



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ
& ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη πληθυσμιακής δομής και εφαρμογή καινοτόμων εργαλείων
για τη διάγνωση και αντιμετώπιση του Γλοιοσπορίου



Δημήτρης Γ. Σαρέλλης

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:
Τζίμα Αλίκη, Λέκτορας Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2022

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη πληθυσμιακής δομής και εφαρμογή καινοτόμων εργαλείων
για τη διάγνωση και αντιμετώπιση του Γλοιοσπορίου

“Investigation of population dynamics and implementation of innovative tools
for the detection and treatment of Olive anthracnose”

Δημήτρης Γ. Σαρέλλης

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Τζίμα Αλίκη, Λέκτορας Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Παπλωματάς Επαμεινώνδας, Καθηγητής Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ

Τσιτσιγιάννης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ

Μελέτη της πληθυσμιακής δομής και εφαρμογή καινοτόμων εργαλείων για τη διάγνωση και αντιμετώπιση του Γλοιοσπορίου

ΠΜΣ Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας & Διαχείρισης του Περιβάλλοντος
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ασθένεια του Γλοιοσπορίου ή ανθράκνωση, που προκαλείτε από μύκητες του γένους *Colletotrichum*, είναι η πιο σοβαρή προ-συλλεκτική και μετά-συλλεκτική μυκητολογική ασθένεια του ελαιόκαρπου, σε παγκόσμιο επίπεδο. Η ασθένεια έχει εμφανιστεί σε πάρα πολλές ελαιοπαραγωγικές χώρες του κόσμου, προκαλώντας μεγάλες απώλειες στην παραγωγή, όπως και υποβάθμιση της ποιότητας του παραγόμενου ελαιολάδου. Στην Ελλάδα, μετά από μοριακή ταυτοποίηση των παθογόνων που απομονώθηκαν, επιβεβαιώθηκε ότι το κύριο παθογόνο αίτιο της ασθένειας είναι ο μύκητας *Colletotrichum acutatum* s.s. Η ασθένεια εκδηλώνεται περισσότερο στους ώριμους καρπούς, όμως μπορεί επίσης να εκδηλωθεί και σε άλλες δομές του δένδρου (φύλλα, άνθη, ποδίσκοι, μίσχοι και βλαστοί). Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκαν: 1) Δειγματοληψίες ταξιανθιών, καρπών και βλαστών ελιάς από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, για την απομόνωση και τη μελέτη της πληθυσμιακής διακύμανσης των στελεχών *Colletotrichum* spp. 2) Μοριακή ανίχνευση του παθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* σε δείγματα ταξιανθιών και καρπών ελιάς, με τη μέθοδο RT-PCR TaqMan probe. 3) Αξιολόγηση της μυκοτοξικότητας χημικών σκευασμάτων έναντι στελεχών *Colletotrichum* spp. και έλεγχος ανθεκτικότητας των στελεχών αυτών 4) Αξιολόγηση της ικανότητας χημικών σκευασμάτων να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του μύκητα *Colletotrichum acutatum*, σε καρπούς ελιάς. 5) *In vitro* αξιολόγηση της ικανότητας του βιολογικού παράγοντα *Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 (εμπορική ονομασία Serifel®) να παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μυκήτων *Colletotrichum* spp. 6) Αξιολόγηση της ικανότητας του βιολογικού μυκητοκτόνου Serifel® να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μύκητα *Colletotrichum acutatum*, σε καρπούς ελιάς. Από τα αποτελέσματα των δοκιμών της μελέτης προέκυψε ότι με την μοριακή μέθοδο RT-PCR TaqMan probe είναι δυνατή η ανίχνευση του μύκητα από διάφορους φυτικούς ιστούς της ελιάς και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις μολύσματος. Επίσης, από τα χημικά σκευάσματα που αξιολογήθηκαν, Insignia® (δ.ο. pyraclostrobin χημική ομάδα στρομπιλουρινών), Revyona® (δ.ο. mefentrifluconazole χημική ομάδα τριαζολών), Nordox® (δ.ο. copper oxide χημική ομάδα

χαλκούχων), το Insignia® παρουσιάστηκε ως το πιο αποτελεσματικό. Τέλος, το βιολογικό μυκητοκτόνο Serifel® παρουσίασε χαμηλή αποτελεσματικότητα και απαιτείται περαιτέρω πειραματισμός για την αξιολόγηση της δράσης του, έναντι του μύκητα *Colletotrichum acutatum* στην ελιά.

