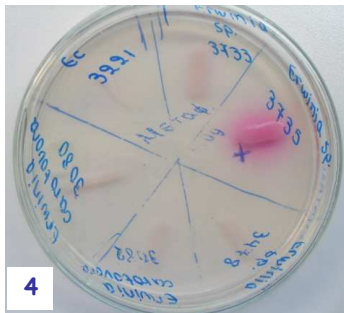
3



9



7



4



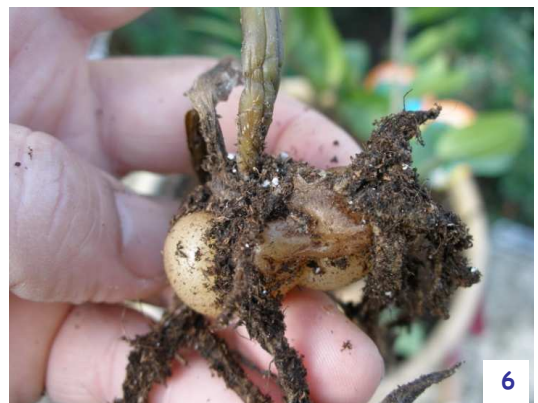
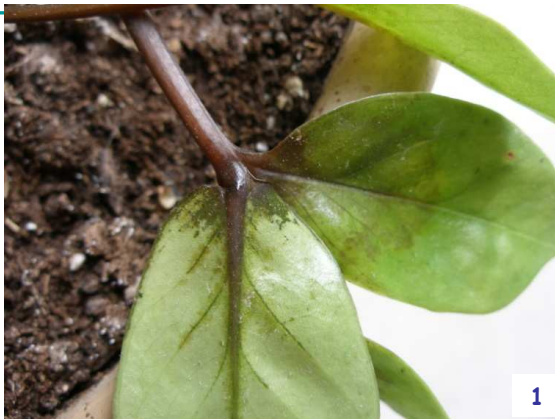
8



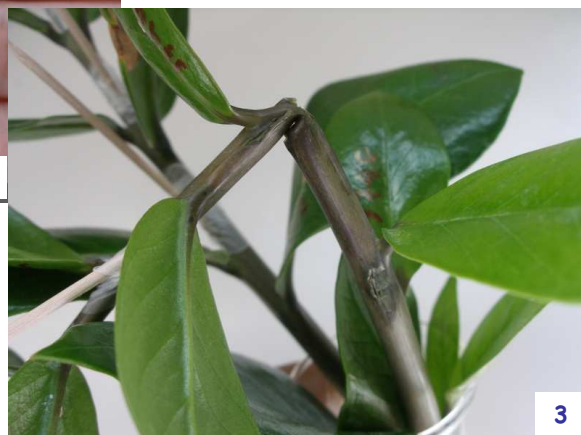
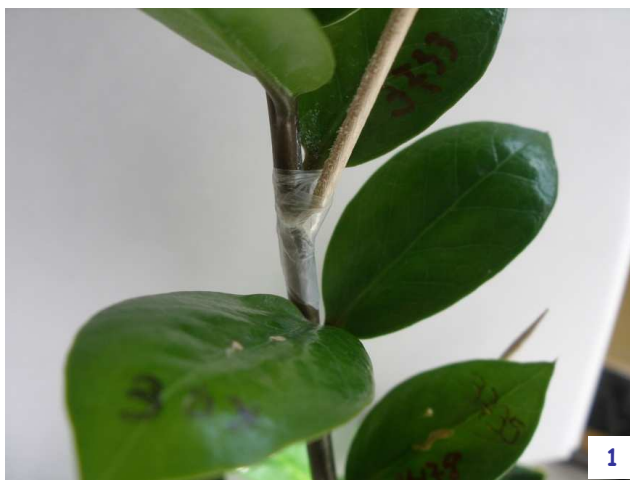
ΕΙΚΟΝΑ 2. Συμπτωματολογία της ασθένειας της βακτηριακής σήψης στο φυτό *Zamioculcas zamiifolia* από το *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Σήψη στη βάση και τήξη των μίσχων του φυτού. Διασυστηματική μόλυνση των φύλλων με εκδήλωση υδαρών περιοχών.



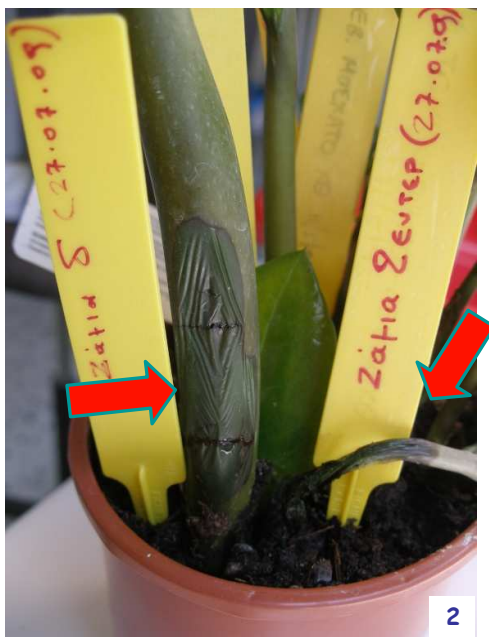
ΕΙΚΟΝΑ 3. Συμπτωματολογία της ασθένειας της βακτηριακής σήψης στο φυτό *Zamioculcas zamiifolia* από το *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. **3.1., 3.2. & 3.3.:** Σήψη τήξη μίσχου, διασυστηματική μόλυνση φύλλων, σήψη εντεριώνης και μεταχρωματισμός αγγείων. **3.4., 3.5. & 3.6.:** Σήψη, αποδιοργάνωση ριζωμάτων και ριζών και αποσύνθεση και μουμιοποίηση ριζωμάτων του φυτού.



