



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ &

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

**Π.Μ.Σ. ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ & ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**



Μεταπτυχιακή μελέτη

**Εφαρμογή μεταβολομικής *in vitro* και *in planta* με σκοπό τη βελτιστοποίηση μέτρων
φυτοπροστασίας έναντι του γλοιοσπορίου της ελιάς (*Colletotrichum acutatum* s.s.)**



Στέφανος Ι. Κολαϊνής

ΑΘΗΝΑ 2020

Επιβλέπων Καθηγητής: Κωνσταντίνος Αλιφέρης

Μεταπτυχιακή μελέτη

Εφαρμογή μεταβολομικής *in vitro* και *in planta* με σκοπό τη βελτιστοποίηση μέτρων φυτοπροστασίας έναντι του γλοιοσπορίου της ελιάς (*Colletotrichum acutatum* s.s.)

Improving plant protection against olive anthracnose (*Colletotrichum acutatum* s.s.) by *in planta* and *in vitro* application of metabolomics

Στέφανος Ι. Κολαϊνής

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπων Καθηγητής:

Κωνσταντίνος Αλιφέρης, Λέκτορας ΓΠΑ, Εργ. Γεωργικής Φαρμακολογίας

Μέλη:

Φωτεινή Φλουρή, Λέκτορας ΓΠΑ, Εργ. Γεωργικής Φαρμακολογίας

Σωτήριος Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ, Εργ. Φυτοπαθολογίας

Περίληψη

Η ελιά (*Olea europaea* L.) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα καλλιεργούμενα είδη στην Ελλάδα, παράγοντας υψηλής ποιότητας προϊόντα. Ωστόσο, οι έντονες προσβολές ελαιοποιήσιμων και επιτραπέζιων ποικιλιών που έχουν σημειωθεί κατά τα τελευταία χρόνια λόγω της εμφάνισης του γλοιοσπορίου (*Colletotrichum* spp.) σε βασικές ελαιοπαραγωγικές περιοχές της χώρας μας, έχουν οδηγήσει σε σοβαρές απώλειες παραγωγής.

Ερευνητικά δεδομένα της ομάδας μας (Pesticide Metabolomics Group, Γ.Π.Α.) έχουν αποδείξει ότι στις Π.Ε. Λακωνίας και Μεσσηνίας, από τις οποίες πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες προσβεβλημένων ελαιοκάρπων, κυριαρχεί το σύμπλοκο είδος *Colletotrichum acutatum*, ενώ διαφορετικοί μορφότυποι του μύκητα έχουν απομονωθεί. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μορφότυποι αυτού παρουσίασαν διαφορετική μολυσματική ικανότητα και επίπεδα ευαισθησίας σε επιλεγμένες δραστικές ουσίες μυκητοκτόνων.

Στην παρούσα μελέτη, εφαρμόστηκε GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση με σκοπό την ανάλυση του μεταβολικού προφίλ των παραπάνω μορφοτύπων. Επιπρόσθετα, εφαρμόστηκαν *in planta* και αξιολογήθηκαν με την ίδια μέθοδο σύγχρονα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.) ως βιοδιεγέρτες σε δενδρύλλια ελιάς.

Οι περαιτέρω αναλύσεις βιοπληροφορικής έδειξαν διαφορές μεταξύ των μεταβολωμάτων των μορφοτύπων του *Colletotrichum acutatum* species complex, στις οποίες μπορούν να αποδοθούν οι διαφορές του στην παθογένεια και την ευαισθησία στα εφαρμοζόμενα μυκητοκτόνα, ενώ ανακαλύφθηκαν μεταβολίτες-βιοσημαντές (π.χ. το phenylacetic acid). Ομοίως, καταγράφηκαν διαφορές στα μεταβολικά προφίλ μεταξύ των διαφορετικών επεμβάσεων με βιοδιεγέρτες στα δενδρύλλια ελιάς, και ανακαλύφθηκαν μεταβολίτες-βιοσημαντές της αντίδρασης του φυτού στους εφαρμοζόμενους βιοδιεγέρτες, (π.χ. οι α , α -trehalose και myo-inositol), οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φυτών, όπως στις αντιδράσεις σε καταπονήσεις.

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την αποτελεσματικότητα των πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν κατά τις αναλύσεις, δίνοντας μια αξιοσημείωτη προοπτική στην παρακολούθηση της ασθένειας και στην περαιτέρω αξιολόγηση και μελέτη της δράσης νέων βιοδραστικών πηγών με σκοπό τη χρήση τους επικουρικά με ήδη εγκεκριμένα Φ.Π. Κρίνεται αναγκαία, επομένως, η διεξαγωγή πειραμάτων μεγαλύτερης κλίμακας και η αξιοποίηση της μεταβολομικής ανάλυσης, ενώ τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά το σχεδιασμό των προγραμμάτων φυτοπροστασίας.

ΑΘΗΝΑ 2020

Λέξεις-Κλειδιά: *Colletotrichum* spp., μεταβολομική ανάλυση μυκήτων, φυτοπροστασία ελιάς, βιοδιεγέρτες

Improving plant protection against olive anthracnose (*Colletotrichum acutatum* s.s.) by *in planta* and *in vitro* application of metabolomics

Olive tree (*Olea europaea* L.) represents one of the most important cultivated plant species in Greece, producing high quality products. However, heavy infections that have been recorded in recent years by olive anthracnose (*Colletotrichum* spp.) in the main olive-growing areas of the country, cause significant yield losses. Research data of our team (Pesticide Metabolomics Group, AUA) confirmed that the main cause of the infections in the prefectures of Laconia and Messinia, from which samples of infected olive fruits were taken, was the fungus *Colletotrichum acutatum* species complex, with various of its morphotypes being isolated. Moreover, the results revealed that these morphotypes exhibit variable pathogenicity and sensitivity to the fungicides. In the present study, GC/EI/MS metabolomics analysis was employed for the dissection of the isolated morphotypes' metabolism. Additionally, new plant protection products (PPPs) were evaluated *in planta* as biostimulants in young olive trees (*Olea europaea* L.) by GC/EI/MS metabolomics. Metabolomics/bioinformatics analyses revealed differences between the metabolomes of the isolated morphotypes of *C. acutatum* species complex. The observed differences in their pathogenicity and resistance to fungicides could be attributed, at least partly, to the fluctuations in their metabolomes (e.g. phenylacetic acid). Similarly, differences in the metabolic profiles of olive trees were observed following treatments with the different biostimulants. Metabolites-biomarkers of the plant's response to the applied plant protection products were detected (e.g. α,α -trehalose and myo-inositol), which play an important role in plant metabolism, as in plant responses to stresses. Results confirmed the effectiveness of the developed bioanalytical protocols, giving a remarkable perspective on the monitoring of the disease and the further evaluation and study of the action of new bioactive sources and their potential implementation in plant protection. Nonetheless, it is necessary to conduct further larger-scale experiments combined with metabolomics analysis in order to draw solid conclusions. Results of such studies should be taken into consideration during the design of plant protection programs.

ATHENS 2020

Key words: *Colletotrichum* spp., fungal metabolomics, olive plant protection, plant biostimulants

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	4
Abstract	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	15
1.1. Ελιά: Βοτανική ταξινόμηση και στοιχεία καλλιέργειας και παραγωγής στην Ε.Ε.	17
1.2. Ο τομέας της ελαιοκαλλιέργειας στην Ελλάδα	18
1.2.1. Στοιχεία καλλιέργειας και παραγωγής	18
1.2.2. Συμβολή της ελαιοκαλλιέργειας στην εθνική οικονομία.....	21
1.3. Φυτοπροστασία της ελιάς: σύγχρονα προβλήματα και προκλήσεις	22
1.4. Το γλοιοσπόριο (ανθράκωση) της ελιάς (<i>Colletotrichum</i> spp.)	25
1.4.1. Συμπτώματα προσβολών από γλοιοσπόριο (<i>Colletotrichum</i> spp.)...27	
1.4.2. Παθογόνο αίτιο της ασθένειας «γλοιοσπόριο» της ελιάς-Ανασκόπηση28	
1.4.3. Βιολογικός κύκλος του γλοιοσπορίου (<i>Colletotrichum</i> spp.)	30
1.4.4. Τυπικό πρόγραμμα φυτοπροστασίας έναντι του γλοιοσπορίου	32
1.5. Η ανάγκη για την έρευνα και ανάπτυξη νέων φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Φ.Π.)	34
1.5.1. Επαγωγείς της ανάπτυξης των φυτών / Βιοδιεγέρτες (plant biostimulants).....	37
1.5.2. Οι χαρπίνες.....	44
1.6. Μεταβολομική ανάλυση.....	47
1.6.1. Ορισμός και εφαρμογές της μεταβολομικής ανάλυσης στα φυτά	47
1.6.1.1. Εφαρμογές της μεταβολομικής ανάλυσης στην ελιά και σε άλλες δενδρώδεις καλλιέργειες.....	48
1.6.2. Εφαρμογή της μεταβολομικής στην χημειοταξινόμηση μυκήτων.....	50
1.6.3. Αναλυτικές τεχνικές και βιοπληροφορική ανάλυση	51
Κεφάλαιο 2: Σκοπός της μελέτης	56
Κεφάλαιο 3: Υλικά και Μέθοδοι	60
3.1. Χημικά και αντιδραστήρια.....	62
3.2. Βιολογικό Υλικό.....	63
3.2.1. Στελέχη του <i>Colletotrichum</i> spp. που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.....	63
3.2.2. Δενδρύλλια ελιάς (<i>Olea europaea</i> L.)	67

3.3. Εμπορικά σκευάσματα βιοδιεγερτών ανάπτυξης των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα	67
3.4. Μοριακή ταυτοποίηση απομονωμένων στελεχών του μύκητα <i>Colletotrichum</i> spp.	69
3.4.1. Προετοιμασία στελεχών για εξαγωγή DNA.....	70
3.4.2. Μέτρηση της συγκέντρωσης DNA	71
3.4.3. Ταυτοποίηση στελεχών σύμφωνα με την ενίσχυση συντηρημένων γονιδίων με εξειδικευμένους εκκινητές για τα είδη <i>Colletotrichum acutatum</i> και <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	71
3.5. Μεταβολομική ανάλυση επιλεγμένων μορφοτύπων του σύμπλοκου είδους <i>Colletotrichum acutatum</i>	73
3.5.1. Πειραματικός σχεδιασμός	73
3.5.2. Συλλογή μυκηλίου και προετοιμασία των δειγμάτων για GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση	73
3.5.3. Παραγωγοποίηση (derivatization) των δειγμάτων	74
3.5.4. Παράμετροι μεταβολομικής ανάλυσης.....	75
3.5.5. Ανάλυση και επεξεργασία χρωματογραφημάτων.....	76
3.5.6. Βιοπληροφορική ανάλυση, ανακάλυψη μεταβολικών διαφορών μεταξύ των στελεχών του σύμπλοκου είδους <i>Colletotrichum acutatum</i> και χημειοταξινόμησή τους	77
3.6. Αξιολόγηση της επίδρασης επιλεγμένων βιοδιεγερτών στο μεταβολισμό δενδρουλλίων ελιάς με εφαρμογή GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης.....	78
3.6.1. Πειραματικός σχεδιασμός	78
3.6.2. Δειγματοληψία φύλλων ελιάς	79
3.6.3. Προετοιμασία δειγμάτων φύλλων ελιάς για GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση, ανάλυση δειγμάτων, ανακάλυψη μεταβολικών-βιοσημαντών	80
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα και Συζήτηση	83
4.1. Το σύμπλοκο είδος <i>Colletotrichum acutatum</i> είναι το κύριο αίτιο των μεγάλων απωλειών ελαιοπαραγωγής στις Π.Ε. Μεσσηνίας και Λακωνίας κατά τα έτη 2016-‘17 και 2017-‘18	85
4.1.1. Μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση καθαρών καλλιεργειών των απομονώσεων του <i>Colletotrichum</i> spp.....	85
4.1.2. Μοριακή ανάλυση επιλεγμένων στελεχών του <i>Colletotrichum</i> spp. ...	87
4.2. Μεταβολομική ανάλυση μορφοτύπων του σύμπλοκου είδους <i>Colletotrichum acutatum</i> με σκοπό την χημειοταξινόμησή τους και τη μελέτη της παθογένειας και της ευαισθησίας τους σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα	89
4.2.1. Η GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση των απομονωμένων στελεχών του μύκητα <i>Colletotrichum acutatum</i> δείχνει διαφορές στα μεταβολικά προφίλ τους, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς για την χημειοταξινόμησή τους	89
4.2.2. Η συγκριτική μεταβολομική ανάλυση μεταξύ του ευαίσθητου και του ανθεκτικού μορφοτύπου του σύμπλοκου είδους <i>Colletotrichum acutatum</i>	

επιβεβαιώνει τις διαφορές στην ευαισθησία σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα και την παθογένεια.....	93
4.2.3. Ρόλος επιλεγμένων μεταβολιτών-βιοσημαντών στο μεταβολισμό και στη φυσιολογία του σύμπλοκου είδους <i>Colletotrichum acutatum</i>	97
4.3. Μεταβολομική ανάλυση δενδρυλλίων ελιάς (<i>Olea europaea</i> L.) με σκοπό την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των βιοδιεγερτών και του μηχανισμού δράσης τους.....	103
4.3.1. GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση φύλλων ελιάς (<i>Olea europaea</i> L.).....	103
4.3.2. Επισκόπηση της GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης δενδρυλλίων ελιάς (<i>Olea europaea</i> L.)	104
4.3.3. Η επέμβαση με τα σκευάσματα βιοδιεγερτών Olivo Plus και ProAct είχε σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό των δενδρυλλίων ελιάς (<i>O. europaea</i> L.).....	107
4.3.4. Μεταβολίτες-βιοσημαντές της επίδρασης των βιοδιεγερτών που εφαρμόστηκαν στα δενδρύλλια ελιάς	110
4.3.4.1. Μεταβολίτες-σήματα.....	110
4.3.4.2. Φαινολικές ουσίες.....	112
4.3.4.3 Υδατάνθρακες	113
Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα.....	119
Παράρτημα.....	123
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	124

Ευχαριστίες

Πρώτα απ' όλα οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Δρ. Κωνσταντίνο Αλιφέρη, Λέκτορα Γεωργικής Φαρμακολογίας, για την αδιάκοπη υποστήριξη και τη συνεχή καθοδήγησή του τόσο κατά το σχεδιασμό και την εκτέλεση του πειραματικού μέρους, όσο και κατά τη διάρκεια της συγγραφής, στοιχεία τα οποία συνετέλεσαν καθοριστικά στην περάτωση της παρούσας εργασίας. Πρέπει, ακόμα, να αναφερθώ στην άψογη συνεργασία μας τόσο σε προπτυχιακό όσο και σε μεταπτυχιακό επίπεδο. Μέσα από αυτή, με τις ευκαιρίες που μου έδωσε και τις γνώσεις που απλόχερα μου προσέφερε, θεωρώ ότι απέκτησα σημαντικά εφόδια για τη μετέπειτα σταδιοδρομία μου. Θεωρώ, επομένως, ότι πρέπει να ευχαριστήσω και πάλι τον κ. Αλιφέρη.

Στη συνέχεια, ευχαριστίες απευθύνω στα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής: τη Λέκτορα Γεωργικής Φαρμακολογίας κα. Φωτεινή Φλουρή και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φυτοπαθολογίας κ. Σωτήριο Τζάμο, για τις συμβουλές και τις υποδείξεις τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μελέτης. Ακόμα, πρέπει να ευχαριστήσω τη Διδάκτορα Φυτοπαθολογίας κα. Δανάη Γκίζη για τη συνδρομή της στη διαδικασία της μοριακής ταυτοποίησης των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικό υλικό στην πειραματική διαδικασία.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Pesticide Metabolomics Group για την καθημερινή συνεργασία μας επί σειρά μηνών στους χώρους του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον υποψήφιο Διδάκτορα κ. Γιάννη Καλαμπόκη και την υποψήφια Διδάκτορα κα. Μάιρα Λυκογιάννη για την καθοριστικής σημασίας βοήθεια που μου προσέφεραν με τις εύστοχες παρατηρήσεις και τις συμβουλές τους σε κάθε βήμα των σπουδών μου. Ευχαριστώ, ακόμα, τον προπτυχιακό φοιτητή Νίκο Μπαρκολιά για τη συνεργασία μας κατά την πειραματική διαδικασία.

Τέλος, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την υπόλοιπη οικογένειά μου για την αμέριστη και αδιάκοπη στήριξη που παρέιχαν, χάρη στην οποία κατάφερα να εκπληρώσω έναν ακόμα στόχο. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και την κοπέλα μου, για τη συνεχή τους ενθάρρυνση να προσπαθώ για το καλύτερο.

ΣΤΕΦΑΝΟΣ ΚΟΛΑΪΝΗΣ, 15/05/2020

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1. Ελιά: Βοτανική ταξινόμηση και στοιχεία καλλιέργειας και παραγωγής στην Ε.Ε.

Η ελιά είναι δένδρο ή θάμνος το οποίο ανήκει στην τάξη *Contortae* και στο γένος *Olea* της οικογένειας *Oleaceae* (Rugini and Fedeli, 1990). Το γένος *Olea* περιλαμβάνει 30 είδη και μόνο ένα από αυτά, το *Olea europaea* L., σχετίζεται με την ανθρώπινη κατανάλωση (Niaounakis and Halvadakis, 2006). Το είδος αυτό περιλαμβάνει δύο υποείδη, το *O. europaea* var. *oleaster*, γνωστό ως αγριελιά και το *O. europaea* var. *sativa*, γνωστό ως ήμερη ελιά (Green, 2002).

Η ήμερη ελιά, η οποία αποτελεί και το καλλιεργούμενο είδος, είναι δένδρο αιθαλές, μπορεί να φτάσει σε ύψος τα 15 μέτρα και έχει προσδόκιμο ζωής έως 500 έτη (Rhizoroulou, 2007). Ευδοκίμει σε περιοχές που επικρατεί το μεσογειακό κλίμα, το οποίο χαρακτηρίζεται από σχετικά ήπιους χειμώνες και ζεστά, ξηρά καλοκαίρια. Καλλιεργείται, πρωτίστως, στις χώρες της λεκάνης της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής, όπου συγκεντρώνεται το μεγαλύτερο μέρος της παγκόσμιας παραγωγής, αλλά και σε αρκετές άλλες χώρες ανά τον κόσμο όπως η Αυστραλία, το Ιράν, η Αργεντινή, η Τουρκία και οι Η.Π.Α., κυρίως στην περιοχή της Καλιφόρνια.

Παγκοσμίως, υπάρχουν περισσότερα από 850 εκατομμύρια παραγωγικά ελαιόδεντρα, τα οποία καταλαμβάνουν συνολική έκταση περίπου 7 εκατομμυρίων εκταρίων (Niaounakis and Halvadakis, 2006). Κύρια περιοχή καλλιέργειας αποτελούν οι χώρες της Νότιας Ευρώπης στις οποίες καταλαμβάνει έκταση περίπου 4,6 εκατομμύρια εκταρίων καλλιεργήσιμης επιφάνειας, όπως προκύπτει από τα πρόσφατα αποτελέσματα της πενταετούς έρευνας της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.) σχετικά με τα οπωροφόρα δέντρα (Eurostat, 2017). Συγκεκριμένα, περισσότερο από τα τρία τέταρτα της εν λόγω έκτασης αντιπροσωπεύουν η Ισπανία (55%) και η Ιταλία (23%), ακολουθούν η Ελλάδα (15%) και η Πορτογαλία (7%), ενώ το υπόλοιπο 1% καλύπτουν η Γαλλία, η Κροατία, η Κύπρος και η Σλοβενία. Στον **Πίνακα 1**, παρουσιάζεται η καλλιεργούμενη έκταση με ελαιόδεντρα συνολικά στην Ε.Ε. αλλά και στις παραπάνω χώρες για το έτος 2017 (Eurostat, 2020) και στον **Πίνακα 2**, αντίστοιχα, η παραγωγή ελαιολάδου σε χιλιάδες τόνους κατά τα έτη 2016-'17 και 2017-'18, καθώς και οι εκτιμήσεις για το έτος 2018-'19 (International Olive Oil Council, 2018). Πρέπει να αναφερθεί ότι στις χώρες αυτές

παράγεται το 97% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου (Mittal, 2011, Banias et al., 2017).

Πίνακας 1 Καλλιεργούμενη έκταση με ελαιόδεντρα στην Ε.Ε. και στις κύριες ελαιοπαραγωγικές χώρες της (Eurostat, 2017)

<i>Χώρα</i>	<i>Έκταση (εκτάρια)</i>
Ε.Ε.	4.592.102
Ισπανία	2.505.786
Ιταλία	1.070.833
Ελλάδα	670.679
Πορτογαλία	300.415

Πίνακας 2 Παραγωγή ελαιολάδου στην Ε.Ε. και στις κύριες ελαιοπαραγωγικές χώρες της κατά τα έτη 2016-'17 και 2017-'18, καθώς και οι εκτιμήσεις για το έτος 2018-'19 (International Olive Oil Council, 2018)

<i>Χώρα</i>	<i>2016-'17 (χιλ. τόνοι)</i>	<i>2017-'18 (χιλ. τόνοι)</i>	<i>2018-'19 (χιλ. τόνοι)</i>
Ε.Ε.	1.752	2.188,3	2.263,4
Ισπανία	1.290,6	1.262,2	1.789,9
Ιταλία	182,3	428,9	185,0
Ελλάδα	195,0	346,0	173,6
Πορτογαλία	69,4	134,8	100,3

1.2.Ο τομέας της ελαιοκαλλιέργειας στην Ελλάδα

1.2.1. Στοιχεία καλλιέργειας και παραγωγής

Η αξία της ελιάς, ειδικά για εμάς τους Έλληνες, είναι διαχρονική και συνυφασμένη με την ίδια τη ζωή μας. Ως σύμβολο ειρήνης, γνώσης, σοφίας, αφθονίας, γονιμότητας, γαλήνης, υγείας, δύναμης και ομορφιάς, λατρεύτηκε επί χιλιάδες χρόνια. Ως δέντρο, αποτελεί ζωντανό μέρος μιας βαριάς πολιτιστικής κληρονομιάς,

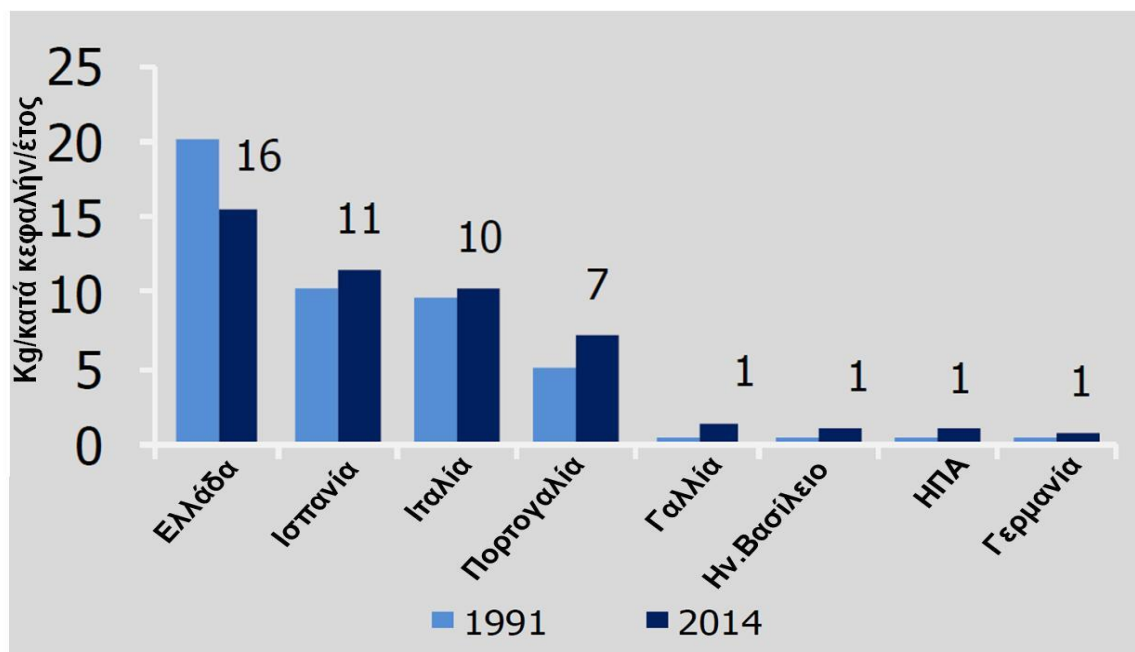
με θρύλους, παραδόσεις και θρησκευτικές τελετουργίες άρρηκτα συνδεδεμένες με την ανθοφορία, τη συγκομιδή και την παραγωγή του ελαιολάδου, του κύριου προϊόντος της ελιάς, το οποίο αποτελεί από την αρχαιότητα βασικό στοιχείο της ελληνικής διατροφής και σήμερα, ένα από τα πιο σημαντικά τρόφιμα της πυραμίδας της μεσογειακής διατροφής (Hu, 2003).

Στις μέρες μας, η καλλιέργειά της διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στον αγροτικό τομέα της χώρας μας, καθώς τα 130 εκ. ελαιόδεντρα που καλλιεργούνται αποτελούν το 60% των καλλιεργούμενων δέντρων και καλύπτουν το 75% των εκτάσεων των συνεχών δενδρώνων της (Galanopoulos et al., 2006). Αναμφισβήτητα, η Κρήτη και η Πελοπόννησος αποτελούν κύριες περιοχές καλλιέργειας και παραγωγής, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3**, στον οποίο καταγράφονται οι Νομοί-Περιφερειακές Ενότητες (Π.Ε.) με το μεγαλύτερο αριθμό ελαιόδεντρων κατά το έτος 2017, η έκταση σε στρέμματα την οποία καταλαμβάνουν καθώς και η ποσότητα ελαιολάδου που παράγεται σε τόνους στις εν λόγω Π.Ε. (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2020). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η Γεωργική Στατιστική Έρευνα για το έτος 2017 (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2017), σύμφωνα με την οποία καταγράφηκε μείωση κατά 5% στην παραγωγή ελαιολάδου, καθώς το έτος αυτό παρήχθησαν 311,7 χιλ. τόνοι, ενώ το 2016, 328 χιλ. τόνοι. Αντίθετα, αύξηση παρατηρήθηκε στην παραγωγή ελαιοκάρπου καθώς το 2017 παρήχθησαν 2.837,8 χιλ. τόνοι ελιών, ενώ το 2016, 2.755,5 χιλ. τόνοι.

Η ετήσια κατανάλωση ελαιολάδου στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια υπολογίζεται σε 130-140 χιλ. τόνους (International Olive Oil Council, 2018), ενώ η ετήσια κατά κεφαλήν κατανάλωση για το 2014 υπολογίστηκε στα 16 κιλά, η οποία είναι και η υψηλότερη παγκοσμίως. Ενδεικτικά, στην **Εικόνα 1** παρουσιάζεται η κατά κεφαλήν κατανάλωση ελαιολάδου στην Ελλάδα, την Ισπανία, την Ιταλία, την Πορτογαλία, τη Γαλλία, το Ηνωμένο Βασίλειο, τις Η.Π.Α. και τη Γερμανία κατά τα έτη 1991 και 2014 (Mylonas, 2015).

Πίνακας 3 Ελαιοκαλλιέργεια στην Ελλάδα κατά το έτος 2017

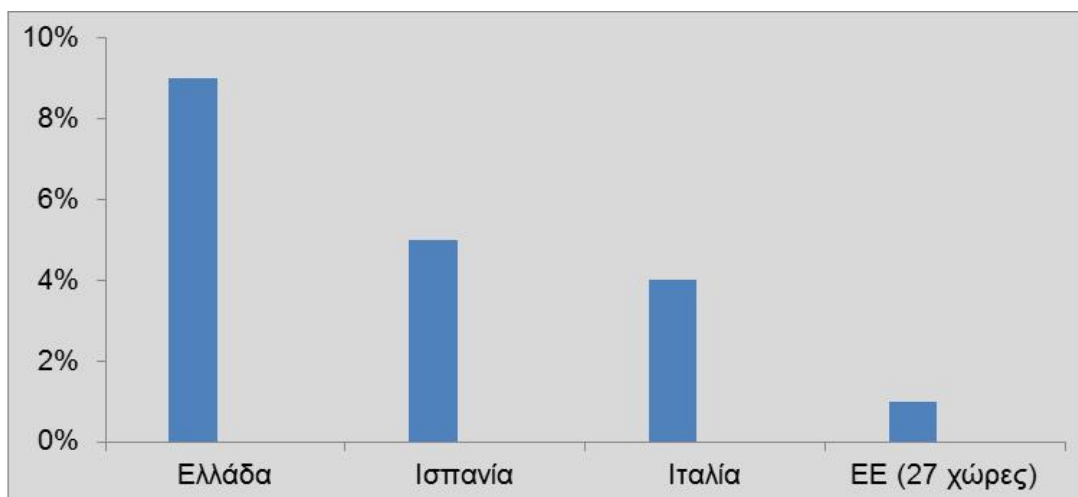
Περιφερειακή Ενότητα	Καλλιεργούμενη έκταση(στρ.)	Αριθμός ελαιόδεντρων	Παραγωγή ελαιολάδου (τόνοι)
Μεσσηνίας	856.320	15.955.878	45.253
Ηρακλείου	896.446	15.747.496	37.696
Λακωνίας	693.512	13.977.391	29.345
Χανίων	437.134	9.809.995	15.555
Ηλείας	401.353	8.692.818	52.150
Φθιώτιδας	337.670	6.474.140	11.775
Λέσβου	415.326	6.054.848	7.801
Λασιθίου	270.864	5.618.032	14.542
Αιτωλοακαρνανίας	231.724	5.424.404	2.603
Χαλκιδικής	260.672	5.401.587	7.627
Ρεθύμνης	276.733	4.757.972	5.064
Αργολίδας	283.580	4.740.140	5.816
Αχαΐας	192.826	4.172.468	15.439
Εύβοιας	266.954	3.815.196	2.937
Μαγνησίας	174.529	3.637.341	2.924
Κορινθίας	204.966	3.402.891	4.675
Αρκαδίας	172.017	2.829.186	3.272
Κέρκυρας	159.939	2.293.122	14.336

**Εικόνα1** Κατά κεφαλήν κατανάλωση ελαιολάδου σε επιλεγμένες χώρες κατά τα έτη 1991 και 2014 (τροποποιημένη από Mylonas, 2015)

1.2.2. Συμβολή της ελαιοκαλλιέργειας στην εθνική οικονομία

Τις τελευταίες δεκαετίες, ο τομέας της ελαιοκαλλιέργειας συνεισφέρει σημαντικά στο εισόδημα της παραδοσιακής ελληνικής οικογένειας. Η καλλιέργεια της ελιάς αποτελεί κύρια ή δευτερεύουσα δραστηριότητα για περίπου 500 χιλ. οικογένειες, ενώ αρκετές οικονομικές δραστηριότητες όπως η μεταποίηση, η τυποποίηση και η εμπορία των κύριων και δευτερευόντων προϊόντων της, έχουν αναπτυχθεί, προσφέροντας πολλαπλά οικονομικά οφέλη. Μία μεγάλη μερίδα του πληθυσμού, επίσης, απασχολείται στα περισσότερα από 2500 ελαιοτριβεία και τις 650 τυποποιητικές μονάδες ελαιολάδου που λειτουργούν στη νησιωτική και ηπειρωτική Ελλάδα (ΥΠΑΑΤ, 2020).

Οι μεγάλες ποσότητες ελαιολάδου που παράγονται κάθε χρόνο στην Ελλάδα, αφενός την κατατάσσουν σταθερά στις πρώτες ελαιοπαραγωγικές χώρες του κόσμου και αφετέρου καταδεικνύουν τη σημασία του παραγόμενου προϊόντος στην εθνική οικονομία. Ενδεικτικά, σύμφωνα με τα στοιχεία της Eurostat, η παραγωγή ελαιολάδου καλύπτει το 9% της αξίας της αγροτικής παραγωγής (**Εικόνα 2**) (έναντι 1% στην Ε.Ε.) και συνεισφέρει το 0,4% του ΑΕΠ (Mylonas, 2015).



Εικόνα 2 Κατά μέσο όρο συνεισφορά της παραγωγής ελαιολάδου στην αγροτική παραγωγή μεταξύ 2001-2014 στην Ελλάδα, την Ισπανία, την Ιταλία και την Ε.Ε. των 27 χωρών (τροποποιημένη από (Mylonas, 2015))

Επιπρόσθετα, σημαντικό μέρος των παραγόμενων ποσοτήτων ελαιολάδου αποτελεί αντικείμενο εξαγωγών, ενισχύοντας κατά αυτό τον τρόπο την εθνική οικονομία. Ειδικότερα, 165 χιλ. τόνοι (κατά μέσο όρο την τελευταία δεκαετία) εξάγονται ετησίως (ΙΟΟC) σε 110 χώρες ανά τον κόσμο, με βασικότερο

προορισμό τις χώρες της Ε.Ε., καθώς αυτές απορροφούν το 90% της συνολικής εξαγόμενης ποσότητας (80% ως χύμα και το υπόλοιπο 10% ως τυποποιημένο) (International Olive Oil Council, 2012, International Olive Oil Council, 2019).

Τέλος, αντικείμενο εξαγωγών αποτελούν και οι επιτραπέζιες ελιές, με περίπου 55 χιλ. τόνους να εξάγονται κάθε χρόνο σε 80 χώρες παγκοσμίως. Κύριοι προορισμοί είναι οι Η.Π.Α., η Ιταλία, η Γερμανία, η Αυστραλία, ο Καναδάς, το Ηνωμένο Βασίλειο και η Σαουδική Αραβία, ενώ αυξημένο ενδιαφέρον παρατηρείται τα τελευταία χρόνια από αγορές όπως αυτής της Ιαπωνίας (ΥΠΑΑΤ, 2013). Συνοπτικά, οι κυριότερες ποικιλίες που καλλιεργούνται στη χώρα μας για επιτραπέζια χρήση είναι η Νυχάτη Καλαμών, η Κονσερβολιά, η Ελιά Χαλκιδικής, η Θρουμπολιά, η Μεγαρείτικη και η Κοθρείκη. Οι περισσότερες από αυτές, διατίθενται προς εξαγωγή.

1.3. Φυτοπροστασία της ελιάς: σύγχρονα προβλήματα και προκλήσεις

Διαχρονικά προβλήματα για τη φυτοπροστασία της ελιάς αποτελούν οι προσβολές από ασθένειες και έντομα – εχθρούς, καθώς επηρεάζουν ποσοτικά και ποιοτικά την παραγωγή και αυξάνουν παράλληλα το συνολικό κόστος της (Fernández-Escobar et al., 2013), συμπιέζοντας το εισόδημα των καλλιεργητών. Οι παραπάνω συνέπειες ενδεχομένως να επιταθούν τα επόμενα χρόνια υπό την επίδραση της κλιματικής αλλαγής (climate change) (π.χ. στην ένταση μίας ασθένειας), δεδομένου ότι το περιβάλλον αποτελεί βασικό παράγοντα ανάπτυξης της (τετράεδρο της ασθένειας) (Edenhofer et al., 2012, Elad and Pertot, 2014). Ενδεικτικά για την καλλιέργεια της ελιάς, αναφέρεται ότι τις επόμενες δεκαετίες θα αντιμετωπίσει τη μεγαλύτερη κλιματική αλλαγή που έχει καταγραφεί από την εξάπλωσή της στη λεκάνη της Μεσογείου (Moriondo et al., 2013).

Αρχικά, διαρκή απειλή για την ελαιοκαλλιέργεια των χωρών της Μεσογείου αποτελεί η βακτηριολογική ασθένεια γνωστή ως ξυλλέλα, η οποία πρωτοεμφανίστηκε στην Ιταλία το 2013 (στην επαρχία της Απουλίας) και έκτοτε το *Xylella fastidiosa* έχει χαρακτηριστεί ως επιβλαβής οργανισμός καραντίνας (Carlucci et al., 2013). Η προσβολή των ελαιόδεντρων προκαλεί αρχικά ξηράνσεις σε μεμονωμένα φύλλα, που μοιάζουν με «κάψιμο», και έπειτα σε βραχίονες, ενώ ακολουθεί ταχύτατη αποπληξία (Loconsole et al., 2014). Η σοβαρότητα της

προσβολής έγκειται στο γεγονός ότι η ασθένεια μπορεί να εξαπλωθεί εύκολα σε έναν ελαιώνα, καθώς μεταδίδεται εύκολα με έντομα-φορείς (κυρίως τζιτζικάκια), ενώ μέχρι σήμερα δεν έχουν προσδιορισθεί μέτρα αντιμετώπισης της, επομένως εφαρμόζονται μόνο προληπτικά μέτρα (Janse and Obradovic, 2010). Σημαντικό είναι το στοιχείο ότι μέχρι σήμερα, δεν έχουν αναφερθεί προσβολές στην Ελλάδα. Εντούτοις ο κίνδυνος εμφάνισης της ασθένειας είναι αυξημένος, λόγω της γειτονίας με την Ιταλία και τη μετάδοσή της με μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό (Health, 2015).

Επιπλέον, η βερτισιλλίωση έχει καταγραφεί σε πολλές ελαιοπαραγωγικές χώρες ανά τον κόσμο. Η ασθένεια αυτή οφείλεται στον εδαφογενή μύκητα *Verticillium dahliae* και εκδηλώνεται είτε με το σύνδρομο του βραδέος μαρασμού είτε με ταχεία αποπληξία των δέντρων (Παναγόπουλος, 2007), ενώ εμφανίζεται σε όλη την έκταση της καλλιέργειας (Jiménez-Díaz et al., 1998). Η σοβαρότητα της οφείλεται τόσο στην απουσία αποτελεσματικής χημικής αντιμετώπισης (Rodríguez et al., 2008, Parasotiriou et al., 2013) και στη μειούμενη ανθεκτικότητα ορισμένων ποικιλιών, όσο και στην υποβάθμιση των εδαφών που προκαλεί, τα οποία καθίστανται ακατάλληλα για ελαιοκαλλιέργεια για αρκετά χρόνια, δεδομένης της δυνητικά μακρόχρονης επιβίωσης του παθογόνου στο έδαφος (Wilhelm, 1955, Angeloroulou et al., 2014). Ο μύκητας έχει εξαπλωθεί και στους ελληνικούς ελαιώνες τα τελευταία χρόνια. Σε αυτό συνέβαλαν η εντατικοποίηση της καλλιέργειας, η αύξηση των καλλιεργούμενων εκτάσεων με ελαιόδεντρα αλλά και η αντικατάσταση της ποικιλίας Αμφίσσης από την συγκριτικά πιο ευαίσθητη ποικιλία Καλαμών σε πολλές ελαιοπαραγωγικές περιοχές της χώρας (Παπλωματάς and Τζάμος, 2015). Αποτελεσματικό μέτρο αντιμετώπισης της ασθένειας θεωρείται η απολύμανση του εδάφους με ηλιακή θερμότητα (ηλιοαπολύμανση) έχοντας εφαρμοστεί σε διάφορες καλλιέργειες (Tjamos and Paplomatas, 1988, Tjamos et al., 2004), μεταξύ των οποίων και η ελιά, όπου δρα θεραπευτικά (Tjamos et al., 1991, Tjamos, 1993, López-Escudero and Blanco-López, 2001, López-Escudero and Mercado-Blanco, 2011).

Επιπρόσθετα, σημαντικό πρόβλημα αποτελούν οι προσβολές των καρπών από τον κυριότερο εντομολογικό εχθρό της ελιάς, το δάκο (*Bactrocera oleae*). Στη χώρα μας καταγράφονται αυξημένοι πληθυσμοί του εντόμου τα τελευταία χρόνια, πιθανόν και λόγω της κλιματικής αλλαγής, με παρατεταμένη επικράτηση ευνοϊκών κλιματικών συνθηκών (π.χ. υψηλά επίπεδα σχετικής υγρασίας) (Μπουρνάκας,

2019). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι εκτεταμένες προσβολές που σημειώθηκαν κατά τη φετινή ελαιοκομική περίοδο (2019-'20) στην Κρήτη (Ροδιτάκης et al., 2020). Άμεση συνέπειά τους αποτελεί η ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση της παραγωγής (Nardi et al., 2005), ενώ ταυτόχρονα διευκολύνονται δευτερογενείς μολύνσεις των καρπών από παθογόνα (μύκητες και βακτήρια) (Athar, 2005), με αποτέλεσμα να προκαλούνται περαιτέρω ζημιές στην καλλιέργεια.

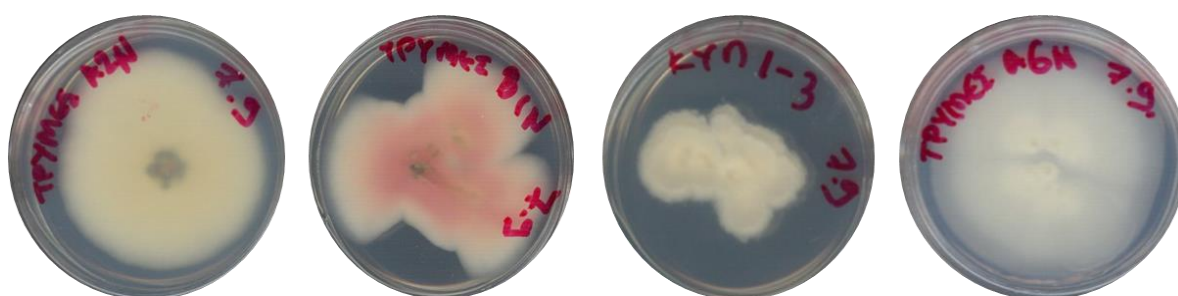
Ένα από αυτά τα παθογόνα, είναι οι μύκητες του γένους *Colletotrichum* spp. οι οποίοι προκαλούν την ασθένεια "γλοιοσπόριο της ελιάς" και έχουν αποδειχθεί αρκετά ζημιογόνοι για την ελαιοκαλλιέργεια στη χώρα μας. Συγκεκριμένα, κατά τις τελευταίες ελαιοκομικές περιόδους, κυρίως από το 2016 και έπειτα, εκτεταμένες προσβολές ελαιοπονήσιμων και επιτραπέζιων ποικιλιών έχουν καταγραφεί σε αρκετές περιοχές, επιφέροντας απώλειες δεκάδων εκατομμυρίων ευρώ (Κολαϊνής et al., 2017, Iliadi et al., 2018, Μπουρνάκας, 2019).

Σε αποτελέσματα προηγούμενης έρευνας της ομάδας Pesticides Metabolomics Group (PMG) του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, σε συνεργασία με τη Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας & Κτηνιατρικής (ΔΑΟΚ) Τριφυλίας, ως αίτιο της ασθένειας στις Π.Ε. Λακωνίας και Μεσσηνίας αναγνωρίστηκε ο μύκητας *Colletotrichum* spp., διαφορετικοί μορφότυποι του οποίου καταγράφηκαν (**Εικόνα 3**). Βιοδοκιμές τοξικότητας στις εγκεκριμένες για την ελιά δραστικές ουσίες (δ.ο.) kresoxim-methyl, pyraclostrobin, trifloxystrobin, που ανήκουν στην ομάδα των στρομπιλουρίνων και των difenconazole και tebuconazole που ανήκουν στην ομάδα των τριαζολικών, έδειξαν διαφορές μεταξύ των μορφοτύπων ως προς την ευαισθησία τους στα παραπάνω μυκητοκτόνα, στις διαφορετικές συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν.

Αξιοσημείωτο εύρημα το οποίο διερευνήθηκε περαιτέρω στην παρούσα μελέτη, αποτέλεσε η μειωμένη ευαισθησία που εμφάνισε το στέλεχος PLS_88 (**M2**) (**εφεξής ανθεκτικός μορφότυπος**) σε όλες τις δ.ο. με τη μικρότερη να καταγράφεται στα τριαζολικά, ενώ αντίστοιχα το στέλεχος PLS_90 (**M1**) (**εφεξής ευαίσθητος μορφότυπος**) έδειξε τη μεγαλύτερη ευαισθησία σε όλες τις δ.ο. που εφαρμόστηκαν. Επιπλέον, κατά τη μελέτη της παθογένειας των μορφοτύπων σε άνθη και καρπούς των ποικιλιών Κορωνέικη και Καλαμών, οι μορφότυποι παρουσίασαν σημαντική παθογόνο ικανότητα, προκαλώντας τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας. Ένα ενθαρρυντικό στοιχείο που προέκυψε ήταν η

μικρότερη (σε σύγκριση με τους υπόλοιπους) μολυσματική ικανότητα του ευαίσθητου μορφότυπου στους καρπούς (Κολαϊνής et al., 2019).

Τέλος, από *in planta* βιοδοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, εξήχθη το συμπέρασμα ότι η προσβολή ελαιοκάρπων από εχθρούς όπως ο δάκος, αποτελεί προαιρετικό παράγοντα εκδήλωσης της ασθένειας, καθώς φάνηκε ότι το παθογόνο, έπειτα από τεχνητή μόλυνση, μπορεί να προσβάλλει ώριμους καρπούς οι οποίοι δεν έφεραν κανένα τραυματισμό εξίσου αποτελεσματικά με καρπούς οι οποίοι είχαν προηγουμένως τεχνητά τραυματιστεί (Κολαϊνής et al., 2017, Κολαϊνής et al., 2018).



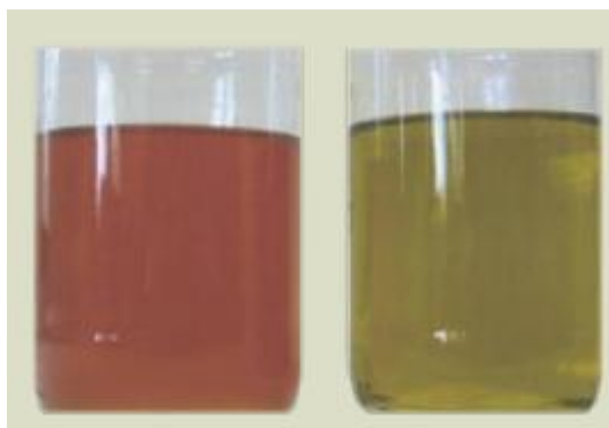
Εικόνα 3 Μορφότυποι (M) του μύκητα *Colletotrichum* spp., όπως αυτοί διαχωρίστηκαν σε προηγούμενη έρευνα του παθογόνου αιτίου των απωλειών ελαιοπαραγωγής στις Π.Ε. Λακωνίας και Μεσσηνίας κατά τα έτη 2016-‘18

1.4. Το γλοιοσπόριο (ανθράκωση) της ελιάς (*Colletotrichum* spp.)