Επιστημονική περιοχή: Φυτοπαθολογία

Λέξεις κλειδιά: Ελιά, Γλοιοσπόριο, *Colletotrichum acutatum*

Investigation of population dynamics and implementation of innovative technics for the detection and treatment of Olive anthracnose

*MSc Plant Protection & Environment
Department of Plant Production
Laboratory of Phytopathology*

ABSTRACT

Olive anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum* spp., is the most serious pre-harvest and post-harvest disease of olive fruit, worldwide. The disease has been reported from many olive-producing countries of the world, causing important yield losses and degradation of oil quality. In Greece, after molecular characterization of the pathogens that had been isolated, it was confirmed that the main causal agent of the disease is the fungus *Colletotrichum acutatum* s.s. The disease affects mostly ripe olive fruits but it can also affect and other tree structures (leaves, flowers, twigs, pedicels and petioles). The aim of the present study was: 1) Collection of samples of olive flowers, olive fruits and olive stems from several regions of Greece, in order to isolate and investigate the population dynamics of the pathogens, belonging to the genus *Colletotrichum*. 2) Molecular detection of the pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum*, in olive flowers and olive fruits samples, using RT-PCR TaqMan probe method. 3) Evaluation of chemicals fungicides against *Colletotrichum* spp. fungal isolates and resistance testing of the particular isolates. 4) Evaluation of chemicals fungicides against *Colletotrichum acutatum*, in olive fruits. 5) Evaluation *In vitro* of *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600 (commercial brand Serifel®) against *Colletotrichum* spp. 6) Evaluation of the biological fungicide Serifel® (*Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600) against *C. acutatum* pathogenic fungus, in olive fruits. The results of this study demonstrate that with RT-PCR TaqMan probe detection method we are able to detect *C. acutatum* in various plant tissues and in very low infection rate. From the tested chemicals fungicides, Insignia® (a.i. pyraclostrobin, strobilurins chemical group), Revyona® (a.i. mefentrifluconazole, triazoles chemical group), Nordox® a.i. copper oxide, copper based fungicides), Insignia® was the most effective. Finally, Serifel® (*Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600) Biofungicide has shown very efficacy against *C. acutatum*, so further experimentation is required for better evaluation of the formulation.

Scientific area: Plant Pathology

Keywords: Olive, anthracnose, *Colletotrichum acutatum*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της συγγραφής της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Λέκτορα Φυτοπαθολογίας κ. Αλίκη Τζίμα τόσο για την ανάθεση του θέματος, όσο και για την υπομονή της και την πολύτιμη καθοδήγηση της καθ' όλη τη χρονική διάρκεια των πειραμάτων.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας κ. Επαμεινώνδα Παπλωματά για την στήριξη που μου παρείχε και για όσες γνώσεις μου μετέδωσε απλόχερα, πάνω στο ευρύτερο πεδίο της Φυτοπαθολογίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω ακόμα στην διδάκτορα κ. Χριστίνα Λαγογιάννη, που με καθοδήγησε πλήρως στο πειραματικό κομμάτι, ευχαριστώ πολύ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φυτοπαθολογίας κ. Δημήτριο Τσιτσιγιάννη για την διδαχή του στα μαθήματα του ΠΜΣ που παρακολούθησα, αλλά και ως μέλους της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μελέτης μου.