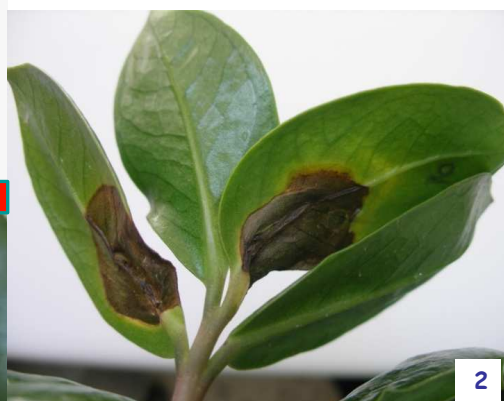
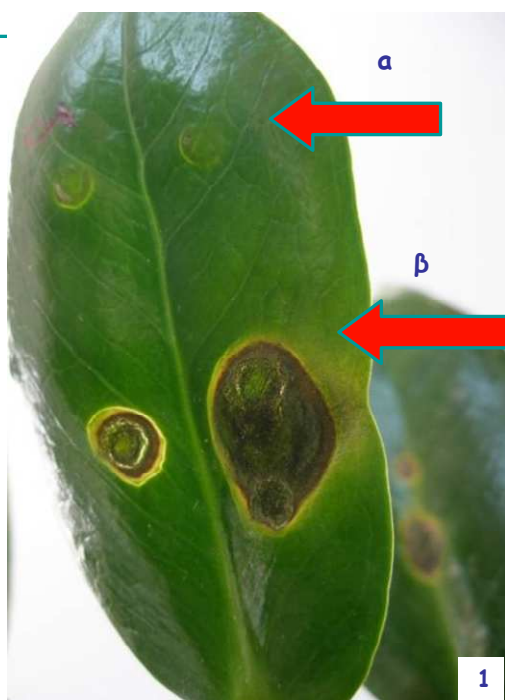
ΕΙΚΟΝΑ 4. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά *Zamioculcas zamiifolia*. Αναπαραγωγή συμπτωμάτων σε μίσχους του φυτού και σε ροδέλες κονδύλων πατάτας. 4.1.: Μέθοδος τεχνητής μόλυνσης μίσχου με οδοντογλυφίδα. 4.2. & 4.3.: Επιτυχής τεχνητή μόλυνση μίσχου με εκδήλωση σήψης & πτώσης.



ΕΙΚΟΝΑ 5. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά *Zamia culcas zamiifolia*. Αναπαραγωγή συμπτωμάτων σε μίσχους του φυτού. **5.1. & 5.2.:** Δημιουργία υδατώδους κηλίδας - σήψης 24 και 72 h μετά τη μόλυνση. **5.3.:** Σήψη και μεταχρωματισμός των ιστών του φυτού. **5.4.:** Σήψη μίσχου με διάφορα στελέχη του παθογόνου



ΕΙΚΟΝΑ 6. Τεχνητές μολύνσεις σε φυτά *Zamiocaulis zamiifolia*. Αναπαραγωγή και εξέλιξη των συμπτωμάτων σε τεχνητές μολύνσεις στα φύλλα. 6.1.: Μη επιτυχής (α) & επιτυχής (β) μόλυνση 48h μετά. 6.2., 6.3. & 6.4.: Εξέλιξη της μόλυνσης στα φύλλα σε μεσοδιάστημα μιας εβδομάδας



6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Blanchard M., & Lopez P., 2007. ZZ plant is an easy tough indoor use. *GMPRO*, January 2007 (www.GreenBeam.com)
- Γκούμας Δ.Ε., 2005. Εργαστηριακές Ασκήσεις Φυτοπαθολογίας. Έκδοση: Σ.Τ.Ε.Γ, Τ.Ε.Ι. Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης, σελ. 85.
- Costa A. B., Eloy M., Cruz L., Janse J.D., Oliveira H., 2006. Studies on pectolytic *Erwinia* spp. in Portugal reveal unusual strains of *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. *Journal of Plant Pathology*, 88, 161 - 169.
- Feng C.T., Ho W.C. & Chao Y.C., 2006. Basal petiole rot and kill of *Zamioculcas zamiifolia* caused by *Phytophthora nicotianae*. *Plant Disease*, 90, 1107.
- Goumas D.E., Malathrakis N.E. and Chatzaki A.K. 1999. Characterization of *Pseudomonas viridiflava* associated with a new symptom on tomato fruit. *European Journal of Plant Pathology* 105, 927-932.
- Lelliot R.A. and Stead D.E. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. P.216.
- Schaad N.W., Jones J.B. & Chum W., 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic bacteria*. APS Press, St.Paul, Minnesota, USA.
- (<http://www.avianweb.com/zamioculcas.html>).