Το γλοιοσπόριο (ανθράκωση, *Colletotrichum* spp.) αποτελεί μια ιδιαίτερα καταστρεπτική μυκητολογική ασθένεια της ελιάς, η οποία αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1899 στην Πορτογαλία από τον J.V. d’Almeida (Almeida, 1899, Cacciola et al., 2012). Έκτοτε, έχει καταγραφεί σε αρκετές χώρες ανά τον κόσμο όπως τις Αυστραλία, Αργεντινή, Βραζιλία, Ιαπωνία, Ινδία, Κίνα, Νέα Ζηλανδία, Ουρουγουάη (Margarita et al., 1986), Σερβία-Μαυροβούνιο (Latinovic and Vucinic, 2002) και Τυνησία (Rhouma et al., 2010). Όσον αφορά τις κυριότερες ελαιοπαραγωγικές χώρες της Μεσογείου, αξίζει να αναφερθεί ότι η ασθένεια αυτή στην Ισπανία είναι γνωστή από το 1930 ως ‘σαπούνι φρούτων’, ενώ στην Ιταλία από το 1950 ως ‘λέπρα’ (Graniti et al., 1993, Martín et al., 2002, Moral et al., 2008, Cacciola et al., 2012). Στη χώρα μας πρωτοεμφανίστηκε το 1920 στην Κέρκυρα, οπότε

καταγράφηκαν σοβαρές επιδημικές εκρήξεις (Petri, 1930) και πρόσφατα επανεμφανίστηκε σε βασικές περιοχές καλλιέργειας όπως η Πελοπόννησος (Κολαϊνής et al., 2017, Κολαϊνής et al., 2019), η Αιτωλοακαρνανία και η Ζάκυνθος (Iliadi et al., 2018).

Η ασθένεια, γνωστή και ως παστέλλα, μπορεί να προκαλέσει δραστική μείωση έως εκμηδένιση της παραγωγής των ελαιόδεντρων και υποβάθμιση της ποιότητας τόσο του παραγόμενου ελαιολάδου όσο και των επιτραπέζιων ελιών. Πιο συγκεκριμένα, το ελαιόλαδο που εξάγεται από προσβεβλημένους καρπούς, παρουσιάζει δυσάρεστη γεύση, έχει υπέρυθρο χρωματισμό (**Εικόνα 4**), ενώ παρατηρούνται μεταβολές στη χημική σύστασή του με αύξηση της οξύτητας και



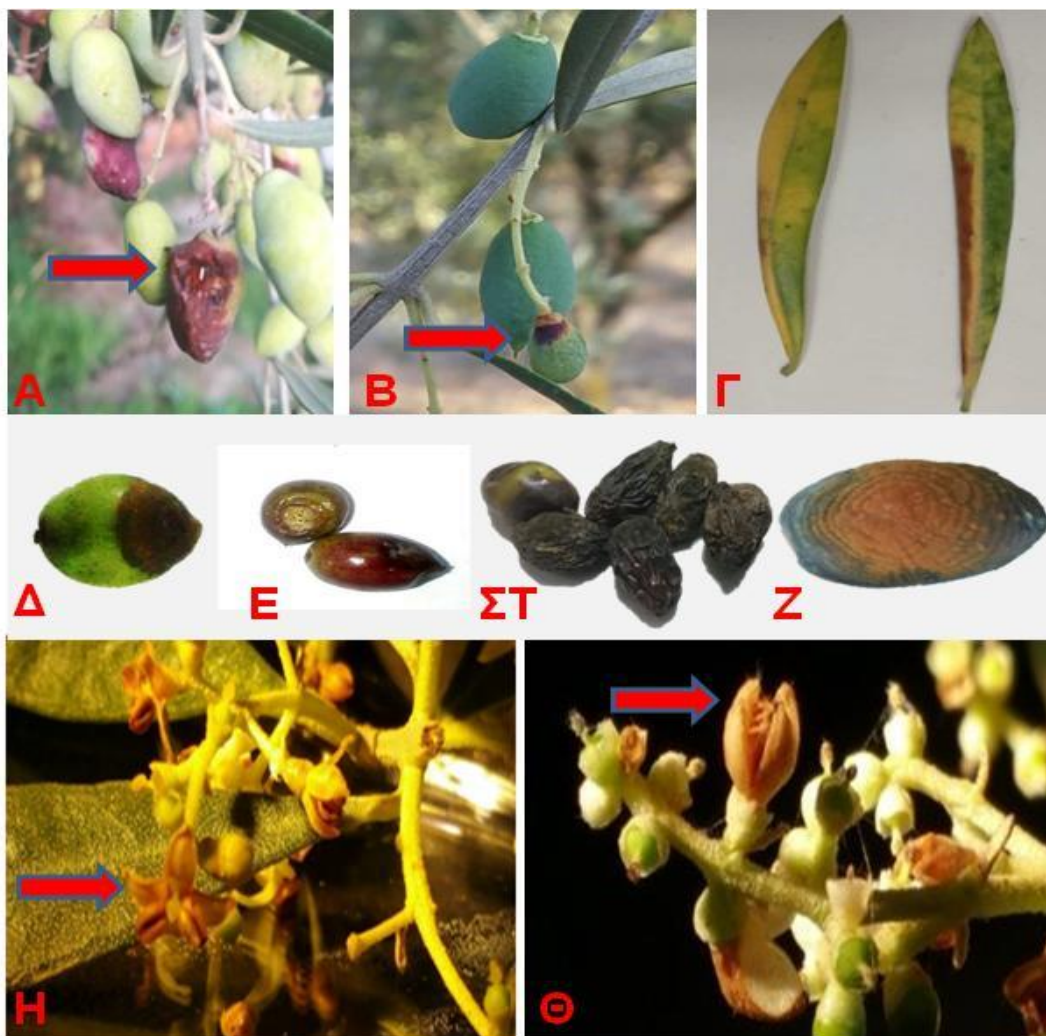
Εικόνα 4 Ελαιόλαδο το οποίο έχει εξαχθεί από καρπούς προσβεβλημένους από το γλοιοσπόριο (αριστερά) και από υγιείς καρπούς (δεξιά) (<http://olivediseases.com/olive-diseases/anthracnose>)

μείωση στις πολυφαινόλες (Cacciola et al., 2012, Gouvinhas et al., 2019), ουσίες που σχετίζονται άμεσα με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου και έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση (El Riachy et al., 2012). Επιπρόσθετα, έχει διαπιστωθεί από χημικές αναλύσεις μείωση της περιεκτικότητάς της β-σιτοστερόλης, μιας ουσίας που εμποδίζει την απορρόφηση της χοληστερίνης από τον ανθρώπινο οργανισμό και της α-τοκοφερόλης, η οποία αποτελεί πηγή βιταμινών στη διατροφή του ανθρώπου (Mincione et al., 2004). Εξίσου σημαντική είναι η υποβάθμιση της ποιότητας των καρπών που προορίζονται για επιτραπέζια χρήση με αποτέλεσμα να καθίστανται ακατάλληλοι για περαιτέρω επεξεργασία και εμπορία. Συνίσταται, επομένως, και στις δύο περιπτώσεις, η άμεση επεξεργασία των καρπών, μετά τη συγκομιδή (Cacciola et al., 2012).

1.4.1. Συμπτώματα προσβολών από γλοιοσπόριο (*Colletotrichum* spp.)

Τα συμπτώματα είναι πιο εύκολα διακριτά στους καρπούς της ελιάς. Περισσότερο ευάλωτοι στις προσβολές εμφανίζονται οι (σχεδόν) ώριμοι καρποί, αλλά υπό ευνοϊκές κλιματικές συνθήκες, οι μολύνσεις μπορούν επίσης να εμφανιστούν σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (**Εικόνες 5A-B**). Στις ποικιλίες με επίμηκες σχήμα, οι μολύνσεις αρχίζουν συνήθως από την κορυφή (**Εικόνα 5Γ**), ενώ σε εκείνες με μεγάλους, σχεδόν σφαιρικούς καρπούς, τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται ως κηλίδες και εξελίσσονται σε συγκεντρικούς κύκλους, ξεκινώντας από το κέντρο της προσβολής (**Εικόνα 5Δ**). Σε προχωρημένα στάδια μόλυνσης, οι καρποί πέφτουν στο έδαφος ή παραμένουν στα δέντρα και μουμιοποιούνται (**Εικόνα 5Ε**), αποτελώντας κατ' αυτό τον τρόπο σημαντική πηγή μολύσματος για μετέπειτα προσβολές (Moral and Trapero, 2012). Ακόμα, σε συνθήκες υψηλής υγρασίας, παρατηρείται σήψη των προσβεβλημένων καρπών και κάλυψη της επιφάνειάς τους με τα πολυάριθμα σπόρια του παθογόνου, τα οποία εμφανίζονται ως γλοιώδης μάζα ρόδινου ή πορτοκαλί χρώματος (**Εικόνα 5Ζ**). Τα παραπάνω συμπτώματα, έπειτα από πειραματικές διαδικασίες, έχουν αποδοθεί στην τοξική δράση των μεταβολιτών που παράγονται από το παθογόνο (Ballio et al., 1969).

Προσβολές από το παθογόνο εντοπίζονται και στα άνθη. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αρχικά μάρανση ακολουθούμενη από ξήρανση και σχηματισμός υφών του μύκητα, ενώ αποκτούν ελαφρά καστανό μεταχρωματισμό (**Εικόνες 5Η-Θ**). Πολύ σημαντικό για την περαιτέρω εξέλιξη της ασθένειας είναι το γεγονός ότι μπορεί να υπάρξει ασυμπτωματική μόλυνση των ανθέων (Sergeeva et al., 2008), με μεταφορά του μολύσματος και εμφάνιση συμπτωμάτων στα νεαρά καρπίδια, (μικροί καρποί μεγέθους κόκκου σταριού) (**Εικόνα 5Β**). Τέλος, λιγότερο συχνή είναι η εμφάνιση συμπτωμάτων στα φύλλα (**Εικόνα 5Γ**), τους ποδίσκους των καρπών και τους νεαρούς κλαδίσκους. Η προσβολή των φύλλων και των βλαστών από το γλοιοσπόριο είναι μικρότερης οικονομικής σημασίας για τη χώρα μας (Παναγόπουλος, 2007).



Εικόνα 5 Συμπτώματα του γλοισπορίου (*Colletotrichum* spp.) στην ελιά. Διακρίνονται: Προσβολή καρπών σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης (**A,B**), Προσβολή σε φύλλα (**Γ**), Έναρξη της προσβολής από την κορυφή σε καρπούς επιμήκους σχήματος (**Δ**), Εξέλιξη των κηλίδων σε συγκεντρικούς κύκλους, ξεκινώντας από το κέντρο της προσβολής (**Ε**), Μουμιοποίηση (**ΣΤ**), Σπόρια του παθογόνου στην επιφάνεια προσβεβλημένου καρπού (**Ζ**), Προσβολές σε άνθη (**Η,Θ**).

1.4.2. Παθογόνο αίτιο της ασθένειας «γλοισπόριο» της ελιάς-Ανασκόπηση

Η ανθράκωση καταγράφηκε για πρώτη φορά στην Πορτογαλία το 1899 και ως παθογόνο αίτιο προσδιορίστηκε το *Gloeosporium olivarum* Alm. Αρκετά χρόνια αργότερα, το είδος αυτό βρέθηκε να μην διαφέρει από το *Gloeosporium fructigenum* Berk., το παθογόνο αίτιο της πικρής σήψης των μήλων, με αποτέλεσμα το γένος *Gloeosporium* να αναθεωρηθεί (Von Arx, 1957) και τα παραπάνω είδη να μεταφερθούν στο *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc., το οποίο ήταν το ανάμορφο (anamorph) του *Glomerella cingulata*

(Stonem.) Spaulding et v. Schrenk. Το 1999, ερευνητές αναγνώρισαν δύο ανάμορφα είδη του γένους *Colletotrichum*, το *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc. και το *C. acutatum* JH Simmonds ex JH Simmonds, ως παθογόνα αίτια της ασθένειας (Martín and García-Figueroes, 1999). Πιο συγκεκριμένα, το *C. acutatum* αναφέρθηκε για πρώτη φορά ως ξεχωριστό είδος το 1965 από τον (Simmonds, 1966). Έκτοτε, στο είδος αυτό έχει εκχωρηθεί ένας μεγάλος αριθμός μυκήτων, ο οποίος αφορά είτε νέα είδη, είτε αναταξινόμηση άλλων ειδών, κυρίως του *C. gloeosporioides*, με υψηλή μορφολογική ομοιότητα και αλληλεπικαλυπτόμενο φάσμα ξενιστών (Peres et al., 2005, Sreenivasaprasad and Talhinhas, 2005).

Τα τελευταία χρόνια, η ταξινόμηση του γένους *Colletotrichum* υπόκειται σε συνεχείς και μακροχρόνιες αναθεωρήσεις (Schena et al., 2014), προκειμένου να κατανοηθεί η σύνθετη αιτιολογία και επιδημιολογία της ασθένειας. Οι αναλύσεις απομονώσεων με βάση τα φυλογενετικά, μορφολογικά και παθολογικά χαρακτηριστικά τους, συνέβαλαν σημαντικά στην κατανόηση της ποικιλομορφίας του γένους (Damm et al., 2012, Weir et al., 2012). Ειδικότερα, οι παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι με την ασθένεια (στην ελιά) σχετίζονται δύο σύμπλοκα είδη με υψηλή φαινοτυπική και γονοτυπική ποικιλομορφία, το *C. gloeosporioides sensu lato (s.l.)* και το *C. acutatum sensu lato (s.l.)* (Talhinhas et al., 2005, Moral et al., 2008, Cacciola et al., 2011, Talhinhas et al., 2011). Θεωρείται δε σήμερα, ότι μόνο έξι είδη προκαλούν σημαντικές απώλειες παραγωγής. Τα είδη αυτά, τα οποία στο παρελθόν αναγνωρίστηκαν ως ομάδες ειδών εντός του *C. acutatum s.l.*, είναι τα: *C. simmondsii*, *C. fiorinae*, *C. godetiae* (συν *C. clavatum*), *C. nympphaeae*, *C. rhombiforme* και το σύμπλοκο είδος *C. acutatum* (Sreenivasaprasad and Talhinhas, 2005, Faedda et al., 2011, Cacciola et al., 2012, Damm et al., 2012).

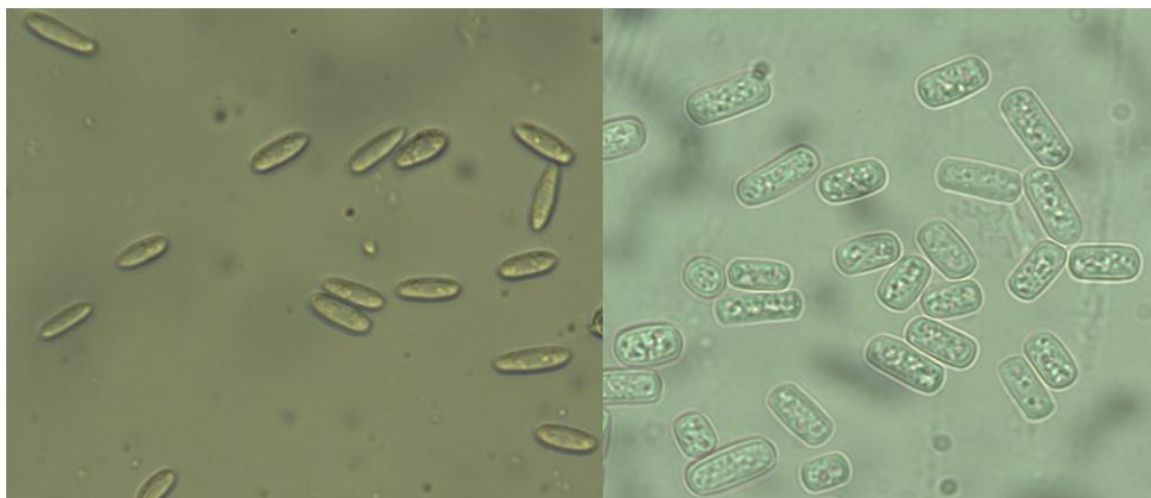
Η εκτενής παρουσία της ασθένειας στις ελαιοπαραγωγικές χώρες της Μεσογείου, έχει οδηγήσει στην πιο ενδελεχή μελέτη της αιτιολογίας της με σκοπό την αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή της. Αρχικά, σε έρευνα των (Mosca et al., 2014, Abdelfattah et al., 2015) προέκυψε η ευρεία κατανομή των *C. acutatum* και *C. godetiae* σε ελαιώνες της νότιας Ιταλίας (Καλαβρία), σε αναλύσεις δειγμάτων καρπών, φύλλων και ανθέων, σε διαφορετικά φαινολογικά στάδια. Στην ίδια έρευνα καταγράφηκαν και άλλοι μορφότυποι (morphotypes) που σχετίζονται με τα *C. gloeosporioides s.s.*, *C. karstii*, και *C. kahawae* και μη καλά προσδιορισμένα είδη των *C. acutatum s.l.* και *C. gloeosporioides s.l.* Ωστόσο, τα παραπάνω

εμφανίστηκαν σε μικρό βαθμό, ενώ δε φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση της ασθένειας (Mosca et al., 2014).

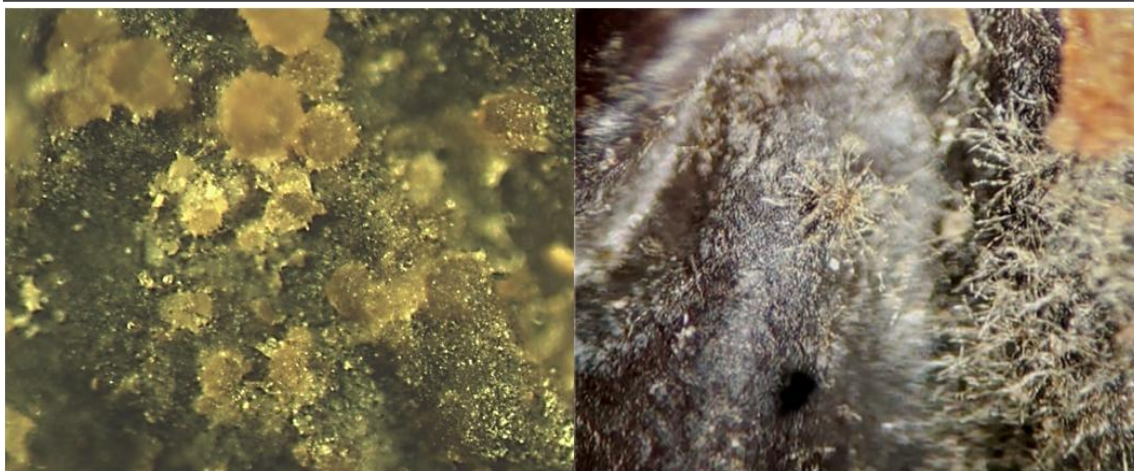
Αναφορικά με το σύμπλοκο είδος *C. acutatum*, πέρα από την Ιταλία, έχει ταυτοποιηθεί και σε άλλες χώρες όπως τις Ισπανία (Martín et al., 2002), Τυνησία (Chattaoui et al., 2016) και Πορτογαλία (Talhinhas et al., 2005). Στις δύο τελευταίες χώρες, η συχνότητα εμφάνισής του σε προσβεβλημένους καρπούς ήταν μεγαλύτερη από 95-97%, σε αντίθεση με το *C. gloeosporioides s.l.* το οποίο καταγράφηκε σε ποσοστό 3-5%. Στην Ελλάδα το *C. acutatum* καταγράφηκε για πρώτη φορά το 2015 σε απομονώσεις από προσβεβλημένους καρπούς αλλά και φύλλα και άνθη ελιάς (Iliadi et al., 2018). Βάσει των παραπάνω πρόσφατων ερευνητικών δεδομένων, προκύπτει ότι στους μεσογειακούς ελαιώνες κυρίαρχο είδος είναι το σύμπλοκο είδος *C. acutatum*.

1.4.3. Βιολογικός κύκλος του γλοιοσπορίου (*Colletotrichum spp.*)

Τα ακέρβουλα του μύκητα (**Εικόνα 6**) σχηματίζονται στο μεσοκάρπιο των προσβεβλημένων ιστών και εμφανίζονται στην επιφάνεια των καρπών μετά από διάρρηξη του επικαρπίου. Από τα ακέρβουλα εξέρχονται πολυάριθμα σπόρια (κονίδια) με τη μορφή ρόδινης ή πορτοκαλί γλοιώδους μάζας, τα οποία καλύπτουν μεγάλο μέρος της επιφάνειας, ενώ μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα κονίδια (**Εικόνα 7**) είναι υαλώδη, μονοκύτταρα, ελλειψοειδή, ευθεία ή λίγο κεκαμμένα (Παναγόπουλος, 2007).



Εικόνα 6 Κονίδια του μύκητα *Colletotrichum acutatum* όπως παρατηρήθηκαν σε μικροσκοπική εξέταση καθαρής καλλιέργειας (μεγέθυνση 100x)

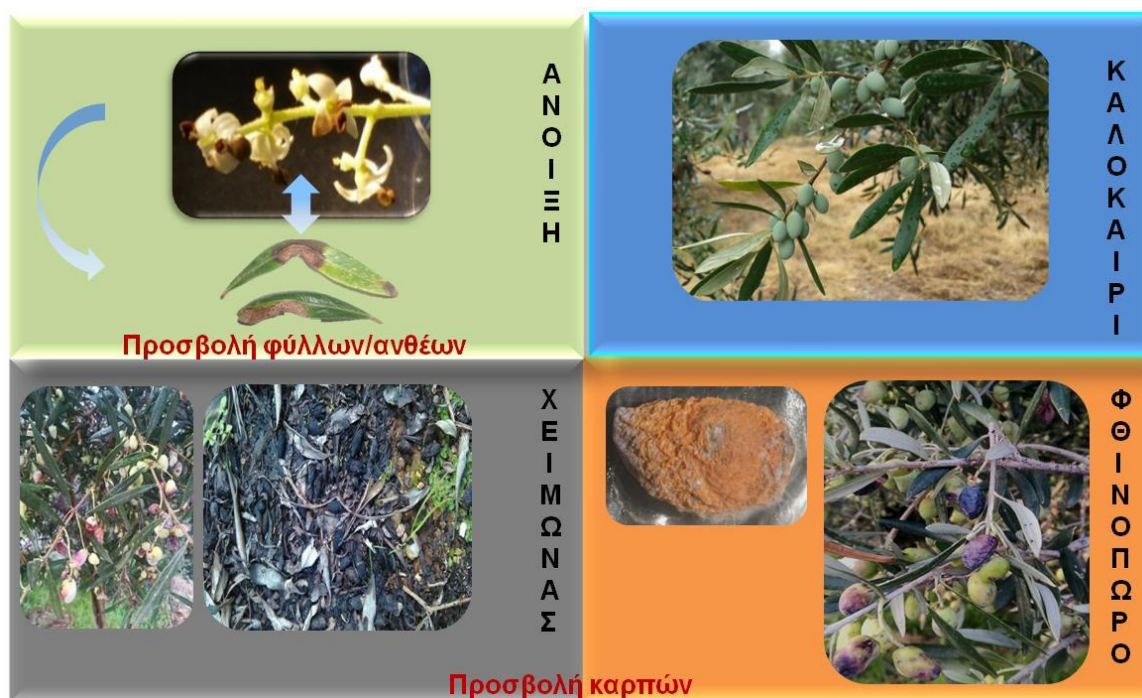


Εικόνα 7 Ακέρβουλα του μύκητα *Colletotrichum acutatum* όπως παρατηρήθηκαν σε στερεοσκοπική εξέταση προσβεβλημένου ελαιοκάρπου

Καθοριστικό παράγοντα για τη διασπορά των κονιδίων (μυξοσπόρια) και την πραγματοποίηση των μολύνσεων αποτελεί η παρουσία νερού (βροχοπτώσεις, σχετική υγρασία), ενώ θερμοκρασίες 10-25°C είναι ιδανικές για την ανάπτυξη του παθογόνου. Οι μολύνσεις ξεκινούν την άνοιξη με την προσβολή κυρίως των ανθέων, θεωρούνται δε σημαντικές για την περαιτέρω εξέλιξη της ασθένειας, λόγω των ευνοϊκών κλιματικών συνθηκών και την ύπαρξη διαθέσιμου μολύσματος από προσβεβλημένους καρπούς του παρελθόντος έτους. Συμπτώματα στους καρπούς παρατηρούνται από τα αρχικά στάδια ανάπτυξης, ενώ έντονες προσβολές μπορούν να αποτελέσουν αιτία πρόωρης καρπώπτωσης. Κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών και την απουσία βροχοπτώσεων, το παθογόνο αναστέλλει τη δράση του σε κάποιο βαθμό. Παρόλα αυτά, η κλιματική μεταβολή έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια σε θερμά και υγρά καλοκαίρια, γεγονός που ευνοεί την ανάπτυξη του και την παραγωγή μολύσματος για νέες μολύνσεις νωρίς το φθινόπωρο, εποχή ιδανική για την εξέλιξη της ασθένειας (Cacciola et al., 2012).

Ειδικότερα, κατά το φθινόπωρο, η επικράτηση μέσης θερμοκρασίας 10-16°C σε συνδυασμό με τα υψηλά επίπεδα σχετικής υγρασίας (και λόγω της έναρξης των βροχοπτώσεων), ευνοούν τόσο την ταχεία ανάπτυξη του μύκητα μέσα στον καρπούς, όσο και την ταχεία βλάστηση και διασπορά των σπορίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι μολύνσεις να φθάνουν στο μέγιστο με την έναρξη της ωρίμανσης (τέλη Οκτωβρίου-αρχές Νοεμβρίου) και να παρατείνονται έως τα τέλη Δεκεμβρίου. Προσβολές εμφανίζονται ενίοτε και στα φύλλα, ωστόσο δεν θεωρείται ότι

αποτελούν πηγή μολύσματος (Cacciola et al., 2012). Ο βιολογικός κύκλος του γλοιοσπορίου παρουσιάζεται σχηματικά στην **Εικόνα 8**.



Εικόνα 8 Βιολογικός κύκλος του γλοιοσπορίου (*Colletotrichum* spp.)

1.4.4. Τυπικό πρόγραμμα φυτοπροστασίας έναντι του γλοιοσπορίου

Στις περιοχές στις οποίες το γλοιοσπόριο ενδημεί, η αντιμετώπιση του βασίζεται κυρίως στην πρώιμη συγκομιδή του ελαιοκάρπου ώστε να αποφεύγονται οι σοβαρές επιπτώσεις κυρίως στο παραγόμενο ελαιόλαδο αλλά και οι δευτερογενείς μολύνσεις στους καρπούς, η ευαισθησία των οποίων αυξάνεται όσο πλησιάζει η ωρίμανση, ιδιαίτερα όταν το φθινόπωρο είναι υγρό (Κολαϊνής et al., 2019). Επιπρόσθετα, το κλάδεμα των δέντρων συμβάλλει στον καλύτερο αερισμό τους, στη μείωση της σχετικής υγρασίας στο εσωτερικό της κόμης και στην ομοιόμορφη κάλυψη από το ψεκαστικό υγρό. Σημαντικό καλλιεργητικό μέτρο αποτελεί, επίσης, η αφαίρεση και καταστροφή προσβεβλημένων οργάνων, όπως βλαστών με ασθενείς ταξιανθίες και μουμιοποιημένων καρπών, με σκοπό τη μείωση του μολύσματος για την επόμενη άνοιξη (Cacciola et al., 2012).

Η χημική αντιμετώπιση της ασθένειας αφορά στη διενέργεια δύο, συνήθως, προληπτικών ψεκασμών κατά τα τέλη Οκτωβρίου-αρχές Νοεμβρίου. Εντούτοις, τα νέα επιδημιολογικά δεδομένα επιβάλλουν επεμβάσεις και την άνοιξη, στο στάδιο της ανθοφορίας (Απρίλιο-Μάιο), σε χρόνο και συχνότητα που καθορίζεται σε

συνάρτηση με τις κλιματικές συνθήκες της εκάστοτε περιοχής και την καλλιεργούμενη ποικιλία. Απαραίτητη είναι η τήρηση του χρονικού ορίου μεταξύ των επεμβάσεων και μεταξύ τελευταίας επέμβασης και συγκομιδής. Ενδείκνυται επεμβάσεις σε ελαιώνες με προσβολές, ιδιαίτερα μετά από περιόδους έντονων βροχοπτώσεων. Όμως, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι οι συχνές βροχοπτώσεις και η υψηλή υγρασία μπορεί να περιορίσουν τη δράση των μυκητοκτόνων, ενδέχεται να υπάρξει μη αποτελεσματική προστασία των καρπών, ενώ βρίσκονται στο στάδιο υψηλότερης ευαισθησίας.

Έγκριση για εφαρμογή στην χημική φυτοπροστασία της ελιάς, με στόχο την αντιμετώπιση τόσο του γλοιοσπορίου όσο και άλλων κύριων παθογόνων μυκήτων, έχουν 14 δ.ο., οι οποίες αναφέρονται στον **Πίνακα 4** με χρωματισμό αντίστοιχο της κατηγορίας μυκητοκτόνων στην οποία ανήκουν (Κόκκινο:Στρομπιλουρίνες, Μαύρο:Χαλκούχα, Μπλέ: Διθειοκαρβαμιδικά, Μωβ:Επιφανειοδραστικά, Πράσινο:Τριαζολικά). Αναφέρονται, επίσης, ορισμένες πληροφορίες σχετικά με την εφαρμογή τους (ΥΠΑΑΤ, 2020).

Πίνακας 4 Εγκεκριμένες δραστικές ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται στη φυτοπροστασία της ελιάς (ΥΠΑΑΤ, 2020) με χρωματισμό αντίστοιχο της κατηγορίας μυκητοκτόνων στην οποία ανήκουν (Κόκκινο: Στρομπιλουρίνες, Μαύρο: Χαλκούχα, Μπλέ: Διθειοκαρβαμιδικά, Μωβ: Επιφανειοδραστικά, Πράσινο: Τριαζολικά)

Δραστική ουσία	Γλοιοσπόριο (<i>Colletotrichum</i> spp.)	Κλαδοσπόριο (<i>Cladosporium</i> spp.)	Κυκλοκόνιο (<i>Spilocaea</i> <i>oleagina</i>)	Μέγιστος αριθμός εφαρμογών/ καλλιεργητική περίοδο	Τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή (ημέρες)
Azoxystrobin	+		+	1	Κατά την άνθηση
Bordeaux mixture	+		+	2	21
Copper hydroxide	+		+	2	21
Copper oxide			+	2	21
Copper oxychloride	+	+	+	2	21
Difenoconazole			+	2/14 ημέρες	30
Dodine	+		+	2/7 ημέρες	7
Fenbuconazole			+	1	Κατά την άνθηση
Kresoxim-methyl			+	1-2	30
Mancozeb	+		+	1-3	21
Pyraclostrobin	+		+	Ελαιοποιήσιμες ποικιλίες: 2/21 ημέρες	105
Tebuconazole			+	1	Πριν την ανθοφορία
Tribasic copper sulfate	+		+	2	21
Trifloxystrobin			+	1-2	14

1.5. Η ανάγκη για την έρευνα και ανάπτυξη νέων φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Φ.Π.)

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.) αποτέλεσαν αναπόσπαστο κομμάτι της παγκόσμιας γεωργίας κατά τον τελευταίο αιώνα, επιτρέποντας την αισθητή αύξηση των αποδόσεων και της παραγωγής τροφίμων (Alexandratos and Bruinsma, 2012). Όμως, η εκτεταμένη χρήση τους η οποία καθιερώθηκε κατά την περίοδο της ανάπτυξης της συμβατικής γεωργίας (conventional farming) με σκοπό την κάλυψη των αυξανόμενων αναγκών για τρόφιμα, και συνεχίζεται μέχρι σήμερα, έχει συνδεθεί με μία σειρά αρνητικών επιπτώσεων για το περιβάλλον και τον άνθρωπο (Lichtfouse et al., 2009, Bernardes et al., 2015).

Η έκθεση του πληθυσμού σε Φ.Π. και συνθετικές χημικές ουσίες έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την ανθρώπινη υγεία καθώς σχετίζεται με τον καρκίνο, την παχυσαρκία, τις ενδοκρινικές διαταραχές και άλλες ασθένειες (Gorell et al., 1998, Bassil et al., 2007, George and Shukla, 2011, Mrema et al., 2013, de Araujo et al., 2016, Organization, 2017). Σήμερα, περίπου 1,8 δισ. άνθρωποι ανά τον κόσμο ασχολούνται με τη γεωργία και χρησιμοποιούν τα Φ.Π., ενώ εκτιμάται ότι περίπου 25 εκατομμύρια εργαζόμενοι αντιμετωπίζουν κάθε χρόνο δηλητηριάσεις από αυτά (Alavanja, 2009).

Η διασπορά των προϊόντων αυτών μέσω των υπολειμμάτων τους έχει, επίσης, συνδεθεί με τη σημαντική επιβάρυνση του περιβάλλοντος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η ρύπανση των εδαφών και των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων (Hussain et al., 2009), με αποτέλεσμα να ενέχεται κίνδυνος για τη δημόσια υγεία (Carvalho, 2017), και η θανάτωση οργανισμών-μη στόχων όπως οι μέλισσες, τα πτηνά, τα ψάρια και τα μικρά θηλαστικά (Köhler and Triebkorn, 2013, Paoli et al., 2015, Organization, 2017).

Επιπρόσθετα, η χρήση τους συνδέεται με μια σειρά από κοινωνικό-οικονομικά ζητήματα. Το κυριότερο από αυτά είναι η διαρκής αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού, ο οποίος αναμένεται το 2050 να φτάσει τα 9,7 δισεκατομμύρια (UN and Social Affairs, 2015). Πρακτικά, αυτό μεταφράζεται σε υψηλότερη ζήτηση για Φ.Π. ώστε να εξασφαλίζεται η επάρκεια τροφίμων (Wezel et al., 2014, Marín-Benito et al., 2016), δεδομένου και ότι ένα σημαντικό ποσοστό της παγκόσμιας παραγωγής (20-30% ετησίως) εξακολουθεί να χάνεται λόγω των ασθενειών των φυτών (Oerke and Dehne, 2004, Oerke, 2006).

Παράλληλα, ανθεκτικοί πληθυσμοί των διαφόρων εχθρών των καλλιεργειών (έντομα, παράσιτα, παθογόνοι μικροοργανισμοί, ζιζάνια) έχουν αναπτυχθεί, ως αποτέλεσμα της μακροχρόνιας και ευρείας εφαρμογής τους από τους καλλιεργητές, στην προσπάθειά τους να παρέχουν προστασία και βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των φυτών, ώστε να παράγουν υψηλής ποιότητας προϊόντα (Hahn, 2014). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τα παραπάνω, υποδεικνύει την ανάγκη μείωσης ή / και καλύτερης χρήσης των Φ.Π., ειδικότερα αυτών που έχει επιβεβαιωθεί ότι σχετίζονται με φαινόμενα ανθεκτικότητας (Πίνακας 5) (Lamichhane et al., 2016).

Πίνακας 5 Παραδείγματα καταγεγραμμένης ανθεκτικότητας μυκήτων σε μυκητοκτόνα και οι σχετικές αναφορές (Lamichhane et al., 2016)

Pathogen	Resistance	References	Pathogen	Resistance	References
<i>Alternaria solani</i>	Boscalid	Miles et al. 2013	<i>Helminthosporium solani</i>	Thia-bendazole	Geary et al. 2007
	Penthiopyrad	Miles et al. 2013		Thiophanate-methyl	Geary et al. 2007
<i>Ascochyta rabiei</i>	Pyraclostrobin	Delgado et al. 2012		Strobilurin	Walker et al. 2009
<i>Botrytis cinerea</i>	Fenhexamid	De Miccolis Angelini et al. 2014	<i>Microdochium nivale</i> and <i>M. majus</i>	Propiconazole	Brannen et al. 2005
	Boscalid	De Miccolis Angelini et al. 2014	<i>Monilinia fructicola</i>	Methyl benzimidazole carbamate	Chen et al. 2013
	Pyraclostrobin	Bardas et al. 2010		Demethylase inhibitor	Chen et al. 2013
	Benomyl	Tanović and Ivanović 2010	<i>Oculimacula acufiformis</i> and <i>O. yallundae</i>	Prothioconazole	Leroux et al. 2013
	Benzimidazole	Banno et al. 2008		Boscalid	Leroux et al. 2013
	Dicarboximide	Banno et al. 2008	<i>Penicillium digitatum</i>	Fludioxonil	Kim, Saito, and Xiao 2015
	Thiophanate-methyl	Fernández-Ortuño et al. 2015	<i>Penicillium expansum</i>	Pyrimethanil	Caiazzo, Kim, and Xiao 2014
	Iprodione	Fernández-Ortuño et al. 2015		Pyrimethanil	Xiao, Kim, and Boal 2011
	Fludioxonil	Fernández-Ortuño et al. 2015	<i>Peronospora belbahrii</i>	Mefenoxam	Cohen et al. 2013
	Fluopyram	Amiri et al. 2014	<i>Peronophythora litchii</i>	Carboxylic acid amide	Wang et al. 2010
	Fluxapyroxad	Amiri et al. 2014	<i>Phytophthora capsici</i>	Mefenoxam	Café-Filho and Ristaino 2008
	Penthiopyrad	Amiri et al. 2014	<i>Phytophthora infestans</i>	Mefenoxam	Childers et al. 2015
	Trifloxystrobin	Weber 2011	<i>Podosphaera fusca</i>	Fenarimol	López-Ruiz et al. 2010
	Cyprodinil	Weber 2011	<i>Podosphaera xanthii</i>	Triadimenol	López-Ruiz et al. 2010
	Carbendazim	Sun et al. 2010	<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>	Cyflufenamid	Pironi et al. 2014
	Diethofencarb	Sun et al. 2010		Propiconazole	Jo et al. 2008
	Procymidone	Sun et al. 2010		Thiophanate-methyl	Jo et al. 2008
	Pyrimethanil	Sun et al. 2010	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Dimethachlon	Ma et al. 2009
	Anilinopyrimidine	Myresiotis et al. 2007	<i>Venturia inaequalis</i>	Kresoxim-methyl	Chapman et al. 2011
	Phenylpyrrole	Myresiotis et al. 2007		Dodine	Chapman et al. 2011
	Hydroxyanilide	Myresiotis et al. 2007		Myclobutanil	Chapman et al. 2011
<i>Calonectria pauciramosa</i>	Prochloraz	Guamaccia et al. 2014		Tthiophanate-methyl	Chapman et al. 2011
<i>Cercospora kikuchii</i>	Thiophanate methyl	Price et al. 2015		Benzenimidazole	Quello et al. 2010
	Methyl benzimidazole carbamate	Price et al. 2015			
<i>Cercospora sojina</i>	Quinone outside inhibitor	Standish et al. 2015			
<i>Colletotrichum cereale</i>	Azoxystrobin	Young et al. 2010			
<i>Fusarium</i> spp.	Fludioxonil	Gachango et al. 2011			
<i>Fusarium graminearum</i>	Carbendazim	Chen and Zhou 2009			
<i>Fusicladium carpophilum</i>	Azoxystrobin	Luo et al. 2013			

(continued in next column)

Στο πλαίσιο αυτό, με σκοπό τον περιορισμό του κινδύνου έκθεσης του ανθρώπου στα Φ.Π. και με γνώμονα την προστασία του περιβάλλοντος και των οργανισμών μη στόχων, η Ε.Ε. διενεργεί συνεχείς ελέγχους που καλύπτουν όλες τις πιθανές δυσμενείς επιδράσεις που απορρέουν από την χρήση τους (Ζιώγας and Μάρκογλου, 2010, EFSA, 2011). Μέσω της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA), πραγματοποιείται αξιολόγηση των Φ.Π. πριν από την έγκρισή τους και μετά τη διάθεση τους στην αγορά, με έλεγχο των υπολειμμάτων στα τρόφιμα (EFSA, 2018). Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια θέτει υπό αναθεώρηση το νομοθετικό πλαίσιο για την αξιολόγηση και τη διάθεσή τους στην αγορά. Πραγματοποιώντας ανασκόπηση των σχεδόν 1.000 δ.ο. που ήταν εγκεκριμένες κατά την έναρξη ισχύος της οδηγίας 414/EEC του 1991, έχει αποσύρει σε λιγότερο από 20 χρόνια (1993 έως 2010) από την κοινοτική αγορά το 74% των δ.ο. που χρησιμοποιούνται σε Φ.Π. (Lamichhane et al., 2016).

Επίσης, η κυκλοφορία ενός μεγάλου αριθμού Φ.Π. έχει απαγορευτεί ή περιοριστεί δραστικά (Hillocks, 2012), ενώ ο αριθμός αυτός ενδέχεται να αυξηθεί σημαντικά μετά την εφαρμογή του κανονισμού 1107/2009/EK που τέθηκε σε ισχύ το 2011, αντικαθιστώντας την παραπάνω οδηγία. Συγκεκριμένα, ο εν λόγω κανονισμός εισήγαγε νέα κριτήρια αξιολόγησης, όπως η πρόκληση ενδοκρινικών διαταραχών στον άνθρωπο (Lamichhane et al., 2016), επομένως εγκρίνονται μόνο οι δ.ο. για τις οποίες υπάρχουν αντικειμενικές ενδείξεις ασφαλούς χρήσης. Σύμφωνα με τελευταία στοιχεία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, είναι εγκεκριμένες 466 δ.ο. Φ.Π. (περίπου το 25% αυτών θεωρούνται χαμηλού κινδύνου), ενώ σε διαδικασία έγκρισης βρίσκονται μόλις 41 (European Commission, 2020).

Οι παραπάνω εξελίξεις έχουν διαμορφώσει μία κατάσταση αβεβαιότητας στους ευρωπαϊούς αγρότες, σχετικά με τα Φ.Π. για τα οποία επιτρέπεται η χρήση τους και εκείνα που ενδεχομένως να αποσυρθούν στο εγγύς μέλλον (Lamichhane et al., 2016), ενώ έχει περιοριστεί σημαντικά ο αριθμός και το πεδίο δράσης των Φ.Π. που κυκλοφορούν (Delcour et al., 2015). Η αυξανόμενη ή αναμενόμενη έλλειψη διαθέσιμων Φ.Π., οδηγεί τους καλλιεργητές στο να εξετάσουν την χρήση μη χημικών μεθόδων για την αντιμετώπιση των διαφόρων επιβλαβών οργανισμών (Lamichhane et al., 2015). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την ανάγκη αντιμετώπισης των προβλημάτων της χημικής καταπολέμησης, κατευθύνει την

έρευνα σε νέες στρατηγικές προστασίας των καλλιεργειών (Burketova et al., 2015).

Στόχο της σύγχρονης γεωργίας αποτελεί η μείωση των εισροών χωρίς να επηρεαστεί η απόδοση των καλλιεργειών και η ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων (Bulgari et al., 2015). Προκύπτει, επομένως, η ανάγκη σταδιακής μείωσης της χρήσης συμβατικών χημικών μέσων στη φυτοπροστασία (Sofo et al., 2014) και αναζήτησης ασφαλέστερων εναλλακτικών λύσεων. Οι πολύ τοξικές χημικές ουσίες μπορούν να αντικατασταθούν από νέες, λιγότερο επικίνδυνες ή πιο φιλικές προς το περιβάλλον, επομένως τα τρόφιμα θα είναι περισσότερο ασφαλή και οι αρνητικές επιπτώσεις της αυξημένης έκθεσης των καταναλωτών σε υπολείμματα Φ.Π., ως συνέπεια της κλιματικής αλλαγής, ενδέχεται να μην εμφανιστούν (Delcour et al., 2015). Στην προσπάθεια αυτή μπορεί να συμβάλλουν μέτρα όπως η ανάπτυξη νέων Φ.Π. π.χ. οι επαγωγείς της ανάπτυξης των φυτών (plant biostimulants) καθώς και αποτελεσματικών μεθόδων για την εφαρμογή τους (Calvo et al., 2014, Bulgari et al., 2015, Yakhin et al., 2017).

1.5.1. Επαγωγείς της ανάπτυξης των φυτών / Βιοδιεγέρτες (plant biostimulants)

Ως επαγωγέας της ανάπτυξης των φυτών ή βιοδιεγέρτης (plant biostimulant) ορίζεται οποιαδήποτε ουσία ή μικροοργανισμός που εφαρμόζεται στα φυτά και έχει στόχο την ενίσχυση της ενεργειακής απόδοσης, της αντοχής στις αβιοτικές καταπονήσεις ή / και των χαρακτηριστικών ποιότητας των καλλιεργειών, ανεξάρτητα από την περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά (du Jardin, 2015). Παρόλα αυτά, επί του παρόντος, ο όρος αυτός θεωρείται μη αντιπροσωπευτικός (Yakhin et al., 2017) καθώς στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται πολλά προϊόντα τα οποία έχουν περιγραφεί ποικιλοτρόπως ως διεγέρτες βιολογικής προέλευσης (biogenic stimulants), ενισχυτές του μεταβολισμού (metabolic enhancers), ενισχυτές των φυτών (plant strengtheners), ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών (positive plant growth regulators), διεγέρτες (elicitors), βελτιωτικά φυτών (plant conditioners), φυτοδιεγέρτες (phytostimulators) ή βιολιπάσματα (bio fertilisers). Τα παραπάνω προϊόντα δεν αποτελούν Φ.Π. καθώς δεν παρέχουν

προστασία από τους εχθρούς των φυτών (pests), ενώ δεν κατατάσσονται ούτε στα λιπάσματα αφού δεν αποτελούν εισροές θρεπτικών στοιχείων (La Torre et al., 2016). Ειδικότερα, σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία της Ε.Ε. (Κανονισμός 1009/2019) (European Commission, 2019), ως βιοδιεγέρτης φυτών (plant biostimulant) χαρακτηρίζεται ένα προϊόν λίπανσης (της Ε.Ε.) που έχει ως λειτουργία να διεγείρει τις διαδικασίες θρέψης των φυτών ανεξάρτητα από την περιεκτικότητα του προϊόντος σε θρεπτικά στοιχεία, με μοναδικό σκοπό τη βελτίωση ενός ή περισσότερων από τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του φυτού ή της ριζόσφαιρας του φυτού: **α)** την αποδοτικότητα της χρήσης των θρεπτικών στοιχείων, **β)** την αντοχή σε αβιοτικές καταπονήσεις, **γ)** τα χαρακτηριστικά ποιότητας, ή **δ)** τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων που συγκρατούνται στο έδαφος ή στη ριζόσφαιρα.