Τέλος, ευχαριστώ όλους/ές τους υποψήφιους μεταδιδάκτορες, διδάκτορες, όλους/ές τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας για την βοήθεια που μου παρείχαν στην εκπόνηση της διπλωματικής μου μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Η Ελιά: Ιστορία και Καλλιέργεια	8
1.1.1. Προέλευση και Ιστορία της Ελιάς.....	8
1.1.2 Βοτανική ταξινόμηση ελιάς	9
1.1.3 Βοτανικά χαρακτηριστικά ελιάς.....	10
1.1.4 Οικολογικό περιβάλλον- Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις ελιάς.....	15
1.1.5 Ποικιλίες ελιάς	17
1.1.6 Χρήσεις ελιάς-Θρεπτική αξία ελαιόλαδου.....	24
1.2. Στατιστικά στοιχεία – Σημαντικότητα Καλλιέργειας.....	26
1.2.1 Παγκόσμια στατιστικά στοιχεία	26
1.2.2 Εγχώρια στατιστικά στοιχεία	28
1.3: ΤΟ ΓΛΟΙΟΣΠΟΡΙΟ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	30
1.3.1 Γενικά.....	30
1.3.2 Γεωγραφική εξάπλωση ασθένειας.....	31
1.3.3 Συμπτώματα ασθένειας	32
1.3.4 Παθογόνο αίτιο ασθένειας- Σύμπλοκα.....	35
1.3.5 Επιδημιολογία και βιολογικός κύκλος των ειδών <i>Colletotrichum</i> spp.....	37
1.3.6 Μέθοδοι αναγνώρισης των παθογόνων <i>Colletotrichum</i> spp.	43
1.3.7 Αντιμετώπιση ασθένειας	47
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	50
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	52
3.1 Συλλογή απομονώσεων	52
3.2 Θρεπτικά υλικά	52
3.3 Διαδικασία απομονώσεων μυκήτων <i>Colletotrichum</i> spp.....	53
3.4 Αλληλούχιση και ταυτοποίηση απομονώσεων	54
3.5 Εξαγωγή ολικού DNA από δείγματα ταξιανθιών και καρπών ελιάς	56
3.6 Μοριακή ανίχνευση του παθογόνου μύκητα <i>Colletotrichum acutatum</i>	57
3.7 Προετοιμασία και επώαση μολυσμάτων.....	59
3.8 Αξιολόγηση ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ χημικών σκευασμάτων	59
3.8.1. <i>In vitro</i> αξιολόγηση χημικών σκευασμάτων	59
3.8.2. Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας χημικών σκευασμάτων σε καρπούς ελιάς	63

3.9 Αξιολόγηση του βιολογικού σκευάσματος Serifel® (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> στέλεχος MBI600).....	64
3.9.1 Απομόνωση του <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> στέλεχος MBI600 από το βιολογικό σκεύασμα Serifel®	65
3.9.2 <i>In vitro</i> αξιολόγηση της ικανότητας του <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> στέλεχος MBI600	66
3.9.3 <i>In vitro</i> αξιολόγηση του <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> στέλεχος MBI600 να παρεμποδίζει το μύκητα <i>C. acutatum</i> μέσω πτητικών ενώσεων.....	66
3.9.4 <i>In vitro</i> αξιολόγηση τ του <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> στέλεχος MBI600 να παρεμποδίζει το μύκητα <i>C. acutatum</i> μέσω δευτερογενών μεταβολιτών.....	67
3.9.5 Διερεύνηση των συνθηκών εγκατάστασης και ανάπτυξης του βακτηρίου <i>B. amyloliquefaciens</i> στέλεχος MBI600 σε καρπούς ελιάς.....	67
3.9.6 Αξιολόγηση του βιολογικού σκευάσματος Serifel® να παρεμποδίζει το μύκητα <i>Colletotrichum nymphaeae</i> σε καρπούς ελιάς.....	68
3.9.7 Αξιολόγηση του βιολογικού σκευάσματος Serifel® να παρεμποδίζει το μύκητα <i>C. acutatum</i> σε μικρότερες συγκεντρώσεις μολύσματος σε καρπούς ελιάς.....	70
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	72
4.1 Συλλογή απομονώσεων.....	72
4.2 Αλληλούχιση στελεχών- Πληθυσμιακή διακύμανση.....	75
4.3 Το παθογόνο <i>Colletotrichum acutatum</i> ανιχνευτηκε με την μέθοδο RT-PCR TaqMan probe σε ιστούς ελιασ.....	77
4.4 Αποτελέσματα <i>In vitro</i> αξιολόγησης χημικών σκευασμάτων εναντίον μυκήτων <i>Colletotrichum</i> spp.	80
4.5 Τα χημικά σκευάσματα Insignia και Revyona παρεμποδίζουν το μύκητα <i>Colletotrichum acutatum</i> σε καρπούς ελιάς.....	104
4.6 Το στέλεχος MBI600 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> παρεμποδίζει <i>In vitro</i> το παθογόνου <i>C. acutatum</i> μέσω ανταγωνισμού για χώρο και θρεπτικά στοιχεία.....	106
4.7 Το στέλεχος MBI600 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> παρεμποδίζει <i>In vitro</i> το παθογόνο <i>C. acutatum</i> μέσω παραγωγής πτητικών ενώσεων.....	108
4.8 Το στέλεχος MBI600 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> παρεμποδίζει <i>In vitro</i> το παθογόνο <i>C. acutatum</i> μέσω παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών.....	109
4.9 Διερεύνηση των συνθηκών εγκατάστασης και ανάπτυξης του βακτηρίου <i>B. amyloliquefaciens</i> στέλεχος MBI600 σε καρπούς ελιάς.....	110
4.10 Αξιολόγηση της ικανότητας του βιολογικού σκευάσματος Serifel® να παρεμποδίζει την ανάπτυξη και κονιδιογένεση του μύκητα <i>Colletotrichum nymphaeae</i> σε καρπούς ελιάς.....	111
4.11 Αξιολόγηση της ικανότητας του βιολογικού σκευάσματος Serifel® να παρεμποδίζει την ανάπτυξη και κονιδιογένεση του μύκητα <i>C. acutatum</i> σε μικρότερες συγκεντρώσεις μολύσματος.....	114
5.1 Απομονώσεις-Πληθυσμιακή διακύμανση.....	119
5.2 Μοριακή ανίχνευση του παθογόνου <i>Colletotrichum acutatum</i> με την μέθοδο RT-PCR TaqMan probe.....	120
5.3 Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας χημικών σκευασμάτων να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μυκήτων <i>Colletotrichum</i> spp.	121