Η πλειοψηφία των βιοδιεγερτών που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι πολυσύνθετα μίγματα χημικών ουσιών που προέρχονται από μία βιολογική διαδικασία ή από την εκχύλιση βιολογικών υλικών (Yakhin et al., 2017). Ανάλογα με τη σύνθεσή τους, προτείνεται ο διαχωρισμός των βιοδιεγερτών σε 9 κατηγορίες, 6 μικροβιακούς και 3 μη μικροβιακούς (Colla and Rouphael, 2015). Στους μιν μικροβιακούς κατατάσσονται αυτοί που περιέχουν χιτοζάνη (chitosan) (Pichyangkura and Chadchawan, 2015), χουμικά και φουλβικά οξέα (humic and fulvic acids) (Canellas et al., 2015), υδρολύματα πρωτεϊνών (protein hydrolysates) (Colla et al., 2015), φωσφορώδεις ενώσεις (phosphites) (Gómez-Merino and Trejo-Téllez, 2015), εκχυλίσματα φυκιών (sea weed extracts) (Battacharyya et al., 2015) και πυρίτιο (silicon) (Savvas and Ntatsi, 2015). Αντίθετα, στους μη μικροβιακούς, μύκητες που σχηματίζουν θυσανοειδή μυκόρριζες (arbuscular mycorrhizal fungi) (Ruzzi and Aroca, 2015), ριζοβακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού (plant growth-promoting rhizobacteria) και μύκητες του γένους *Trichoderma*. Με βάση όμως την προαναφερθείσα αναθεώρηση στην ευρωπαϊκή νομοθεσία, ως βιοδιεγέρτες σήμερα χαρακτηρίζονται τα προϊόντα που περιλαμβάνουν κάποια από τις παρακάτω βιοδραστικές φυσικές ουσίες: χουμικά και φουλβικά οξέα (humic and fulvic acids), υδρολύματα ζωικών και φυτικών πρωτεϊνών (animal and vegetable protein hydrolysates), εκχυλίσματα φυκιών (macroalgae seaweeds extracts), πυρίτιο (silicon), καθώς και ευεργετικούς μικροοργανισμούς όπως μύκητες που σχηματίζουν θυσανοειδείς μυκόρριζες

(arbuscular mycorrhizal fungi) και αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (N-fixing bacteria) που ανήκουν στα γένη *Rhizobium*, *Azotobacter* και *Azospirillum*.

Τα παραπάνω προϊόντα εφαρμόζονται τόσο με ψεκασμούς φυλλώματος (foliar applications) όσο και μέσω του εδάφους, σε ένα ευρύ φάσμα καλλιεργειών, όπως οι δενδρώδεις, τα φυτά μεγάλης καλλιέργειας, τα κηπευτικά και τα καλλωπιστικά (Πίνακας 6). Η χρήση τους αφορά σε όλα τα στάδια της γεωργικής παραγωγής και συγκεκριμένα στην εφαρμογή μέσω των σπόρων (seed treatment), κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών και μετασυλλεκτικά (Yakhin et al., 2017).

Πίνακας 6 Παραδείγματα μελέτης της επίδρασης βιοδιεγερτών σε διάφορα είδη φυτών και οι αντίστοιχες αναφορές

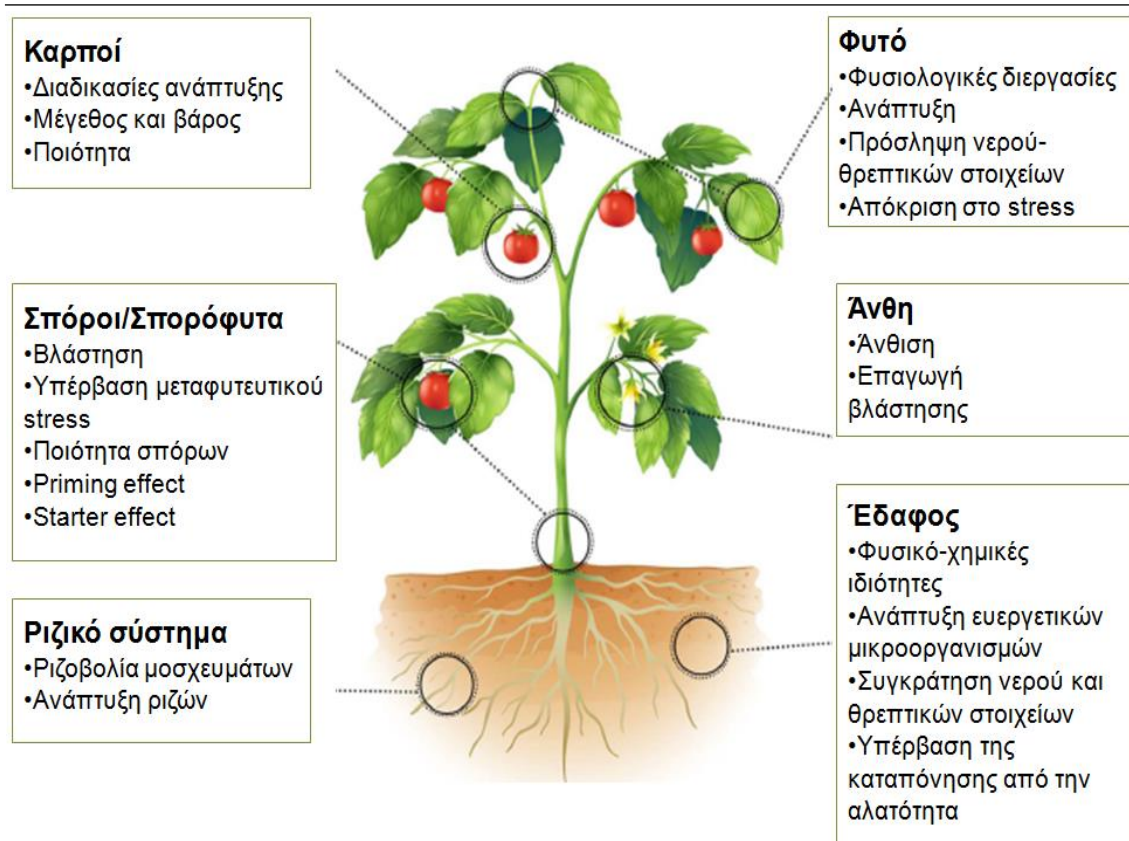
Φυτό	Βιοδιεγέρτης	Αναφορά
Αμπέλι (<i>Vitis vinifera</i>)	Εκχυλίσματα φυκιών	(Mancuso et al., 2006)
Αμυγδαλιά(<i>Prunus dulcis</i>)	Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια	(Saa et al., 2015)
Αραβόσιτος (<i>Zea mays</i>)	Υδρολύματα πρωτεϊνών	(Ertani et al., 2013)
Ηλιάνθος (<i>Helianthus annuus</i>)	Πυρίτιο	(Kamenidou et al., 2008)
Λωτός (<i>Diospyros lotus</i>)	Υδρολύματα πρωτεϊνών	(Visconti et al., 2015)
Μαρούλι (<i>Lactuca sativa</i>)	Εκχυλίσματα φυκιών	(Möller and Smith, 1998)
Μηλιά (<i>Malus domestica</i>)	Εκχυλίσματα φυκιών, υδρολύματα πρωτεϊνών	(Soppelsa et al., 2018)
Πιπεριά(<i>Capsicum annuum</i>)	Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια	(del Amor and Cuadra-Crespo, 2012)
Πορτοκαλιά (<i>Citrus sinensis</i>)	Εκχυλίσματα φυκιών	(Spann and Little, 2011)
Ρεβιθιά (<i>Cicer arietinum</i>)	Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια	(Hamaoui et al., 2001)
Ρύζι (<i>Oryza sativa</i>)	Χουμικά οξέα	(García et al., 2012)
Σπανάκι (<i>Spinacia oleracea</i>)	Εκχυλίσματα φυκιών	(Xu and Leskovar, 2015)
Τομάτα(<i>Solanum lycopersicum</i>)	Υδρολύματα πρωτεϊνών	(Casadesús et al., 2019)
Φάβα(<i>Vicia faba</i>)	Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια	(Hamaoui et al., 2001)

Η δράση των χουμικών ουσιών (χουμικά και φουλβικά οξέα) ως βιοδιεγέρτες, αφορά στη διαθεσιμότητα και την πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών στο έδαφος και έχει αποδοθεί στη βελτίωση διάφορων μηχανισμών που επηρεάζουν τις διεργασίες του εδάφους και τη φυσιολογία των φυτών. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η δομή του εδάφους, η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων και η εξουδετέρωση (neutralizing) του pH του εδάφους, η διαλυτότητα του φωσφόρου, η επαγωγή της πλευρικής ρίζας και των τριχιδίων και η διέγερση της αφομοίωσης των νιτρικών αλάτων (Pinton et al., 1999, Delgado et al., 2002, Garcia-Mina et al., 2004, Schmidt et al., 2007, Halpern et al., 2015, Zandonadi et al., 2016, De Pascale et al., 2017). Επιπλέον, αρκετές μελέτες συνδέουν την χρήση των χουμικών οξέων με την προστασία των φυτών από την καταπόνηση (stress), ιδιαίτερα από την αλατότητα και την έλλειψη νερού (Türkmen et al., 2004, Paksoy et al., 2010, García et al., 2012, Petrozza et al., 2014), με μείωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της υπεροξειδωσης λιπιδίων, αύξηση της περιεκτικότητας σε προλίνη, διαφοροποίηση της γονιδιακής έκφρασης και με βελτίωση της ανάπτυξης των ριζών καθώς και την ποιοτική και ποσοτική βελτίωση των καρπών (Arancon et al., 2006, Yildirim, 2007, Calvo et al., 2014, Battacharyya et al., 2015).

Η εφαρμογή των υδρολυμάτων ζωικών και φυτικών πρωτεϊνών τόσο στον αγρό όσο και στο θερμοκήπιο, έδειξε ότι ενεργοποιούν φυσιολογικές και μοριακές διεργασίες οι οποίες διεγείρουν την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα, μειώνοντας έτσι την καταπόνηση των καλλιεργειών από αβιοτικούς παράγοντες (Colla et al., 2017). Συγκεκριμένα, η άμεση επίδραση των προϊόντων αυτών σχετίζεται με την ενεργοποίηση των βασικών ενζύμων που εμπλέκονται στην αφομοίωση του αζώτου (NR, NiR, GS και GOCAT), στο μεταβολισμό του οξυγόνου (κιτρική συνθάση, μηλεϊνική και ισοκιτρική αφυδρογονάση), στην αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων, στη βιοσύνθεση των χρωστικών και στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών από τα φυτά (Schiavon et al., 2008, Ertani et al., 2009, Roupheal et al., 2017, Roupheal et al., 2018, Sestili et al., 2018). Η έμμεση επίδρασή τους αφορά κυρίως στη βελτίωση της πρόσληψης νερού και θρεπτικών ουσιών, μεταβάλλοντας τη μορφολογία του ριζικού συστήματος (αύξηση διαμέτρου των ριζών, πυκνότητας και μήκους των τριχιδίων) (Colla et al., 2014, Colla et al., 2017).

Επιπρόσθετα, τα εκχυλίσματα φυκιών τα οποία αποτελούν άλλη μία σημαντική κατηγορία οργανικών, μη-μικροβιακών βιοδιεγερτών, συνδέονται με μία σειρά ευεργετικών επιδράσεων για τα φυτά. Ειδικότερα, ενισχύουν τη βλάστηση και την εγκατάσταση των σπόρων, προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, την έκπτυξη των ανθέων και την παραγωγή καρπών, αυξάνουν την αντοχή στις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, την απόδοση καθώς και τη διάρκεια ζωής μετασυλλεκτικά (Norrie and Keathley, 2005, Mancuso et al., 2006, Hong et al., 2007, Rayorath et al., 2008, Khan et al., 2009, Craigie, 2011, Mattner et al., 2013). Αξιοσημείωτη είναι, επίσης, η θετική επίδραση τους στον *in vitro* πολλαπλασιασμό (σε φυτά τομάτας) (Vinoth et al., 2012) και στην προστασία των φυτών από παθογόνα και έντομα-εχθρούς (Hankins and Hockey, 1990, Mercier et al., 2001, Klarzynski et al., 2003, Khan et al., 2009, Jayaraman et al., 2011, Loureiro et al., 2012). Τα παραπάνω μπορούν να αποδοθούν σε διάφορους μηχανισμούς ενίσχυσης της ανάπτυξης όπως: η καθυστερημένη γήρανση, οι βιοχημικές μεταβολές (αυξημένα μικροθρεπτικά συστατικά και χλωροφύλλη, παρουσία αυξητικών ορμονών) και η αυξημένη δραστηριότητα ριζοβακτηρίων και μυκορριζών (Blunden et al., 1996, Battacharyya et al., 2015).

Εξίσου ευρεία και αποτελεσματική είναι η χρήση μικροβιακών βιοδιεγερτών όπως τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (N-fixing bacteria) και οι μυκορριζικοί μύκητες, τα οποία θεωρούνται χρήσιμα εργαλεία για την εξασφάλιση σταθερής απόδοσης των φυτών υπό συνθήκες χαμηλών εισροών, αλλά και ως καινοτόμος τεχνολογία για τη βελτίωση της αντοχής τους υπό συνθήκες καταπόνησης (ακραίες θερμοκρασίες, ξηρασία και αλατότητα) (Rouphael and Colla, 2020). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους (Lace et al., 2015, Ruzzi and Aroca, 2015, Fiorentino et al., 2018), τα προϊόντα αυτά μπορούν να τροποποιήσουν το μικροβιακό πληθυσμό της ριζόσφαιρας με διάφορους τρόπους όπως η παραγωγή ενζύμων (φωσφατάσες) ή/και η απέκκριση οργανικών ενώσεων χαμηλού (αμινοξέων, σακχάρων, οργανικών οξέων και φαινολικών) και υψηλού μοριακού βάρους (πρωτεΐνες) στη ριζόσφαιρα. Επιπλέον, συμβάλλουν στην πρόσληψη και μεταφορά θρεπτικών ουσιών (N, P, Fe, Zn και Mn) και στη ενδυνάμωση του ριζικού συστήματος (Hayat et al., 2010, Candido et al., 2013, Colla et al., 2015, Colla et al., 2015, Rouphael et al., 2015, Saia et al., 2015, De Pascale et al., 2017, Bitterlich et al., 2018).



Εικόνα 9 Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων βιοδιεγερτών σε διαφορετικά μέρη ενός φυτού (τροποποιημένη από (Ponero et al., 2016))

Παρόλο που οι διάφορες μορφές βιοδιεγερτών δείχνουν να επιδρούν ποικιλοτρόπως στα φυτά (**Εικόνα 9**), εντούτοις ο μηχανισμός δράσης τους (Μ.Δ.) είναι συχνά άγνωστος και δύσκολο να προσδιοριστεί. Ουσιαστικά, πρόκειται για προϊόντα που περιέχουν πολλαπλές βιοδραστικές ουσίες οι οποίες, δρώντας συνεργιστικά, μπορούν να επηρεάσουν το φυτό με συγκεκριμένο τρόπο (Ertani et al., 2011). Η δυσκολία κατανόησης του μηχανισμού δράσης οφείλεται κυρίως στην ετερογενή φύση των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των βιοδιεγερτών και στα πολύπλοκα μείγματα των συστατικών που περιέχονται σε αυτούς, γεγονός που καθιστά σχεδόν αδύνατο να αποσαφηνιστεί ποια συστατικά είναι υπεύθυνα για τη βιολογική δραστηριότητα (biological activity), ώστε να διευκρινιστεί επακριβώς ο Μ.Δ. (Paradikonić et al., 2011). Στην προσπάθεια αυτή αναμένεται να συμβάλει η ανάπτυξη προηγμένου αναλυτικού εξοπλισμού και λογισμικών βιοπληροφορικής, δίνοντας μια ολοκληρωμένη εικόνα στο εγγύς μέλλον (Caradonia et al., 2019).

Οι βιοδιεγέρτες τα τελευταία χρόνια καταλαμβάνουν σημαντικό μερίδιο στην παγκόσμια αγορά αγροτικών προϊόντων. Ενδεικτικά, το 2014, οι πωλήσεις τους

ανήλθαν σε περίπου 1,5 δισ. \$, με τις προβλέψεις να εκτιμούν ότι θα φθάσουν τα 4 δισ. το 2025 (ετήσιος ρυθμός ανάπτυξης 10,2%) (Grand View Research, 2018). Η χρήση τους μπορεί να συμβάλει στη μείωση των δυνητικά επικίνδυνων υπαρχόντων Φ.Π. και λιπασμάτων (Kolomazník et al., 2012), δεδομένης της αυξανόμενης σημασίας του βιολογικού παράγοντα στη γεωργία και της ανάπτυξης καινοτόμων προϊόντων με στόχο την ικανοποίηση συγκεκριμένων αναγκών των καλλιεργειών. Όσον αφορά την ελληνική αγορά, αρκετά τέτοια προϊόντα κυκλοφορούν σήμερα με δυνατότητα εφαρμογής σε ένα ευρύ φάσμα καλλιεργειών. Μερικά από αυτά αναφέρονται στον **Πίνακα 7**.

Πίνακας 7 Παραδείγματα εμπορικών σκευασμάτων που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά ως βιοδιεγέρτες, η σύστασή τους και οι καλλιέργειες στις οποίες εφαρμόζονται

Εμπορική Ονομασία	Σύσταση (% w/w)	Καλλιέργειες
ΒΙΟCΥΑJΕ	Φώσφορος (P ₂ O ₅): 20 Κάλιο (K ₂ O): 5 Βόριο (B): 0,02 Σίδηρος (Fe) : 0,1 Μαγγάνιο (Mn): 0,2 Μολυβδαίνιο (Mo): 2,5 Ψευδάργυρος (Zn): 0,2	Αμπέλι, Ελιά , Εσπεριδοειδή, Κηπευτικά, Οπωροφόρα δένδρα, Υδροπονικές καλλιέργειες
ΜΑΧΙ CΡΟΡ Ν	Ολικό διαθέσιμο άζωτο 17 (ουρικό Ν 14,5-μέγιστη περιεκτικότητα σε διουρία 0,3%) Εκχύλισμα θαλάσσιων φυκών του είδους <i>Ascophyllum nodosum</i> : 4,2% w/v, στο οποίο περιέχονται ορμονικοί φυσικοί βιοδιεγέρτες ανάπτυξης όπως: Αυξίνες, Γιβερελλίνες, Μπεταΐνες, Κυτοκινίνες, Αλγινικό οξύ και τα παράγωγά του, Μανιτόλη, Λαμιναρίνη, Πεντοζάνες και χουμικά οξέα, άλλα και ιχνοστοιχεία κυρίως σε χηλική μορφή (Fe, Cu, Mn, Zn, B, Mo, κ.ά.).	Αμπέλι, Βιομηχανικά Φυτά, Οπωροφόρα, Εσπεριδοειδή, Ελιά , Καλλωπιστικά- Ανθοκομικά Φυτά, Κτηνοτροφικά - Χορτοδοτικά Φυτά, Σιτηρά, Γκαζόν, Λαχανικά- Κηπευτικά

Olivo Plus	<p>Άζωτο (N) ολικό: 5 Θείο (SO₃) : 3,5 Βόριο (B) : 1,2 Μαγγάνιο (Mn) : 1 Μολυβδαίνιο (Mo) : 0,1 Μαγνήσιο (MgO) : 1,5 Ψευδάργυρος (Zn) : 0,5</p>	<p>Ελιά (βρώσιμη & ελαιοποιήσιμη)</p>
ProAct	<p>Harpin αβ 1%</p>	<p>Οπωροφόρα δένδρα, Ελιά, Κηπευτικά/ Λαχανικά, Σιτηρά, Βιομηχανικά Φυτά</p>
SERGOMAX L-90 ECO	<p>Χαλκός (Cu), : 1,8 Μαγγάνιο (Mn) : 0,8 Ψευδάργυρος (Zn) : 0,5</p>	<p>Αμπέλι, Ελιά, Εσπεριδοειδή, Κηπευτικά/ Λαχανικά, Οπωροφόρα</p>
STRONG 26	<p>Χουμικά & Φουλβικά οξέα: 26 Οργανικός άνθρακας (C): 10,5 Άζωτο (N): 0,1 Φώσφορος (P₂O₅): 0,06 Κάλιο (K₂O): 5 Ασβέστιο (CaO): 0,03 Μαγνήσιο (MgO): 0,03 Ιχνοστοιχεία (Fe, Cu, Mn, Zn, κ.α)</p>	<p>Αμπέλι, Αραβόσιτος, Ελιά, Εσπεριδοειδή, Κηπευτικά/ Λαχανικά, Οπωροφόρα, Φράουλα</p>

1.5.2. Οι χαρπίνες

Οι χαρπίνες είναι όξινες πρωτεΐνες που παράγονται από αρνητικά κατά Gram φυτοπαθογόνα βακτήρια (Peng et al., 2003). Τα εν λόγω βακτήρια, κατά την αλληλεπίδραση με φυτά-ξενιστές, χρησιμοποιούν ένα εξελιγμένο σύστημα έκκρισης πρωτεϊνών (σύστημα τύπου III, T3SS), ώστε να προκαλέσουν μία ασθένεια (Grant et al., 2006). Οι δομικές πρωτεΐνες του T3SS κωδικοποιούνται από την αντίδραση υπερευαισθησίας (hypersensitive response, HR) και από τα συντηρημένα γονίδια της παθογένειας (*hrp*) (Tampakaki et al., 2010).

Η αντίδραση υπερευαισθησίας αφορά στην επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού, αναστέλλοντας την ανάπτυξη των παθογόνων είτε έμμεσα, βοηθώντας στην ενίσχυση των τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων, είτε άμεσα με την παραγωγή αντιμικροβιακών ενζύμων και φυτοαλεξινών (Scheel,

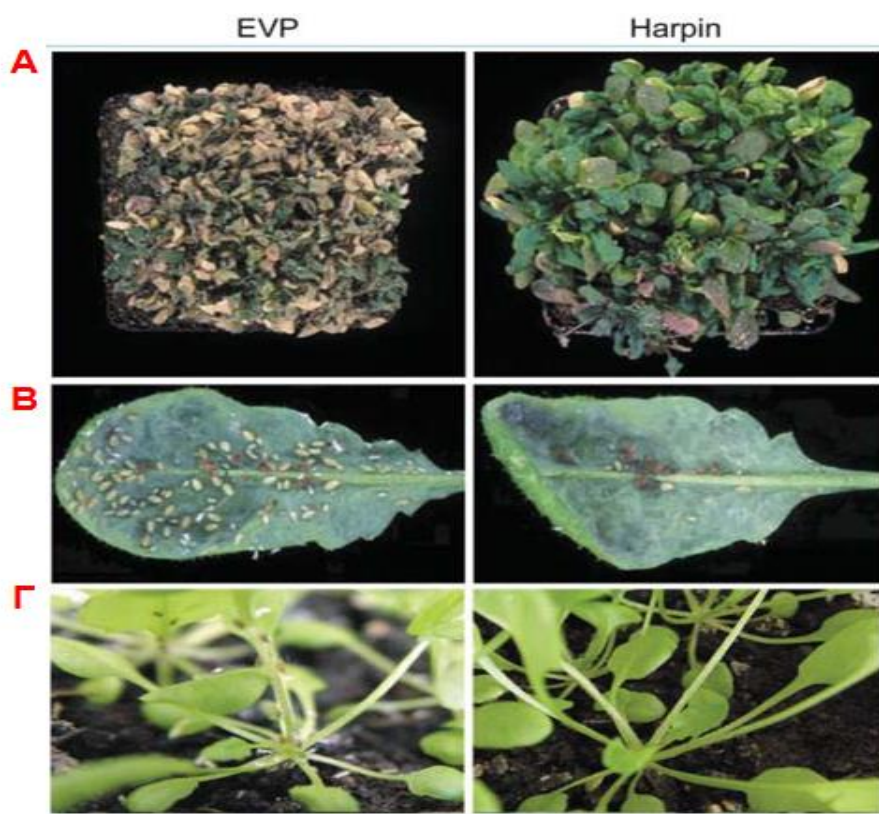
1998, Dangl and Jones, 2001). Πρόκειται για μία αμυντική απόκριση με στόχο τον περιορισμό της περαιτέρω εξάπλωσης των παθογόνων στους φυτικούς ιστούς.

Επιπρόσθετα, τα *hrp* είναι γονίδια τα οποία περιγράφησαν για πρώτη φορά σε σχετική έρευνα όταν βρέθηκε ότι ήταν απολύτως απαραίτητα τόσο στην HR όσο και στην παθογένεια του *Pseudomonas syringae* (Lindgren et al., 1986),. Σε μεταγενέστερη μελέτη, η περαιτέρω ανάλυση του γονιδίου *hrp* του *Erwinia amylovora*, έδειξε ότι αποτελείτο από 8 συμπληρωματικές ομάδες (complementation groups), οι οποίες εμπλέκονταν είτε στην παραγωγή είτε στην έκκριση της χαρπίνης (HrpN), μιας πρωτεΐνης-διεγέρτη της HR (Wei and Beer, 1993). Έκτοτε, έχουν περιγραφεί και άλλες χαρπίνες τόσο στο *Erwinia* όσο και σε άλλα βασικά γένη φυτοπαθογόνων βακτηρίων όπως τα *Pseudomonas*, *Ralstonia* και *Xanthomonas* (He et al., 1993, Bauer et al., 1995, Roine et al., 1997, Charkowski et al., 1998, Jiménez-Díaz et al., 1998, Kim and Beer, 1998, Zhu et al., 2000).

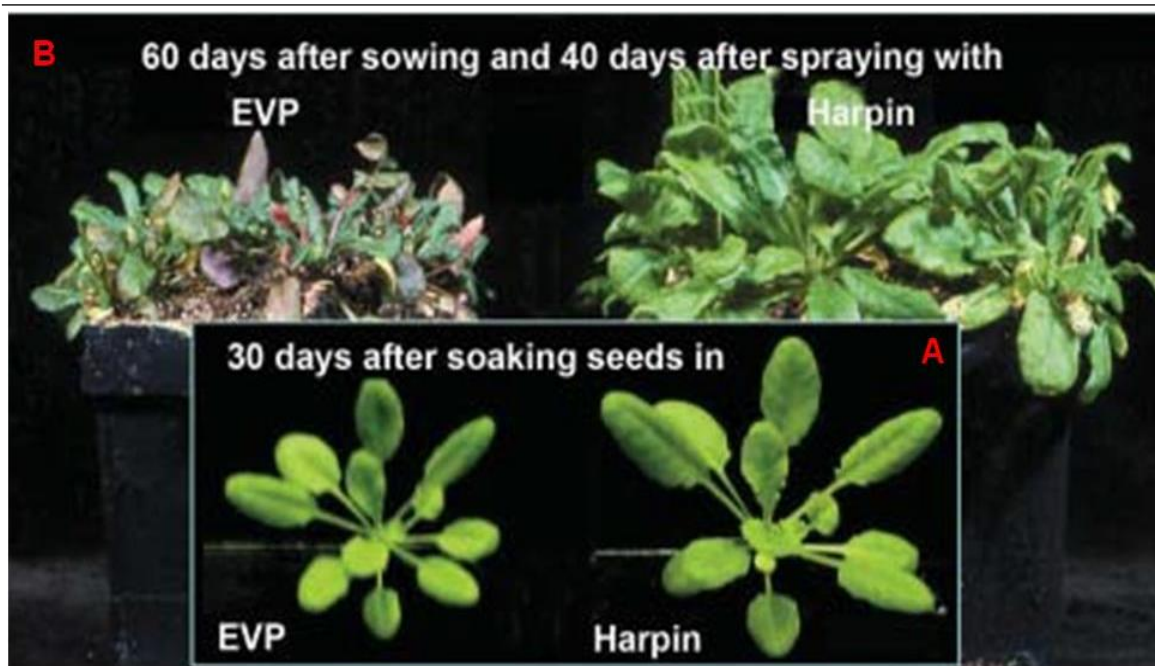
Οι πρωτεΐνες αυτές εφαρμόζονται σε αρκετά είδη φυτών και η δράση τους σχετίζεται με την ενίσχυση της ανάπτυξης και την πρόκληση αντίστασης / επαγωγής της άμυνας έναντι σε παθογόνα και έντομα (Peng et al., 2003). Για παράδειγμα, η εφαρμογή HrpN σε καρπούς μηλιάς (*Malus domestica*) τόσο προσυλλεκτικά όσο και μετασυλλεκτικά, είχε ως αποτέλεσμα οι καρποί να είναι πιο ανθεκτικοί στο παθογόνο *Penicillium expansum* και ως εκ τούτου να μειώνονται τα σημεία σήψης κατά τη μακροχρόνια αποθήκευσή τους (de Cardeville et al., 2003). Σε φυτά πιπεριάς που καλλιεργούνταν στον αγρό, οι προσβολές από το *Ostrinia nubilalis* (πυραλίδα του αραβοσίτου) ήταν λιγότερες στα φυτά στα οποία είχε προηγηθεί επέμβαση (Zitter and Beer, 1998, Dong et al., 2004), ενώ σε φυτά αγγουριάς τα άτομα του είδους *Acalymma vittatum* προτιμούσαν να αποικίζουν τα φυτά που χρησιμοποιούνταν ως μάρτυρες (Zitter and Beer, 1998, Dong et al., 2004). Ακόμα, σε φυτά Αραβίδοψης (*Arabidopsis thaliana*) η επίδραση της HrpN μελετήθηκε σχετικά με την προσβολή τους από την πράσινη αφίδα της ροδακινιάς (*Myzus persicae*) (Dong et al., 2004). Πραγματοποιήθηκε αποικισμός 200 αφίδων/φυτό και έπειτα από 30 ημέρες, τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες είχαν υποστεί σοβαρές ζημιές, ενώ στα περισσότερα επήλθε φυτικός θάνατος. Αντίθετα, στα φυτά όπου είχε προηγηθεί ψεκασμός με HrpN, οι προσβολές ήταν πιο περιορισμένες και τα περισσότερα φυτά αναπτύσσονταν **(Εικόνα 10)**. Τέλος, στην ίδια μελέτη διαφορές παρατηρήθηκαν τόσο στη

μορφολογία όσο και στο νωπό βάρος ανάμεσα στα φυτά που είχαν ψεκαστεί με HrpN και σε αυτά που είχαν χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρες (ψεκασμός με ίδιο όγκο ανενεργών πρωτεϊνών). Ειδικότερα, τα σπορόφυτα της πρώτης κατηγορίας, 40 ημέρες μετά παρουσίασαν εμφανώς μεγαλύτερη ανάπτυξη και 60 ημέρες μετά, ηπιότερα σημάδια γήρανσης (**Εικόνα 11**), ενώ το νωπό βάρος τους ήταν περίπου 1,6 φορές μεγαλύτερο από τα φυτά-μάρτυρες.

Επιπρόσθετα, οι HrpN φαίνεται να επηρεάζουν και το μεταβολισμό του φυτού, ενεργοποιώντας ένζυμα όπως η αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) από τη βιοσυνθετική οδό της πολυφαινόλης (Ruiz-García and Gómez-Plaza, 2013). Συγκεκριμένα, επέμβαση σε καρπούς ροδακινιάς (*Prunus persica*) και τζιτζιφιάς (*Ziziphus jujuba*) η οποία πραγματοποιήθηκε μετασυλλεκτικά, οδήγησε σε αύξηση των ολικών φαινολών (Danner et al., 2008, Li et al., 2012), ενώ αυξημένα επίπεδα φαινολικών ενώσεων, φλαβονοειδών και λιγνίνης καταγράφηκαν έπειτα από επέμβαση σε καλλιέργεια πεππονιάς (*Cucumis melo*) (Wang et al., 2011).



Εικόνα 10 Φυτά Αραβίδοψης (*Arabidopsis thaliana*) μετά το ψεκασμό με διάλυμα ανενεργών πρωτεϊνών (EVP) (αριστερά) και με διάλυμα χαρπίνης (δεξιά), 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση αφίδων (*Myzus persicae*). Διακρίνονται: Προσβολές σε πυκνά φυτά (**A**), αποικία αφίδων στην κάτω επιφάνεια φύλλου (**B**) και αφίδες σε μεμονωμένα φυτά (**Γ**) (Dong et al., 2004).



Εικόνα 11 Ανάπτυξη φυτών Αραβίδοψης (*Arabidopsis thaliana*) 60 ημέρες μετά τη σπορά και 40 ημέρες μετά το ψεκασμό με διάλυμα ανενεργών πρωτεϊνών (EVP) (αριστερά) και με διάλυμα χαρπίνης (δεξιά) (**A**) και 30 μέρες μετά την εμφύτευση σπόρων στα παραπάνω διαλύματα (**B**) (Dong et al., 2004).

1.6. Μεταβολομική ανάλυση

1.6.1. Ορισμός και εφαρμογές της μεταβολομικής ανάλυσης στα φυτά

Ως μεταβολομική ορίζεται η ολοκληρωμένη ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος (Trethewey et al., 1999, Fiehn et al., 2000). Η μέθοδος περιλαμβάνει πειραματικό σχεδιασμό και εκτέλεση, προετοιμασία δειγμάτων για χημική ανάλυση και προ-επεξεργασία δεδομένων, βιοπληροφορική ανάλυση και βιολογική ερμηνεία (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011, Aliferis and Jabaji, 2011)

Η μεταβολομική αποτελεί ένα πολύτιμο αναδυόμενο βιοαναλυτικό εργαλείο για τη μελέτη του φαινοτύπου και των αλλαγών που προκαλούνται σε αυτόν από περιβαλλοντικά αίτια, ασθένειες ή αλλαγές στον γονότυπο (Dettmer et al., 2007). Αφορά τόσο μικροοργανισμούς όσο και φυτά και ζώα, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Wishart, 2008) και εφαρμόζεται σε ένα ευρύ φάσμα επιστημών, μεταξύ των οποίων η επιστήμη των τροφίμων, η ιατρική, η οικολογία και η

γεωπονία {Dixon, 2006 #103;Shulaev, 2006 #104;Bundy, 2009 #105;Wishart, 2008 #106;Aliferis, 2011 #92}.

Σημαντική είναι, ακόμα, η δυνατότητα χρήσης της μεθόδου στη μελέτη του μεταβολισμού και της φυσιολογίας των φυτών (Servili et al., 2016), δεδομένου ότι το μεταβόλωμα τους είναι εξαιρετικά πολύπλοκο, με περισσότερους από 200.000 μεταβολίτες να έχουν καταγραφεί στο φυτικό βασίλειο (Fiehn, 2002). Βάσει αυτών των στοιχείων, η ταυτοποίηση μεταβολιτών με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες έχει καθοριστική σημασία για τη μελέτη της ανάπτυξης και της απόκρισης σε μεταβολές περιβαλλοντικών παραγόντων (Sousa Silva et al., 2019), στην κατεύθυνση της βελτίωσης της παραγωγικότητας και των αποδόσεων των καλλιεργειών (Alseekh et al., 2018). Ουσιαστικά, δίνεται η δυνατότητα μελέτης φυτικών ιστών και κυττάρων (Kruger et al., 2008) έπειτα από διαφορετικές επεμβάσεις και σε διαφορετικά χρονικά σημεία (time points) (Kim et al., 2010). Παραδείγματα εφαρμογών αφορούν στη μελέτη της καταπόνησης (stress) από παράγοντες όπως η θερμοκρασία (Cook et al., 2004, Kaplan et al., 2004), η αλατότητα του νερού (Johnson et al., 2003, Brosché et al., 2005, Gong et al., 2005, Kim et al., 2006, Cramer et al., 2007), η οξείδωση του θείου (Nikiforova et al., 2004) καθώς και πολλαπλών παραγόντων σε συνδυασμό (Rizhsky et al., 2004), στην καταγραφή των μεταβολικών διαφορών ανάμεσα σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης ενός φυτού (Tweeddale et al., 1998, Martins et al., 2004) αλλά και στην αναγνώριση και περιγραφή των διαφορών και ομοιοτήτων μεταξύ διαφορετικών φυτικών ειδών και ποικιλιών (Harrigan et al., 2007). Παράλληλα, με έναν υψηλής ρυθμοαπόδοσης χαρακτηρισμό (high-throughput screening) βιοδραστικών ουσιών, ερευνάται η ανακάλυψη Φ.Π. με υψηλή εκλεκτικότητα, πρωτότυπους Μ.Δ. και αποδεκτές οικοτοξικολογικές και τοξικολογικές ιδιότητες (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

1.6.1.1. Εφαρμογές της μεταβολομικής ανάλυσης στην ελιά και σε άλλες δενδρώδεις καλλιέργειες

Βάσει της αναζήτησης στη διεθνή βιβλιογραφία, εντοπίστηκαν μελέτες εφαρμογής της μεταβολομικής στην ανάλυση του μεταβολισμού του φυτού της ελιάς (*O. europaea* L.). Αρχικά, κατέστη δυνατή η καταγραφή των διαφορών της

μεταβολικής σύνθεσης ώριμων καρπών της ποικιλίας Cipressino μεταξύ δέντρων που υπέστησαν υδατική καταπόνηση και δέντρων που αρδεύονταν κατά την περίοδο από τη σκλήρυνση του πυρήνα μέχρι τη συγκομιδή των καρπών. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι υπήρχε σαφής διαχωρισμός των μεταβολικών προφίλ, ενώ σε δείγματα καρπών που υπέστησαν υδατική καταπόνηση ανιχνεύθηκε μείωση των διαλυτών σακχάρων και των ακόρεστων λιπαρών οξέων, γεγονός που υποδηλώνει επιτάχυνση της διαδικασίας ωρίμανσης (Martinelli et al., 2013). Σε παρόμοια μελέτη (Martinelli et al., 2012) σε ελαιόδεντρα της ποικιλίας Leccino, 46 μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στο ώριμο μεσοκάρπιο, εμφάνισαν σημαντικά διαφορετική περιεκτικότητα σε καρπούς που προέρχονταν από δέντρα τα οποία αρδεύονταν σε σχέση με καρπούς δέντρων που δεν αρδεύονταν, ενώ ορισμένες ενώσεις που εμπλέκονται στον πρωτογενή (υδατάνθρακες, αμινοξέα, οργανικά οξέα) και στο δευτερογενή μεταβολισμό (σκουαλένιο, απλές φαινόλες), ήταν σε μεγαλύτερα ποσοστά στους καρπούς της πρώτης κατηγορίας. Επιπρόσθετα, σε αυτούς τους καρπούς παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα ολικής πολυφαινόλης, ενώ κατά την ωρίμανση τους καταγράφηκε αύξηση της συγκέντρωσης ανθοκυανίνης. Επίσης, έχει πραγματοποιηθεί μελέτη με στόχο τον προσδιορισμό του μεταβολικού περιεχομένου διαφορετικών ιστών της ποικιλίας Leccino, κατά την οποία αναγνωρίστηκαν 226 διαφορετικοί μεταβολίτες από τρεις διαφορετικούς ιστούς, 76 εκ των οποίων επιβεβαιώθηκαν (Guodong et al., 2017). Οι μεταβολίτες αυτοί φάνηκε να συμμετέχουν σε μονοπάτια πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού.

Επιπρόσθετα, η μέθοδος έχει εφαρμοστεί και στην καλλιέργεια της λεμονιάς (*Citrus limon*) (Freitas et al., 2015), με στόχο να εκτιμηθούν οι μεταβολικές διαφορές μεταξύ ασυμπτωματικών και συμπτωματικών ιστών προσβεβλημένων από τη βακτηριολογική ασθένεια του πρασινίσματος (citrus greening disease). Για το σκοπό αυτό, ελήφθησαν εκχυλίσματα δειγμάτων φύλλων και ριζών και υποβλήθηκαν σε ανάλυση με εφαρμογή πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και χημειομετρία. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα φύλλα των δέντρων που παρουσίασαν συμπτώματα είχαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε σακχαρόζη και χαμηλότερη στους μεταβολίτες προλίνη, βεταΐνη και μηλικό, ενώ στις ρίζες δεν παρατηρήθηκαν διαφορές.

1.6.2. Εφαρμογή της μεταβολομικής στην χημειοταξινόμηση μυκήτων

Τις προηγούμενες δεκαετίες, η ταξινόμηση των μυκήτων βασιζόταν κατά κύριο λόγο στο φαινότυπο (Guarro et al., 1999) και περιελάμβανε συγκριτικές μελέτες των μορφολογικών χαρακτηριστικών, της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, του κυτταρικού μεταβολισμού κ.α. (Zabek et al., 2017). Με την πάροδο των χρόνων, η μέθοδος αυτή συνέχισε να χρησιμοποιείται στην περιγραφή των μυκήτων, παρόλο που υστερούσε σε αντικειμενικότητα σε σχέση μία αλληλουχία DNA (Hibbett and Donoghue, 1998, Taylor et al., 2000, Prillinger et al., 2002). Εν τούτοις, μέχρι σήμερα, δεν έχουν περιγραφεί είδη μυκήτων μόνο με βάση την αλληλουχία τους, ενώ είδη που ανακαλύπτονται με αλληλουχίσεις, συνδέονται πάντα με διακριτά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, ώστε να περιγραφούν επίσημα (Aoki et al., 1963, Nirenberg and O'Donnell, 1998).

Η ανάπτυξη μεθόδων αναλυτικής και μοριακής βιολογίας και η εξέλιξη των αναλυτικών οργάνων που έχουν επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια, έχουν οδηγήσει σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών προσεγγίσεων στην χημειοταξινόμηση ή χημειοσυστηματική, δηλαδή στην ταυτοποίηση και ταξινόμηση οργανισμών (π.χ. μύκητες και βακτήρια), με βάση επιβεβαιωμένες ομοιότητες και διαφορές στη βιοχημική σύνθεσή τους (Hao et al., 2012). Αποκορύφωμα των εξελίξεων αυτών αποτελεί η μεταβολομική ανάλυση (Reynolds, 2007) η οποία επιτρέπει την ταυτοποίηση και ταξινόμηση των μυκήτων με βάση την ποικιλομορφία των μεταβολιτών τους (Smedsgaard and Nielsen, 2005).

Ειδικότερα, με την εφαρμογή της μεθόδου προσδιορίζεται το μεταβολικό προφίλ των μυκήτων, το οποίο αποτελείται από το ενδο-μεταβόλωμα, που είναι το άθροισμα των ενδοκυττάρων πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών, και το εξω-μεταβόλωμα, το οποίο αντιπροσωπεύει τους μεταβολίτες που παράγονται από τον οργανισμό και αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον (Aliferis et al., 2013).

Ουσιαστικά, λοιπόν, γίνονται προσπάθειες και έχει πραγματοποιηθεί πρόοδος στην ταξινόμηση των μυκήτων αφενός με βάση λειτουργικά χαρακτηριστικά όπως η μικρομορφολογία, η οποία καλύπτει τις φυσικές και μηχανικές ιδιότητες και αφετέρου με βάση το εξω-μεταβόλωμα, δηλαδή το πλήρες φάσμα των δευτερογενών μεταβολιτών (Frisvad and Samson, 2004, Thrane et al., 2007).

Ειδικότερα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν χημικές ενώσεις χαμηλής μοριακής μάζας οι οποίες συμμετέχουν σε μια σειρά κυτταρικών διεργασιών όπως

η μεταγραφή, η ανάπτυξη και η διακυτταρική επικοινωνία (Brakhage, 2013). Αρκετά παραδείγματα επιτυχούς χρήσης των ενώσεων αυτών στην χημειοταξινόμηση των μυκήτων έχουν καταγραφεί. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται βασικά είδη ασκομυκήτων όπως τα *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium* και ορισμένα γένη βασιδιομυκήτων (Frisvad and Samson, 1990, Andersen et al., 2008, Frisvad et al., 2008).

1.6.3. Αναλυτικές τεχνικές και βιοπληροφορική ανάλυση

Η μεταβολομική ανάλυση βασίζεται αφενός στην χρήση σύγχρονων αναλυτικών οργάνων για την ανάλυση μεταβολικών προφίλ και την ανίχνευση-ταυτοποίηση μεταβολιτών και αφετέρου στην χρήση λογισμικού βιοπληροφορικής για την επεξεργασία των δεδομένων, ώστε να ανακαλυφθούν μεταβολίτες-βιοσημαντές (biomarkers) (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται δύο συμπληρωματικές προσεγγίσεις, το μεταβολικό προφίλ (metabolic profiling) και το μεταβολικό αποτύπωμα (metabolic fingerprinting) (Dettmer and Hammock, 2004, Dettmer et al., 2007).

Η προσέγγιση του μεταβολικού αποτυπώματος αφορά στην ταχεία ταξινόμηση αναλυόμενων δειγμάτων, ανάλογα με τη βιολογική τους προέλευση (Fiehn, 2001), με σκοπό την ανάπτυξη μιας υψηλής απόδοσης τεχνικής προσδιορισμού (high-throughput technique) της μεταβολικής σύστασής τους σε μία δεδομένη χρονική στιγμή. Στην προσέγγιση αυτή, ανιχνεύονται όλοι οι μεταβολίτες, χωρίς να πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση ή αναγνώρισή τους (Johnson et al., 2003). Ουσιαστικά, βασίζεται στη σύγκριση των αποτυπωμάτων (fingerprints) των μεταβολιτών που επηρεάζονται από μία ασθένεια, έκθεση σε τοξίνες, ή τροποποιήσεις / αλλοιώσεις περιβαλλοντικών / γενετικών παραγόντων (Dettmer and Hammock, 2004). Επομένως, γίνεται μια πρώτη προσέγγιση, συγκριτικά χαμηλότερου κόστους σε σχέση με αυτή του μεταβολικού προφίλ (η οποία είναι πιο δαπανηρή) (Allwood et al., 2008). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται φασματοσκοπικές τεχνικές όπως πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR), υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-R), Raman και ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionisation, ESI).

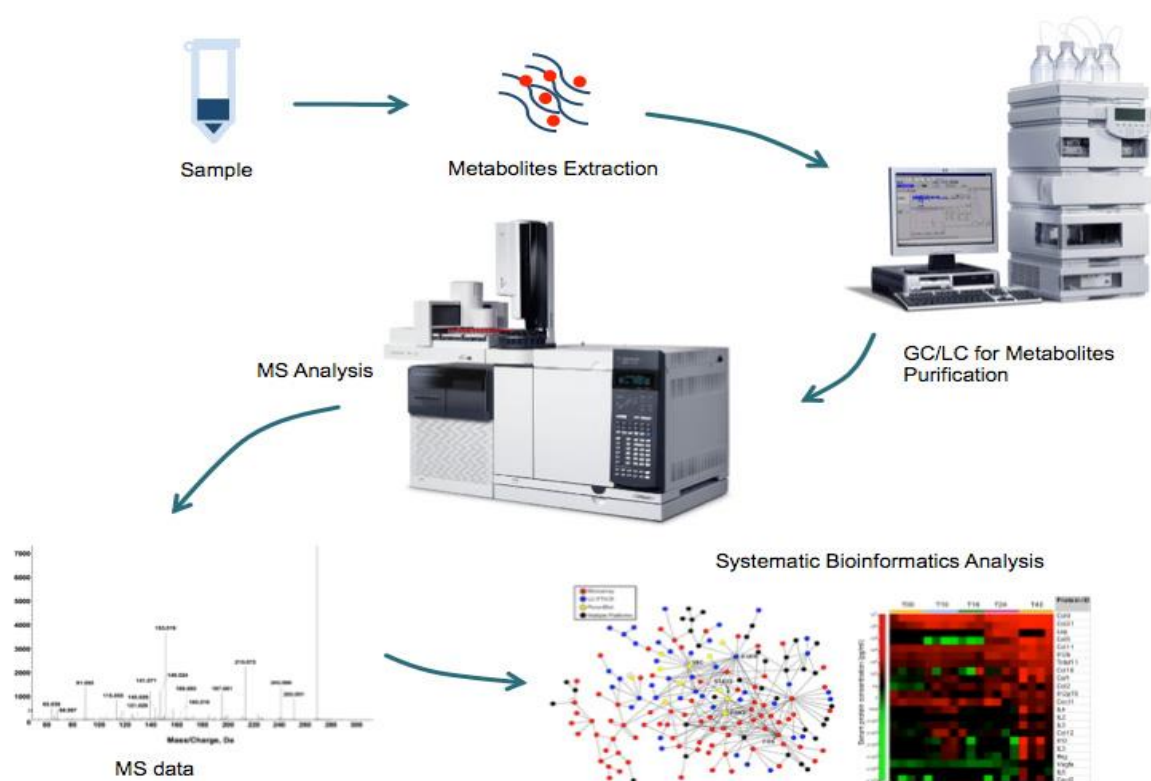
Αντίθετα, η προσέγγιση του μεταβολικού προφίλ εστιάζει στην ανάλυση μίας ομάδας μεταβολιτών ενός δείγματος / εκχυλίσματος που σχετίζονται είτε με ένα συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι είτε με μία κατηγορία ενώσεων (π.χ. αμινοξέα) και περιλαμβάνει την ανίχνευση, τον ποσοτικό προσδιορισμό και, σε ορισμένες περιπτώσεις, την ταυτοποίηση μεταβολιτών. Η ταυτοποίηση πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση χρωματογραφικού διαχωρισμού, δηλαδή αέριας (Gas Chromatography, GC) ή υγρής (Liquid Chromatography, LC) χρωματογραφίας, σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) (Allwood et al., 2008).

Η τεχνική GC/MS τυγχάνει ευρύτερης εφαρμογής στις αναλύσεις μεταβολομικής καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και ανίχνευση μεταβολιτών σε μικρές συγκεντρώσεις (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011), λόγω του ότι στην αέρια φάση επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των ενώσεων, ενώ υπερέχει από άλλες τεχνικές λόγω του συγκριτικά χαμηλότερου κόστους αγοράς, λειτουργίας και συντήρησης και της φιλικότητάς της προς τον χρήστη (Kanani et al., 2008).

Για την κατανόηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης, είναι απαραίτητη η χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής και εξόρυξης δεδομένων για αυτοματοποιημένη επεξεργασία (Shulaev et al., 2008). Για το σκοπό αυτό, έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός βάσεων δεδομένων όπως η NIST ChemWebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>), η BioCyc (<http://biocyc.org/>) και η PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), οι οποίες είναι ελεύθερα προσβάσιμες στο διαδίκτυο. Οι βάσεις αυτές, με την χρήση κατάλληλου λογισμικού, όπως το Amdis (<http://www.amdis.net>), επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάλυση τεράστιων όγκων δεδομένων GC/MS μεταβολομικής ανάλυσης (Wishart, 2016).

Επιπρόσθετα, προκειμένου να γίνει ευκολότερη η στατιστική ερμηνεία των δεδομένων (μείωση αριθμού μεταβλητών), εφαρμόζεται πολυπαραγοντική ανάλυση κατά την οποία η μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS) περιγράφει τη γραμμική σχέση μεταξύ των προγνωστικών μεταβλητών X και των μεταβλητών Y , μέσω μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης (Wiklund et al., 2008). Εφαρμόζεται, ακόμα, η μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων-διακριτικής ανάλυσης (Partial Least Squares-Discriminant Analysis, PLS-DA) με μια περιστροφή της προβολής, με σκοπό την ανακάλυψη των

μεταβλητών που συμβάλλουν στο διαχωρισμό και ομαδοποίηση των δειγμάτων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Τέλος, γίνεται χρήση της μεθόδου OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis, OPLS-DA), η οποία αποτελεί επέκταση της PLS-DA, με στόχο την αναγνώριση και αφαίρεση της διακύμανσης των μεταβλητών X που είναι κάθετη προς τις προγνωστικές μεταβλητές Y . Από την ανάλυση προκύπτουν τρεις παράμετροι, ο συντελεστής συσχέτισης R^2X και R^2Y και η προγνωστική ικανότητα Q^2 , οι οποίες δείχνουν την ευρωστία (robustness) του μοντέλου (Wiklund et al., 2008). Στην **(Εικόνα 12)**, παρουσιάζονται σχηματικά τα επιμέρους στάδια της μεταβολομικής ανάλυσης.



Εικόνα 12 Σχηματική απεικόνιση των επιμέρους πειραματικών σταδίων της μεταβολομικής ανάλυσης
(πηγή: <https://www.creative-proteomics.com/services/targeted-metabolomics.htm>)

Κεφάλαιο 2: Σκοπός της μελέτης

Σημαντικές απώλειες της ελαιοπαραγωγής από προσβολές γλοιοσπορίου παρατηρούνται τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα από το 2016 και έπειτα, σε μεγάλο μέρος των ελαιώνων της χώρας. Η ασθένεια ευθύνεται για την ποιοτική υποβάθμιση των κύριων προϊόντων της καλλιέργειας, του ελαιολάδου και της επιτραπέζιας ελιάς. Σε προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γ.Π.Α. καταγράφηκαν διαφορετικοί μορφότυποι του παθογόνου αιτίου *Colletotrichum* spp. στους ελαιώνες των Π.Ε. Λακωνίας και Μεσσηνίας, από τους οποίους πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες προσβεβλημένων καρπών. Στο πλαίσιο αυτό, αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η μελέτη μορφολογικών χαρακτηριστικών μορφοτύπων του γλοιοσπορίου και η μεταβολομική ανάλυσή τους με σκοπό την ανακάλυψη μεταβολίτων-βιοσημαντών οι οποίοι πιθανόν να σχετίζονται με την παθογένεια, τη μολυσματικότητα και την ανθεκτικότητα/ευαισθησία των μορφοτύπων σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα. Επιπρόσθετα, στα πλαίσια της διερεύνησης της χρήσης βιοδιεγερτών επικουρικά με εγκεκριμένα Φ.Π., αξιολογήθηκε *in planta* η αποτελεσματικότητα και ο Μ.Δ. εμπορικών σκευασμάτων βιοδιεγερτών με εφαρμογή μεταβολομικής. Απώτερο σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ανάπτυξη ενός ολοκληρωμένου προγράμματος/στρατηγικής φυτοπροστασίας έναντι του γλοιοσπορίου με στοιχεία από προηγμένες αναλύσεις μεταβολομικής.

Κεφάλαιο 3: Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Χημικά και αντιδραστήρια

Για τη μοριακή ταυτοποίηση στελεχών του γλοιοσπορίου, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές (primers) εξειδικευμένοι για τα είδη *C. acutatum* και *C. gloeosporioides* (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) (**Πίνακας 8**). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K 1081), Gene Ruler 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.) καθώς και Liquid RNase A (Macherey-Nagel, Duren, Germany).

Για την εκχύλιση μεταβολιτών του ενδο-μεταβολώματος του μύκητα *Colletotrichum acutatum* και μεταβολιτών των φύλλων της ελιάς (*O. europaea* L. var. Koroneiki) χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες οξικός αιθυλεστέρας και μεθανόλη 50:50 v/v (GC/MS grade, καθαρότητας 99.9%, Carlo Erba Reagents, val de Reuil, France). Για την προετοιμασία των δειγμάτων για GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε πυριδίνη (99.8%), υδροχλωρική μεθοξυλαμίνη (methoxylamine hydrochloride, MeOX) (98% w/w) και N-methyl-N-(trimethyl-silyl) trifluoroacetamide (MSTFA) (Sigma-Aldrich Ltd, Steinheim, Germany). Αναλυτικά πρότυπα επιλεγμένων μεταβολιτών του μύκητα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την απόλυτη ταυτοποίηση, ήταν επίσης της ίδιας εταιρείας.

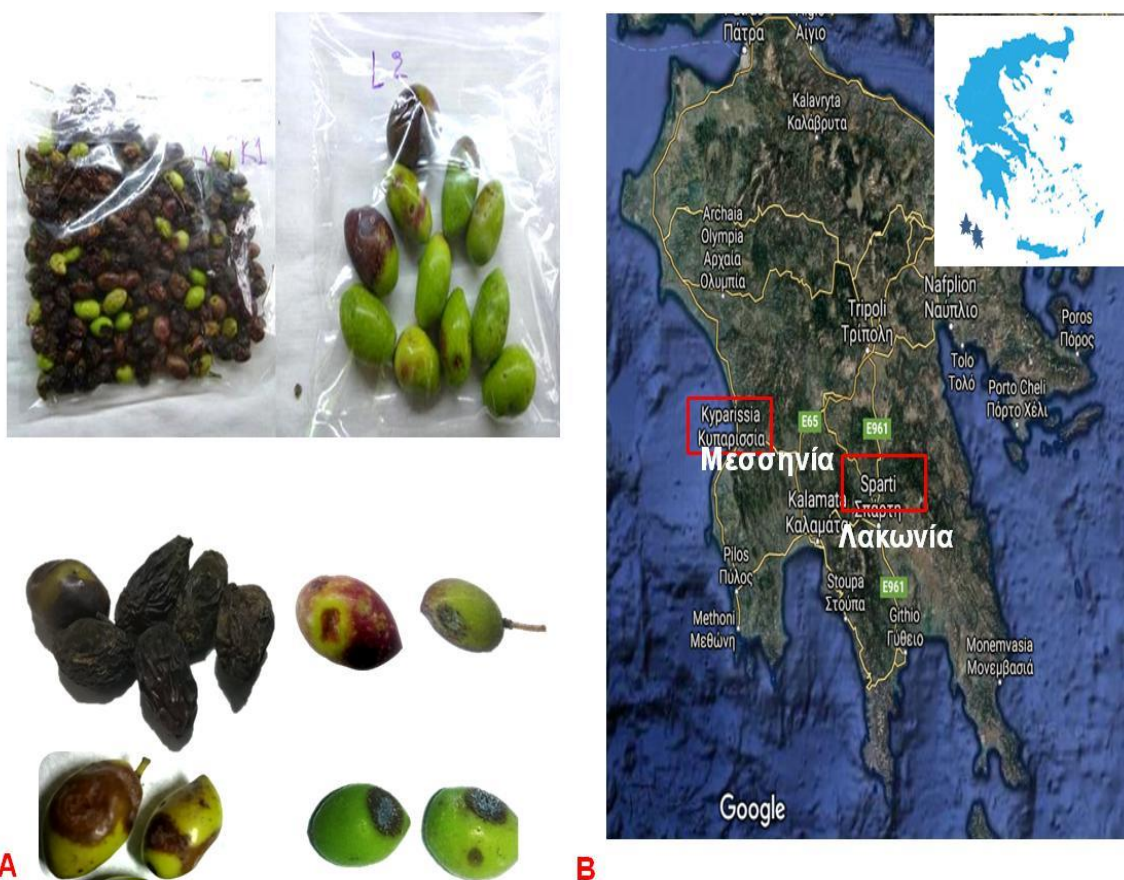
Πίνακας 8 Εκκινητές εξειδικευμένοι για τα είδη *C. gloeosporioides* και *C. acutatum*

Είδος	Εκκινητής
<i>C. acutatum</i>	TBCA (5'-CGGAGGCCTGGTTGGGTGAG-3') CaInt2 (5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3')
<i>C. gloeosporioides</i>	TBCG (5'-CGGAAGCCTGGGTAGGAGCG-3') CgInt (GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG)
<i>C. gloeosporioides</i> & <i>C. acutatum</i>	TB5 (5'-GGTAACCAGATTGGTGCTGCCTT-3') ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5')

3.2. Βιολογικό Υλικό

3.2.1. Στελέχη του *Colletotrichum* spp. που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα

Στα πειράματα μελετήθηκαν απομονώσεις στελεχών του μύκητα *Colletotrichum* spp από δείγματα προσβεβλημένων ελαιοκάρπων. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν κατά τις ελαιοκομικές περιόδους 2016-'17 και 2017-'18 σε ελαιώνες του Δήμου Τριφυλίας (Π.Ε. Μεσσηνίας) και του Δήμου Ανατολικής Μάνης (Π.Ε. Λακωνίας) (**Εικόνα 13**) και η περαιτέρω μελέτη τους λάμβανε χώρα στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του ΓΠΑ (Κολαϊνής et al., 2017, Κολαϊνής et al., 2018). Επίσης, για την αξιολόγηση του πρωτοκόλλου μοριακής ταυτοποίησης χρησιμοποιήθηκε στέλεχος του *C. gloeosporioides*, το οποίο παραχωρήθηκε ευγενικά από τον Καθηγητή Δ. Τσιτσιγιάννη (Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ).

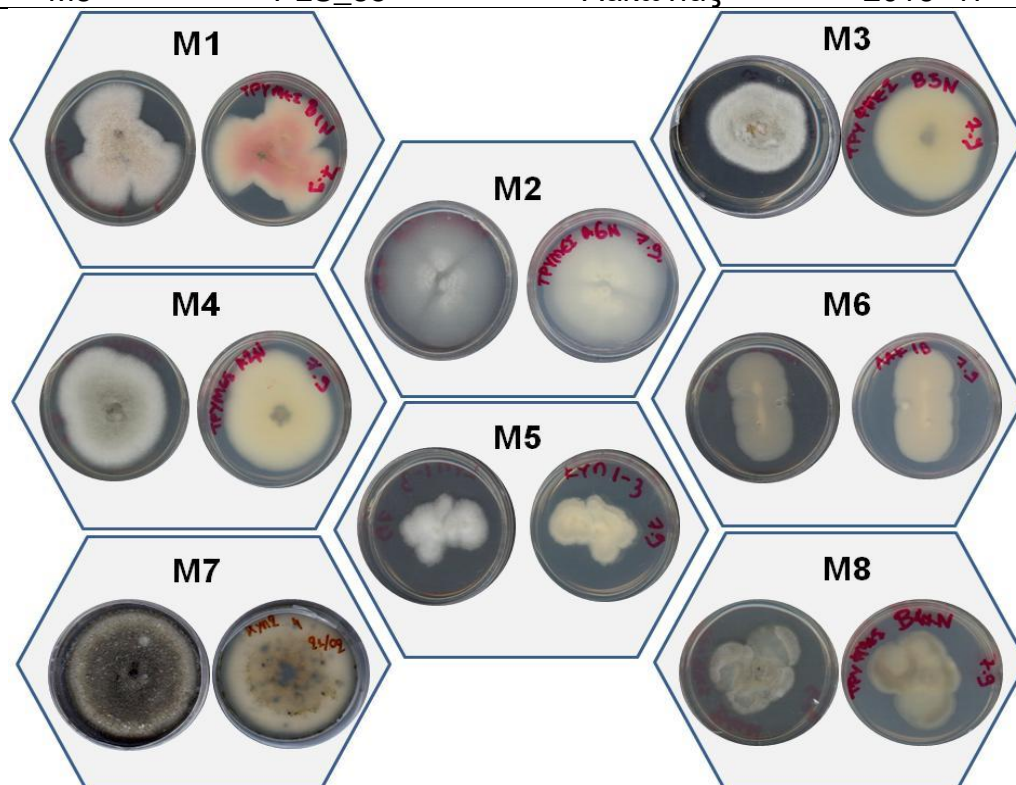


Εικόνα 13 Δείγματα προσβεβλημένων ελαιοκάρπων από τους οποίους πραγματοποιήθηκε απομόνωση παθογόνων (A) και οι αντίστοιχες περιοχές δειγματοληψίας τους (B).

Στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκαν για περαιτέρω έρευνα ορισμένες από τις απομονώσεις στελεχών που πραγματοποιήθηκαν και συγκεκριμένα οι PLS_82 (M5), PLS_88 (M2), PLS_90 (M1), PLS_91 (M4), PLS_111 (M1), PLS_85 (M8), PLS_92 (M3) και PLS_93 (M4) (**Πίνακας 9**). Τα στελέχη καλλιεργούνταν σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) με 15 mL PDA (Potato Dextrose Agar) θρεπτικό υπόστρωμα για την παρασκευή του οποίου χρησιμοποιήθηκαν 39 gr σκόνης PDA (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France), 5 gr σκόνης άγαρ (Acumedia/Neogen, Lansing, Michigan, U.S.A.) και 1 L απιονισμένο νερό (**Εικόνα 14**). Η επώαση γινόταν σε ειδικό επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ στο σκοτάδι. Σε τακτικά διαστήματα (15 ημέρες) πραγματοποιούνταν ανανέωσή τους με τη μεταφορά μυκηλιακού δίσκου (διαμέτρου 4 mm) από την περιφέρεια της καλλιέργειας σε καινούριο υπόστρωμα. Η μακροχρόνια διατήρηση τους γινόταν υπό τη μορφή δίσκων (διαμέτρου 4 mm) σε διάλυμα 20% γλυκερόλης στους -80°C . Για τα πειράματα, όλα τα υλικά αποστειρώνονταν, αρχικά, σε κλίβανο υγρής θερμότητας (Tuttnauer Autoclave-Steam Steril) θερμοκρασίας 121°C για 25 min. Όλοι οι μετέπειτα χειρισμοί πραγματοποιούνταν σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (Laminar).

Πίνακας 9 Στελέχη του σύμπλοκου είδους *Colletotrichum acutatum* όπως διαχωρίστηκαν σε μορφότυπους (M) καθώς και η περιοχή και το έτος δειγματοληψίας των προσβεβλημένων καρπών ελιάς από τους οποίους απομονώθηκαν

Μορφότυπος (M)	Στέλεχος	Π.Ε. δειγματοληψίας	Έτος δειγματοληψίας
M1	PLS_86	Λακωνίας	2016-‘17
	PLS_90	Λακωνίας	2016-‘17
	PLS_111	Λακωνίας	2017-‘18
M2	PLS_87	Λακωνίας	2016-‘17
	PLS_88	Μεσσηνίας	2016-‘17
M3	PLS_92	Λακωνίας	2016-‘17
	PLS_109	Μεσσηνίας	2017-‘18
	PLS_112	Μεσσηνίας	2017-‘18
M4	PLS_84	Λακωνίας	2016-‘17
	PLS_91	Μεσσηνίας	2016-‘17
	PLS_93	Μεσσηνίας	2017-‘18
	PLS_110	Μεσσηνίας	2017-‘18
M5	PLS_82	Λακωνίας	2016-‘17
M6	PLS_81	Μεσσηνίας	2016-‘17
M7	PLS_83	Μεσσηνίας	2016-‘17
	PLS_102	Λακωνίας	2017-‘18
M8	PLS_85	Λακωνίας	2016-‘17



Εικόνα 14 Καθαρές καλλιέργειες των στελεχών PLS_82 (M5), PLS_88 (M2), PLS_90 (M1), PLS_91 (M4), PLS_111 (M1), PLS_85 (M8), PLS_92 (M3) και PLS_93 (M4) του σύμπλοκου είδους *Colletotrichum acutatum*.

3.2.2. Δενδρύλλια ελιάς (*Olea europaea* L.)

Για την αξιολόγηση της δράσης των σκευασμάτων βιοδιεγερτών Olivo Plus και Proact, χρησιμοποιήθηκαν δενδρύλλια της ποικιλίας Κορωνέικη (*O. europaea* L. var. Koroneiki) ηλικίας ενός έτους και ύψους 100 εκ. (**Εικόνα 15**), τα οποία ήταν ευγενική χορηγία των φυτωρίων ΚΩΣΤΕΛΕΝΟΣ (Πόρος, Τροιζηνία). Τα δενδρύλλια διατηρούνταν σε θερμοκήπιο (θερμοκρασία $22 \pm 2^\circ\text{C}$, φωτοπερίοδος 14 h) και ποτίζονταν σε τακτικά διαστήματα 3 ημερών με 100 mL νερό.



Εικόνα 15 Δενδρύλλια ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα

3.3. Εμπορικά σκευάσματα βιοδιεγερτών ανάπτυξης των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα

Στις *in planta* βιοδοκιμές με βιοδιεγέρτες ανάπτυξης των φυτών χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά σκευάσματα Olivo Plus (ΕΛΛΑΓΡΕΤ Α.Β.Ε.Ε.) και ProAct (Κ&Ν ΕΥΘΥΜΙΑΔΗ Α.Β.Ε.Ε.), τα οποία ήταν ευγενική χορηγία των εταιρειών. Η σύστασή των σκευασμάτων παρουσιάζεται στους **Πίνακες 10 και 11**.

Το Olivo Plus αποτελεί ένα υγρό μείγμα με θρεπτικά ιχνοστοιχεία το οποίο εφαρμόζεται διαφυλλικά και είναι εγκεκριμένο αποκλειστικά στην καλλιέργεια της ελιάς (επιτραπέζιες και ελαιοποιήσιμες ποικιλίες). Ως φυσικός ενεργοποιητής, συμβάλλει στην ευρωστία και τη βελτίωση της παραγωγικότητας του φυτού, καθώς

ενισχύει την αντοχή του στις καταπονήσεις. Παράλληλα, παρέχει στο φυτό ισορροπημένη θρέψη.

Αντίθετα, το ProAct, πέρα από την ελιά, εφαρμόζεται και σε οπωροφόρα δέντρα, φυτά μεγάλης καλλιέργειας και κηπευτικά. Διατίθεται σε μορφή βρέξιμων εναιωρηματοποιήσιμων κόκκων και προορίζεται για ψεκασμούς πλήρους κάλυψης φυλλώματος. Πρόκειται για ένα φυσικό βιοδιεγέρτη της ανάπτυξης των φυτών το οποίο περιέχει την πρωτεΐνη 2^{ης} γενιάς "χαρπίνη αβ". Η ουσία αυτή ενεργοποιεί τις φυσικές διεργασίες για την ανάπτυξη των φυτικών πρωτεϊνών (harpinN, harpinW, ropA και harpinZ) από τα ίδια τα φυτά. Η δράση του σκευάσματος σχετίζεται με λειτουργίες όπως η ενεργοποίηση της φυσικής ανάπτυξης των φυτών (αύξηση βιομάζας), η αυξημένη αναπαραγωγική ικανότητα (αύξηση ανθοφορίας και καρπόδεσης) και η βελτίωση φυσικών μηχανισμών αντιμετώπισης βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων, ενώ παράλληλα συμβάλλει στην αναβάθμιση της ποιότητας και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των καρπών.

Πίνακας 10 Σύσταση εμπορικού σκευάσματος ProAct

Συστατικό	Περιεκτικότητα (%)
Πρωτεΐνες (Harpin αβ)	1,00
Βοηθητικές ουσίες	99,00

Πίνακας 11 Σύσταση εμπορικού σκευάσματος Olivo Plus

Συστατικό	Περιεκτικότητα (%)
Άζωτο (N) ολικό	5,00
Θείο (SO₃), υδατοδιαλυτό	3,50
Βόριο (B),υδατοδιαλυτό	1,20
Μαγγάνιο (Mn), υδατοδιαλυτό	1,00
Μολυβδαίνιο (Mo), υδατοδιαλυτό	0,10
Μαγνήσιο (MgO), υδατοδιαλυτό	1,50
Ψευδάργυρος (Zn), υδατοδιαλυτός	0,50

3.4. Μοριακή ταυτοποίηση απομονωμένων στελεχών του μύκητα *Colletotrichum* spp.

Για στελέχη τα οποία είχαν δυνητικά ταυτοποιηθεί ως *Colletotrichum* spp., πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τη μοριακή τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών για τα είδη *C. acutatum* (forward: TBCA-TB5 και reverse: Calnt2-ITS4) και *C. gloeosporioides* (forward: TBCB-TB5 και reverse: Cglnt-ITS4) (Πίνακας 12) (Talhinhas et al., 2005).

Συγκεκριμένα, σε αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν με χρήση του εκκινητή Calnt2 (σε συνδυασμό με τον ITS4 από μία συντηρημένη αλληλουχία του rDNA) για ένα μεγάλο αριθμό απομονώσεων διαφόρων ειδών του *Colletotrichum* spp., προέκυψε ενίσχυση των επιθυμητών αλληλουχιών (στα 490 basepairs, bp) μόνο για τα στελέχη του *C. acutatum*. Έκτοτε, ο Calnt2, ο οποίος στοχεύει στην ενδομεταγραφόμενη περιοχή (internal transcribed spacer, ITS) του ριβοσωμικού DNA (nrDNA) του *C. acutatum*, θεωρείται εξειδικευμένος για το είδος (Sreenivasaprasad et al., 1996). Αντίστοιχα, σε αντιδράσεις PCR με χρήση του Cglnt σε συνδυασμό με τον ITS4 για απομονώσεις *Colletotrichum* spp., παρατηρήθηκε ενίσχυση των επιθυμητών αλληλουχιών (στα 450bp) μόνο από στελέχη του *C. gloeosporioides*. Επομένως, ο Cglnt, ο οποίος στοχεύει στην ITS1 περιοχή του nrDNA του *C. gloeosporioides*, χαρακτηρίστηκε εξειδικευμένος για το είδος (Mills et al., 1992). Τέλος, με βάση την αλληλουχία νουκλεοτιδίων μίας μεταβλητής περιοχής εντός του γονιδίου της τουμπουλίνης (β -tubulin 2) και έπειτα από αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν για είδη του *Colletotrichum* spp., προέκυψαν οι εξειδικευμένοι εκκινητές TBCA και TBCG για τα *C. acutatum* και *C. gloeosporioides*, αντίστοιχα (Talhinhas et al., 2002).

Πίνακας 12 Ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών για τα είδη *Colletotrichum acutatum* και *Colletotrichum gloeosporioides* τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην ανίχνευση στελεχών του γλοιοσπορίου (Talhinhas et al., 2005)

Γονίδιο- Στόχος	Εκκινητές-Αλληλουχία εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος (bp)
β-tubulin 2	<i>Colletotrichum acutatum</i>	
Forward	TBCA (5'-CGGAGGCCTGGTTGGGTGAG-3')	
Reverse	TB5 (5'-GGTAACCAGATTGGTGCTGCCTT-3')	300
β-tubulin 2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	
Forward	TBCG (5'-CGGAAGCCTGGGTAGGAGCG 3')	
Reverse	TB5 (5'-GGTAACCAGATTGGTGCTGCCTT-3')	300
ITS region	<i>Colletotrichum acutatum</i>	
Forward	CaInt 2 (5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3')	
Reverse	ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5')	500
ITS region	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	
Forward	CgInt (GGCCTCCC GCCTCCGGGCGG)	500
Reverse	ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5')	

3.4.1. Προετοιμασία στελεχών για εξαγωγή DNA

Νέες καλλιέργειες των υπό μελέτη στελεχών δημιουργούνταν με μεταφορά υλικού από τους -80°C σε θρεπτικό υλικό PDA και επώαση σε θερμοκρασία 22 ± 1°C στο σκοτάδι, για 7 ημέρες. Η εξαγωγή DNA βασίστηκε σε προηγούμενο πρωτόκολλο (Lockington et al., 1985), το οποίο εφαρμόστηκε μερικώς τροποποιημένο. Αρχικά, συλλέχθηκε μυκήλιο από την καλλιέργεια κάθε στελέχους και τοποθετήθηκε σε σωληνάριο (tube) τύπου Eppendorf (2 mL). Ακολούθησε λυοφιλίωση των δειγμάτων για 24 h, θρυμματισμός του μυκηλίου και προσθήκη 700 µL διαλύματος εξαγωγής DNA (DNA-extraction buffer), το οποίο αποτελούνταν από 200 mM Tris-HCl (pH=8), 1% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (pH=8) και H₂O. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έντονη ανάμειξη (vortex) για ομογενοποίηση και τοποθέτηση των Eppendorf tubes προς επώαση για 20 min σε πάγο. Ακολούθησε προσθήκη 700 µL μείγματος φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5

min (12.000 στροφές ·min⁻¹) σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο και προστέθηκαν οξικό οξύ (CH₃COONa) και ισοπροπανόλη όγκου ίσου με το 1/10 του όγκου του δείγματος και ακολούθησε ελαφριά ανάμειξη για 10 sec και φυγοκέντρηση σε για 5 min (12.000 στροφές ·min⁻¹) σε θερμοκρασία 4°C. Αφαιρέθηκε εκ νέου το υπερκείμενο, προστέθηκαν 500 µL αιθυλικής αλκοόλης (EtOH) 70% και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 2 min (12.000 στροφές ·min⁻¹). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε στέγνωμα του ιζήματος που προέκυψε και αναδιάλυση σε 25 µL διπλά απεσταγμένου νερού (double distilled water, ddH₂O). Τέλος, στα δείγματα προστέθηκαν 2 µL RNase 10 mM, πραγματοποιήθηκε ανάδευση και τοποθετήθηκαν για 30 min σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C.

3.4.2. Μέτρηση της συγκέντρωσης DNA

Μετά την απομόνωση του ολικού DNA από τα στελέχη του γλοιοσπορίου, εκτιμήθηκε, με την χρήση του φασματοφωτόμετρου Nanodrop ND-2000C (Thermo Scientific), η συγκέντρωση και η ποιότητα κάθε δείγματος. Με βάση την απορρόφηση στα 260 nm εκτιμάται η συγκέντρωση του DNA και με βάση την απορρόφηση στα 280 nm οι δευτερεύουσες ουσίες οι οποίες απομονώθηκαν μαζί με το DNA, όπως οι πρωτεΐνες. Η καθαρότητα του δείγματος DNA από τις πρωτεΐνες προκύπτει από το λόγο 260 nm/280 nm, ο οποίος αναμένεται να έχει τιμή περίπου ίση με 2. Στη συνέχεια, τα δείγματα DNA αραιώθηκαν με νερό διπλά απεσταγμένο και αποστειρωμένο, μέχρι τελικής συγκέντρωσης 50 ng mL⁻¹.

3.4.3. Ταυτοποίηση στελεχών σύμφωνα με την ενίσχυση συντηρημένων γονιδίων με εξειδικευμένους εκκινητές για τα είδη *Colletotrichum acutatum* και *Colletotrichum gloeosporioides*

Η ενίσχυση τμημάτων των συντηρημένων γονιδίων (ITS και β-tubulin 2) με αντίστοιχους εκκινητές, πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις PCR σε θερμικό κυκλοποιητή Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Κάθε αντίδραση περιείχε τα εξής συστατικά (Master Mix) :

- Διπλά απεσταγμένο νερό (ddH₂O)
- PCR buffer
- MgCl₂ 3 mM

-
- Διάλυμα νουκλεοτιδίων (dNTPs) 1 mM
 - Primer forward 0,6 pmol·μL⁻¹
 - Primer reversed 0,6 pmol·μL⁻¹
 - DreamTaq Green PCR 2X (DNA Πολυμεράση)
 - DNA

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή των αντιδραστηρίων (Thermo Fisher Scientific) με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο:

- i. 4 min στους 95°C (αρχική αποδιάταξη του DNA)
- ii. 30 sec στους 95°C (αποδιάταξη του DNA)
- iii. 30 sec στους 62°C (υβριδισμός των εκκινητών)
- iv. 30 sec στους 72°C (επιμήκυνση των εκκινητών)
- v. 35 x τα στάδια ii, iii, iv
- vi. 8 °C επ' αόριστον.

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης, παρασκευάστηκε πηκτική (gel) αγαρόζης 1% w/v (1 gr άγαρ/100 mL ρυθμιστικού διαλύματος TAE buffer), το οποίο τοποθετήθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο. Στις θέσεις υποδοχής του gel, τοποθετήθηκαν 10 μL από κάθε δείγμα και 10 μL μάρτυρα μοριακών μεγεθών (Gene ruler 1 kb DNA ladder), καθώς και ίδιος όγκος Master Mix χωρίς την προσθήκη του DNA-στόχου (αρνητικός μάρτυρας, negative control ή blank). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση για 40-45 min με εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης 100 Volt και έπειτα, χρώση του gel αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο για 15 min για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων. Τέλος, το gel σαρώθηκε με την χρήση του λογισμικού LumiBIS 1.4 (DNR Bio-Imaging Systems Ltd, Neve Yamin, Israel).

3.5. Μεταβολομική ανάλυση επιλεγμένων μορφοτύπων του σύμπλοκου είδους *Colletotrichum acutatum*

3.5.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη PLS_82 (M5), PLS_88 (M2), PLS_90 (M1), PLS_91 (M4), PLS_111 (M1), PLS_85 (M8), PLS_92 (M3) και PLS_93 (M4) του *Colletotrichum acutatum*, τα οποία διατηρούνταν όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.1. Για την έναρξη νέων καλλιεργειών, ως μόλυσμα χρησιμοποιήθηκε μυκηλιακός δίσκος διαμέτρου 4 mm ο οποίος λαμβανόταν με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα. Πριν τη μόλυνση των καλλιεργειών, τοποθετήθηκε στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού (PDA) αποστειρωμένη μεμβράνη σελοφάν (500PUT, Futamura Inc., Atlanta, GA, U.S.A.), προκειμένου να διαχωριστούν οι υφές από το θρεπτικό υλικό και να είναι δυνατή η διάκριση ενδο-μεταβολώματος και έξω-μεταβολώματος. Οι μεμβράνες είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως με απεσταγμένο νερό. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 15 βιολογικές επαναλήψεις (replications) ανά στέλεχος, οι οποίες συγκεντρώθηκαν τελικά σε ομάδες των 3, οπότε προέκυψαν 5 συνδυασμένα (pooled) δείγματα. Επιπρόσθετα, υποπολλαπλάσια τμήματα κάθε βιολογικής επανάληψης συνδυάστηκαν για να ληφθούν δείγματα ελέγχου ποιότητας (Quality Control, QC).

3.5.2. Συλλογή μυκηλίου και προετοιμασία των δειγμάτων για GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε 7 ημέρες μετά τις επεμβάσεις. Ειδικότερα, συλλέχθηκε αρχικά μυκήλιο από τις καλλιέργειες κάθε στελέχους με τη βοήθεια σπάτουλας σε σωληνάρια τύπου Eppendorf (2 mL) τα οποία αμέσως εμβαπτίστηκαν σε υγρό άζωτο (N₂) για τη διακοπή του μεταβολισμού (quenching) (Lisec et al., 2006). Στη συνέχεια, τα δείγματα κονιορτοποιήθηκαν σε πορσελάνινο γουδί με γουδοχέρι (CoorsTek, Inc, Colorado, U.S.A.) με την χρήση υγρού αζώτου και ζυγίστηκε ποσότητα υφών (40 mg νωπού βάρους) σε γυάλινα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη (glass auto sampler vial, Macherey-Nagel) των 2 mL, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα αποθηκεύτηκε στους -80°C.

Ακολούθησε η εκχύλιση των δειγμάτων με προσθήκη μείγματος μεθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (50:50, v/v) (0,5 mL/δείγμα) (Aliferis and Jabaji, 2011, Aliferis and Jabaji, 2012, Aliferis et al., 2013, Kalampokis et al., 2018, Karamanou and Aliferis, 2020). Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων (ultrasonic bath, Branson 1210, Danbury, U.S.A.) για 20 min και έπειτα σε ανακίνηση για 45 min σε οριζόντιο αναδευτήρα (orbital shaker, GFL 3006, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany). Ακολούθησε φιλτράρισμα με φίλτρο PTFE διαμέτρου πόρων 0.2 μm (Macherey-Nagel) για την αφαίρεση των στερεών σωματιδίων (debris) και τοποθέτηση των δειγμάτων σε νέα Eppendorf tubes, καθώς επίσης και εξάτμιση σε συμπυκνωτή κενού (vacuum concentrator, Labconco, Kansas City, MO, U.S.A.). Με το πέρας της παραπάνω διαδικασίας, τα αποξηραμένα δείγματα ήταν έτοιμα για παραγωγοποίηση.

3.5.3. Παραγωγοποίηση (derivatization) των δειγμάτων

Η παραγωγοποίηση αποτελεί ένα κρίσιμο πειραματικό στάδιο το οποίο απαιτεί αυξημένη προσοχή, καθώς ενδέχεται να δημιουργηθούν προβλήματα στη GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση. Με βάση το γεγονός ότι μόνο πτητικές και θερμικά σταθερές ενώσεις πρέπει να διέρχονται από τον αέριο χρωματογράφο και δεδομένου ότι οι περισσότεροι από τους μεταβολίτες δεν διαθέτουν αυτές τις ιδιότητες, είναι απαραίτητο να παραγωγοποιηθούν (Kanani et al., 2008). Ουσιαστικά, η διαδικασία αποσκοπεί στην αύξηση της σταθερότητας θερμικά ασταθών ουσιών, ώστε να μην αποικοδομηθούν κατά τη διάρκεια της θερμικής έκλουσης (thermal elution) από τη στήλη του χρωματογράφου και στην αύξηση του εύρους των ουσιών / μεταβολιτών (components) που ανιχνεύονται (π.χ. αμινοξέα, λιπαρά οξέα, σάκχαρα) (Kim and Verpoorte, 2010). Επιπλέον, συμβάλλει στη σημαντική βελτίωση του σχήματος των κορυφών και της ανάλυσης των χρωματογραφημάτων και στη βελτίωση της έντασης των κορυφών μοριακών ιόντων (observed molecular ion peaks) ή χαρακτηριστικών ιονικών θραυσμάτων (fragment ions), η οποία είναι απαραίτητη για την αναγνώριση των μεταβολιτών (Wang, 2008).

Στην παρούσα μελέτη, η παραγωγοποίηση πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια (Kalampokis et al., 2018, Kostopoulou et al., 2020). Στα αποξηραμένα δείγματα

προστέθηκαν 80 μL MeOX και τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30°C για 2h (waterbath, Daihan Labtech, Gyeonggi-do, Korea). Στο στάδιο αυτό, το οποίο ονομάζεται μεθοξυμάτωση (methoxymation), το MeOX δεσμεύει τις καρβονυλικές ομάδες των σακχάρων και παρεμποδίζει με αυτό τον τρόπο το σχηματισμό δακτυλίου (ring formation), ώστε να μην δημιουργηθούν πολλαπλές χρωματογραφικές κορυφές (Bekele et al., 2014). Στη συνέχεια, ακολούθησε η συλιλίωση (silylation) με προσθήκη 80 μL MSTFA και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 1h και 30 min. Στο στάδιο αυτό, μια συλιλομάδα (silylgroup) $[-\text{Si}(\text{CH}_3)_3]$ αντικαθιστά ένα ενεργό υδρογόνο μέσα σε ένα μόριο και το καθιστά λιγότερο πολικό και περισσότερο πτητικό (Wang, 2008).

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της παραγωγοποίησης, το περιεχόμενο κάθε δείγματος μεταφέρθηκε σε micro inserter των 180 μL (Macherey-Nagel) το οποίο ήταν τοποθετημένο σε αντίστοιχα αριθμημένο γυάλινο φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη. Παράλληλα, για τον ποιοτικό έλεγχο της ανάλυσης (quality control), παρασκευάστηκαν προς ανάλυση τυφλά δείγματα (experimental blanks), με σκοπό την ανίχνευση μεταβολικών χαρακτηριστικών που δεν σχετίζονται με το αναλυθέν βιολογικό υλικό (π.χ. πιθανή ρύπανση από τον χειρισμό, την προετοιμασία του δείγματος, τα αντιδραστήρια, τη στήλη ή το όργανο) (Lisec et al., 2006, Aliferis et al., 2015). Τα δείγματα αυτά παρασκευάστηκαν κατά τον ίδιο τρόπο.

3.5.4. Παράμετροι μεταβολομικής ανάλυσης

Η ανάλυση των μεταβολικών προφίλ των στελεχών του σύμπλοκου είδους *C. acutatum* πραγματοποιήθηκε με χρήση αέριου χρωματογράφου Agilent 6890 MS (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, U.S.A.) εφοδιασμένου με αυτόματο δειγματολήπτη (autosampler) 7683 και ανιχνευτή μάζας 5973 (inert mass selective detector, MSD) (**Εικόνα 16**). Χρησιμοποιήθηκε η στήλη HP-5MS ultra inert (UI) (μήκους 30 m, διαμέτρου 0.25 mm, πάχος υμενίου 0.25 μm , Agilent Technologies Inc.). Η έκχυση πραγματοποιούνταν σε αναλογία 5:1, υπό θερμοκρασία 230°C, ενώ φέρον αέριο ήταν το ήλιο (He) (ρυθμός ροής 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Επιπρόσθετα, στον κλίβανο η αρχική θερμοκρασία για 5 min ήταν 70°C και έπειτα αυξανόταν με

ρυθμό $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ έως τους 310°C , όπου διατηρούνταν σταθερή για 1 min. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε θετικός ιονισμός ηλεκτρονίων στα 70 eV. Τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης αποκτήθηκαν στην περιοχή μαζών 50-800 Da (4 σαρώσεις $\cdot\text{sec}^{-1}$) και η αρχική καθυστέρηση καταγραφής σημάτων ήταν διάρκειας 10 min. Η πηγή MS είχε θερμοκρασία 230°C και το τετράπολο 150°C .



Εικόνα 16 Αέριος χρωματογράφος Agilent 6890 MS

3.5.5. Ανάλυση και επεξεργασία χρωματογραφημάτων

Τα αποκτηθέντα χρωματογραφήματα αναλύθηκαν με το λογισμικό AMDIS v.2.66 (National Institute of Standards and Technology library, NIST, Gaithersburg, MD, U.S.A.) το οποίο επιτρέπει την ανάλυση χρωματογραφημάτων (Halket et al., 2005). Η δυνητική ταυτοποίηση των μεταβολικών χαρακτηριστικών βασίστηκε στην αντιστοίχιση/σύγκριση των φασμάτων μάζας τους με αυτά που είναι καταχωρημένα στη βάση NIST 08 (Lee, 2012). Οι κορυφές που υπήρχαν επίσης στα τυφλά δείγματα (experimental blanks), αποκλείστηκαν από τις περαιτέρω αναλύσεις. Η απόλυτη ταυτοποίηση επιλεγμένων μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε αντιστοιχίζοντας τα φάσματα μάζας και τους χρόνους κατακράτησης τους (retention time, RT) με αυτά αναλυτικών πρότυπων που είχαν αναλυθεί στην ίδια πλατφόρμα με την ίδια μέθοδο, όπως προβλέπεται από το Metabolomics

Standards Initiative (MSI) (Fiehn et al., 2007). Η παραπάνω πειραματική διαδικασία παρουσιάζεται σχηματικά στην **(Εικόνα 17)**.



Εικόνα 17 Πειραματική διαδικασία μεταβολομικής ανάλυσης στελεχών του σύμπλοκου είδους *Colletotrichum acutatum*.

3.5.6. Βιοπληροφορική ανάλυση, ανακάλυψη μεταβολικών διαφορών μεταξύ των στελεχών του σύμπλοκου είδους *Colletotrichum acutatum* και χημειοταξινόμησή τους

Τα αποκτηθέντα GC/EI/MS χρωματογραφήματα επεξεργάστηκαν, σε ένα πρώτο στάδιο, με το λογισμικό MS-DIAL v.3.70 46 (Tsugawa et al., 2015), ώστε να γίνουν απαραίτητες επεξεργασίες όπως η διόρθωση των γραμμών βάσης και η συμπλήρωση των κενών στα δεδομένα (Kalampokis et al., 2018, Karamanou and Aliferis, 2020). Η μήτρα (matrix) που αποκτήθηκε, επεξεργάστηκε περαιτέρω στο πρόγραμμα MS Excel®, όπου αφαιρέθηκαν μεταβολικά χαρακτηριστικά που μείωναν την ακρίβεια της ανάλυσης π.χ. ουσίες μη σχετικές με το βιολογικό υλικό. Σε ένα επόμενο στάδιο, η μήτρα υποβλήθηκε σε πολυπαραγοντική ανάλυση (multivariate analysis) χρησιμοποιώντας το λογισμικό βιοπληροφορικής SIMCA-P + v.13.0.3 (Umetrics, Sartorius Stedim Biotech, Umea, Sweden) για την ανακάλυψη τάσεων ανάμεσα στα δεδομένα και των αντίστοιχων μεταβολικών-βιοσημαντών (Kalampokis et al., 2018, Karamanou and Aliferis, 2020). Για την αρχική επισκόπηση του συνόλου δεδομένων πραγματοποιήθηκε OPLS-DA

ανάλυση ($P < 0,05$). Η ανακάλυψη των διαφορών μεταξύ των ενδο-μεταβολωμάτων των απομονωμένων στελεχών βασίστηκε στα contribution plots. Πιθανές ακραίες τιμές (outliers) ανιχνεύθηκαν με εφαρμογή PCA ανάλυσης, ενώ συμπληρωματικά της OPLS-DA πραγματοποιήθηκε ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες (Hierarchical cluster analysis, HCA).

3.6. Αξιολόγηση της επίδρασης επιλεγμένων βιοδιεγερτών στο μεταβολισμό δενδρυλλίων ελιάς με εφαρμογή GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης

3.6.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Για τις ανάγκες των βιοδοκιμών, χρησιμοποιήθηκαν δεκατέσσερα δενδρύλλια ελιάς τα οποία διατηρούνταν όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.2. Πέντε από αυτά ψεκάστηκαν με το σκεύασμα ProAct WG, πέντε με το Olivo Plus, ενώ τα υπόλοιπα τέσσερα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες και ψεκάστηκαν με αποστειρωμένο νερό. Αριθμήθηκαν και ταξινομήθηκαν όπως φαίνεται στον **Πίνακα 13**. Τα δενδρύλλια χωροθετήθηκαν στο θερμοκήπιο σε αποστάσεις 4 m μεταξύ των γραμμών και 2 m επί της γραμμής, προσομοιάζοντας ότι βρίσκονται σε ελαιώνα υπέρπυκνης φύτευσης, όπου έπειτα από υπολογισμούς προκύπτει ότι αντιστοιχούν 128 δέντρα/στρέμμα $[(33/4 \cdot 33/2)/1000]$.

Για την παρασκευή του ψεκαστικού διαλύματος, ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της ετικέτας κάθε σκευάσματος. Συγκεκριμένα, το ProAct εφαρμόζεται σε δοσολογία 12-15 gr/στρ., η οποία αναλογεί σε 0,105 gr/δέντρο, ενώ το Olivo Plus εφαρμόζεται σε δοσολογία 200-250 mL/100 L νερό, η οποία αναλογεί σε 1,75 mL/δέντρο. Με βάση τον παραπάνω υπολογισμό και με την παραδοχή ότι για την κάλυψη ενός στρέμματος απαιτούνται 100 L ψεκαστικού υγρού, σε κάθε δέντρο εφαρμόστηκε όγκος 700 mL ψεκαστικού διαλύματος. Σε όλα τα δέντρα πραγματοποιήθηκε ψεκασμός πλήρους κάλυψης φυλλώματος με 50 mL ψεκαστικού διαλύματος (**Εικόνα 18**). Ο ψεκασμός γινόταν από πάνω έως κάτω, από διάφορες κατευθύνσεις και σε απόσταση 20 cm από το φυτό. Οι παραπάνω υπολογισμοί βασίστηκαν σε προκαταρκτικά πειράματα που προηγήθηκαν του βασικού πειράματος.