5.4 Αξιολόγηση της ικανότητας του βιολογικού σκευάσματος Serifel® (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> στέλεχος MBI600) να παρεμποδίζει μύκητες του γένους <i>colletotrichum in vitro</i> και σε καρπούς ελιάς	124
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	128

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ΕΛΙΑ: ΙΣΤΟΡΙΑ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

1.1.1. Προέλευση και Ιστορία της Ελιάς

Η ελιά (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) (Εικόνα 1) είναι ένα αειθαλές, αιωνόβιο, καρποφόρο δένδρο και η καλλιέργεια της αποτελεί μια από τις πιο παλιές και σημαντικές καλλιέργειες, στην λεκάνη της Μεσογείου. Η εξημέρωση και εκμετάλλευση της χρονολογείται χιλιετίες πίσω στο παρελθόν και είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τις παραδόσεις, αλλά και την οικονομική ευρωστία των τοπικών κοινωνιών. Στον ελλαδικό χώρο η ελιά καλλιεργείται από τα μινωικά και μυκηναϊκά χρόνια, όπως μαρτυρούν τα ευρήματα των ανασκαφών και για τους κατοίκους του, το δένδρο αυτό, ήταν σύμβολο της ειρήνης, της σοφίας και της γονιμότητας, αποτελώντας αναπόσπαστο κομμάτι του πολιτισμού τους (Fooks R.,2002).

Η ελιά ανήκει στο γένος *Olea* της οικογένειας *Oleaceae*. Η οικογένεια *Oleaceae* περιλαμβάνει 25 γένη και περίπου 688 είδη και είναι μια οικογένεια δικοτυλήδων φυτών, τα οποία γνωρίζουν μεγάλη εξάπλωση στις εύκρατες, υποτροπικές και τροπικές περιοχές (Yan-Li Huang, et al., 2019). Το γένος *Olea* αριθμεί περίπου 40 είδη και υποείδη, που εκτείνονται από την Αφρική και την Ευρώπη, μέχρι την Ασία και Ωκεανία (Green and Wickens, 1989, Besnard, Green and Berville, 2001). Η ελιά (*Olea europaea* L. *l.s.*) είναι το είδος με τη μεγαλύτερη γεωγραφική εξάπλωση, περιλαμβάνοντας αρκετά υποείδη, μεταξύ των οποίων και την *Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *europaea* που αναγνωρίζεται ως ένα από τα παλαιότερα καλλιεργούμενα δένδρα της λεκάνης της Μεσογείου, αλλά και την Μεσογειακή αγριελιά *Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris* (Medail F., et al 2001). Η καλλιεργούμενη ελιά περιλαμβάνει πολλές ποικιλίες και οικότυπους, είναι είδος υποτροπικό και αειθαλές που αναπτύσσεται σε δένδρο ή θάμνο και καλλιεργείται κυρίως για τον βρώσιμο καρπό και το λάδι της.

Για την προέλευση και καταγωγή της ελιάς έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες. Σύμφωνα με την επικρατέστερη, η εξημέρωση της έλαβε χώρα στη ανατολική Μεσόγειο, συμπεριλαμβανομένου και της Κύπρου, κατά την Προκεραμική Νεολιθική περίοδο (7000-6000 π.Χ.) και στη συνέχεια διαδόθηκε δυτικότερα, σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου, μέχρι τα στενά του Γιβραλτάρ. Μέσα στο πέρασμα των αιώνων, η εξημέρωση και εκμετάλλευση της ελιάς αντιπροσωπεύει μια μακρά και συνεχή διαδικασία που εμπεριείχε πολυάριθμες γενετικές ανταλλαγές μεταξύ των καλλιεργούμενων ποικιλιών και των γενετικών δεξαμενών της αγριελιάς (Besnard G., et al., 2013).