Εικόνα 18 Ψεκασμός πλήρους κάλυψης φυλλώματος δενδρυλλίου ελιάς

3.6.2. Δειγματοληψία φύλλων ελιάς

Η δειγματοληψία φύλλων ελιάς πραγματοποιήθηκε 96 h μετά τον ψεκασμό των δενδρυλλίων με τα ψεκαστικά διαλύματα των σκευασμάτων ProAct και Olivo Plus. Συγκεκριμένα, από κάθε δενδρύλλιο πραγματοποιήθηκε αποκοπή τεσσάρων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων κάτω από την επάκρια κορυφή, τα οποία άνηκαν σε ξεχωριστούς βλαστούς, επομένως από κάθε δενδρύλλιο προέκυψαν δύο διαφορετικά δείγματα. Αμέσως μετά, ξεπλύθηκαν με νερό και αφήθηκαν να στεγνώσουν σε διηθητικό χαρτί για λίγα λεπτά. Ακολούθησε η αρίθμηση κάθε δείγματος (π.χ. P2-1, P2-2) και η εμβάπτιση σε δοχείο με υγρό άζωτο (quenching), ώστε να διακοπούν οι μεταβολικές διεργασίες. Συνολικά, τα δείγματα ήταν 28 (**Πίνακας 14**).

Πίνακας 13 Αρίθμηση και ταξινόμηση των πειραματικών δενδρυλλίων ελιάς βάσει του διαλύματος με το οποίο ψεκάστηκαν

	ProAct (P)	Olivo Plus (O)	Control (C)
Δέντρα ελιάς	P2, P3, P6, P11, P12	O1, O5, O9, O13, O14	C4, C7, C8, C10

Πίνακας 14 Αρίθμηση και ταξινόμηση των δειγμάτων φύλλων ελιάς βάσει του πειραματικού δενδρουλλίου από το οποίο πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία

	ProAct (P)	Olivo Plus (O)	Control (C)
Δείγματα φύλλων ελιάς	P2-1,P2-2, P3-1, P3-2, P6-1, P6-2, P11-1, P11-2, P12-1, P12-2	O1-1, O1-2, O5-1, O5-2, O9-1, O9-2, O13-1, O13-2, O14-1, O14-2	C4-1,C4-2, C7-1, C7-2, C8-1, C8-2, C10-1, C10-2

3.6.3. Προετοιμασία δειγμάτων φύλλων ελιάς για GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση, ανάλυση δειγμάτων, ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών

Η προετοιμασία των δειγμάτων φύλλων ελιάς για GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο το οποίο περιγράφεται στις υποενότητες 3.5.2. και 3.5.3. Στις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν 40 mg ιστού. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.5.4. και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της με σκοπό την ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών, όπως στην 3.5.5. Στην **(Εικόνα 19)**, παρουσιάζεται η πειραματική διαδικασία περιλαμβανομένου του ψεκασμού των δενδρουλλίων με βιοδιεγέρτες, της δειγματοληψίας των φύλλων και της προετοιμασίας των δειγμάτων για ανάλυση.



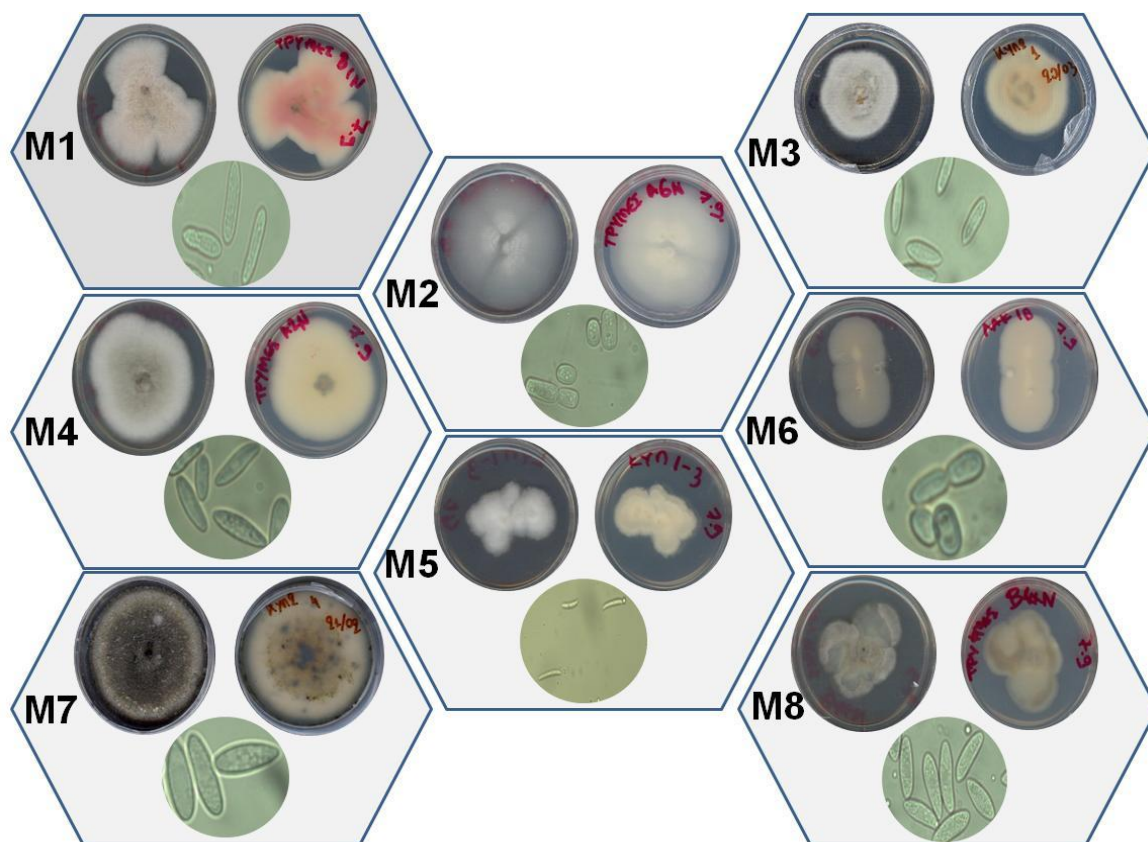
Εικόνα 19 Πειραματική διαδικασία μεταβολομικής ανάλυσης φύλλων ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1. Το σύμπλοκο είδος *Colletotrichum acutatum* είναι το κύριο αίτιο των μεγάλων απωλειών ελαιοπαραγωγής στις Π.Ε. Μεσσηνίας και Λακωνίας κατά τα έτη 2016-‘17 και 2017-‘18

4.1.1. Μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση καθαρών καλλιεργειών των απομονώσεων του *Colletotrichum* spp.

Κατά τη μακροσκοπική παρατήρηση καθαρών καλλιεργειών των απομονώσεων, καταγράφηκαν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, δηλαδή ο χρωματισμός και η μορφολογία τους. Σε εξέταση των καλλιεργειών αυτών σε μικροσκόπιο, παρατηρήθηκαν οι καρποφορίες τους, τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται (**Εικόνα 20 και Πίνακας 15**). Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν από δείγματα προσβεβλημένων ελαιοκάρπων που προέρχονταν τόσο από την Π.Ε. Μεσσηνίας όσο και από την Π.Ε. Λακωνίας και ταυτοποιήθηκαν ως γλοιοσπόρια (*Colletotrichum* spp.).



Εικόνα 20 Καθαρές καλλιέργειες των στελεχών του *Colletotrichum* spp. και τα κονιδία τους, όπως παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο (μεγέθυνση 1000x)

Πίνακας 15 Μορφολογικά χαρακτηριστικά (διαστάσεις και σχήμα) των κονιδίων μορφοτύπων του σύμπλοκου είδους *Colletotrichum acutatum*, όπως παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο (μεγέθυνση 1000x).

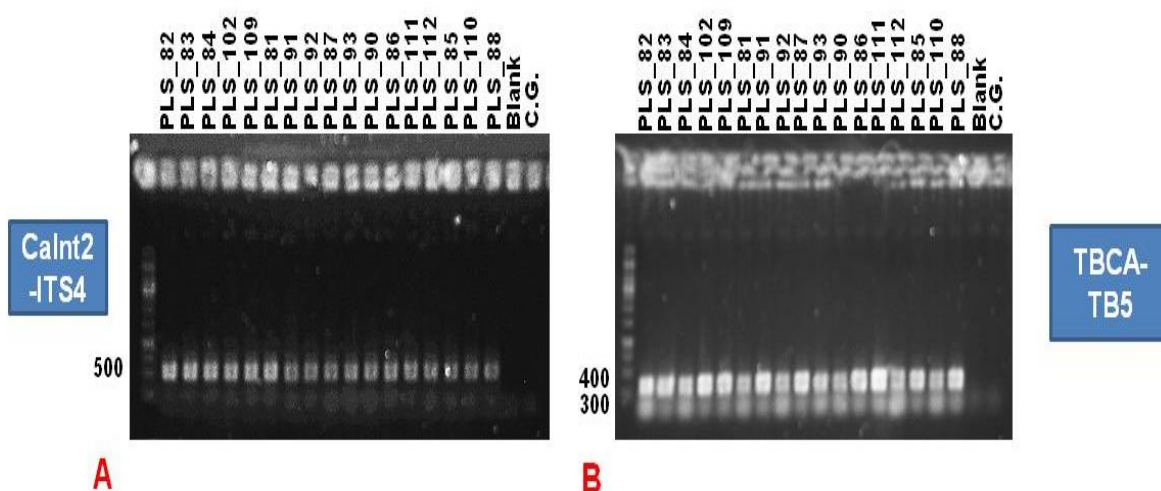
Μορφότυπος (M)	Στέλεχος	Διαστάσεις (μήκος x πλάτος) κονιδίων(μm)	Σχήμα κονιδίων
M1	PLS_86	12.38 ± 0.95 x 4.25 ± 0.50	Ατρακτοειδές
	PLS_90	11.75 ± 0.50 x 4.75 ± 0.50	Ατρακτοειδές
	PLS_111	11.50 ± 0.75 x 4.35 ± 0.50	Ατρακτοειδές
M2	PLS_87	8.25 ± 0.95 x 5.00 ± 0.81	Ελλειψοειδές
	PLS_88	8.25 ± 1.25 x 4.75 ± 0.95	Ελλειψοειδές
M3	PLS_92	12.75 ± 0.50 x 3.75 ± 0.50	Κυλινδρικό
	PLS_109		
	PLS_112	11.65 ± 0.50 x 4.50 ± 0.25	Κυλινδρικό
		12.00 ± 0.45 x 4.25 ± 0.35	Κυλινδρικό
M4	PLS_84	13.50 ± 1.73 x 3.50 ± 0.57	Κυλινδρικό
	PLS_91		
	PLS_93	15.25 ± 0.95 x 4.75 ± 0.50	Κυλινδρικό
	PLS_110	12.75 ± 0.50 x 3.75 ± 0.50	Κυλινδρικό
		13.00 ± 0.25 x 3.95 ± 0.30	Κυλινδρικό
M5	PLS_82	14.00 ± 0.81 x 2.00 ± 0.10	Ελλειψοειδές
M6	PLS_81	9.00 ± 0.35 x 4.10 ± 0.20	Ελλειψοειδές
M7	PLS_83	11.75 ± 1.50 x 4.12 ± 0.25	Κυλινδρικό
	PLS_102	14.75 ± 0.95 x 5.12 ± 0.62	Κυλινδρικό
M8	PLS_85	12.75 ± 2.36 x 4.25 ± 0.50	Κυλινδρικό

4.1.2. Μοριακή ανάλυση επιλεγμένων στελεχών του *Colletotrichum* spp.

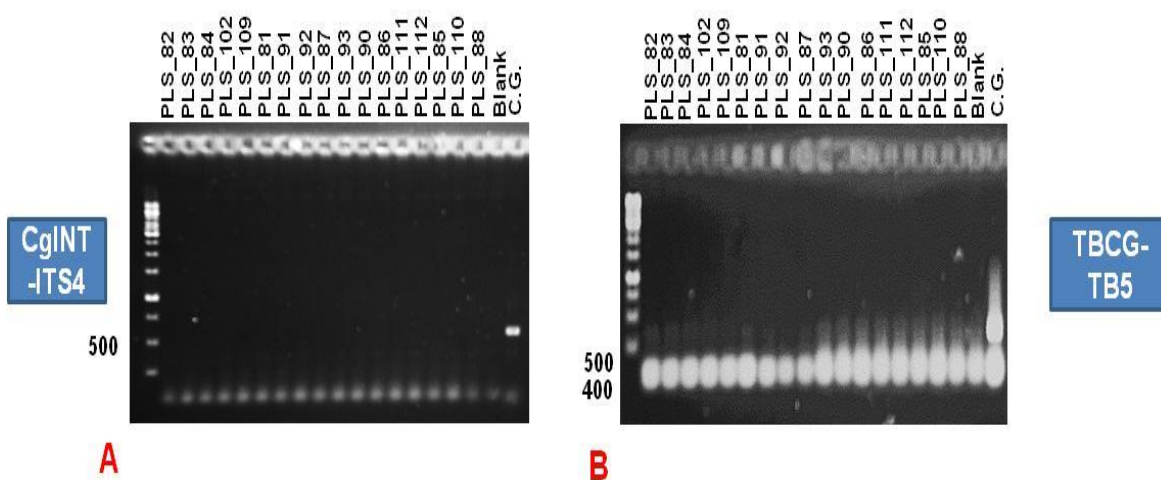
Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των αντιδράσεων PCR, προέκυψε η ενίσχυση στα επιθυμητά τμήματα DNA (Mills et al., 1992, Lewis Ivey et al., 2004) με βάση τους εξειδικευμένους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, για τα στελέχη του *C. acutatum*, παρατηρήθηκε ενίσχυση του γονιδίου της τουμπουλίνης μεταξύ 300-400 bp και της ριβοσωμικής περιοχής ITS4 σε ένα τμήμα της αλληλουχίας περίπου 500 βάσεων (bp) για τα ζεύγη εκκινητών TBCA-TB5 (**Εικόνα 21A**) και Calnt2-ITS4 (**Εικόνα 21B**), αντίστοιχα, ενώ δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση σε καμία από τις δύο περιπτώσεις για το στέλεχος του *C. gloeosporioides*. Αντίστοιχα, για το *C. gloeosporioides*, ενισχύθηκε η επιλεγμένη ITS4 περιοχή στις 500 περίπου bp για το ζεύγος TBCB-TB5 (**Εικόνα 22A**) και η περιοχή του γονιδίου της τουμπουλίνης μεταξύ 400-500 bp για το CgInt-ITS4 (**Εικόνα 22B**), ενώ δεν διαχωρίστηκαν καθόλου τα μόρια DNA του *C. acutatum*.

Από τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα εξεταζόμενα στελέχη ανήκουν στο *C. acutatum*, (επιβεβαιώνοντας το αποτέλεσμα της προηγούμενης μελέτης), επομένως υπάρχουν σημαντικά στοιχεία ότι το είδος αυτό αποτέλεσε το κύριο αίτιο των μεγάλων απωλειών ελαιοπαραγωγής στις Π.Ε. Μεσσηνίας και Λακωνίας κατά τις ελαιοκομικές περιόδους 2016-‘17 και 2017-‘18. Επιπλέον, βάσει προηγούμενων ερευνών στις οποίες αναφέρεται ότι το σύμπλοκο είδος *C. acutatum* είναι το κύριο αίτιο του γλοιοσπορίου (ανθράκωση) της ελιάς στις ελαιοπαραγωγικές χώρες της Μεσογείου, αντίστοιχα θεωρείται η ύπαρξη του είδους αυτού και στις περιοχές δειγματοληψίας.

Επιπρόσθετα, η επιτυχία της μεθόδου που εφαρμόστηκε κατά τη μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών του γλοιοσπορίου, αποτελεί ένα πρώτο ενθαρρυντικό αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης. Το γεγονός ότι οι εξειδικευμένοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην ταυτοποίηση των δύο ειδών του *Colletotrichum* spp., επέτρεψαν το σαφή διαχωρισμό μεταξύ των στελεχών που αναλύθηκαν, χωρίς να εμφανιστούν παραπροϊόντα, αποτελεί ένα αξιόπιστο στοιχείο για την μελλοντική παρακολούθηση της ασθένειας.



Εικόνα 21 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης 1%(w/v) ενισχυμένα με εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών (*σύμπλοκο είδος C. acutatum*) για την ITS περιοχή (πρόσθιος: Calnt2, ανάστροφος: ITS4) (**A**) και για το γονίδιο της β-τουμπουλίνης (πρόσθιος: TBCA, ανάστροφος: TB5) (**B**). Παρατηρείται ενίσχυση των αλληλουχιών-στόχων των 17 στελεχών του *Σύμπλοκο είδος C. acutatum*. (PLS).



Εικόνα 22 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης 1%(w/v) ενισχυμένα με εξειδικευμένο ζεύγος εκκινητών (*C. gloeosporioides s.l.*) για την περιοχή ITS (πρόσθιος: CgInt, ανάστροφος: ITS4) (**A**) και για το γονίδιο της β-τουμπουλίνης (πρόσθιος: TBCG, ανάστροφος: TB5) (**B**). Παρατηρείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου μόνο του *C. gloeosporioides s.l.* (C.G.).

4.2. Μεταβολομική ανάλυση μορφοτύπων του σύμπλοκου είδους *Colletotrichum acutatum* με σκοπό την χημειοταξινόμησή τους και τη μελέτη της παθογένειας και της ευαισθησίας τους σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα

4.2.1. Η GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση των απομονωμένων στελεχών του μύκητα *Colletotrichum acutatum* δείχνει διαφορές στα μεταβολικά προφίλ τους, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς για την χημειοταξινόμησή τους

Το βιοαναλυτικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε, αποδείχθηκε αποτελεσματικό καθώς επέτρεψε την ανάλυση (deconvolution) του ενδο-μεταβολώματος των στελεχών που αναλύθηκαν, παρέχοντας υψηλής ποιότητας μεταβολικά προφίλ (οξείες κορυφές και χρωματογραφικός διαχωρισμός), όπως διακρίνεται στα χρωματογραφήματα GC/EI/MS που ελήφθησαν (**Εικόνες 23 A-B**). Συγκεκριμένα, η μήτρα (matrix) που δημιουργήθηκε αποτελούνταν από 195 μεταβολικά χαρακτηριστικά (metabolic features), 138 εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν. Οι 114 μοναδικοί μεταβολίτες που καταγράφηκαν, στην πλειοψηφία τους άνηκαν στους υδατάνθρακες, τα αμινοξέα, τα καρβοξυλικά και τα λιπαρά οξέα, ενώ ένα μικρότερο ποσοστό τους, σε ομάδες ενώσεων όπως τα φωσφορικά οξέα, τα αλκαλοειδή, οι βιταμίνες κ.α. (**Εικόνα 24**).

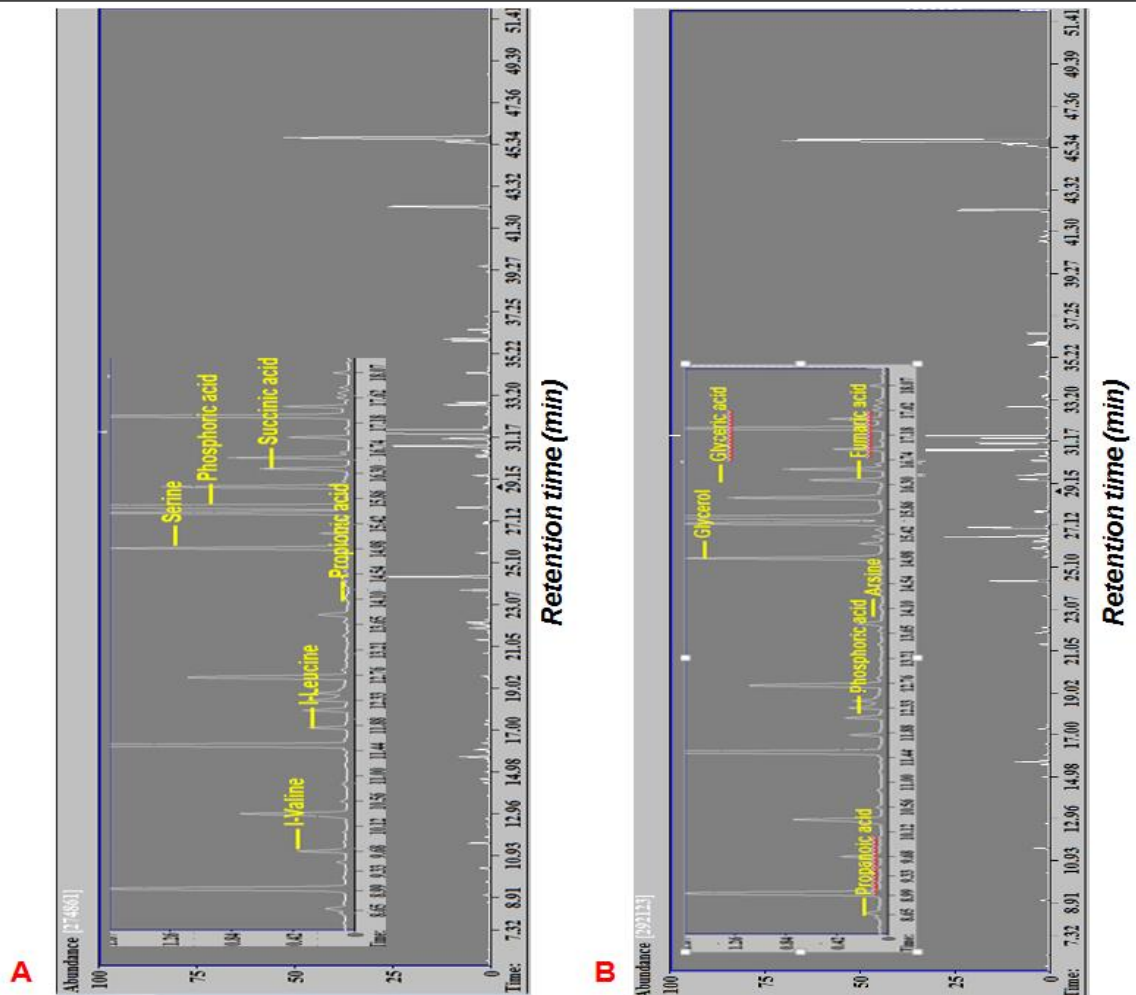
Η βιοπληροφορική επεξεργασία των χρωματογραφημάτων με το λογισμικό MS-Dial σε συνδυασμό με εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης (PCA) έδειξε τόσο τη στενή ομαδοποίηση των βιολογικών επαναλήψεων (replications) των διαφόρων στελεχών του σύμπλοκου είδους *Colletotrichum acutatum* όσο και την απουσία ακραίων τιμών (outliers). Ειδικότερα, τα δεδομένα ομαδοποιήθηκαν με τη μέθοδο OPLS-DA και προέκυψαν οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης $R^2X_{(cum)}=0.94$, $R^2Y_{(cum)}=0.96$ και η τιμή της προγνωστικής ικανότητας του μοντέλου $Q^2_{(cum)}=0.90$. Παράλληλα, όπως φαίνεται στο αντίστοιχο OPLS-DA scoreplot (**Εικόνα 25A**), οι αποστάσεις μεταξύ των σημείων είναι ανάλογες των διαφορών στα καταγεγραμμένα μεταβολικά προφίλ, ενώ έχουν σχηματιστεί ξεχωριστές ομάδες μεταξύ των στελεχών που ανήκουν στον ίδιο μορφότυπο. Τα στοιχεία αυτά επιβεβαίωσαν την άριστη απόδοση και την επαναληψιμότητα των πρωτοκόλλων (βιοανάλυσης και βιοπληροφορικής) που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της μεταβολομικής ανάλυσης. Βάσει αυτών των παρατηρήσεων, οι διαφορές στα μεταβολικά προφίλ μελετήθηκαν περαιτέρω ώστε να σχηματιστεί πιο πλήρης

εικόνα σχετικά με τις βιοχημικές ιδιαιτερότητες των μορφοτύπων και των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών τους.

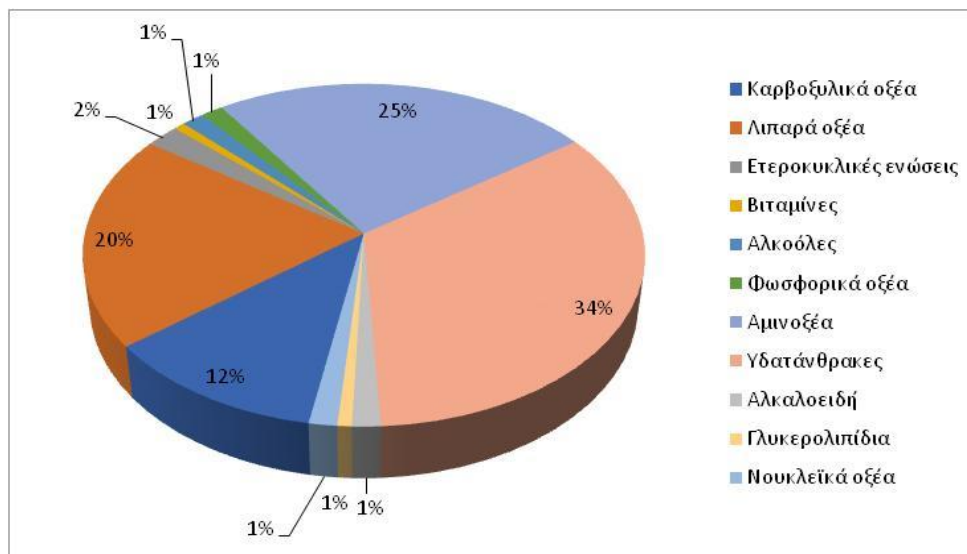
Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν από την HCA ανάλυση, η οποία εφαρμόστηκε συμπληρωματικά της OPLS-DA. Στο αντίστοιχο δενδρόγραμμα κατά συστάδες (HCA dendrogram) παρατηρείται πολύ καλός διαχωρισμός μεταξύ των επαναλήψεων ανάλογα με τις επεμβάσεις (**Εικόνα 25B**). Παρόλα αυτά, πρέπει να σημειωθεί ότι ο ευαίσθητος μορφότυπος (PLS_88) παρουσιάζει σαφή διαχωρισμό σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη.

Βάσει των παραπάνω και δεδομένου ότι η GC/EI/MS χημειοταξινόμηση έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στη μελέτη διαφόρων γενών μυκήτων όπως τα *Aspergillus*, *Alternaria*, και *Rhizoctonia* (Frisvad et al., 2008, Aliferis et al., 2013), συμπεραίνεται η καταλληλότητα της μεθόδου σε αναλύσεις ρουτίνας απομονώσεων τυχαίων στελεχών *C. acutatum* από τον αγρό. Η μέθοδος αυτή θα μπορούσε να υποκαταστήσει ή να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά με μοριακές τεχνικές, παρέχοντας επιπλέον πληροφορίες για τη μεταβολική σύσταση των αναλυόμενων στελεχών.

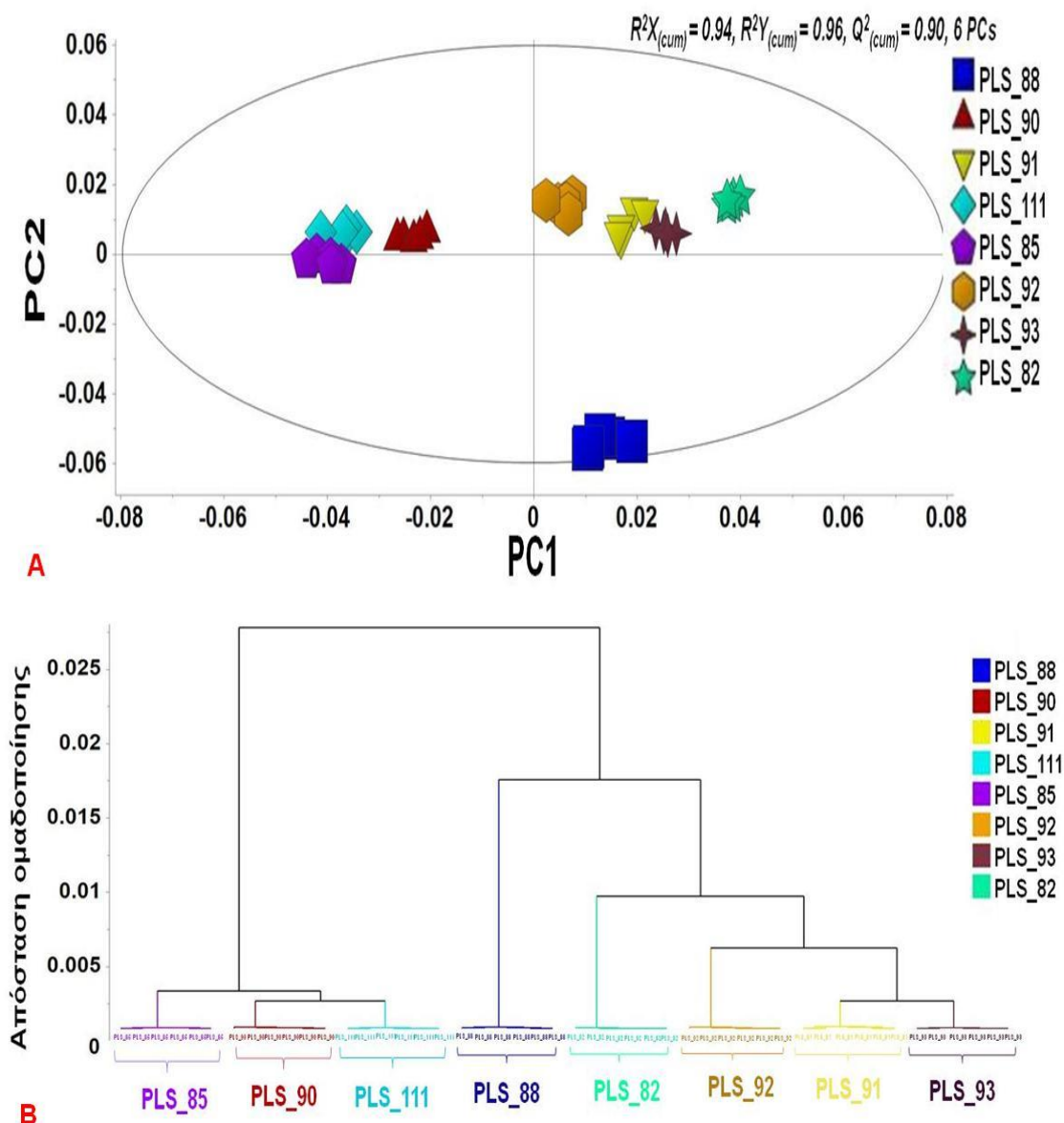
Τέλος, με βάση την αρχή ελεύθερης πρόσβασης σε δεδομένα πειραματισμού, τα πρωτότυπα δεδομένα του πειράματος είναι ελεύθερα προσβάσιμο στο διαδικτυακό χώρο του Pesticide Metabolomics Group (<https://www.aua.gr/pesticide-metabolomicsgroup/Resources/default.html>), υπό την κωδική ονομασία "*Colletotrichum acutatum*. (PMG-06-19)", σε μορφή "*.cdf",



Εικόνα 23 Αντιπροσωπευτικά ολικά χρωματογραφήματα ιόντος (TIC) του ενδο-μεταβολώματος των στελεχών PLS_88 (A) και PLS_90 (B) του σύμπλοκου είδους *Colletotrichum acutatum*. Σημειώνονται ενδεικτικά μεταβολίτες που αναγνωρίστηκαν.



Εικόνα 24 GC/EI/MS μεταβολικό προφίλ του ενδο-μεταβολώματος του σύμπλοκου είδους *Colletotrichum acutatum*.

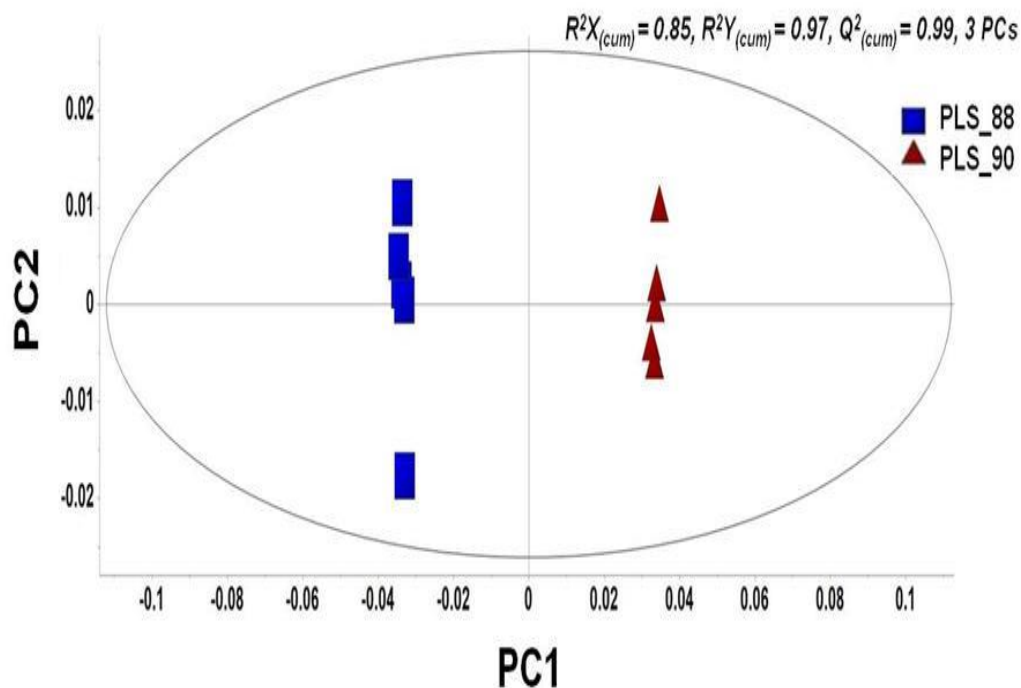


Εικόνα 25 OPLS-DA score plot για το διαχωρισμό μεταξύ των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ του ενδο-μεταβολώματος των στελεχών PLS_82 (M5), PLS_88 (M2), PLS_90 (M1), PLS_91 (M4), PLS_111 (M1), PLS_85 (M8), PLS_92 (M3) και PLS_93 (M4) του σύμπλοκου είδους *Colletotrichum acutatum*. Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T^2 σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Principal Components, Κύριες Συνιστώσες) (A) και το αντίστοιχο δένδρογραμμα ιεραρχικής ανάλυσης (HCA) το οποίο προέκυψε με εφαρμογή της μεθόδου Ward (B). Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 15 βιολογικές επαναλήψεις ανά στέλεχος, οι οποίες συγκεντρώθηκαν σε ομάδες των τριών, για να ληφθούν τελικά πέντε συγκεντρωμένα δείγματα. Υποπολλαπλάσια τμήματα κάθε βιολογικής επανάληψης συνδυάστηκαν για να ληφθούν 6 δείγματα ελέγχου ποιότητας (QC) Η επαναληψιμότητα της πειραματικής διαδικασίας και των αναλύσεων αποδεικνύεται από τις υψηλές τιμές των συντελεστών συσχέτισης $R^2X_{(cum)}=0.94$, $R^2Y_{(cum)}=0.96$ και την τιμή της προγνωστικής ικανότητας $Q^2_{(cum)}=0.90$.

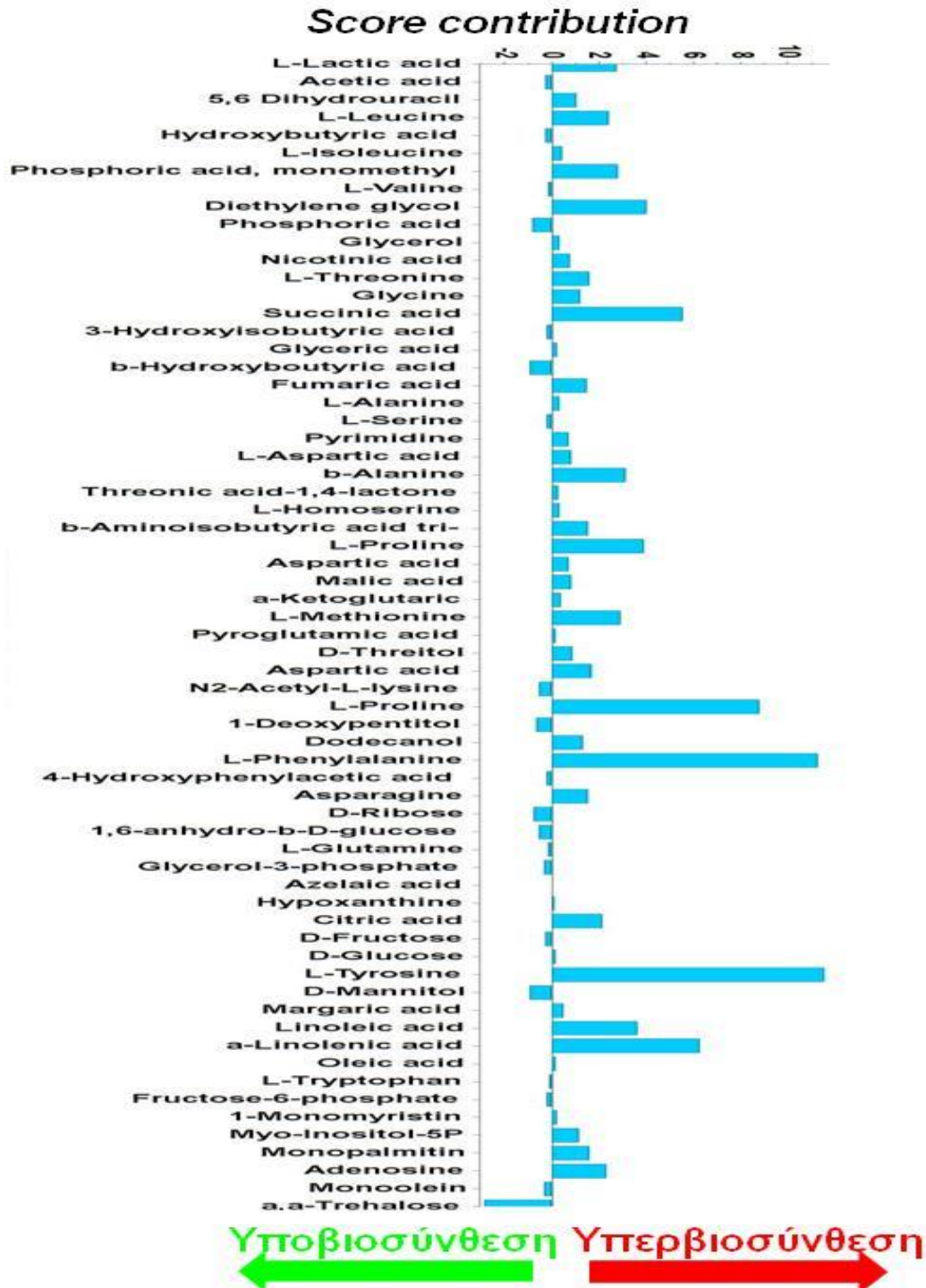
4.2.2. Η συγκριτική μεταβολομική ανάλυση μεταξύ του ευαίσθητου και του ανθεκτικού μορφοτύπου του σύμπλοκου είδους *Colletotrichum acutatum* επιβεβαιώνει τις διαφορές στην ευαισθησία σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα και την παθογένεια

Η ανάλυση OPLS-DA κατά ζεύγη (pairwise analysis) που πραγματοποιήθηκε για τον ευαίσθητο (PLS_90) και τον ανθεκτικό (PLS_88) μορφότυπο του μύκητα *C. acutatum* επίσης επιβεβαίωσε την ποιότητα των πειραματικών και βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν, καταδεικνύοντας παράλληλα τις διαφορές στα μεταβολικά προφίλ τους (**Εικόνα 26**). Επιπρόσθετα, όπως φαίνεται στα contribution plots (**Εικόνες 27, 28**), παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα καταγεγραμμένα μεταβολικά προφίλ, περιλαμβανομένων μεταβολιτών οι οποίοι παίζουν βασικό ρόλο στη φυσιολογία του μύκητα.

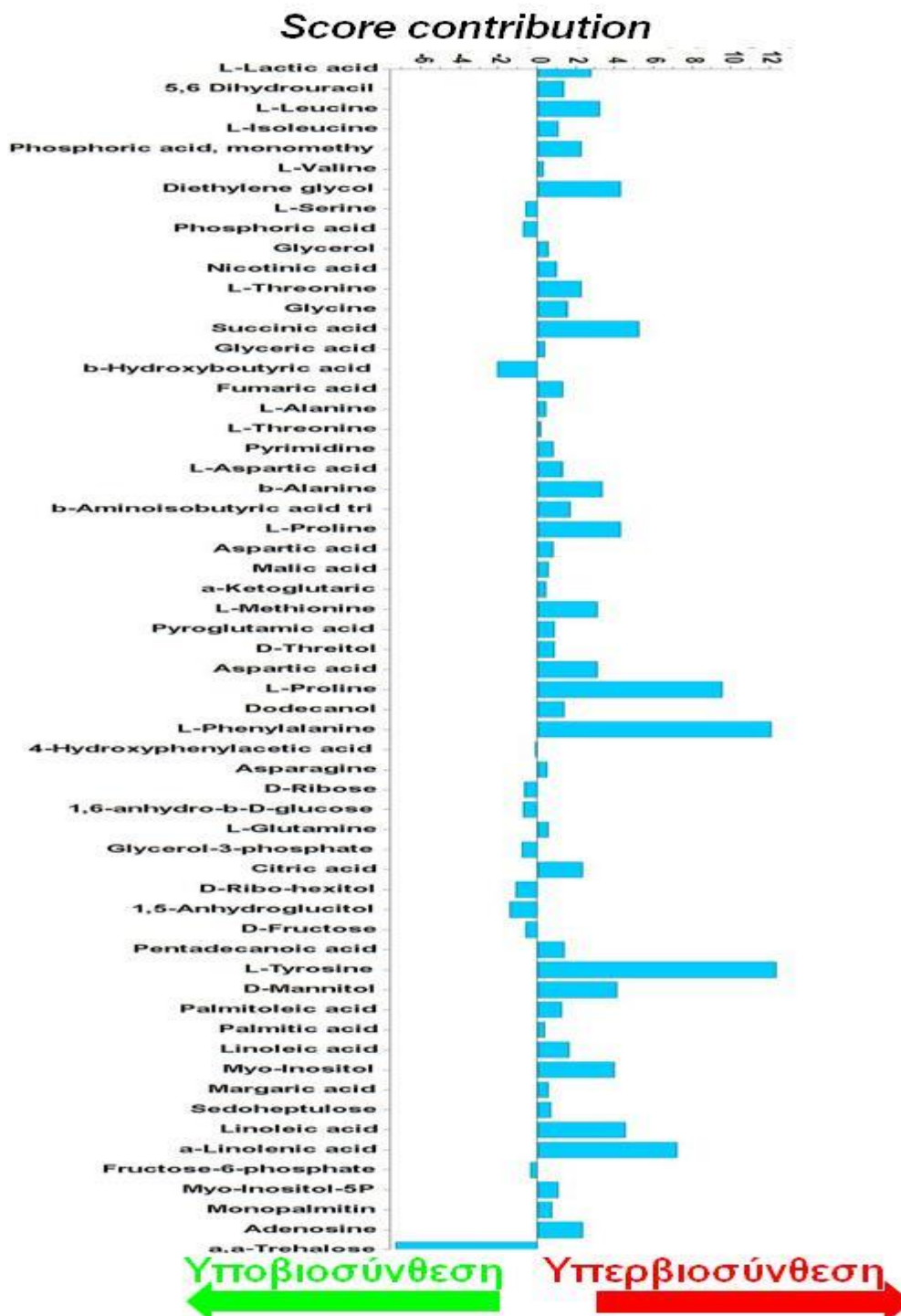
Μεταξύ των σημαντικότερων, περιλαμβάνονται οι μεταβολίτες-βιοσημαντές hydroxyphenylacetic acid (υδροξυφαινυλοξικό οξύ), myo inositol-P (μυοϊνοσιτόλη-P), pentadecanoic acid (πενταδεκανοϊκό οξύ), nicotinic acid (νικοτινικό οξύ), citric acid (κιτρικό οξύ), succinate (σουκινικό οξύ), adenosine (αδενοσίνη), β -alanine (β -αλανίνη), methionine (μεθειονίνη), fumaric acid (φουμαρικό οξύ), galactic acid (γαλακτικό οξύ), glycine (γλυκίνη), linoleic acid (λινολεϊκό οξύ), aspartic acid (ασπαρτικό οξύ), α -Linolenic acid (α -λινολενικό οξύ), L-alanine (L-αλανίνη), L-tyrosine (L-τυροσίνη), L-phenylalanine (L-φαινυλαλανίνη), L-proline (L-προλίνη) και α,α -trehalose (α,α -τρεχαλόζη). Οι διαφορές στην περιεκτικότητα των παραπάνω μεταβολιτών, είναι πιθανό να επεξηγούν εν μέρει τη διαφοροποίηση στην ευαισθησία σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα και στην παθογένεια μεταξύ των στελεχών του σύμπλοκου είδους *C. acutatum*.



Εικόνα 26 OPLS-DA score plot για το διαχωρισμό των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ του ενδο-μεταβολώματος μεταξύ ευαίσθητου και ανθεκτικού μορφοτύπου του σύμπλοκου είδους *C. acutatum*. Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T^2 σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Principal Components, Κύριες Συνιστώσες). Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 15 βιολογικές επαναλήψεις ανά στέλεχος, οι οποίες συγκεντρώθηκαν σε ομάδες των τριών, για να ληφθούν τελικά πέντε συγκεντρωμένα δείγματα. Υποπολλαπλάσια τμήματα κάθε βιολογικής αντιγραφής συνδυάστηκαν για να ληφθούν δείγματα ελέγχου ποιότητας (QC). Η επαναληψιμότητα της πειραματικής διαδικασίας και των αναλύσεων αποδεικνύεται από τις υψηλές τιμές των συντελεστών συσχέτισης $R^2X_{(cum)} = 0.85$, $R^2Y_{(cum)} = 0.97$ και την τιμή της προγνωστικής ικανότητας $Q^2_{(cum)} = 0.99$.



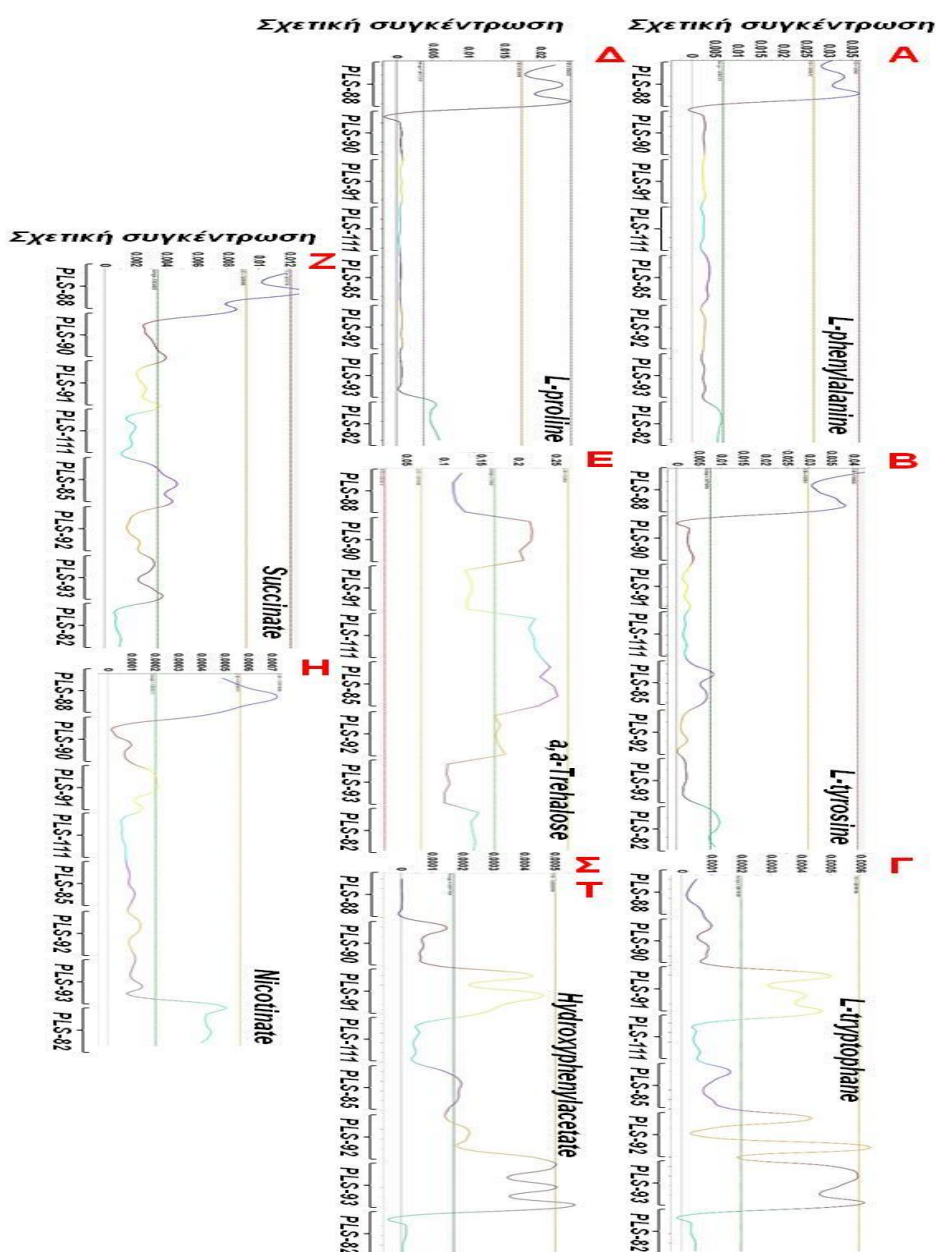
Εικόνα 27 Contribution / Coefficient Plot με τις αντίστοιχες τιμές Coefficient για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση των μεταβολικών προφίλ του ευαίσθητου μορφοτύπου (σε μονάδες κλίμακας) και του μέσου όρου των υπόλοιπων στελεχών που αναλύθηκαν. Οι υψηλές απόλυτες τιμές αντιστοιχούν σε μεταβολίτες με την υψηλότερη βαρύτητα στον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Οι θετικές τιμές αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που παρατηρούνται σε αυξημένα επίπεδα στο στέλεχος PLS_88 (M2) (υπερβιοσύνθεση), ενώ οι αρνητικές σε εκείνα με μειωμένα επίπεδα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη (υποβιοσύνθεση).



Εικόνα 28 Contribution / Coefficient Plot με τις αντίστοιχες τιμές Coefficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση των μεταβολικών προφίλ μεταξύ ευαίσθητου και ανθεκτικού μορφοτύπου του σύμπλοκου είδους *C. acutatum* (σε μονάδες κλίμακας). Οι υψηλές απόλυτες τιμές αντιστοιχούν στους μεταβολίτες με υψηλότερη βαρύτητα στον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Οι θετικές τιμές αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που παρατηρούνται σε αυξημένα επίπεδα στο στέλεχος PLS_88 (M2) (υπερβιοσύνθεση), ενώ οι αρνητικές σε εκείνα με μειωμένα επίπεδα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη (υπο-βιοσύνθεση).

4.2.3. Ρόλος επιλεγμένων μεταβολιτών-βιοσημαντών στο μεταβολισμό και στη φυσιολογία του σύμπλοκου είδους *Colletotrichum acutatum*

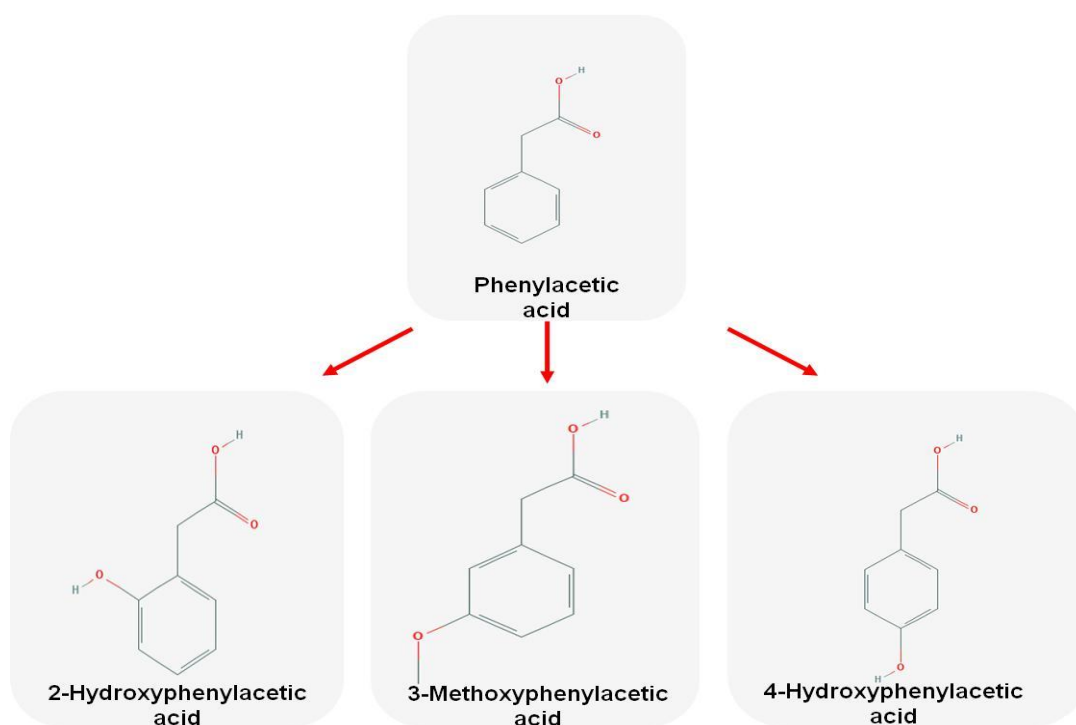
Όπως προαναφέρθηκε, με την εφαρμογή βιοπληροφορικής ανάλυσης ανακαλύφθηκε ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών, η σχετική συγκέντρωση των οποίων διέφερε σημαντικά μεταξύ των στελεχών που αναλύθηκαν (Εικόνα 29).



Εικόνα 29 Trend plots της διακύμανσης της περιεκτικότητας των μεταβολιτών L-phenylalanine (Α), L-tyrosine (Β), L-tryptophane (Γ), L-proline (Δ), α,α-trehalose (Ε), Hydroxyphenylacetate (ΣΤ), Succinate (Ζ) και Nicotinate (Η) στα στελέχη PLS_88 (M2), PLS_90 (M1), PLS_91 (M4), PLS_111 (M1), PLS_85 (M8), PLS_92 (M3), PLS_93 (M4) και PLS_82 (M5) του σύμπλοκου είδους *C. acutatum*.

Με βάση το γεγονός ότι η ανάλυση του συνόλου των διαφορών ήταν εκτός των πλαισίων της παρούσας έρευνας, επικεντρωθήκαμε στη συζήτηση σχετικά με επιλεγμένους μεταβολίτες οι οποίοι με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στο μεταβολισμό και τη φυσιολογία των μυκήτων. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς ήταν οι hydroxyphenylacetic acid, *α,α*-trehalose και L-proline, για τους οποίους υπάρχουν δεδομένα στη βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο τους στην παθογένεια των μυκήτων και την αντίδραση στις καταπονήσεις (stress), όπως αναφέρεται παρακάτω. Ως εκ τούτου, είναι πιθανό να υποδηλώνεται ένας παρόμοιος ρόλος τους για το σύμπλοκο είδος *C. acutatum*.

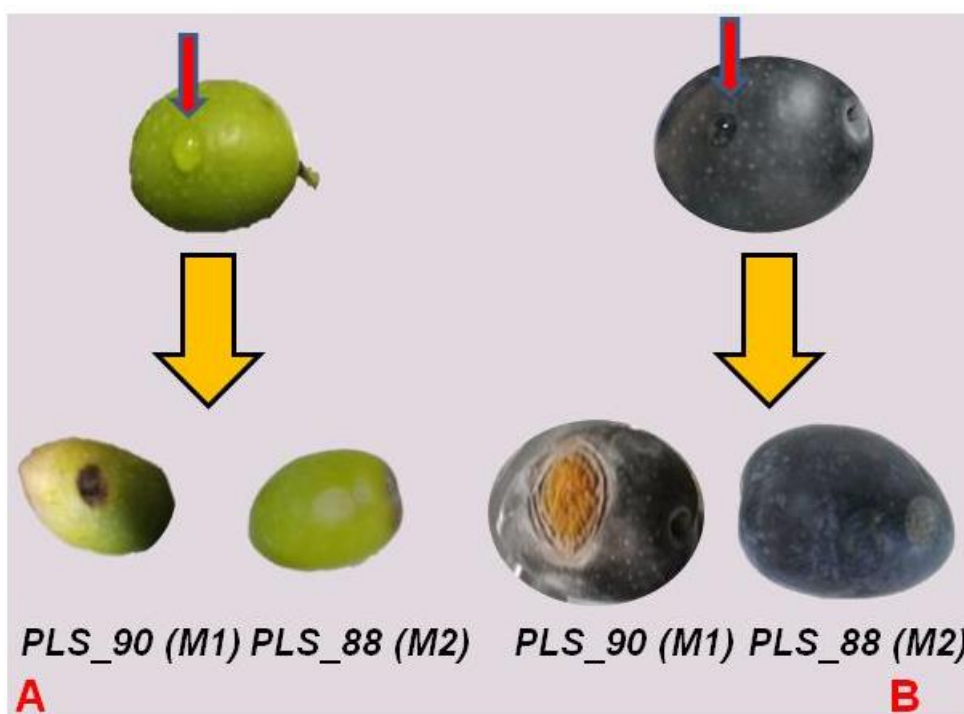
Ειδικότερα, το phenylacetic acid και τα παράγωγά του (**Εικόνα 30**) συμπεριλαμβανομένου του hydroxyphenylacetic acid, είναι φυτοτοξικοί μεταβολίτες που παράγονται από διάφορα είδη μυκήτων, όπως το *Rhizoctonia solani* (Aoki et al., 1963, Aliferis et al., 2013) και το *Streptomyces humidus* (Hwang et al., 2001).



Εικόνα 30 Χημικές δομές του phenylacetic acid (φαινολοξικό οξύ) και παραγώγων του (πηγή: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Επίσης, αναφέρεται στενή συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας των μυκήτων να συνθέσουν phenylacetic acid (και τα παράγωγά του) και της παθογένειάς τους (Bartz et al., 2012). Βάσει των παραπάνω, μπορεί αντίστοιχα να θεωρηθεί ότι η ικανότητα παραγωγής του hydroxyphenylacetic acid από τα στελέχη του

σύμπλοκου είδους *C. acutatum* σχετίζεται, επίσης, θετικά με την παθογένεια σε καρπούς ελιάς και επομένως την ανάπτυξη των αντίστοιχων συμπτωμάτων (Εικόνα 5). Η παραπάνω παρατήρηση είναι σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα της έρευνας μας. Συγκεκριμένα, κατά την τεχνητή μόλυνση καρπών των ποικιλιών Κορωνέικη και Καλαμών με αιώρημα κονιδίων (Κολαΐνης et al., 2019), ο ευαίσθητος μορφότυπος PLS_90 (M1) ο οποίος χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη μολυσματική ικανότητα, βρέθηκε κατά την ανάλυση να έχει υψηλότερη σχετική συγκέντρωση hydroxyphenylacetic acid σε σύγκριση με τον ανθεκτικό μορφότυπο PLS_88 (M2) ο οποίος στις βιοδοκιμές παρουσίασε μικρότερη μολυσματική ικανότητα. Επομένως, στο γεγονός αυτό μπορεί να αποδίδεται η εμφάνιση συμπτωμάτων στην πρώτη περίπτωση και η μη εμφάνιση συμπτωμάτων στη δεύτερη (Εικόνες 31 A-B).



Εικόνα 31 Πιθανή συσχέτιση της σχετικής συγκέντρωσης των στελεχών PLS_88 και PLS_90 σε hydroxyphenylacetic acid και της εκδήλωσης συμπτωμάτων κατά την τεχνητή μόλυνση καρπών των ποικιλιών Κορωνέικης (A) και Καλαμών (B) με αιώρημα κονιδίων στελεχών του μύκητα *C. acutatum*.

Παρόλα αυτά, απαιτούνται επιπρόσθετες μελέτες μεγαλύτερης κλίμακας, που να περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό απομονώσεων και ποικιλιών για την περαιτέρω επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης. Μία επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης επαληθεύοντας το ρόλο του hydroxyphenylacetic acid ως μεταβολίτη-βιοσημαντή

της μολυσματικής ικανότητας του γλοιοσπορίου, θα οδηγούσε στην ανάπτυξη μίας μεθόδου βασισμένης στη μεταβολομική ανάλυση για τον υψηλής ρυθμοαπόδοσης χαρακτηρισμό στελεχών αγρού, με προφανή οφέλη για το σχεδιασμό προγραμμάτων φυτοπροστασίας.

Επιπρόσθετα, η αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας των στελεχών του σύμπλοκου είδους *C. acutatum*, που καταγράφηκε στην *a,a*-trehalose και της ευαισθησίας τους σε μυκητοκτόνα (τριαζολικά, στρομπιλουρίνες) που εφαρμόστηκαν σε *in vitro* βιοδοκιμές σε προηγούμενη μελέτη μας (Κολαϊνής et al., 2019), ευθυγραμμίζεται με προηγούμενη έρευνα (Sevastos et al., 2018) σχετικά με την ανθεκτικότητα στελεχών του μύκητα *Fusarium graminearum* στη δ.ο. carbendazim. Όμως, παρά το γεγονός ότι βασικό μηχανισμό μέσω του οποίου οι μύκητες αποκτούν ανθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα {Brent, 1995 #472}, περιλαμβανομένων των τριαζολικών και των στρομπιλουρίνων (FRAC, <https://www.frac.info/publications/downloads>) αποτελούν οι μεταβολές στη θέση-στόχο, τα δεδομένα δεν μας παρέχουν επαρκή στοιχεία που να αποδεικνύουν την αυξημένη ευαισθησία του ευαίσθητου μορφότυπου (PLS_88).

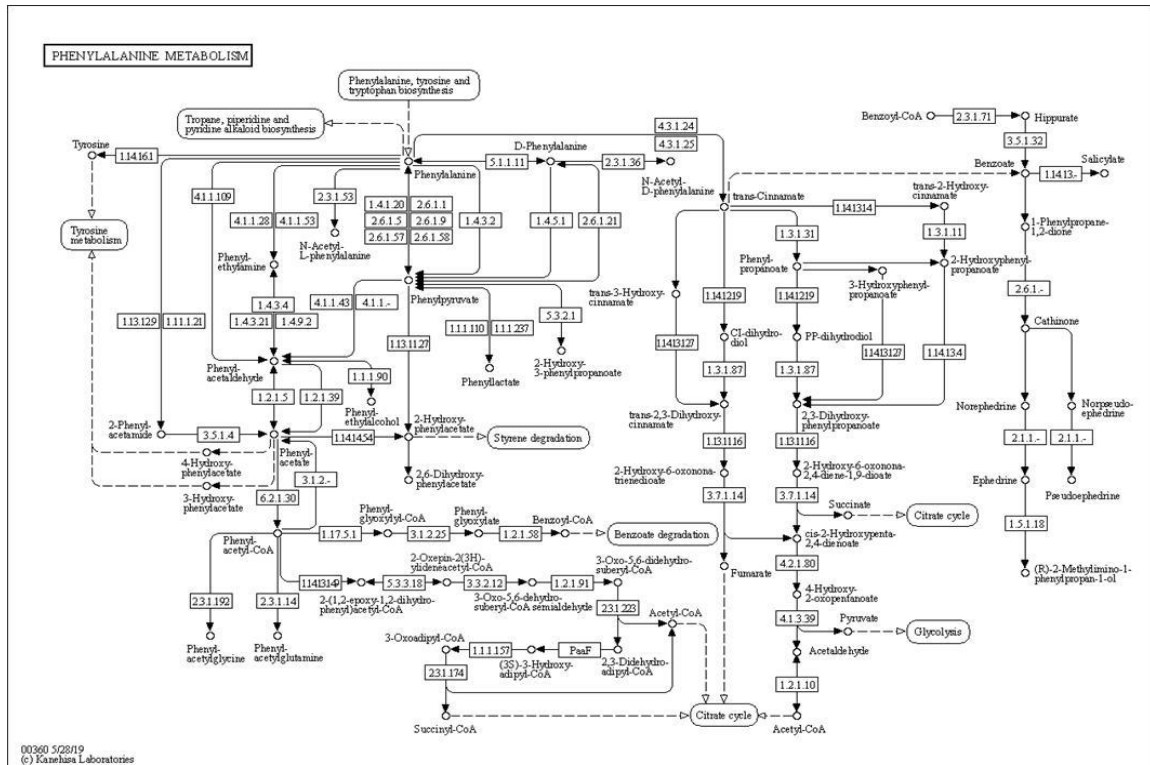
Η *a,a*-trehalose είναι ένας μη αναγωγικός δισακχαρίτης ο οποίος συναντάται ευρέως στους μύκητες, παρουσιάζοντας ποικίλα δράση (Thevelein, 1984). Συγκεκριμένα, προστατεύει τις πρωτεΐνες και τις κυτταρικές μεμβράνες από διάφορες καταπονήσεις (π.χ. έλλειψη νερού, υψηλές/χαμηλές θερμοκρασίες), ρυθμίζει το σχηματισμό (sporulation) και τη διάρκεια ζωής (long-term viability) των σπορίων, συμμετέχει σε διεργασίες όπως η γλυκόλυση (Elbein et al., 2003, Ni and Yu, 2007, Ocón et al., 2007, Iturriaga et al., 2009, Lowe et al., 2009, Aliferis and Jabaji, 2010). Επιπρόσθετα, ο μεταβολίτης αυτός φαίνεται να σχετίζεται και με την παθογένεια, καθώς σε αρκετές περιπτώσεις υποδηλώνεται ο ρόλος του στη μολυσματικότητα (virulence) διαφόρων ειδών μυκήτων (Van Dijck et al., 2002, Foster et al., 2003, Murphy et al., 2005). Για παράδειγμα, στο *Magnaporthe grisea*, η σύνθεση της *a,a*-trehalose βρέθηκε να προκαλείται από το γονίδιο *TPS1*, το οποίο απαιτείται για την βιοσύνθεση μεταβολιτών που σχετίζονται με την παθογένεια (pathogenesis related metabolites) (Foster et al., 2003). Στην ίδια μελέτη, η μετάλλαξη του γονιδίου *OtsA*, βρέθηκε να μειώνει αισθητά την παθογένειά του μύκητα, με την παρεμβολή της *a,a*-trehalose στη διείσδυση των υφών στους φυτικούς ιστούς. Παρόλο που τα δεδομένα της μελέτης δεν είναι επαρκή να αποδείξουν το ρόλο του εν λόγω μεταβολίτη στην παθογένεια του

σύμπλοκου είδους *C. acutatum*, εντούτοις, βάσει των παραπάνω δεδομένων, είναι πιθανό να υποστηρίξουν την υπόθεση ότι τα χαμηλά επίπεδα του δισακχαρίτη, την επηρεάζουν αρνητικά.

Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η αντίδραση των μυκήτων στις αβιοτικές καταπονήσεις (π.χ. οξειδωτικές, οσμωτικές) ελέγχεται από έναν πολύπλοκο ρυθμιστικό μηχανισμό, τα επίπεδα μεταβολιτών όπως η L-proline θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως αξιόπιστοι μεταβολίτες-βιοσημαντές που να προσδιορίζουν την παραπάνω σχέση (Szabados and Savoure, 2010, Rejeb et al., 2014). Η L-proline αποτελεί αμινοξύ με αντιοξειδωτική δράση έναντι των ενεργών μορφών οξυγόνου (reacting oxygen species, ROS), ενώ ρυθμίζει την όσμωση (osmoregulator) και σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες και τις κυτταρικές μεμβράνες (Szabados and Savoure, 2010, Rejeb et al., 2014). Επιπλέον, αυξημένα επίπεδά της σχετίζονται με την αντίδραση μυκήτων σε επεμβάσεις με μυκητοκτόνα (Sevastos et al., 2018). Τα αποτελέσματα της έρευνας μας συμφωνούν με την παραπάνω παρατήρηση, υποδεικνύοντας τη θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της L-proline και της ανθεκτικότητας / μειωμένης ευαισθησίας των απομονώσεων του *C. acutatum* στα μυκητοκτόνα που εφαρμόστηκαν, όπως αναφέρεται παραπάνω.

Τέλος, σημαντικό εύρημα αποτελούν τα αυξημένα επίπεδα των αρωματικών αμινοξέων L-phenylalanine και L-tyrosine που καταγράφηκαν στο μεταβολικό προφίλ του ευαίσθητου μορφότυπου (PLS_88, M2). Οι μεταβολίτες αυτοί αποτελούν πρόδρομες ουσίες (precursors) πολυάριθμων δευτερογενών μεταβολιτών (των μυκήτων) που συντίθενται μέσω των βιοσυνθετικών οδών (biosynthetic pathways) των ινδολικών αλκαλοειδών (indole alkaloid), των φαινυλοπροπανοειδών (phenyl propanoid), των τροπανίων (tropane), της πιπεριδίνης (piperidine) και των αλκαλοειδών πυριδίνης (pyridine alkaloid) (**Εικόνα 32**). Ανάλογα αυξημένα επίπεδα καταγράφηκαν σε μεταβολομική ανάλυση στελεχών του μύκητα *F. graminearum*, τα οποία ήταν ανθεκτικά στη δ.ο carbendazim (Sevastos et al., 2018). Φαίνεται, επομένως, ότι αυξημένη σχετική περιεκτικότητα των δύο αυτών αρωματικών αμινοξέων οδηγεί στην αυξημένη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι, ενδεχομένως, βοηθούν το παθογόνο να ανταπεξέλθει στην καταπόνηση που προκαλείται από την τοξική δράση του εκάστοτε μυκητοκτόνου. Η ενεργοποίηση του δευτερογενούς

μεταβολισμού των μυκήτων είναι μία τυπική αντίδραση τους όταν βρίσκονται υπό συνθήκες καταπόνησης (Macheleidt et al., 2016).

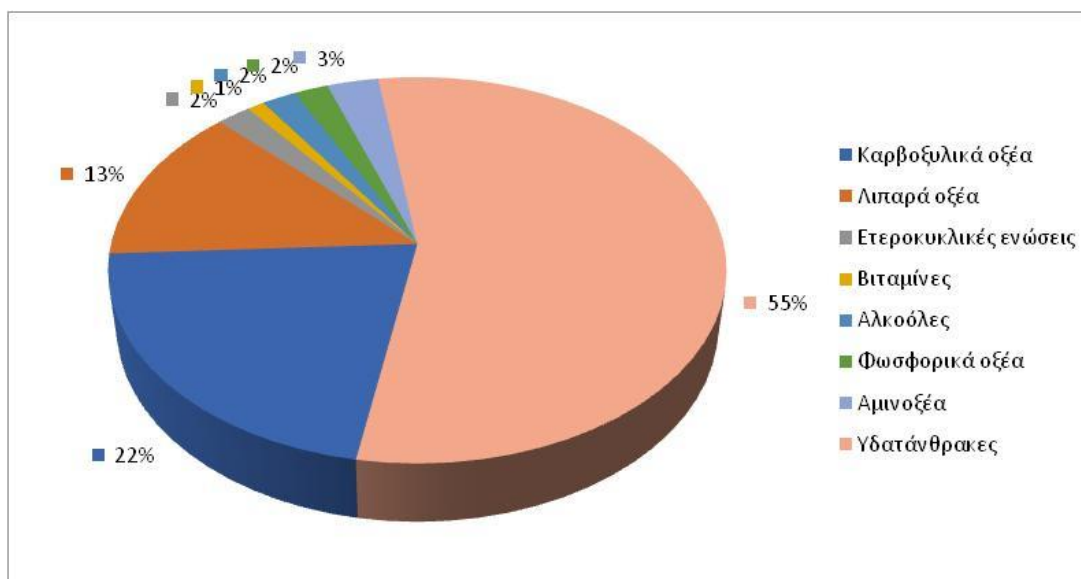


Εικόνα 32 Βιοσυνθετική οδός L-phenylalanine (πηγή: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00360+C00642)

4.3. Μεταβολομική ανάλυση δενδρυλλίων ελιάς (*Olea europaea* L.) με σκοπό την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των βιοδιεγερτών και του μηχανισμού δράσης τους

4.3.1. GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση φύλλων ελιάς (*Olea europaea* L.)

Το βιοαναλυτικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε, αποδείχθηκε αποτελεσματικό καθώς επέτρεψε την ανάλυση (deconvolution) του ενδο-μεταβολώματος των φύλλων ελιάς που αναλύθηκαν, παρέχοντας υψηλής ποιότητας μεταβολικό προφίλ (οξείες κορυφές και χρωματογραφικός διαχωρισμός). Κατά τη GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση, ανιχνεύτηκαν 179 μεταβολικά χαρακτηριστικά, 98 εκ των οποίων αναγνωρίστηκαν, προκύπτοντας τελικά 70 μοναδικοί μεταβολίτες. Το μεταβολικό προφίλ αποτελούνταν κατά κύριο λόγο (90%) από υδατάνθρακες, καρβοξυλικά και λιπαρά οξέα, ενώ ομάδες ενώσεων όπως αμινοξέα, αλκοόλες, ετεροκυκλικές ενώσεις, φωσφορικά οξέα και βιταμίνες, καταγράφηκαν σε ένα μικρό ποσοστό (10%) (**Εικόνα 33**).



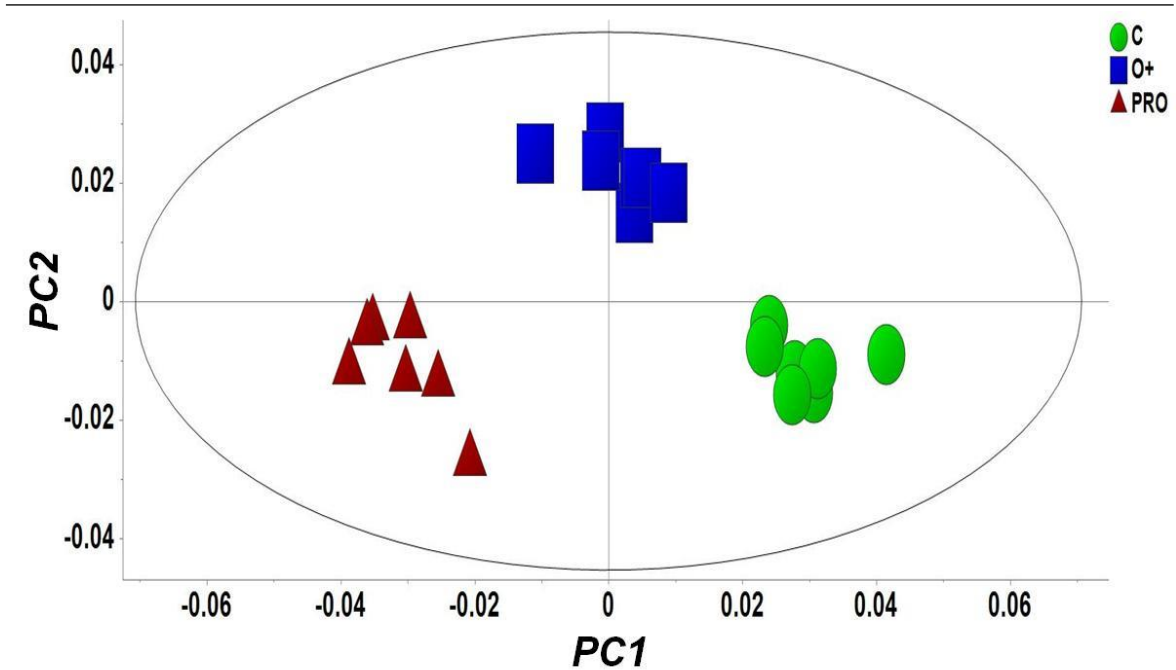
Εικόνα 33 GC/EI/MS μεταβολικό προφίλ του ενδο-μεταβολώματος των φύλλων ελιάς.

4.3.2. Επισκόπηση της GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης δενδρυλλίων ελιάς (*Olea europaea* L.)

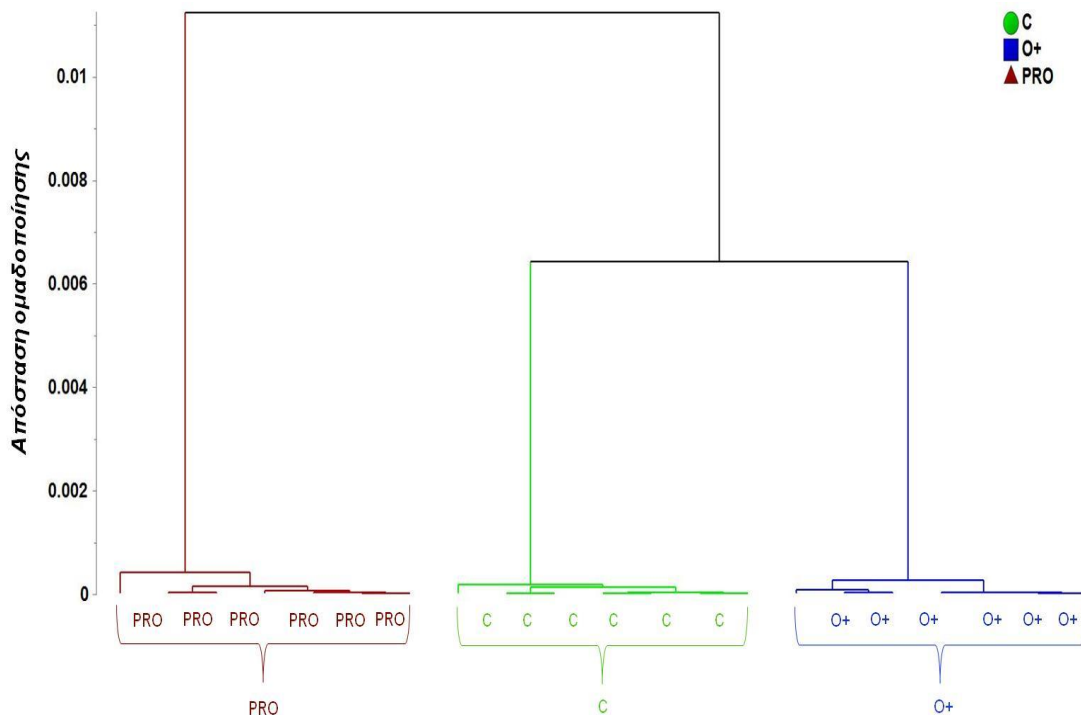
Η αποτελεσματικότητα του βιοαναλυτικού πρωτοκόλλου επιβεβαιώθηκε και στην περίπτωση της GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης των δενδρυλλίων ελιάς (*Olea europaea* L.), έπειτα από την επέμβαση με βιοδιεγέρτες.

Επιπρόσθετα, η βιοπληροφορική επεξεργασία των χρωματογραφημάτων με το λογισμικό MS-Dial σε συνδυασμό με εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης (PCA), έδειξε τόσο τη στενή ομαδοποίηση των βιολογικών επαναλήψεων (replications) των διαφορετικών δειγμάτων φύλλων ελιάς, όσο και την απουσία ακραίων τιμών (outliers). Ειδικότερα, τα δεδομένα ομαδοποιήθηκαν με τη μέθοδο OPLS-DA και προέκυψαν οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης $R^2X_{(cum)}=0,55$, $R^2Y_{(cum)}=0,917$ και η τιμή της προγνωστικής ικανότητας του μοντέλου $Q^2_{(cum)}=0,86$. Παράλληλα, όπως φαίνεται στο αντίστοιχο OPLS-DA scoreplot (**Εικόνα 34**), οι αποστάσεις μεταξύ των σημείων είναι ανάλογες των διαφορών στα καταγεγραμμένα μεταβολικά προφίλ, ενώ έχουν σχηματιστεί ξεχωριστές ομάδες μεταξύ των δειγμάτων που προέρχονται από κάθε διαφορετική επέμβαση. Βάσει αυτών των παρατηρήσεων, οι διαφορές στα μεταβολικά προφίλ μελετήθηκαν περαιτέρω, ώστε να σχηματιστεί πιο πλήρης εικόνα σχετικά με το μηχανισμό δράσης και τη σύσταση κάθε βιοδιεγέρτη.

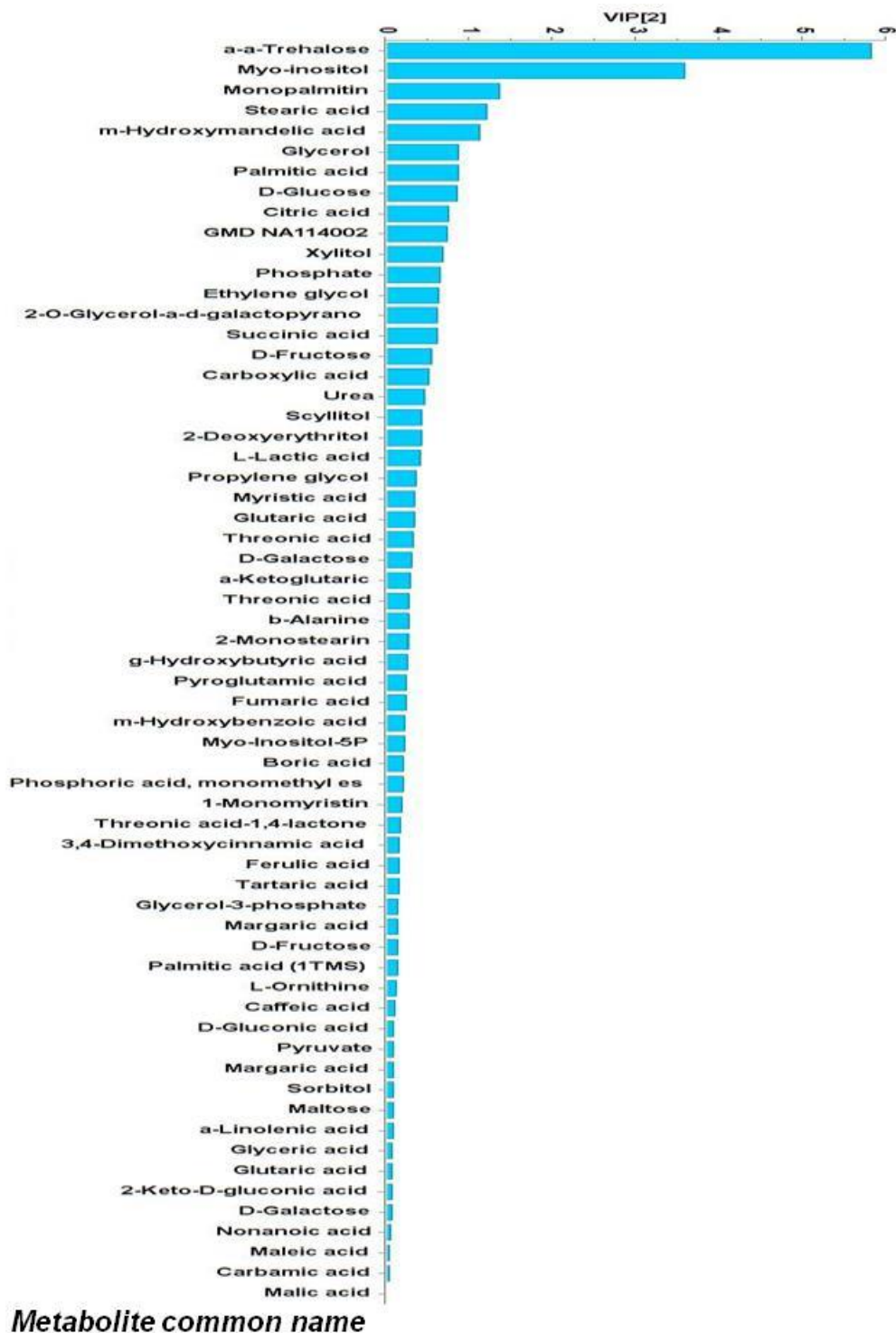
Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν από την HCA ανάλυση, η οποία εφαρμόστηκε συμπληρωματικά της OPLS-DA. Στο αντίστοιχο δενδρόγραμμα κατά συστάδες (HCA dendrogram) παρατηρείται πολύ καλός διαχωρισμός μεταξύ των επαναλήψεων ανάλογα με τις επεμβάσεις, ενώ η επέμβαση με το βιοδιεγέρτη ProAct παρουσιάζει σαφή διαχωρισμό σε σχέση με το Ολίνο Plus και το μάρτυρα (**Εικόνα 35**). Τέλος, στην (**Εικόνα 36**) παρουσιάζεται η επίδραση των μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό μεταξύ των δενδρυλλίων ελιάς που δέχτηκαν τις διαφορετικές επεμβάσεις, με τις υψηλότερες τιμές να αντιστοιχούν στους μεταβολίτες που είχαν τη μεγαλύτερη βαρύτητα στον παραπάνω διαχωρισμό.



Εικόνα 34 OPLS-DA scoreplot για το διαχωρισμό των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ των δενδρυλλίων ελιάς (Olivo Plus: (O+), ProAct: (PRO), Control: (C)). Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T^2 σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Principal Components, Κύριες Συνιστώσες). Υποπολλαπλάσια τμήματα κάθε βιολογικής αντιγραφής συνδυάστηκαν για να ληφθούν δείγματα ελέγχου ποιότητας (QC). Η επαναληψιμότητα της πειραματικής διαδικασίας και των αναλύσεων αποδεικνύεται από τις υψηλές τιμές των συντελεστών συσχέτισης $R^2X_{(cum)}=0,55$, $R^2Y_{(cum)}=0,917$ και την τιμή της προγνωστικής ικανότητας $Q^2_{(cum)}=0,86$.



Εικόνα 35 Το αντίστοιχο δένδρογραμμα ιεραρχικής ανάλυσης (HCA) το οποίο προέκυψε με εφαρμογή της μεθόδου Ward.



Εικόνα 36 VIP plot για την επίδραση των μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό μεταξύ δενδρυλλίων ελιάς (*O. europaea* L. var *Koroneiki*) που δέχτηκαν επέμβαση με αποστειρωμένο νερό (Control) και με τους βιοδιεγέρτες ProAct και Ολίνο Plus. Υψηλότερες τιμές αντιστοιχούν σε μεταβολίτες με μεγαλύτερη βαρύτητα στον παραπάνω διαχωρισμό.

4.3.3. Η επέμβαση με τα σκευάσματα βιοδιεγερτών Olivo Plus και ProAct είχε σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό των δενδρυλλίων ελιάς (*O. europaea* L.)

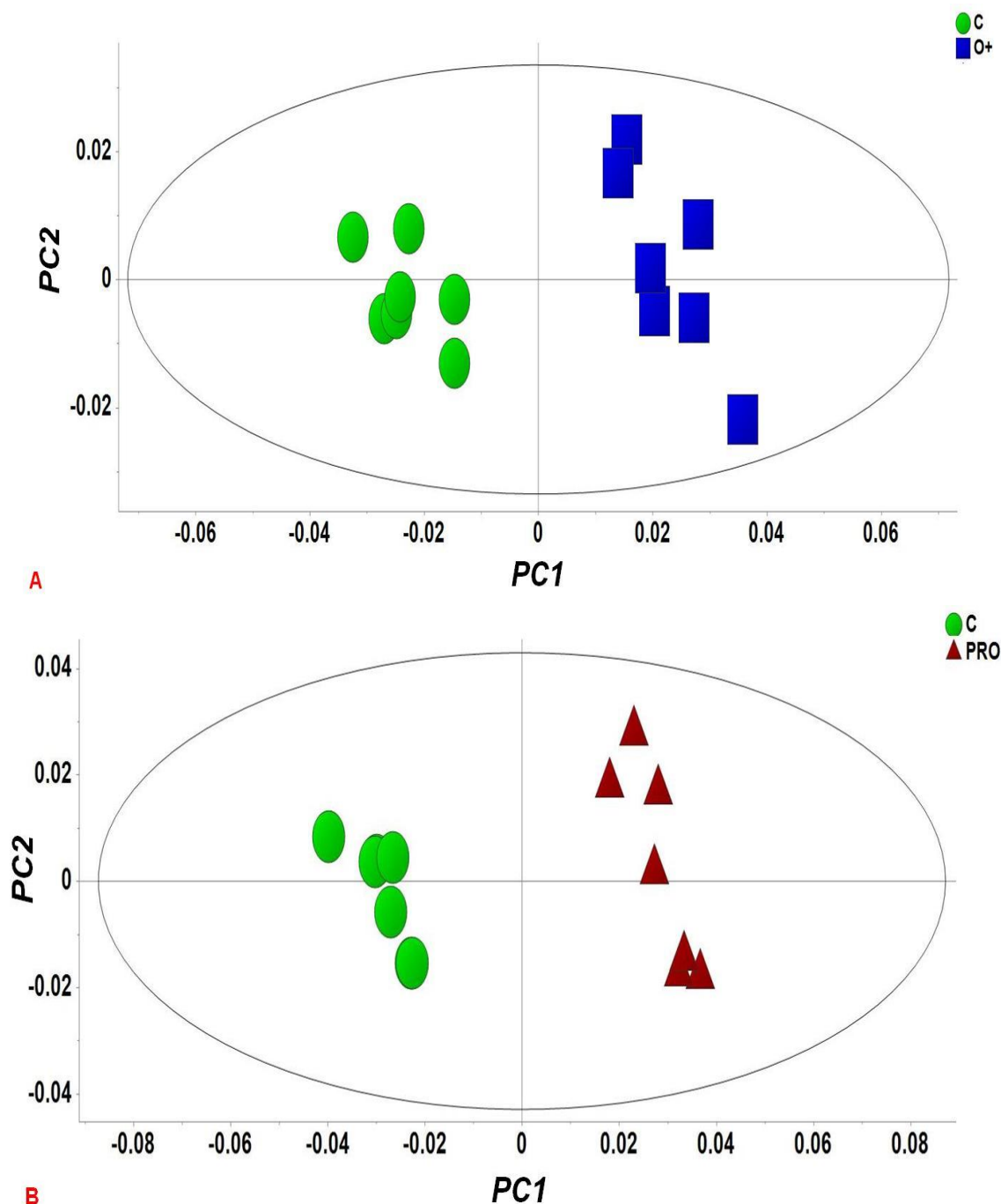
Προκειμένου να αξιολογηθεί συγκριτικά η επίδραση των σκευασμάτων βιοδιεγερτών Olivo Plus και ProAct στο μεταβολισμό των δενδρυλλίων ελιάς, πραγματοποιήθηκε OPLS-DA ανάλυση ανά ζεύγη (pairwise analysis), με την ποιότητα των πειραματικών και βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν να επιβεβαιώνονται και σε αυτή την περίπτωση.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατέδειξαν τις διαφορές στα μεταβολικά προφίλ μεταξύ των δενδρυλλίων στα οποία έγινε επέμβαση με βιοδιεγέρτες και των δενδρυλλίων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Παράλληλα, παρατηρήθηκε στενή ομαδοποίηση των βιολογικών επαναλήψεων μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας επέμβασης **(Εικόνες 37 A-B)**. Από την ανάλυση, διαπιστώθηκε η σημαντική επίδραση των σκευασμάτων στο μεταβολισμό των δενδρυλλίων της ελιάς.

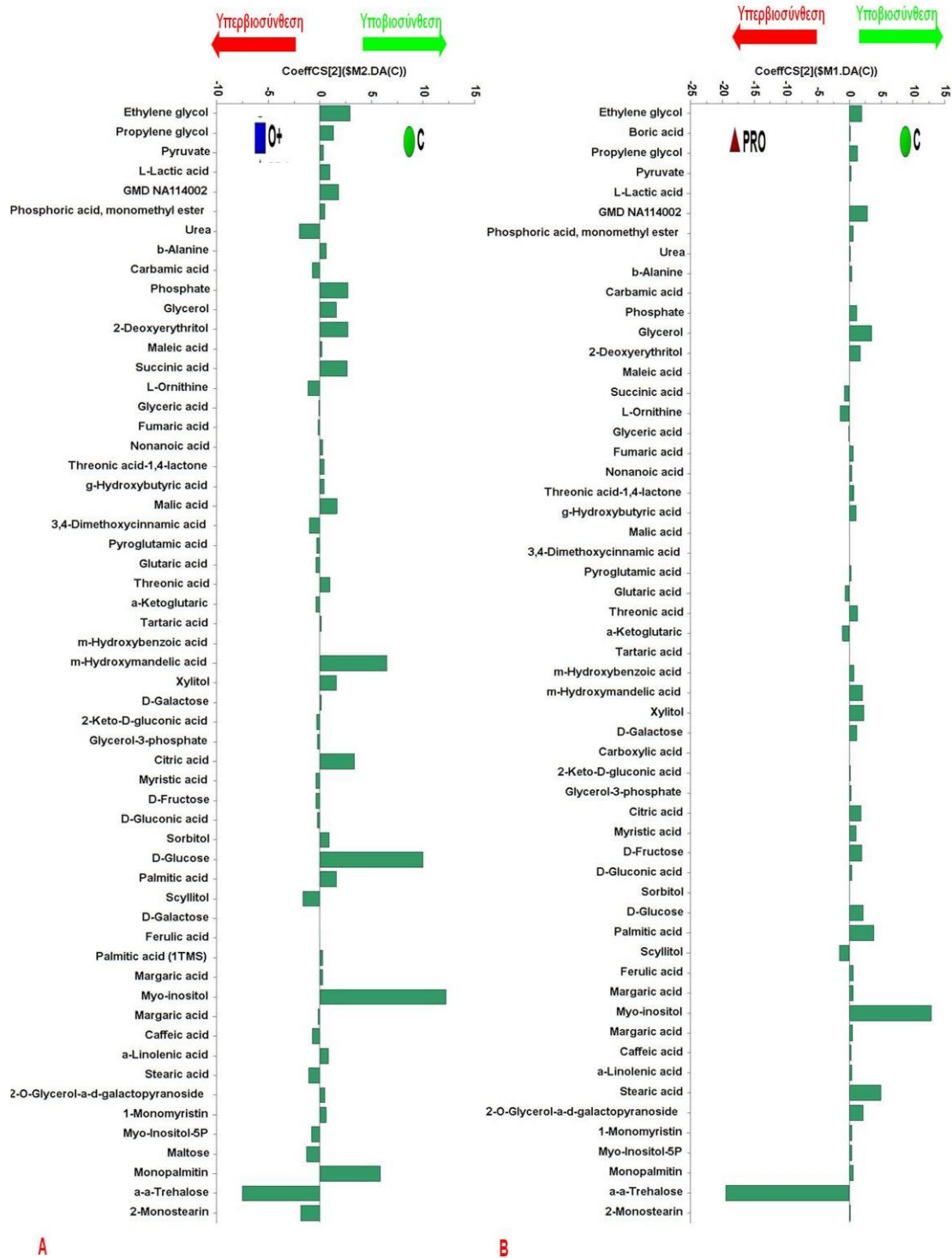
Συγκεκριμένα, όσον αφορά το Olivo Plus, 22 καταγεγραμμένοι μεταβολίτες υποβιοσυντέθηκαν, 31 υπερ-βιοσυντέθηκαν, ενώ μόλις 3 μεταβολίτες εμφάνισαν κοινή αντίδραση στην επέμβαση με το παραπάνω σκεύασμα **(Εικόνα 38A)**.

Αντίστοιχα, για το ProAct, 7 καταγεγραμμένοι μεταβολίτες ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερες σχετικές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το μάρτυρα (υποβιοσυντέθηκαν), 40 σε υψηλότερες (υπερ-βιοσυντέθηκαν), ενώ μόλις 8 μεταβολίτες εμφάνισαν κοινή αντίδραση στην επέμβαση με το παραπάνω σκεύασμα **(Εικόνα 38B)**.

Οι μεταβολίτες που υπερ-βιοσυντέθηκαν και στις δύο περιπτώσεις ήταν οι ethylene glycol, propylene glycol, pyruvate, phosphoric acid-monomethyl ester, β -alanine, phosphate, glycerol, 2-Deoxyerythritol, nonanoic acid, threonic acid-1,4-lactone, g-Hydroxybutyric acid, threonic acid, m-hydroxymandelic acid, xyllitol, d-galactose, citric acid, d-glucose, palmitic acid, myo-inositol, α -linolenic acid, 2-O-glycerol- α -d-galactopyranoside, 1-monomyristin, monopalmitin. Αντίθετα, υποβιοσυντέθηκαν οι μεταβολίτες L-ornithine, glyceric acid, glutaric acid, α -ketoglutaric, scyllitol και α,α -trehalose.



Εικόνα 37 OPLS-DA score plot (pairwise analysis) για το διαχωρισμό των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ μεταξύ των δενδρυλλίων ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (C) και αυτών στα οποία έγινε επέμβαση με Olivo Plus (O+) (**A**) και ProAct (PRO) (**B**). Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T^2 σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Components). Η επαναληψιμότητα της πειραματικής διαδικασίας και των αναλύσεων αποδεικνύεται από τις υψηλές τιμές των συντελεστών συσχέτισης $R^2X_{(cum)}=0.564$, $R^2Y_{(cum)}=0.965$ και την τιμή της προγνωστικής ικανότητας $Q^2_{(cum)}=0.86$ (**A**) και $R^2X_{(cum)}=0.652$, $R^2Y_{(cum)}=0.988$ και την τιμή της προγνωστικής ικανότητας $Q^2_{(cum)}=0.961$ (**B**).



Εικόνα 38 Coefficient Plots με τις αντίστοιχες τιμές Coefficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ του μάρτυρα (C) και του Olivo Plus (O+) (A) και του μάρτυρα και του ProAct (PRO) (B), 96 h μετά τις επεμβάσεις. Οι απόλυτες τιμές των συντελεστών (coefficient) είναι ανάλογες τις βαρύτητας των αντίστοιχων μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης προέρχονται από jack-knifing (95%). Θετικές τιμές αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που υπο-βιοσυντέθηκαν (πράσινο βέλος) ενώ αρνητικές τιμές σε αυτούς που υπερ-βιοσυντέθηκαν (κόκκινο βέλος), ως αντίδραση στην επέμβαση με τον κάθε βιοδιεγέρτη.

4.3.4. Μεταβολίτες-βιοσημαντές της επίδρασης των βιοδιεγερτών που εφαρμόστηκαν στα δένδρύλλια ελιάς

Η ενδελεχής μελέτη του πλήρους μεταβολικού προφίλ της ελιάς και το πώς αυτό επηρεάζεται από τις επεμβάσεις με τους βιοδιεγέρτες, ήταν εκτός του αντικειμένου της παρούσας μελέτης. Παρόλα αυτά, παρακάτω, συζητείται η επίδραση των επεμβάσεων σε επιλεγμένους μεταβολίτες οι οποίοι παίζουν κομβικό ρόλο στη φυσιολογία του φυτού, είτε ως σήματα είτε ως λειτουργικοί μεταβολίτες. Ανάμεσα σε αυτούς είναι οι μεταβολίτες β -alanine, α -linolenic acid, ferulic acid, caffeic acid, myo-inositol και α,α -trehalose, όπως παρουσιάζεται παρακάτω.

4.3.4.1. Μεταβολίτες-σήματα

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το μεταβολισμό του φυτού παρουσιάζουν μεταβολίτες οι οποίοι πλέον της συμμετοχής τους στις βιοσυνθετικές οδούς του, λειτουργούν ως σήματα. Από την ανάλυση ταυτοποιήθηκαν δύο τέτοιοι μεταβολίτες, οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο λειτουργώντας ως σήματα, η β -alanine και το α -linolenic acid.

Η β -alanine είναι αμινοξύ το οποίο ενσωματώνεται στο panthoetic acid (πανθοθενικό οξύ) και ως εκ τούτου είναι μία πρόδρομη ένωση του συνενζύμου A (Coenzyme A, CoA) και της ακυλ-μεταφορικής πρωτεΐνης (acyl-carrier protein), ουσίες που δεσμεύουν τον άνθρακα στα κύτταρα (Parthasarathy et al., 2019). Συμμετέχει στη σύνθεση των φωσφολιπιδίων, τη σύνθεση και την αποδόμηση των λιπαρών οξέων και τη λειτουργία του κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle), ενώ τα φυτά την χρησιμοποιούν και στο δευτερογενή μεταβολισμό, περιλαμβανομένης της διαδικασίας βιοσύνθεσης της λιγνίνης (Broeckling et al., 2005). Επιπρόσθετα, η β -alanine εμπλέκεται σε αντιδράσεις των φυτών σε καταπονήσεις. Για παράδειγμα, τόσο η ξηρασία όσο και η θερμική καταπόνηση βρέθηκε να προκαλούν αύξησή της στο φυτό της αραβίδοψης (*Arabidopsis thaliana*) (Kaplan et al., 2004, Rizhsky et al., 2004), ενώ σε μεταβολομική ανάλυση του ίδιου φυτού, ως αντίδραση στην καταπόνηση βαρέων μετάλλων, ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα β -alanine, L-alanine και άλλων μεταβολιτών (Sun et al., 2010). Τέλος, διάφορες βιοτικές και αβιοτικές

καταπονήσεις σε καλλιέργειες κυτάρων *Medicago truncatula*, οδήγησαν σε αυξημένα επίπεδα β -alanine, υποδηλώνοντας αλλαγές στον μεταβολισμό του CoA (Broeckling et al., 2005).

Το α -linolenic acid (18:3) αποτελεί πρόδρομη ουσία του jasmonic acid, το οποίο εμπλέκεται στη σηματοδότηση (signaling) κατά την αντίδραση των φυτών σε καταπονήσεις από παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το ψύχος και η όσμωση (Wasternack, 2014). Αποτελεί, ακολούθως, πρόδρομο του oxylipin pathway (Mata-Pérez et al., 2015), μέσω του οποίου συντίθενται οι οξυλιπίνες. Πρόκειται για προϊόντα οξείδωσης και περαιτέρω μετατροπών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, κυρίως του linoleic acid και του α -linolenic acid, τα οποία ρυθμίζουν το μηχανισμό άμυνας στα φυτά (Creelman and Mulruri, 2002).

Ειδικότερα, προκειμένου τα φυτά να ανταπεξέλθουν σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, αναδιαμορφώνουν τη ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών (remodeling membrane fluidity), απελευθερώνοντας α -linolenic acid από τα λιπίδιά τους. Σημαντικό είναι, επίσης, το γεγονός ότι διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας της μεμβράνης και της λειτουργικότητας ενσωματωμένων πρωτεϊνών της, όπως αυτών που σχηματίζουν το φωτοσυνθετικό μηχανισμό, επομένως, η μείωση της συγκέντρωσής του έχει σημαντικό αντίκτυπο στη φωτοσύνθεση (Urchurch, 2008).

Παρά το γεγονός ότι ο ρόλος του jasmonic acid έχει μελετηθεί σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, εντούτοις ο ρόλος του α -linolenic acid στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε περιπτώσεις αβιοτικών καταπονήσεων (π.χ. οξείδωσης), παραμένει ακόμα ελάχιστα κατανοητός (Mata-Pérez et al., 2015).

Η GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση έδειξε ότι τόσο η επέμβαση με το βιοδιεγέρτη ProAct όσο και με το βιοδιεγέρτη Olivo Plus, μειώνει τη σχετική περιεκτικότητα των φύλλων ελιάς στους μεταβολίτες β -alanine και α -linolenic acid. Συγκεκριμένα, με εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης οι αντίστοιχες τιμές Coefficient (CoeffCS) υπολογίστηκαν για τη β -alanine σε $\text{CoeffCS}[\text{PRO}] = -0,43$ και $\text{CoeffCS}[\text{O}+] = -0,60$ ενώ για το α -linolenic acid σε $\text{CoeffCS}[\text{PRO}] = -0,43$ και $\text{CoeffCS}[\text{O}+] = -0,83$.

Παρόλο που η παρατηρούμενη μείωση της περιεκτικότητας φύλλων ελιάς στους συγκεκριμένους μεταβολίτες δεν θεωρείται σημαντική, εντούτοις ενδέχεται να υποδηλώνει ότι οι φυσιολογικές διεργασίες για τις όποιες αποτελούν σήματα δεν επηρεάζονται από την εφαρμογή των δύο βιοδιεγερτών. Για την πλήρη κατανόηση

του φαινομένου φαίνεται ότι απαιτούνται δεδομένα από επιπλέον <<ομικές>> αναλύσεις στα πλαίσια της βιολογίας συστημάτων (systems biology). Είναι πιθανόν, ωστόσο, η μείωση αυτή να επηρεάζει την ικανότητα αντίδρασης του φυτού σε καταπονήσεις αλλά και τη δυνατότητα δέσμευσης του άνθρακα στα κύτταρα και παραγωγής του jasmonic acid, δεδομένου της συμμετοχής τους σε αυτές τις διαδικασίες, όπως προαναφέρθηκε.

4.3.4.2. Φαινολικές ουσίες

Οι φαινολικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένων των φαινυλοπροπανοειδών και των φλαβονοειδών, αποτελούν τους σημαντικότερους δευτερογενείς μεταβολίτες που βιοσυντίθενται από τα φυτά (Riaz et al., 2019). Ανάμεσα σε αυτούς που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, περιλαμβάνονται το ferulic acid (φερουλικό οξύ) και το caffeic acid (καφεϊκό οξύ), οι οποίοι σχολιάζονται παρακάτω.

Το ferulic acid προκύπτει από το μεταβολισμό της phenylalanine και της tyrosine (Turner and Rice, 1975) η οποία παράγεται στα φυτά από την αμμωνιάλυση της φαινυλαλανίνης (phenylalanine ammonia lyase, PAL), μέσω της οδού του σικιμικού οξέος (shikimate pathway) (Graf, 1992). Βρίσκεται σε υψηλή σχετική συγκέντρωση στα κυτταρικά τοιχώματα ενός μεγάλου αριθμού φυτών (Mathew and Abraham, 2004) και ως φαινολική ουσία, συμμετέχει στην προστασία των κυττάρων έναντι ενεργών μορφών οξυγόνου (reacting oxygen species, ROS), την προστασία των λιπιδίων από υπεροξειδωση και τη σταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών (Michalak, 2006). Ειδικότερα, σχετίζεται με τη ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών, τις αντιοξειδωτικές δραστηριότητες και τις κυτταροτοξικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Saleh et al., 2015), ενώ στη δράση του περιλαμβάνεται η παρεμπόδιση της εισόδου των παθογόνων στους φυτικούς ιστούς (Hartley and Jones, 1977) και η αδρανοποίηση ιών (Sridhar et al., 1979). Ακόμα, η άμεση τοξικότητά του μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενάντια στις προσβολές από έντομα αλλά και ως αντιβιοτικό (Beschta et al., 1982, Cabrera et al., 1995).

Παρόμοιος είναι και ο ρόλος του caffeic acid, το οποίο εμπλέκεται κυρίως στη σύνθεση της λιγνίνης, ως βασική πρόδρομη ουσία, αλλά και σε διαδικασίες όπως η ρύθμιση της ανάπτυξης των κυττάρων (regulation of cell expansion), η σπαργή

(turgor pressure), ο φωτοτροπισμός, η ροή του νερού (water flux) και η ανάπτυξη (Lattanzio et al., 2006). Βάσει της βιβλιογραφίας, το caffeic acid αποτελεί μεταβολίτη ο οποίος ενισχύει την αντοχή των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις, κυρίως λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής του δράσης και της ρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ειδικότερα, ρυθμίζει την παραγωγή ROS σε φυτικά κύτταρα (Bubna et al., 2011) και προστατεύει τα κυτταρικά οργανίδια (cell organelles) αποτρέποντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων των μεμβρανών τους (μέσω της καταστολή της δράσης της λιποξυγενάσης) (Gutteridge, 1995).

Από την ανάλυση, προέκυψε μείωση της σχετικής συγκέντρωσης των φύλλων ελιάς στους παραπάνω μεταβολίτες κατά την επέμβαση με το βιοδιεγέρτη ProAct, με τιμές $\text{CoeffCS}[\text{PRO}] = -0,64$ για το ferulic acid και $\text{CoeffCS}[\text{PRO}] = -0,25$ για το caffeic acid. Αντίθετα, αύξηση προέκυψε κατά την επέμβαση με το Olivo Plus με τις τιμές να διαμορφώνονται σε $\text{CoeffCS}[\text{O}+] = +0,76$ και $\text{CoeffCS}[\text{O}+] = +0,06$ για τους παραπάνω μεταβολίτες, αντίστοιχα. (θετικές τιμές αντιστοιχούν σε αύξηση και αρνητικές τιμές σε μείωση της σχετικής συγκέντρωσης των φύλλων ελιάς στους μεταβολίτες κατά τις επεμβάσεις με τους δύο βιοδιεγέρτες).

Παρά το γεγονός ότι και σε αυτή την περίπτωση οι μεταβολές στην περιεκτικότητα των εν λόγω μεταβολιτών δεν φαίνεται να είναι σημαντικές, εντούτοις η αύξηση των επιπέδων και των δυο μεταβολιτών κατά την επέμβαση με Olivo Plus είναι πιθανόν να οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας των δενδρυλλίων σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι HrpN μπορούν να ενεργοποιούν ένζυμα όπως η PAL (Ruiz-García and Gómez-Plaza, 2013), η οποία με τη σειρά της συνδέεται με την αντίδραση σε βιοτικά και αβιοτικά ερεθίσματα (Diallinas and Kanellis, 1994, Keleş and Öncel, 2002), ενδεχομένως να υποδηλώνει την επίδραση του ProAct στην αντίδραση των δενδρυλλίων σε παρόμοιες καταπονήσεις.

4.3.4.3 Υδατάνθρακες

Κύρια λειτουργία των υδατανθράκων αποτελεί η παροχή ενέργειας στο φυτό, ενώ επιπρόσθετα είναι γνωστός και ο σημαντικός ρόλος τους ως μεταβολίτες-σήματα, με τρόπο παρόμοιο με τις ορμόνες (Sheen et al., 1999, Rolland et al., 2006). Οι υδατάνθρακες χαρακτηρίζονται, επίσης, ως παράγοντες ενός σύνθετου συστήματος επικοινωνίας απαραίτητο για τον συντονισμό του μεταβολισμού με την

ανάπτυξη, την ανάπτυξη και τις αντιδράσεις σε μεταβολές περιβαλλοντικών παραγόντων και καταπονήσεων (Rolland et al., 2006). Μεταξύ των υδατανθράκων που ταυτοποιήθηκαν, περιλαμβάνονται η myo-inositol και η α,α -trehalose, των οποίων ο πιθανός ρόλος συζητείται.

Οι inositols αποτελούν ομάδα ενώσεων που συναντάται ευρέως στο βιολογικό βασίλειο με τους μεταβολίτες τους να λειτουργούν είτε ως ενδιάμεσοι μεταβολίτες/πρόδρομες ουσίες (metabolic mediators) είτε να συμμετέχουν σε διάφορες σηματοδοτικές οδούς ως αντίδραση στις καταπονήσεις, τις ορμόνες και τα θρεπτικά συστατικά (Valluru and Van den Ende, 2011). Κεντρική θέση στο μεταβολισμό τους κατέχει η myo-inositol (Loewus and Murthy, 2000). Συγκεκριμένα, η myo-inositol (και τα παράγωγά της), συμμετέχουν σε βασικές λειτουργίες των φυτικών κυττάρων όπως η μεταφορά σημάτων (Thole and Nielsen, 2008)[9], η μεταφορά συστατικών των μεμβρανών (membrane trafficking) (Thole and Nielsen, 2008), η εξαγωγή mRNA (Sheveleva et al., 1997, Sengupta et al., 2008), η αντοχή στις καταπονήσεις (Sheveleva et al., 1997, Sengupta et al., 2008) αλλά και η αποθήκευση φωσφόρου (Stevenson-Paulik et al., 2005, Murphy et al., 2008, Thole and Nielsen, 2008). Σημαντικό είναι, επίσης, το στοιχείο ότι η myo-inositol μπορεί να συζευχθεί με αυξίνες, αποτρέποντας τη βιολογική δραστηριότητα και επιτρέποντας τη μεταφορά μεγάλων αποστάσεων εντός του φυτού (Cohen and Bandurski, 1982). Επιπρόσθετα, το κύριο προϊόν διάσπασης της myo-inositol, το d-glucuronic acid, χρησιμοποιείται στη σύνθεση διαφόρων πηκτινών και μη κυτταρινικών ενώσεων του κυτταρικού τοιχώματος και στη σύνθεση του ascorbic acid (Sasaki et al., 1989, Loewus and Murthy, 2000, Lorence et al., 2004, Loewus, 2006).

Η α,α -trehalose αποτελεί μη αναγωγικό δισακχαρίτη ο οποίος συναντάται σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών, περιλαμβανομένων των μυκήτων, των βακτηρίων και των φυτών (Elbein et al., 2003). Όσον αφορά τα φυτά, συνδέεται με μια σειρά διαδικασιών όπως η ανάπτυξη εμβρύων και φύλλων (Eastmond et al., 2002, Gómez et al., 2006), η κυτταρική διαίρεση και η σύνθεση κυτταρικών τοιχωμάτων (Gómez et al., 2006), η διαμόρφωση των ταξιανθιών (Sato-Nagasawa et al., 2006) και ο μεταβολισμός του αμύλου (Sato-Nagasawa et al., 2006). Επιπρόσθετα, συμμετέχει στην αντίδραση σε διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως το ψύχος και η αλατότητα, καθώς και σε λειτουργίες όπως η ρύθμιση της στοματικής αγωγιμότητας και της αποδοτικότητας της χρήσης του

νερού (John et al., 2017). Σε μελέτες *in vitro* έχει βρεθεί ότι η α,α -trehalose προστατεύει τις μεμβράνες και τις πρωτεΐνες από την αποικοδόμηση (Crowe et al., 1998, Magazù et al., 2012). Επιπρόσθετα, *in vivo* έχει αποδειχθεί ότι η ουσία αυτή, σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα από την μετουσίωση (Crowe, 2007, Chen et al., 2009). Σε διάφορους ανυδρόβιους οργανισμούς, περιλαμβανομένων και ορισμένων φυτών, τα υψηλά επίπεδα α,α -trehalose (πάνω από το 10% του ξηρού βάρους) δίνουν τη δυνατότητα επιβίωσής τους από διάφορες καταπονήσεις όπως η πλήρης αφυδάτωση (Singer and Lindquist, 1998, Iturriaga et al., 2000), η θερμοκρασία και το οξειδωτικό στρες (Parrou et al., 1997, Bonini et al., 2004).

Παρόλο που υπάρχουν κοινοί μηχανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις, και ως εκ τούτου η α,α -trehalose αναμένεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην αντίδραση σε μεταβολές βιοτικών παραγόντων, λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σήμερα αν και υπάρχουν αναφορές που δείχνουν ότι θα μπορούσε να λειτουργεί αντιφατικά (Fujita et al., 2006, Fernandez et al., 2010).

Όσον αφορά την παρούσα μελέτη, ενδιαφέρον αποτελεί η μειωμένη περιεκτικότητα των φύλλων που αναλύθηκαν σε myo-inositol, τόσο κατά την επέμβαση με το ProAct όσο και με το Olivo Plus, με τις αντίστοιχες τιμές $\text{CoeffCS}[\text{PRO}] = -12,89$ και $\text{CoeffCS}[\text{O+}] = -12,23$. Οι προκύπτουσες τιμές είναι στατιστικά σημαντικές και δεδομένου του ρόλου της myo-inositol, όπως αναφέρεται παραπάνω, η μείωση της περιεκτικότητας σε αυτό το μεταβολίτη, πιθανόν να σχετίζεται με μειωμένη ικανότητα του φυτού να ανταπεξέλθει σε βασικές φυσιολογικές διεργασίες όπως η αντοχή στις καταπονήσεις.

Όσον αφορά την α,α -trehalose, η αύξηση που παρατηρήθηκε κατά την επέμβαση με Olivo Plus ($\text{CoeffCS}[\text{O+}] = +7,5$), δεδομένου του ρόλου του μεταβολίτη αυτού στην κυτταρική διαίρεση, στη συμμετοχή σε αντιδράσεις σε αβιοτικές καταπονήσεις αλλά και στη ρύθμιση αποδοτικότητας της χρήσης του νερού, είναι ένα θετικό στοιχείο το οποίο μπορεί να σημαίνει ότι τα δενδρύλλια στα οποία εφαρμόστηκε ο συγκεκριμένος βιοδιεγέρτης είναι πιο ανθεκτικά σε αβιοτικές καταπονήσεις. Το αντίθετο πιθανόν να συμβαίνει στα δενδρύλλια στα οποία έγινε επέμβαση με ProAct, καθώς παρατηρήθηκε μείωση της περιεκτικότητας α,α -trehalose κατά 7,5 ($\text{CoeffCS}[\text{O+}] = +7,5$).

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα

Η καλλιέργεια της ελιάς αποτελεί το βασικότερο πυλώνα του γεωργικού τομέα της χώρας μας καθώς διεισδύει σε πολλαπλά κοινωνικά επίπεδα και σε πολλές οικονομικές δραστηριότητες, συνεισφέροντας σημαντικά στην εθνική οικονομία. Εντούτοις, στα διαχρονικά προβλήματα τα οποία αντιμετωπίζει η ελληνική ελαιοκαλλιέργεια, έχει προστεθεί τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα από το 2016 και έπειτα, η μυκητολογική ασθένεια γλοιοσπόριο. Συγκεκριμένα, οι εκτεταμένες προσβολές που έχουν σημειωθεί σε αρκετές περιοχές ανά την Ελλάδα, έχουν ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση και την ποιοτική υποβάθμιση της παραγωγής επιτραπέζιων και ελαιοποιήσιμων ποικιλιών, αποτελώντας παράλληλα τροχοπέδη στην περαιτέρω ανάπτυξη του τομέα. Στο πλαίσιο αυτό, κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή προηγμένων βιοαναλυτικών μεθόδων για την πλήρη χαρτογράφηση της παραλλακτικότητας του γλοιοσπορίου σε όλο τον ελλαδικό χώρο, με στόχο την ανάπτυξη εξατομικευμένων, κατά περιοχή, προγραμμάτων φυτοπροστασίας έναντι της ασθένειας καθώς και η αξιολόγηση-μελέτη της δράσης σύγχρονων εναλλακτικών Φ.Π. (βιοδιεγέρτες), τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν επικουρικά με ήδη εγκεκριμένα Φ.Π. Για παράδειγμα, η απομόνωση στελεχών (μορφοτύπων) ανθεκτικών σε στρομπιλουρίνες είναι μία πληροφορία που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στην ανάπτυξη εναλλακτικών προγραμμάτων φυτοπροστασίας. Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης ενθαρρύνουν προς αυτή την κατεύθυνση, δίνοντας μια αξιοσημείωτη προοπτική. Εν τούτοις, απαιτείται πιο ενδελεχής μελέτη μεταβολικών-βιοσημαντών για το σχεδιασμό στρατηγικών φυτοπροστασίας όπως το hydroxyphenylacetic acid, ο οποίος φαίνεται να σχετίζεται με τη μολυσματική ικανότητα στελεχών του γλοιοσπορίου καθώς και περαιτέρω μελέτη της δράσης των βιοδιεγερτών, ως νέες βιοδραστικές πηγές. Κρίνεται, επομένως, αναγκαία η διεξαγωγή πειραμάτων μεγαλύτερης κλίμακας και η αξιοποίηση της σύγχρονης μεθόδου της μεταβολομικής ανάλυσης. Απώτερο στόχο αποτελεί η βελτιστοποίηση των μέτρων φυτοπροστασίας έναντι του γλοιοσπορίου, μέσω της οποίας θα διασφαλιστεί το εισόδημα των παραγωγών και θα δημιουργηθούν οι προϋποθέσεις για την αναβάθμιση του τομέα της ελαιοκαλλιέργειας και τη βελτίωση της διεθνούς ανταγωνιστικότητας της χώρας μας.

Παράρτημα

Αποτελέσματα φασματοφωτόμετρησης δειγμάτων DNA από στελέχη του γλοιοσπορίου

Sample ID	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Factor
PLS_82	876,1	ng/μl	17,523	10,053	1,74	0,81	50
PLS_92	2296,9	ng/μl	45,938	22,877	2,01	1,57	50
PLS_84	2038,1	ng/μl	40,762	20,529	1,99	1,38	50
PLS_91	2776,7	ng/μl	55,535	27,524	2,02	1,55	50
PLS_93	1590,5	ng/μl	31,811	17,225	1,85	1,07	50
PLS_86	3762,4	ng/μl	75,248	36,678	2,05	1,89	50
PLS_81	6107,5	ng/μl	122,149	59,011	2,07	2,12	50
PLS_86	4008,8	ng/μl	80,175	39,016	2,05	2,03	50
PLS_83	2729,9	ng/μl	54,598	26,822	2,04	1,79	50
PLS_85	9528	ng/μl	190,561	95,288	2	2,06	50
PLS_111	6422	ng/μl	128,44	62,655	2,05	2,04	50
PLS_111(Reblank)	6659,3	ng/μl	133,186	63,651	2,09	2,17	50
PLS_110	1224,8	ng/μl	24,496	13,536	1,81	0,96	50
PLS_109	4222,9	ng/μl	84,459	42,938	1,97	1,62	50
PLS_87	1967,5	ng/μl	39,351	21,664	1,82	1,04	50
PLS_90	1937,2	ng/μl	38,744	21,408	1,81	0,97	50
PLS_102	4544,2	ng/μl	90,885	45,622	1,99	1,59	50
PLS_88	3793,4	ng/μl	75,869	39,917	1,9	1,27	50

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdelfattah, A., M. G. L. D. Nicosia, S. O. Cacciola, S. Droby and L. Schena (2015). "Metabarcoding analysis of fungal diversity in the phyllosphere and carposphere of olive (*Olea europaea*)." PLoS One **10**(7): e0131069.

Alavanja, M. (2009). "Pesticides use and exposure extensive worldwide." Health **24**(4): 303-309.

Alexandratos, N. and J. Bruinsma (2012). World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision, ESA Working paper.

Aliferis, K. and S. Jabaji (2010). "¹H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of *Rhizoctonia solani* sclerotia." Metabolomics **6**(1): 96-108.

Aliferis, K. A., R. Chamoun and S. Jabaji (2015). "Metabolic responses of willow (*Salix purpurea* L.) leaves to mycorrhization as revealed by mass spectrometry and ¹H NMR spectroscopy metabolite profiling." Frontiers in Plant Science **6**: 344.

Aliferis, K. A. and M. Chrysayi-Tokousbalides (2011). "Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives." Metabolomics **7**(1): 35-53.

Aliferis, K. A., M. A. Cubeta and S. Jabaji (2013). "Chemotaxonomy of fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex performing GC/MS metabolite profiling." Metabolomics **9**(1): 159-169.

Aliferis, K. A. and S. Jabaji (2011). "Metabolomics—a robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: a review." Pesticide Biochemistry and physiology **100**(2): 105-117.

Aliferis, K. A. and S. Jabaji (2012). "FT-ICR/MS and GC-EI/MS metabolomics networking unravels global potato sprout's responses to *Rhizoctonia solani* infection." PLoS One **7**(8): e42576.

Allwood, J. W., D. I. Ellis and R. Goodacre (2008). "Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions." Physiologia Plantarum **132**(2): 117-135.

Almeida, J. V. d. (1899). "La gaffa des olives en Portugal." Bulletin de la Societé Mycologique de France, Tome XV, fasc. 2, 1899, p. 90.

Alseekh, S., L. Bermudez, L. A. De Haro, A. R. Fernie and F. Carrari (2018). "Crop metabolomics: from diagnostics to assisted breeding." Metabolomics **14**(11): 148.

Andersen, B., A. Dongo and B. M. Pryor (2008). "Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*." Mycological Research **112**(2): 241-250.

Angelopoulou, D., E. Naska, E. Paplomatas and S. Tjamos (2014). "Biological control agents (BCAs) of verticillium wilt: influence of application rates and delivery

method on plant protection, triggering of host defence mechanisms and rhizosphere populations of BCAs." Plant pathology **63**(5): 1062-1069.

Aoki, H., T. Sassa and T. Tamura (1963). "Phytotoxic metabolites of *Rhizoctonia solani*." Nature **200**(4906): 575-575.

Arancon, N. Q., C. A. Edwards, S. Lee and R. Byrne (2006). "Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth." European journal of soil biology **42**: S65-S69.

Athar, M. (2005). "Infestation of olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, in California and taxonomy of its host trees." Agriculturae Conspectus Scientificus **70**(4): 135-138.

Ballio, A., A. Bottalico, V. Buonocore, A. Carilli, V. Di Vittorio and A. Graniti (1969). "Production and isolation of aspergillomarasin B (lycomarasmic acid) from cultures of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (*Gloeosporium olivarum* Aim.)." Phytopathologia Mediterranea: 187-196.

Banias, G., C. Achillas, C. Vlachokostas, N. Moussiopoulos and M. Stefanou (2017). "Environmental impacts in the life cycle of olive oil: a literature review." Journal of the Science of Food and Agriculture **97**(6): 1686-1697.

Bartz, F. E., N. J. Glassbrook, D. A. Danehower and M. A. Cubeta (2012). "Elucidating the role of the phenylacetic acid metabolic complex in the pathogenic activity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 3." Mycologia **104**(4): 793-803.

Bassil, K. L., C. Vakil, M. Sanborn, D. Cole, J. S. Kaur and K. Kerr (2007). "Cancer health effects of pesticides: systematic review." Canadian Family Physician **53**(10): 1704-1711.

Battacharyya, D., M. Z. Babgohari, P. Rathor and B. Prithviraj (2015). "Seaweed extracts as biostimulants in horticulture." Scientia Horticulturae **196**: 39-48.

Bauer, D. W., Z.-M. Wei, S. V. Beer and A. Collmer (1995). "*Erwinia chrysanthemi* Harpin_{Ech}: An Elicitor of the Hypersensitive Response that Contributes to Soft-Rot Pathogenesis." Molecular Plant Microbe Interactions **8**: 484-484.

Bekele, E. A., C. E. Annaratone, M. L. Hertog, B. M. Nicolai and A. H. Geeraerd (2014). "Multi-response optimization of the extraction and derivatization protocol of selected polar metabolites from apple fruit tissue for GC-MS analysis." Analytica chimica acta **824**: 42-56.

Bernardes, M. F. F., M. Pazin, L. C. Pereira and D. J. Dorta (2015). "Impact of pesticides on environmental and human health." Toxicology studies-cells, drugs and environment: 195-233.

Beschia, M., A. Leonte and I. Oancea (1982). "Phenolic components with biological activity in vegetable extracts." Bulletin of the University of Galati **6**(5): 59-63.

Bitterlich, M., Y. Roupael, J. Graefe and P. Franken (2018). "Arbuscular mycorrhizas: a promising component of plant production systems provided favorable conditions for their growth." Frontiers in Plant Science **9**: 1329.

Blunden, G., T. Jenkins and Y.-W. Liu (1996). "Enhanced leaf chlorophyll levels in plants treated with seaweed extract." Journal of applied phycology **8**(6): 535-543.

Bonini, B., P. Van Dijck and J. Thevelein (2004). Trehalose metabolism: enzymatic pathways and physiological functions. Biochemistry and Molecular Biology, Springer: 291-332.

Brakhage, A. A. (2013). "Regulation of fungal secondary metabolism." Nature Reviews Microbiology **11**(1): 21.

Broeckling, C. D., D. V. Huhman, M. A. Farag, J. T. Smith, G. D. May, P. Mendes, R. A. Dixon and L. W. Sumner (2005). "Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism." Journal of experimental botany **56**(410): 323-336.

Brosché, M., B. Vinocur, E. R. Alatalo, A. Lamminmäki, T. Teichmann, E. A. Ottow, D. Djilianov, D. Afif, M.-B. Bogeat-Triboulot and A. Altman (2005). "Gene expression and metabolite profiling of *Populus euphratica* growing in the Negev desert." Genome biology **6**(12): R101.

Bubna, G. A., R. B. Lima, D. Y. L. Zanardo, W. D. Dos Santos, M. d. L. L. Ferrarese and O. Ferrarese-Filho (2011). "Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*)." Journal of plant physiology **168**(14): 1627-1633.

Bulgari, R., G. Cocetta, A. Trivellini, P. Vernieri and A. Ferrante (2015). "Biostimulants and crop responses: a review." Biological Agriculture & Horticulture **31**(1): 1-17.

Bundy, J. G., M. P. Davey and M. R. Viant (2009). "Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives." Metabolomics **5**(1): 3.

Burketova, L., L. Trda, P. G. Ott and O. Valentova (2015). "Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens." Biotechnology advances **33**(6): 994-1004.

Cabrera, H., O. Munoz, G. Zuniga, L. Corcuera and V. Argandona (1995). "Changes in ferulic acid and lipid content in aphid-infested barley." Phytochemistry **39**(5): 1023-1026.

Cacciola, S., G. E. Agosteo and L. Schena (2011). "Olive diseases and disorders."

Cacciola, S., R. Faedda, F. Sinatra, G. Agosteo, L. Schena, S. Frisullo and G. M. di San Lio (2012). "Olive anthracnose." Journal of Plant Pathology **94**(1): 29-44.

Calvo, P., L. Nelson and J. W. Kloepper (2014). "Agricultural uses of plant biostimulants." Plant and soil **383**(1-2): 3-41.

Candido, V., G. Campanelli, T. D'Addabbo, D. Castronuovo, M. Renco and I. Camele (2013). "Growth and yield promoting effect of artificial mycorrhization combined with different fertiliser rates on field-grown tomato." Italian Journal of Agronomy: e22-e22.

Canellas, L. P., F. L. Olivares, N. O. Aguiar, D. L. Jones, A. Nebbioso, P. Mazzei and A. Piccolo (2015). "Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture." Scientia Horticulturae **196**: 15-27.

Caradonia, F., V. Battaglia, L. Righi, G. Pascali and A. La Torre (2019). "Plant biostimulant regulatory framework: prospects in europe and current situation at international level." Journal of Plant Growth Regulation **38**(2): 438-448.

Carlucci, A., F. LoPs, G. Marchi, L. MUGnAi and G. Surico (2013). "Has *Xylella fastidiosa* "chosen" olive trees to establish in the Mediterranean basin?" Phytopathologia Mediterranea: 541-544.

Carvalho, F. P. (2017). "Pesticides, environment, and food safety." Food and Energy Security **6**(2): 48-60.

Casadesús, A., J. Polo and S. Munné-Bosch (2019). "Hormonal Effects of an Enzymatically Hydrolyzed Animal Protein-Based Biostimulant (Pepton) in Water-Stressed Tomato Plants." Frontiers in Plant Science **10**(758).

Charkowski, A. O., J. R. Alfano, G. Preston, J. Yuan, S. Y. He and A. Collmer (1998). "The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate." Journal of bacteriology **180**(19): 5211-5217.

Chattaoui, M., M. Raya, M. Bouri, J. Moral, M. Perez-Rodriguez, A. Trapero, M. Msallem and A. Rhouma (2016). "Characterization of a *Colletotrichum* population causing anthracnose disease on olive in northern Tunisia." Journal of applied microbiology **120**(5): 1368-1381.

Chen, W., X. Zhang, M. Liu, J. Zhang, Y. Ye, Y. Lin, J. Luyckx and J. Qu (2009). "Trehalose protects against ocular surface disorders in experimental murine dry eye through suppression of apoptosis." Experimental eye research **89**(3): 311-318.

Colla, G., L. Hoagland, M. Ruzzi, M. Cardarelli, P. Bonini, R. Canaguier and Y. Rouphael (2017). "Biostimulant action of protein hydrolysates: unraveling their effects on plant physiology and microbiome." Frontiers in Plant Science **8**: 2202.

Colla, G., S. Nardi, M. Cardarelli, A. Ertani, L. Lucini, R. Canaguier and Y. Rouphael (2015). "Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture." Scientia Horticulturae **196**: 28-38.

Colla, G. and Y. Rouphael (2015). "Biostimulants in horticulture." Scientia Horticulturae(196): 1-2.

Colla, G., Y. Rouphael, R. Canaguier, E. Svecova and M. Cardarelli (2014). "Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis." Frontiers in Plant Science **5**: 448.

-
- Colla, G., Y. Roupael, E. Di Mattia, C. El-Nakhel and M. Cardarelli (2015). "Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops." Journal of the Science of Food and Agriculture **95**(8): 1706-1715.
- Cook, D., S. Fowler, O. Fiehn and M. F. Thomashow (2004). "A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(42): 15243-15248.
- Craigie, J. S. (2011). "Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture." Journal of Applied Phycology **23**(3): 371-393.
- Cramer, G. R., A. Ergül, J. Grimplet, R. L. Tillett, E. A. Tattersall, M. C. Bohlman, D. Vincent, J. Sonderegger, J. Evans and C. Osborne (2007). "Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles." Functional & integrative genomics **7**(2): 111-134.
- Creelman, R. A. and R. Mulpuri (2002). "The oxylipin pathway in Arabidopsis." The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists **1**.
- Crowe, J. H. (2007). Trehalose as a "chemical chaperone". Molecular aspects of the stress response: chaperones, membranes and networks, Springer: 143-158.
- Crowe, J. H., J. F. Carpenter and L. M. Crowe (1998). "The role of vitrification in anhydrobiosis." Annual review of physiology **60**(1): 73-103.
- Damm, U., P. Cannon, J. Woudenberg and P. Crous (2012). "The *Colletotrichum acutatum* species complex." Studies in mycology **73**: 37-113.
- Dangl, J. L. and J. D. Jones (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." Nature **411**(6839): 826.
- Danner, M. A., S. A. Zolet Sasso, J. G. Sousa Medeiros, J. A. Marchese and S. M. Mazaro (2008). "Induction of resistance to brown-rot on peaches by elicitors use in post-harvest." PESQUISA AGROPECUARIA BRASILEIRA **43**(7): 793-799.
- de Araujo, J. S., I. F. Delgado and F. J. Paumgarten (2016). "Glyphosate and adverse pregnancy outcomes, a systematic review of observational studies." BMC Public Health **16**(1): 472.
- de Capdeville, G., S. V. Beer, C. B. Watkins, C. L. Wilson, L. O. Tedeschi and J. R. Aist (2003). "Pre-and post-harvest harpin treatments of apples induce resistance to blue mold." Plant Disease **87**(1): 39-44.
- De Pascale, S., Y. Roupael and G. Colla (2017). "Plant biostimulants: innovative tool for enhancing plant nutrition in organic farming." Eur. J. Hort. Sci **82**(6): 277-285.
- del Amor, F. M. and P. Cuadra-Crespo (2012). "Plant growth-promoting bacteria as a tool to improve salinity tolerance in sweet pepper." Functional Plant Biology **39**(1): 82-90.
-

Delcour, I., P. Spanoghe and M. Uyttendaele (2015). "Literature review: Impact of climate change on pesticide use." Food Research International **68**: 7-15.

Delgado, A., A. Madrid, S. Kassem, L. Andreu and M. D. C. Del Campillo (2002). "Phosphorus fertilizer recovery from calcareous soils amended with humic and fulvic acids." Plant and Soil **245**(2): 277-286.

Dettmer, K., P. A. Aronov and B. D. Hammock (2007). "Mass spectrometry-based metabolomics." Mass Spectrometry Reviews **26**(1): 51-78.

Dettmer, K. and B. D. Hammock (2004). "Metabolomics--a new exciting field within the "omics" sciences." Environmental Health Perspectives **112**(7): A396-A397.

Diallinas, G. and A. K. Kanellis (1994). "A phenylalanine ammonia-lyase gene from melon fruit: cDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding." Plant molecular biology **26**(1): 473-479.

Dixon, R. A., D. R. Gang, A. J. Charlton, O. Fiehn, H. A. Kuiper, T. L. Reynolds, R. S. Tjeerdema, E. H. Jeffery, J. B. German and W. P. Ridley (2006). "Applications of metabolomics in agriculture." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(24): 8984-8994.

Dong, H.-P., J. Peng, Z. Bao, X. Meng, J. M. Bonasera, G. Chen, S. V. Beer and H. Dong (2004). "Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated Arabidopsis growth and insect defense." Plant Physiology **136**(3): 3628-3638.

du Jardin, P. (2015). "Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation." Scientia Horticulturae **196**: 3-14.

Eastmond, P. J., A. J. Van Dijken, M. Spielman, A. Kerr, A. F. Tissier, H. G. Dickinson, J. D. Jones, S. C. Smeekens and I. A. Graham (2002). "Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation." The Plant Journal **29**(2): 225-235.

Edenhofer, O., J. Wallacher, H. Lotze-Campen, M. Reder, B. Knopf and J. Müller (2012). Climate change, justice and sustainability: Linking climate and development policy, Springer Science & Business Media.

EFSA, E. F. S. A. (2011). "Submission of scientific peer-reviewed open literature for the approval of pesticide active substances under Regulation (EC) No 1107/2009." EFSA Journal **9**(2): 2092.

EFSA, E. F. S. A. (2018). "Use of EFSA Pesticide Residue Intake Model (EFSA PRIMo revision 3)." EFSA Journal **16**(1): e05147.

El Riachy, M., F. Priego-Capote, L. Rallo, M. D. Luque-de Castro and L. León (2012). "Phenolic profile of virgin olive oil from advanced breeding selections." 2012 **10**(2): 11.

Elad, Y. and I. Pertot (2014). "Climate change impacts on plant pathogens and plant diseases." Journal of Crop Improvement **28**(1): 99-139.

Elbein, A. D., Y. Pan, I. Pastuszak and D. Carroll (2003). "New insights on trehalose: a multifunctional molecule." Glycobiology **13**(4): 17R-27R.

Ertani, A., L. Cavani, D. Pizzeghello, E. Brandellero, A. Altissimo, C. Ciavatta and S. Nardi (2009). "Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings." Journal of plant nutrition and soil science **172**(2): 237-244.

Ertani, A., M. Schiavon, A. Altissimo, C. Franceschi and S. Nardi (2011). "Phenol-containing organic substances stimulate phenylpropanoid metabolism in *Zea mays*." Journal of Plant Nutrition and Soil Science **174**(3): 496-503.

Ertani, A., M. Schiavon, A. Muscolo and S. Nardi (2013). "Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants." Plant and soil **364**(1-2): 145-158.

European Commission, E. (2019). "Regulation (EU) 2019/1009 of the European Parliament and of the Council of 5 June 2019 laying down rules on the making available on the market of EU fertilising products and amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009 and repealing Regulation (EC) No 2003/2003." 2020, from <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2019/1009/oj>.

European Commission, E. (2020). "EU - Pesticides database." 2020, from <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>.

Eurostat. (2017). "Olive trees cover 4.6 million hectares in the EU." 2020, from <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/DDN-20190301-1?inheritRedirect=true>.

Eurostat. (2020). "Olive trees - Area by age and density classes (area in ha)." 2020, from <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/submitViewTableAction.do>.

Faedda, R., G. E. Agosteo, L. Schena, S. Mosca, S. Frisullo, G. M. Di San Lio and S. O. Cacciola (2011). "*Colletotrichum clavatum* sp. nov. identified as the causal agent of olive anthracnose in Italy." Phytopathologia Mediterranea **50**(2): 283-302.

Fernández-Escobar, R., R. De la Rosa, L. Leon, J. Gómez, L. Testi, F. Orgaz, J. Gil-Ribes, E. Quesada-Moraga, A. Trapero and M. Masallem (2013). "Evolution and sustainability of the olive production systems." Options Mediterraneennes **106**: 11-42.

Fernandez, O., L. Béthencourt, A. Quero, R. S. Sangwan and C. Clément (2010). "Trehalose and plant stress responses: friend or foe?" Trends in plant science **15**(7): 409-417.

Fiehn, O. (2001). "Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks." International Journal of Genomics **2**(3): 155-168.

Fiehn, O. (2002). Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. Functional genomics, Springer: 155-171.

Fiehn, O., J. Kopka, P. Dörmann, T. Altmann, R. N. Trethewey and L. Willmitzer (2000). "Metabolite profiling for plant functional genomics." Nature biotechnology **18**(11): 1157.

Fiehn, O., D. Robertson, J. Griffin, M. van der Werf, B. Nikolau, N. Morrison, L. W. Sumner, R. Goodacre, N. W. Hardy and C. Taylor (2007). "The metabolomics standards initiative (MSI)." Metabolomics **3**(3): 175-178.

Fiorentino, N., V. Ventrino, S. L. Woo, O. Pepe, A. De Rosa, L. Gioia, I. Romano, N. Lombardi, M. Napolitano and G. Colla (2018). "Trichoderma-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables." Frontiers in Plant Science **9**: 743.

Foster, A. J., J. M. Jenkinson and N. J. Talbot (2003). "Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*." The EMBO journal **22**(2): 225-235.

Freitas, D. d. S., E. F. Carlos, M. r. C. S. d. S. Gil, L. G. E. Vieira and G. B. Alcantara (2015). "NMR-Based Metabolomic analysis of Huanglongbing-asymptomatic and-symptomatic citrus trees." Journal of agricultural and food chemistry **63**(34): 7582-7588.

Frisvad, J. and R. Samson (1990). Chemotaxonomy and morphology of *Aspergillus fumigatus* and related taxa. Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification, Springer: 201-208.

Frisvad, J. C., B. Andersen and U. Thrane (2008). "The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi." Mycological research **112**(2): 231-240.

Frisvad, J. C. and R. A. Samson (2004). "Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins." Studies in mycology **49**(1): 1-174.

Fujita, M., Y. Fujita, Y. Noutoshi, F. Takahashi, Y. Narusaka, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki (2006). "Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks." Current opinion in plant biology **9**(4): 436-442.

Galanopoulos, K., K. Mattas and G. Baourakis (2006). "Agricultural Situation Report—Greece." EC MEDFROL Project, Sixth Framework Programme Priority 8.

Garcia-Mina, J., M. Antolin and M. Sanchez-Diaz (2004). "Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: a study based on different plant species cultivated in diverse soil types." Plant and Soil **258**(1): 57-68.

García, A. C., R. L. L. Berbara, L. P. Farías, F. G. Izquierdo, O. L. Hernández, R. H. Campos and R. N. Castro (2012). "Humic acids of vermicompost as an

ecological pathway to increase resistance of rice seedlings to water stress." African Journal of Biotechnology **11**(13): 3125-3134.

García, A. C., L. A. Santos, F. G. Izquierdo, M. V. L. Sperandio, R. N. Castro and R. L. L. Berbara (2012). "Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress." Ecological Engineering **47**: 203-208.

George, J. and Y. Shukla (2011). "Pesticides and cancer: insights into toxicoproteomic-based findings." Journal of proteomics **74**(12): 2713-2722.

Gómez-Merino, F. C. and L. I. Trejo-Téllez (2015). "Biostimulant activity of phosphite in horticulture." Scientia Horticulturae **196**: 82-90.

Gómez, L. D., S. Baud, A. Gilday, Y. Li and I. A. Graham (2006). "Delayed embryo development in the ARABIDOPSIS TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1 mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation." The Plant Journal **46**(1): 69-84.

Gong, Q., P. Li, S. Ma, S. Indu Rupassara and H. J. Bohnert (2005). "Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*." The Plant Journal **44**(5): 826-839.

Gorell, J. M., C. Johnson, B. Rybicki, E. Peterson and R. Richardson (1998). "The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living." Neurology **50**(5): 1346-1350.

Gouvinhas, I., P. Martins-Lopes, T. Carvalho, A. Barros and S. Gomes (2019). "Impact of *Colletotrichum acutatum* Pathogen on Olive Phenylpropanoid Metabolism." Agriculture **9**(8): 173.

Graf, E. (1992). "Antioxidant potential of ferulic acid." Free Radical Biology and Medicine **13**(4): 435-448.

Grand View Research, I. (2018). "Biostimulants Market Size Worth \$4.14 Billion By 2025 | CAGR: 10.2%." 2020, from <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-biostimulants-market>.

Graniti, A., S. Frisullo, A. Pennisi and G. M. di San Lio (1993). "Infections of *Glomerella cingulata* on olive in Italy ¹." EPPO Bulletin **23**(3): 457-465.

Grant, S. R., E. J. Fisher, J. H. Chang, B. M. Mole and J. L. Dangl (2006). "Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria." Annu. Rev. Microbiol. **60**: 425-449.

Green, P. S. (2002). "A revision of *Olea* L. (*Oleaceae*)." Kew Bulletin: 91-140.

Guarro, J., J. Gené and A. M. Stchigel (1999). "Developments in fungal taxonomy." Clinical microbiology reviews **12**(3): 454-500.

Guodong, R., L. Xiaoxia, Z. Weiwei, W. Wenjun and Z. Jianguo (2017). "Metabolomics reveals variation and correlation among different tissues of olive (*Olea europaea* L.)." Biology open **6**(9): 1317-1323.

Gutteridge, J. (1995). "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage." Clinical chemistry **41**(12): 1819-1828.

Hahn, M. (2014). "The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study." Journal of chemical biology **7**(4): 133-141.

Halket, J. M., D. Waterman, A. M. Przyborowska, R. K. Patel, P. D. Fraser and P. M. Bramley (2005). "Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS." Journal of experimental botany **56**(410): 219-243.

Halpern, M., A. Bar-Tal, M. Ofek, D. Minz, T. Muller and U. Yermiyahu (2015). The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. Advances in agronomy, Elsevier. **130**: 141-174.

Hamaoui, B., J. Abbadi, S. Burdman, A. Rashid, S. Sarig and Y. Okon (2001). "Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions."

Hankins, S. and H. Hockey (1990). The effect of a liquid seaweed extract from *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta) on the two-spotted red spider mite *Tetranychus urticae*. Thirteenth International Seaweed Symposium, Springer.

Hao, D. C., P. G. Xiao, G. B. Ge and M. Liu (2012). "Biological, chemical, and omics research of *Taxus* medicinal resources." Drug Development Research **73**(8): 477-486.

Harrigan, G. G., S. Martino-Catt and K. C. Glenn (2007). "Metabolomics, metabolic diversity and genetic variation in crops." Metabolomics **3**(3): 259-272.

Hartley, R. D. and E. C. Jones (1977). "Phenolic components and degradability of cell walls of grass and legume species." Phytochemistry **16**(10): 1531-1534.

Hayat, R., S. Ali, U. Amara, R. Khalid and I. Ahmed (2010). "Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review." Annals of Microbiology **60**(4): 579-598.

He, S. Y., H.-C. Huang and A. Collmer (1993). "*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants." Cell **73**(7): 1255-1266.

Hibbett, D. S. and M. J. Donoghue (1998). "Integrating phylogenetic analysis and classification in fungi." Mycologia **90**(3): 347-356.

Hillocks, R. J. (2012). "Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture." Crop Protection **31**(1): 85-93.

Hong, D. D., H. M. Hien and P. N. Son (2007). "Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer." Journal of Applied Phycology **19**(6): 817-826.

Hu, F. B. (2003). "The Mediterranean diet and mortality-olive oil and beyond." New England Journal of Medicine **348**(26): 2595-2596.

Hussain, S., T. Siddique, M. Saleem, M. Arshad and A. Khalid (2009). "Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions." Advances in agronomy **102**: 159-200.

Hwang, B. K., S. W. Lim, B. S. Kim, J. Y. Lee and S. S. Moon (2001). "Isolation and *in vivo* and *in vitro* antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*." Appl. Environ. Microbiol. **67**(8): 3739-3745.

Iliadi, M., E. Tjamos, P. Antoniou and D. Tsitsigiannis (2018). "First Report of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose on Olives in Greece." Plant disease **102**(4): 820.

International Olive Oil Council, I. (2012). "General Description of Olive Growing in Greece." 2020, from https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/ENGLISH_POLICY_GREECE-2012_OK.pdf.

International Olive Oil Council, I. (2018). "Olive oil production (1,000 tonnes)." 2020, from https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/production2_ang.pdf.

International Olive Oil Council, I. (2018). "Olive oils consumption (1,000 tonnes)." from https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/consommation2_ang.pdf.

International Olive Oil Council, I. (2019). "Olive oil exports (1,000 tonnes)." 2020, from <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/04/HO-CE901-29-11-2019-C.pdf>.

Iturriaga, G., D. F. Gaff and R. Zentella (2000). "New desiccation-tolerant plants, including a grass, in the central highlands of Mexico, accumulate trehalose." Australian Journal of Botany **48**(2): 153-158.

Iturriaga, G., R. Suárez and B. Nova-Franco (2009). "Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling." International journal of molecular sciences **10**(9): 3793-3810.

Janse, J. and A. Obradovic (2010). "*Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks." Journal of Plant Pathology: S35-S48.

Jayaraman, J., J. Norrie and Z. K. Punja (2011). "Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber." Journal of Applied Phycology **23**(3): 353-361.

Jiménez-Díaz, R., E. Tjamos and M. Cirulli (1998). "Verticillium wilt of major tree hosts: olive." A compendium of Verticillium wilts in tree species: 13-16.

John, R., V. Raja, M. Ahmad, N. Jan, U. Majeed, S. Ahmad, U. Yaqoob and T. Kaul (2017). Trehalose: metabolism and role in stress signaling in plants. Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective, Volume 2, Springer: 261-275.

Johnson, H. E., D. Broadhurst, R. Goodacre and A. R. Smith (2003). "Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes." Phytochemistry **62**(6): 919-928.

Kalampokis, I. F., G. C. Kapetanakis, K. A. Aliferis and G. Diallinas (2018). "Multiple nucleobase transporters contribute to boscalid sensitivity in *Aspergillus nidulans*." Fungal Genetics and Biology **115**: 52-63.

Kamenidou, S., T. J. Cavins and S. Marek (2008). "Silicon supplements affect horticultural traits of greenhouse-produced ornamental sunflowers." HortScience **43**(1): 236-239.

Kanani, H., P. K. Chrysanthopoulos and M. I. Klapa (2008). "Standardizing GC-MS metabolomics." Journal of Chromatography B **871**(2): 191-201.

Kaplan, F., J. Kopka, D. W. Haskell, W. Zhao, K. C. Schiller, N. Gatzke, D. Y. Sung and C. L. Guy (2004). "Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*." Plant physiology **136**(4): 4159-4168.

Karamanou, D. A. and K. A. Aliferis (2020). "Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) GC/EI/MS metabolomics dataset." Data in brief **29**: 105208.

Keleş, Y. and I. Öncel (2002). "Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings." Plant Science **163**(4): 783-790.

Khan, W., U. P. Rayirath, S. Subramanian, M. N. Jithesh, P. Rayorath, D. M. Hodges, A. T. Critchley, J. S. Craigie, J. Norrie and B. Prithiviraj (2009). "Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development." Journal of Plant Growth Regulation **28**(4): 386-399.

Kim, H. K., Y. H. Choi and R. Verpoorte (2010). "NMR-based metabolomic analysis of plants." Nature protocols **5**(3): 536.

Kim, H. K. and R. Verpoorte (2010). "Sample preparation for plant metabolomics." Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques **21**(1): 4-13.

Kim, J. F. and S. V. Beer (1998). "HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class." Journal of bacteriology **180**(19): 5203-5210.

Kim, J. K., T. Bamba, K. Harada, E. Fukusaki and A. Kobayashi (2006). "Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment." Journal of Experimental Botany **58**(3): 415-424.

Klarzynski, O., V. Descamps, B. Plesse, J.-C. Yvin, B. Kloareg and B. Fritig (2003). "Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus." Molecular Plant-Microbe Interactions **16**(2): 115-122.

Köhler, H.-R. and R. Triebkorn (2013). "Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond?" Science **341**(6147): 759-765.

Kolomazník, K., J. Pecha, V. Friebrová, D. Janáčková and V. Vašek (2012). "Diffusion of biostimulators into plant tissues." Heat and Mass Transfer **48**(9): 1505-1512.

Kostopoulou, S., G. Ntatsi, G. Arapis and K. A. Aliferis (2020). "Assessment of the effects of metribuzin, glyphosate, and their mixtures on the metabolism of the model plant *Lemna minor* L. applying metabolomics." Chemosphere **239**: 124582.

Kruger, N. J., M. A. Troncoso-Ponce and R. G. Ratcliffe (2008). "¹H NMR metabolite fingerprinting and metabolomic analysis of perchloric acid extracts from plant tissues." Nature Protocols **3**(6): 1001.

La Torre, A., V. Battaglia and F. Caradonia (2016). "An overview of the current plant biostimulant legislations in different European Member States." Journal of the Science of Food and Agriculture **96**(3): 727-734.

Lace, B., A. Genre, S. Woo, A. Faccio, M. Lorito and P. Bonfante (2015). "Gate crashing arbuscular mycorrhizas: in vivo imaging shows the extensive colonization of both symbionts by *Trichoderma atroviride*." Environmental microbiology reports **7**(1): 64-77.

Lamichhane, J. R., W. Arendse, S. Dachbrodt-Saaydeh, P. Kudsk, J. C. Roman, J. E. van Bijsterveldt-Gels, M. Wick and A. Messéan (2015). "Challenges and opportunities for integrated pest management in Europe: A telling example of minor uses." Crop Protection **74**: 42-47.

Lamichhane, J. R., S. Dachbrodt-Saaydeh, P. Kudsk and A. Messéan (2016). "Toward a Reduced Reliance on Conventional Pesticides in European Agriculture." Plant Disease **100**(1): 10-24.

Latinovic, J. and Z. Vucinic (2002). "Cultural characteristics, pathogenicity, and host range of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from olive plants in Montenegro." Acta horticulturae.

Lattanzio, V., V. M. Lattanzio and A. Cardinali (2006). "Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects." Phytochemistry: Advances in research **661**(2): 23-67.

Lee, M. S. (2012). Mass spectrometry handbook, John Wiley & Sons.

Lewis Ivey, M. L., C. Nava-Diaz and S. A. Miller (2004). "Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers." Plant disease **88**(11): 1198-1204.

-
- Li, M., M. Yu, Z. Zhang, Z. Liu and Y. Pan (2012). "Control of black spot disease caused by *Alternaria alternata* on jujube (*Ziziphus jujuba* Mill. cv. Dongzao) using HarpinXoo protein." The Journal of Horticultural Science and Biotechnology **87**(3): 250-254.
- Lichtfouse, E., M. Navarrete, P. Debaeke, V. Souchère, C. Alberola and J. Ménassieu (2009). Agronomy for sustainable agriculture: a review. Sustainable agriculture, Springer: 1-7.
- Lindgren, P. B., R. C. Peet and N. J. Panopoulos (1986). "Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants." Journal of Bacteriology **168**(2): 512-522.
- Lisec, J., N. Schauer, J. Kopka, L. Willmitzer and A. R. Fernie (2006). "Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants." Nature protocols **1**(1): 387.
- Lockington, R. A., H. Scaly-Lewis, C. Scazzocchio and R. W. Davies (1985). "Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*." Gene **33**(2): 137-149.
- Loconsole, G., O. Potere, D. Boscia, G. Altamura, K. Djelouah, T. Elbeaino, D. Frasherri, D. Lorusso, F. Palmisano and P. Pollastro (2014). "Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods." Journal of Plant Pathology **96**(1): 7-14.
- Loewus, F. A. (2006). Inositol and plant cell wall polysaccharide biogenesis. Biology of Inositols and Phosphoinositides, Springer: 21-45.
- Loewus, F. A. and P. P. Murthy (2000). "myo-Inositol metabolism in plants." Plant science **150**(1): 1-19.
- López-Escudero, F. and M. Blanco-López (2001). "Effect of a single or double soil solarization to control *Verticillium* wilt in established olive orchards in Spain." Plant disease **85**(5): 489-496.
- López-Escudero, F. J. and J. Mercado-Blanco (2011). "Verticillium wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen." Plant and soil **344**(1-2): 1-50.
- Lorence, A., B. I. Chevone, P. Mendes and C. L. Nessler (2004). "Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis." Plant Physiology **134**(3): 1200-1205.
- Loureiro, R. R., R. P. Reis, F. D. Berrogain and A. T. Critchley (2012). "Extract powder from the brown alga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis (AMPEP): a "vaccine-like" effect on *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex PC Silva." Journal of applied phycology **24**(3): 427-432.
- Lowe, R. G., M. Lord, K. Rybak, R. D. Trengove, R. P. Oliver and P. S. Solomon (2009). "Trehalose biosynthesis is involved in sporulation of *Stagonospora nodorum*." Fungal Genetics and Biology **46**(5): 381-389.
-

Macheleidt, J., D. J. Mattern, J. Fischer, T. Netzker, J. Weber, V. Schroeckh, V. Valiante and A. A. Brakhage (2016). "Regulation and role of fungal secondary metabolites." Annual review of genetics **50**: 371-392.

Magazù, S., F. Migliardo, A. Benedetto, R. La Torre and L. Hennet (2012). "Bio-protective effects of homologous disaccharides on biological macromolecules." European Biophysics Journal **41**(4): 361-367.

Mancuso, S., E. Azzarello, S. Mugnai and X. Briand (2006). "Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake and water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants." Advances in Horticultural Science: 156-161.

Margarita, L., A. Porta-Puglia and A. Quacquarelli (1986). "*Colletotrichum acutatum*, nuovo patogeno dell'olivo in Cina e confronto con l'agente della "lebbra" dell'olivo." Ann. Ist. Sper. Patol. Veg. Roma **11**: 125-133.

Marín-Benito, J. M., M. J. Sánchez-Martín and M. S. Rodríguez-Cruz (2016). "Impact of spent mushroom substrates on the fate of pesticides in soil, and their use for preventing and/or controlling soil and water contamination: a review." Toxics **4**(3): 17.

Martín, M. and F. García-Figueres (1999). "*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives." European Journal of Plant Pathology **105**(8): 733-741.

Martín, M. P., F. García-Figueres and A. Trapero (2002). "Iniciadores específicos para detectar las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de los olivos."

Martinelli, F., B. Basile, G. Morelli, R. d'Andria and P. Tonutti (2012). "Effects of irrigation on fruit ripening behavior and metabolic changes in olive." Scientia Horticulturae **144**: 201-207.

Martinelli, F., D. Remorini, S. Saia, R. Massai and P. Tonutti (2013). "Metabolic profiling of ripe olive fruit in response to moderate water stress." Scientia Horticulturae **159**: 52-58.

Martins, A., D. Camacho, J. Shuman, W. Sha, P. Mendes and V. Shulaev (2004). "A systems biology study of two distinct growth phases of *Saccharomyces cerevisiae* cultures." Current Genomics **5**(8): 649-663.

Mata-Pérez, C., B. Sánchez-Calvo, J. C. Begara-Morales, F. Luque, J. Jiménez-Ruiz, M. N. Padilla, J. Fierro-Risco, R. Valderrama, A. Fernández-Ocaña and F. J. Corpas (2015). "Transcriptomic profiling of linolenic acid-responsive genes in ROS signaling from RNA-seq data in Arabidopsis." Frontiers in plant science **6**: 122.

Mathew, S. and T. E. Abraham (2004). "Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications." Critical reviews in biotechnology **24**(2-3): 59-83.

Mattner, S., D. Wite, D. Riches, I. Porter and T. Arioli (2013). "The effect of kelp extract on seedling establishment of broccoli on contrasting soil types in southern Victoria, Australia." Biological agriculture & horticulture **29**(4): 258-270.

Mercier, L., C. Lafitte, G. Borderies, X. Briand, M. T. Esquerré-Tugayé and J. Fournier (2001). "The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence." New Phytologist **149**(1): 43-51.

Michalak, A. (2006). "Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress." Polish Journal of Environmental Studies **15**(4).

Mills, P. R., S. Sreenivasaprasad and A. E. Brown (1992). "Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR." FEMS Microbiology Letters **98**(1-3): 137-143.

Mincione, A., M. Valenzise, A. Runcio, M. Poiana, G. Agosteo and P. Taccone (2004). "Ricerche sugli oli di oliva vergini calabresi. Influenza delle fitopatie sulle caratteristiche qualitative degli oli. Nota I: Effetti diretti degli attacchi di Antracnosi." Rivista Italiana delle Sostanze Grasse **81**(1): 9-17.

Mittal, V. (2011). Renewable polymers: synthesis, processing, and technology, John Wiley & Sons.

Möller, M. and M. Smith (1998). "The significance of the mineral component of seaweed suspensions on lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedling growth." Journal of Plant Physiology **153**(5-6): 658-663.

Moral, J., K. Bouhmidi and A. Trapero (2008). "Influence of fruit maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by *Colletotrichum acutatum*." Plant disease **92**(10): 1421-1426.

Moral, J. and A. Trapero (2012). "Mummified fruit as a source of inoculum and disease dynamics of olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp." Phytopathology **102**(10): 982-989.

Moriondo, M., G. Trombi, R. Ferrise, G. Brandani, C. Dibari, C. M. Ammann, M. M. Lippi and M. Bindi (2013). "Olive trees as bio-indicators of climate evolution in the Mediterranean Basin." Global Ecology and Biogeography **22**(7): 818-833.

Mosca, S., M. G. L. D. Nicosia, S. O. Cacciola and L. Schena (2014). "Molecular analysis of *Colletotrichum* species in the carposphere and phyllosphere of olive." PLoS One **9**(12): e114031.

Mrema, E., F. Rubino, S. Mandic-Rajcevic, E. Sturchio, R. Turci, A. Osculati, G. Brambilla, C. Minoia and C. Colosio (2013). "Exposure to priority organochlorine contaminants in the Italian general population. Part 1. Eight priority organochlorinated pesticides in blood serum." Human & experimental toxicology **32**(12): 1323-1339.

Murphy, A. M., B. Otto, C. A. Brearley, J. P. Carr and D. E. Hanke (2008). "A role for inositol hexakisphosphate in the maintenance of basal resistance to plant pathogens." The Plant Journal **56**(4): 638-652.

Murphy, H. N., G. R. Stewart, V. V. Mischenko, A. S. Apt, R. Harris, M. S. McAlister, P. C. Driscoll, D. B. Young and B. D. Robertson (2005). "The OtsAB pathway is essential for trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*." Journal of Biological Chemistry **280**(15): 14524-14529.

Mylonas, P. (2015). "Olive Oil: Establishing the Greek brand." National Bank of Greece.

Nardi, F., A. Carapelli, R. Dallai, G. K. Roderick and F. Frati (2005). "Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae)." Molecular Ecology **14**(9): 2729-2738.

Ni, M. and J.-H. Yu (2007). "A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*." PLoS One **2**(10).

Niaounakis, M. and C. P. Halvadakis (2006). Olive processing waste management: literature review and patent survey, Elsevier.

Nikiforova, V. J., B. Gakiere, S. Kempa, M. Adamik, L. Willmitzer, H. Hesse and R. Hoefgen (2004). "Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case study on sulphur metabolism." Journal of Experimental Botany **55**(404): 1861-1870.

Nirenberg, H. I. and K. O'Donnell (1998). "New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex." Mycologia **90**(3): 434-458.

Norrie, J. and J. Keathley (2005). Benefits of ascophyllum nodosum marine-plant extract applications to Thompson Seedless grape production. X International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production 727.

Ocón, A., R. Hampp and N. Requena (2007). "Trehalose turnover during abiotic stress in arbuscular mycorrhizal fungi." New Phytologist **174**(4): 879-891.

Oerke, E.-C. (2006). "Crop losses to pests." The Journal of Agricultural Science **144**(1): 31-43.

Oerke, E.-C. and H.-W. Dehne (2004). "Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection." Crop Protection **23**(4): 275-285.

Organization, W. H. (2017). Agrochemicals, health and environment: directory of resources, WHO, Geneva.

Paksoy, M., Ö. Türkmen and A. Dursun (2010). "Effects of potassium and humic acid on emergence, growth and nutrient contents of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) seedling under saline soil conditions." African Journal of Biotechnology **9**(33).

Paoli, D., F. Giannandrea, M. Gallo, R. Turci, M. Cattaruzza, F. Lombardo, A. Lenzi and L. Gandini (2015). "Exposure to polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene, semen quality and testicular cancer risk." Journal of endocrinological investigation **38**(7): 745-752.

Papasotiriou, F. G., K. G. Varypatakis, N. Christofi, S. E. Tjamos and E. J. Paplomatas (2013). "Olive mill wastes: a source of resistance for plants against *Verticillium dahliae* and a reservoir of biocontrol agents." Biological control **67**(1): 51-60.

Parađiković, N., T. Vinković, I. Vinković Vrček, I. Žuntar, M. Bojić and M. Medić-Šarić (2011). "Effect of natural biostimulants on yield and nutritional quality: an example of sweet yellow pepper (*Capsicum annuum* L.) plants." Journal of the Science of Food and Agriculture **91**(12): 2146-2152.

Parrou, J. L., M.-A. Teste and J. François (1997). "Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose." Microbiology **143**(6): 1891-1900.

Parthasarathy, A., M. A. Savka and A. O. Hudson (2019). "The Synthesis and Role of β -Alanine in Plants." Frontiers in Plant Science **10**(921).

Peng, J.-L., H.-S. Dong, H.-P. Dong, T. Delaney, J. Bonasera and S. Beer (2003). "Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance require the *NDR1* and *EDS1* genes." Physiological and Molecular Plant Pathology **62**(6): 317-326.

Peres, N. A., L. W. Timmer, J. E. Adaskaveg and J. C. Correll (2005). "Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*." Plant Disease **89**(8): 784-796.

Petri, L. (1930). "Azione tossica dell'arseniato sodico sopra le spore del *Gloeosporium olivarum* Alm." Bollettino della Regia Stazione di Patologia Vegetale: 359-361.

Petrozza, A., A. Santaniello, S. Summerer, G. Di Tommaso, D. Di Tommaso, E. Paparelli, A. Piaggese, P. Perata and F. Cellini (2014). "Physiological responses to Megafol® treatments in tomato plants under drought stress: a phenomic and molecular approach." Scientia Horticulturae **174**: 185-192.

Pichyangkura, R. and S. Chadchawan (2015). "Biostimulant activity of chitosan in horticulture." Scientia Horticulturae **196**: 49-65.

Pinton, R., S. Cesco, G. Iacoletti, S. Astolfi and Z. Varanini (1999). "Modulation of NO_3^- uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H^+ -ATPase." Plant and soil **215**(2): 155-161.

Povero, G., J. F. Mejia, D. Di Tommaso, A. Piaggese and P. Warrior (2016). "A Systematic Approach to Discover and Characterize Natural Plant Biostimulants." Frontiers in Plant Science **7**(435).

Prillinger, H., K. Lopandic, W. Schweigkofler, R. Deak, H. J. Aarts, R. Bauer, K. Sterflinger, G. F. Kraus and A. Maraz (2002). "Phylogeny and systematics of the fungi with special reference to the Ascomycota and Basidiomycota." Chemical immunology **81**: 207-295.

Rayorath, P., M. N. Jithesh, A. Farid, W. Khan, R. Palanisamy, S. D. Hankins, A. T. Critchley and B. Prithiviraj (2008). "Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh." Journal of applied phycology **20**(4): 423-429.

Rejeb, K. B., C. Abdelly and A. Savouré (2014). "How reactive oxygen species and proline face stress together." Plant Physiology and Biochemistry **80**: 278-284.

Reynolds, T. (2007). "The evolution of chemosystematics." Phytochemistry **68**(22-24): 2887-2895.

Rhizopoulou, S. (2007). "*Olea europaea* L. A botanical contribution to culture." American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences **2**(4): 382-387.

Rhouma, A., M. A. Triki and M. Msallem (2010). "First report of olive anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Tunisia." Phytopathologia Mediterranea **49**(1): 95.

Riaz, U., M. A. Kharal, G. Murtaza, Q. uz Zaman, S. Javaid, H. A. Malik, H. Aziz and Z. Abbas (2019). "Prospective roles and mechanisms of caffeic acid in counter plant stress: A mini review." Pakistan Journal of Agricultural Research **32**(1): 8.

Rizhsky, L., H. Liang, J. Shuman, V. Shulaev, S. Davletova and R. Mittler (2004). "When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress." Plant physiology **134**(4): 1683-1696.

Rodríguez, E., J. M. García-garrido, P. A. García and M. Campos (2008). "Agricultural factors affecting *Verticillium* wilt in olive orchards in Spain." European Journal of Plant Pathology **122**(2): 287.

Roine, E., W. Wei, J. Yuan, E.-L. Nurmiäho-Lassila, N. Kalkkinen, M. Romantschuk and S. Y. He (1997). "Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(7): 3459-3464.

Rolland, F., E. Baena-Gonzalez and J. Sheen (2006). "Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms." Annu. Rev. Plant Biol. **57**: 675-709.

Rouphael, Y., M. Cardarelli, P. Bonini and G. Colla (2017). "Synergistic action of a microbial-based biostimulant and a plant derived-protein hydrolysate enhances lettuce tolerance to alkalinity and salinity." Frontiers in Plant Science **8**: 131.

Rouphael, Y. and G. Colla (2020). "Biostimulants in Agriculture." Frontiers in Plant Science **11**.

Rouphael, Y., P. Franken, C. Schneider, D. Schwarz, M. Giovannetti, M. Agnolucci, S. De Pascale, P. Bonini and G. Colla (2015). "Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops." Scientia Horticulturae **196**: 91-108.

Rouphael, Y., L. Spíchal, K. Panzarová, R. Casa and G. Colla (2018). "High-throughput plant phenotyping for developing novel biostimulants: from lab to field or from field to lab?" Frontiers in Plant Science **9**: 1197.

Rugini, E. and E. Fedeli (1990). Olive (*Olea europaea* L.) as an oilseed crop. Legumes and Oilseed Crops I, Springer: 593-641.

Ruiz-García, Y. and E. Gómez-Plaza (2013). "Elicitors: a tool for improving fruit phenolic content." Agriculture **3**(1): 33-52.

Ruzzi, M. and R. Aroca (2015). "Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture." Scientia Horticulturae **196**: 124-134.

Saa, S., O.-D. Rio, S. Castro and P. H. Brown (2015). "Foliar application of microbial and plant based biostimulants increases growth and potassium uptake in almond (*Prunus dulcis* [Mill.] DA Webb)." Frontiers in Plant Science **6**: 87.

Saia, S., V. Rappa, P. Ruisi, M. R. Abenavoli, F. Sunseri, D. Giambalvo, A. S. Frenda and F. Martinelli (2015). "Soil inoculation with symbiotic microorganisms promotes plant growth and nutrient transporter genes expression in durum wheat." Frontiers in Plant Science **6**: 815.

Saleh, A. M., M. M. Madany and L. González (2015). "The effect of coumarin application on early growth and some physiological parameters in Faba Bean (*Vicia faba* L.)." Journal of Plant Growth Regulation **34**(2): 233-241.

Sasaki, K., G. Nagahashi, M. R. Gretz and I. E. Taylor (1989). "Use of per-C-deuterated myo-inositol for study of cell wall synthesis in germinating beans." Plant physiology **90**(2): 686-689.

Satoh-Nagasawa, N., N. Nagasawa, S. Malcomber, H. Sakai and D. Jackson (2006). "A trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize." Nature **441**(7090): 227-230.

Savvas, D. and G. Ntatsi (2015). "Biostimulant activity of silicon in horticulture." Scientia Horticulturae **196**: 66-81.

Scheel, D. (1998). "Resistance response physiology and signal transduction." Current opinion in plant biology **1**(4): 305-310.

Schena, L., S. Mosca, S. O. Cacciola, R. Faedda, S. M. Sanzani, G. E. Agosteo, V. Sergeeva and G. Magnano di San Lio (2014). "Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose." Plant Pathology **63**(2): 437-446.

Schiavon, M., A. Ertani and S. Nardi (2008). "Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(24): 11800-11808.

Schmidt, W., S. Santi, R. Pinton and Z. Varanini (2007). "Water-extractable humic substances alter root development and epidermal cell pattern in Arabidopsis." Plant and Soil **300**(1-2): 259-267.

Sengupta, S., B. Patra, S. Ray and A. L. Majumder (2008). "Inositol methyl transferase from a halophytic wild rice, *Porteresia coarctata* Roxb.(Tateoka): regulation of pinitol synthesis under abiotic stress." Plant, Cell & Environment **31**(10): 1442-1459.

Sergeeva, V., N. G. Nair and R. Spooner-Hart (2008). "Evidence of early flower infection in olives (*Olea europaea*) by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing anthracnose disease." Australasian Plant Disease Notes **3**(1): 81-82.

Servili, M., B. Sordini, S. Esposito, A. Taticchi, S. Urbani and L. Sebastiani (2016). Metabolomics of olive fruit: A focus on the secondary metabolites. The Olive Tree Genome, Springer: 123-139.

Sestili, F., Y. Rouphael, M. Cardarelli, A. Pucci, P. Bonini, R. Canaguier and G. Colla (2018). "Protein hydrolysate stimulates growth in tomato coupled with N-dependent gene expression involved in N assimilation." Frontiers in Plant Science **9**: 1233.

Sevastos, A., I. Kalampokis, A. Panagiotopoulou, M. Pelecanou and K. Aliferis (2018). "Implication of *Fusarium graminearum* primary metabolism in its resistance to benzimidazole fungicides as revealed by ¹H NMR metabolomics." Pesticide biochemistry and physiology **148**: 50-61.

Sheen, J., L. Zhou and J.-C. Jang (1999). "Sugars as signaling molecules." Current opinion in plant biology **2**(5): 410-418.

Sheveleva, E., W. Chmara, H. J. Bohnert and R. G. Jensen (1997). "Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L." Plant Physiology **115**(3): 1211-1219.

Shulaev, V. (2006). "Metabolomics technology and bioinformatics." Briefings in Bioinformatics **7**(2): 128-139.

Shulaev, V., D. Cortes, G. Miller and R. Mittler (2008). "Metabolomics for plant stress response." Physiologia plantarum **132**(2): 199-208.

Simmonds, J. (1966). "A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland." Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences **22**(4): 437-459.

Singer, M. A. and S. Lindquist (1998). "Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose." Trends in biotechnology **16**(11): 460-468.

Smedsgaard, J. and J. Nielsen (2005). "Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics." Journal of experimental botany **56**(410): 273-286.

Sofo, A., M. Nuzzaci, A. Vitti, G. Tataranni and A. Scopa (2014). Control of biotic and abiotic stresses in cultivated plants by the use of biostimulant microorganisms. Improvement of crops in the Era of Climatic Changes, Springer: 107-117.

Soppelsa, S., M. Kelderer, C. Casera, M. Bassi, P. Robatscher and C. Andreotti (2018). "Use of biostimulants for organic apple production: effects on tree growth, yield, and fruit quality at harvest and during storage." Frontiers in Plant Science **9**: 1342.

Sousa Silva, M., C. Cordeiro, U. Roessner and A. Figueiredo (2019). "Metabolomics in Crop Research-Current and Emerging Methodologies." Frontiers in Plant Science **10**: 1013.

Spann, T. M. and H. A. Little (2011). "Applications of a commercial extract of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* increases drought tolerance in container-grown 'Hamlin'sweet orange nursery trees." HortScience **46**(4): 577-582.

Sreenivasaprasad, S., K. Sharada, A. Brown and P. Mills (1996). "PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry." Plant pathology **45**(4): 650-655.

Sreenivasaprasad, S. and P. Talhinhos (2005). "Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts." Molecular plant pathology **6**(4): 361-378.

Sridhar, R., S. Mohanty and A. Anjaneyulu (1979). "In vivo inactivation of rice tungro virus by ferulic acid." Journal of Phytopathology **94**(3): 279-281.

Stevenson-Paulik, J., R. J. Bastidas, S.-T. Chiou, R. A. Frye and J. D. York (2005). "Generation of phytate-free seeds in *Arabidopsis* through disruption of inositol polyphosphate kinases." Proceedings of the National Academy of Sciences **102**(35): 12612-12617.

Sun, X., J. Zhang, H. Zhang, Y. Ni, Q. Zhang, J. Chen and Y. Guan (2010). "The responses of *Arabidopsis thaliana* to cadmium exposure explored via metabolite profiling." Chemosphere **78**(7): 840-845.

Szabados, L. and A. Savoure (2010). "Proline: a multifunctional amino acid." Trends in plant science **15**(2): 89-97.

Türkmen, Ö., A. Dursun, M. Turan and Ç. Erdinç (2004). "Calcium and humic acid affect seed germination, growth, and nutrient content of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings under saline soil conditions." Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science **54**(3): 168-174.

Talhinhos, P., C. Mota-Capitão, S. Martins, A. P. Ramos, J. Neves-Martins, L. Guerra-Guimarães, V. Várzea, M. Silva, S. Sreenivasaprasad and H. Oliveira (2011). "Epidemiology, histopathology and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal." Plant Pathology **60**(3): 483-495.

Talhinhas, P., S. Sreenivasaprasad, J. Neves-Martins and H. Oliveira (2002). "Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins." Phytopathology **92**(9): 986-996.

Talhinhas, P., S. Sreenivasaprasad, J. Neves-Martins and H. Oliveira (2005). "Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose." Appl. Environ. Microbiol. **71**(6): 2987-2998.

Tampakaki, A. P., N. Skandalis, A. D. Gazi, M. N. Bastaki, S. Panagiotis F, S. N. Charova, M. Kokkinidis and N. J. Panopoulos (2010). "Playing the "Harp": evolution of our understanding of hrp/hrc genes." Annual review of phytopathology **48**: 347-370.

Taylor, J. W., D. J. Jacobson, S. Kroken, T. Kasuga, D. M. Geiser, D. S. Hibbett and M. C. Fisher (2000). "Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi." Fungal genetics and biology **31**(1): 21-32.

Thevelein, J. M. (1984). "Regulation of trehalose mobilization in fungi." Microbiological reviews **48**(1): 42.

Thole, J. M. and E. Nielsen (2008). "Phosphoinositides in plants: novel functions in membrane trafficking." Current opinion in plant biology **11**(6): 620-631.

Thrane, U., B. Anderson, J. C. Frisvad and J. Smedsgaard (2007). The exo-metabolome in filamentous fungi. Metabolomics, Springer: 235-252.

Tjamos, E. (1993). "Prospects and strategies in controlling verticillium wilt of olive 1." EPPO Bulletin **23**(3): 505-512.

Tjamos, E., D. Biris and E. Paplomatas (1991). "Recovery of olive trees with Verticillium wilt after individual application of soil solarization in established olive orchards." Plant Disease **75**(6): 557-562.

Tjamos, E. and E. Paplomatas (1988). "Long-term effect of soil solarization in controlling Verticillium wilt of globe artichokes in Greece." Plant pathology **37**(4): 507-515.

Tjamos, E. C., D. I. Tsitsigiannis, S. E. Tjamos, P. P. Antoniou and P. Katinakis (2004). "Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts." European Journal of Plant Pathology **110**(1): 35-44.

Trethewey, R. N., A. J. Krotzky and L. Willmitzert (1999). "Metabolic profiling: a Rosetta Stone for genomics?" Current opinion in plant biology **2**(2): 83-85.

Tsugawa, H., T. Cajka, T. Kind, Y. Ma, B. Higgins, K. Ikeda, M. Kanazawa, J. VanderGheynst, O. Fiehn and M. Arita (2015). "MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis." Nature methods **12**(6): 523.

Turner, J. A. and E. L. Rice (1975). "Microbial decomposition of ferulic acid in soil." Journal of Chemical Ecology **1**(1): 41-58.

Tweeddale, H., L. Notley-McRobb and T. Ferenci (1998). "Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis." Journal of bacteriology **180**(19): 5109-5116.

UN, D. o. E. and P. D. Social Affairs (2015). World population prospects: the 2015 revision, key findings and advance tables, United Nations New York, USA.

Upchurch, R. G. (2008). "Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress." Biotechnology letters **30**(6): 967-977.

Valluru, R. and W. Van den Ende (2011). "Myo-inositol and beyond—emerging networks under stress." Plant science **181**(4): 387-400.

Van Dijck, P., L. De Rop, K. Szlufcik, E. Van Ael and J. M. Thevelein (2002). "Disruption of the *Candida albicans* TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase decreases infectivity without affecting hypha formation." Infection and immunity **70**(4): 1772-1782.

Vinoth, S., P. Gurusaravanan and N. Jayabalan (2012). "Effect of seaweed extracts and plant growth regulators on high-frequency in vitro mass propagation of *Lycopersicon esculentum* L. (tomato) through double cotyledonary nodal explant." Journal of applied phycology **24**(5): 1329-1337.

Visconti, F., J. M. de Paz, L. Bonet, M. Jordà, A. Quinones and D. S. Intrigliolo (2015). "Effects of a commercial calcium protein hydrolysate on the salt tolerance of *Diospyros kaki* L. cv. "Rojo Brillante" grafted on *Diospyros lotus* L." Scientia horticulturae **185**: 129-138.

Von Arx, J. (1957). "The species of the genus *Colletotrichum* Corda." Phytopathologische Zeitschrift **29**: 413-468.

Wang, F. (2008). Biomarker methods in drug discovery and development, Springer Science & Business Media.

Wang, J., Y. Bi, Z. Zhang, H. Zhang and Y. Ge (2011). "Reduction of latent infection and enhancement of disease resistance in muskmelon by preharvest application of harpin." Journal of agricultural and food chemistry **59**(23): 12527-12533.

Wasternack, C. (2014). "Action of jasmonates in plant stress responses and development—applied aspects." Biotechnology advances **32**(1): 31-39.

Wei, Z.-M. and S. V. Beer (1993). "HrpI of *Erwinia amylovora* functions in secretion of harpin and is a member of a new protein family." Journal of bacteriology **175**(24): 7958-7967.

Weir, B., P. Johnston and U. Damm (2012). "The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex." Studies in mycology **73**: 115-180.

Wezel, A., M. Casagrande, F. Celette, J.-F. Vian, A. Ferrer and J. Peigné (2014). "Agroecological practices for sustainable agriculture. A review." *Agronomy for Sustainable Development* **34**(1): 1-20.

Wiklund, S., E. Johansson, L. Sjöström, E. J. Mellerowicz, U. Edlund, J. P. Shockcor, J. Gottfries, T. Moritz and J. Trygg (2008). "Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models." *Analytical chemistry* **80**(1): 115-122.

Wilhelm, S. (1955). "Longevity of the Verticillium wilt fungus in the laboratory and field." *Phytopathology* **45**: 180-181.

Wishart, D. S. (2008). "Metabolomics: applications to food science and nutrition research." *Trends in food science & technology* **19**(9): 482-493.

Wishart, D. S. (2016). "Introduction to cheminformatics." *Current protocols in bioinformatics* **53**(1): 14.11. 11-14.11. 21.

Xu, C. and D. I. Leskovar (2015). "Effects of *A. nodosum* seaweed extracts on spinach growth, physiology and nutrition value under drought stress." *Scientia Horticulturae* **183**: 39-47.

Yakhin, O. I., A. A. Lubyantsev, I. A. Yakhin and P. H. Brown (2017). "Biostimulants in plant science: a global perspective." *Frontiers in Plant Science* **7**: 2049.

Yildirim, E. (2007). "Foliar and soil fertilization of humic acid affect productivity and quality of tomato." *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science* **57**(2): 182-186.

Ząbek, A., M. Klimek-Ochab, E. Jawień and P. Młynarz (2017). "Biodiversity in targeted metabolomics analysis of filamentous fungal pathogens by ¹H NMR-based studies." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **33**(7): 132.

Zandonadi, D. B., M. P. Santos, L. S. Caixeta, E. B. Marinho, L. E. P. Peres and A. R. Façanha (2016). "Plant proton pumps as markers of biostimulant action." *Scientia Agricola* **73**(1): 24-28.

Zhu, W., M. M. MaGbanua and F. F. White (2000). "Identification of Two Novelhrp-Associated Genes in the *hrp* Gene Cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*." *Journal of bacteriology* **182**(7): 1844-1853.

Zitter, T. and S. Beer (1998). "Harpin for insect control." *Phytopathology* **88**(sSuppl).

Ελληνική Στατιστική Αρχή, Ε. (2017). "Ετήσια Γεωργική Στατιστική Έρευνα: Έτος 2017." 2020, from https://www.statistics.gr/el/statistics?p_p_id=documents_WAR_publicationsportlet_INSTANCE_qDQ8fBKKo4IN&p_p_lifecycle=2&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_cacheability=cacheLevelPage&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=4&p_p_col_pos=1&documents_WAR_publicationsportlet_INSTANCE_qDQ8fBKKo4IN_javax.faces.resource=document&documents_WAR_publicationsportlet_INSTANCE_qDQ8fBKKo4IN_in=downloadResources&documen

ts_WAR_publicationsportlet_INSTANCE_qDQ8fBKKo4IN_documentID=371325&_documents_WAR_publicationsportlet_INSTANCE_qDQ8fBKKo4IN_locale=el.

Ζιώγας, Β. and Α. Μάρκογλου (2010). Γεωργική Φαρμακολογία, Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων. Αθήνα.

Κολαϊνής, Σ., Α. Κωλέπη, Μ. Λυκογιάννη, Α. Παρασκευόπουλος and Κ. Αλιφέρης (2019). Γλοιοσπόριο της ελιάς: Μολυσματικότητα μορφοτύπων του, ανθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα και προτεινόμενο πρόγραμμα φυτοπροστασίας. Γεωργία-Κτηνοτροφία. Αθήνα: 40-43.

Κολαϊνής, Σ., Μ. Λυκογιάννη, Δ. Καραμάνου, Δ. Γκίζη, Σ. Τζάμος, Α. Παρασκευόπουλος and Κ. Αλιφέρης (2017). Γλοιοσπόριο της ελιάς: *Colletotrichum acutatum* είναι το παθογόνο και δεν χρειάζεται απαραίτητα τα νύγματα του δάκου. Γεωργία-Κτηνοτροφία. Αθήνα: 27-29.

Κολαϊνής, Σ., Μ. Λυκογιάννη, Δ. Καραμάνου, Δ. Γκίζη, Σ. Τζάμος, Α. Παρασκευόπουλος and Κ. Αλιφέρης (2018). Γλοιοσπόριο της ελιάς (*Colletotrichum acutatum*): Νέα στοιχεία και εξελίξεις στο πεδίο έρευνας και φυτοπροστασίας. 19^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Αθήνα.

Μπουρνάκας, Β. (2019). Δάκος και Γλοιοσπόριο. Γεωργία-Κτηνοτροφία. Αθήνα: 38-43.

Παναγόπουλος, Χ. (2007). Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων & Αμπέλου. Αθήνα.

Παπλωματάς, Ε. and Ε. Τζάμος. (2015). "Φυτοπαθολογικά προβλήματα της ελιάς και αντίδραση γηγενών ποικιλιών σε ασθένειες." Retrieved 2020, from http://www.minagric.gr/gpa/gpa_third/omilies/tzamos.pdf.

Ροδιτάκης, Ε., Ε. Μαρκάκης, Δ. Γκούμας, Γ. Σμυρνάκης, Ε. Φιλίππου, Α. Καραταράκη, Ε. Μαλανδράκη, Κ. Φωτάκης and Ν. Μπαγκής (2020). Φυτοπροστασία της ελιάς στην Κρήτη. Γεωργία-Κτηνοτροφία. Αθήνα: 22-26.

ΥΠΑΑΤ. (2013). "Στοιχεία παραγωγής, κατανάλωσης, εισαγωγών, εξαγωγών επιτραπέζιας ελιάς στην Ελλάδα." 2020, from http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Oporokipeytika/epitr_elia_ellada.pdf.

ΥΠΑΑΤ. (2020). "Κατάλογος δραστικών ουσιών κατά καλλιέργεια και παθογόνο." Retrieved 04, 2020, from http://www.minagric.gr/syspest/syspest_bfuncs.aspx.



ΑΘΗΝΑ 2020