Τα τελευταία 500 χρόνια η καλλιέργεια της ελιάς έχει σημειώσει μεγάλη εξάπλωση, έτσι παραγωγικοί ελαιώνες συναντώνται στις μέρες μας στην Νότια και Βόρεια Αμερική (Περού, Αργεντινή, Χιλή, Καλιφόρνια), στην Νότια Αφρική, στην Αυστραλία, στην Κίνα και στην Ιαπωνία (International Olive Council, 2021). Στη λεκάνη της Μεσογείου εξακολουθούν να βρίσκονται οι πιο σημαντικές ελαιοπαραγωγικές χώρες του κόσμου, με την Ισπανία να καταλαμβάνει την πρώτη θέση. Η Ελλάδα βρίσκεται στην τρίτη θέση και αυτή τη στιγμή στην χώρα μας καλλιεργούνται πάνω από 7.900.000 στρέμματα ελαιώνων (ΕΛΣΤΑΤ, 2019), καθιστώντας την καλλιέργεια της ελιάς την πιο σημαντική δενδρώδη καλλιέργεια, με σημαντική συνεισφορά στην οικονομία του τόπου μας.



Εικόνα 1: Υπεραιωνόβιο δένδρο ελιάς (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) σε πάρκο του κέντρου των Αθηνών (πηγή: iefimerida.gr).

1.1.2 Βοτανική ταξινόμηση ελιάς

Η βοτανική ταξινόμηση της καλλιεργούμενης ελιάς είναι η εξής (Σαρλής Γ. Π., 1999):

Βασίλειο: Φυτά (Plantae)

Άθροισμα: Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)

Κλάση: Δικότυλα (Magnoliopsida)

Υποκλάση: Αστερώδη (Asterales)

Τάξη: Scrophulariales

Οικογένεια: Oleaceae

Γένος: *Olea europaea* L.

Είδος: *Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *europaea*

1.1.3 Βοτανικά χαρακτηριστικά ελιάς

Το δένδρο της ελιάς είναι φυτό υποτροπικό, αιθαλές, ανεμόφιλο. Το ύψος του μπορεί να φθάσει στα 15-20 m και ο χρόνος ζωής του κυμαίνεται από μερικές δεκάδες έως εκατοντάδες έτη. Η μακροζωία αυτή μπορεί να αποδοθεί στην ανθεκτικότητα που εμφανίζει το ξύλο της, σε προσβολές από εχθρούς και ασθένειες, καθώς και στην ικανότητα ανάπτυξης νέας βλάστησης από το ριζικό σύστημα και το λαιμό. Η ελιά είναι δένδρο που η ανάπτυξη του ευνοείται σε περιοχές με συνθήκες ξηροθερμικές. Οι εδαφικές απαιτήσεις της δεν είναι μεγάλες και γι' αυτό αναπτύσσεται και σε μη γόνιμα έως πετρώδη εδάφη (Πετροπούλου-Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).

Ο κορμός (Εικόνα 2) της είναι λείος, κυλινδρικός και χρώματος σταχτοπράσινου σε νεαρά δενδρύλλια. Κατά την ανάπτυξη του όμως, παρατηρούνται εξογκώματα και κοιλότητες, δίνοντας του έτσι τραχιά και ανώμαλη μορφή, ενώ ο φλοιός αποκτά σκοτεινό χρώμα. Τα εξογκώματα που εντοπίζονται στον κορμό, στο λαιμό και στις ρίζες καλούνται γόγγροι ή σφαιροβλάστες και είναι υπερπλασίες που δημιουργούνται από την συγκέντρωση θρεπτικών ουσιών και φυτοορμονών. Το χρώμα του ξύλου είναι κίτρινο εξωτερικά και σκούρο κοντά στην εντεριόνη. Οι δακτύλιοι δεν είναι ευκρινείς λόγω της ακανόνιστης αύξησης που παρατηρείται στο δένδρο της ελιάς (Πετροπούλου-Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).



Εικόνα 2: Κορμός δένδρου ελιάς (πηγή: hellasjournal.com).

Το **ριζικό σύστημα** (Εικόνα 3) της ελιάς μέχρι τον τέταρτο χρόνο αναπτύσσεται κάθετα, κυρίως στα σπορόφυτα, αλλά αργότερα το αρχικό αυτό ριζικό σύστημα αντικαθίσταται από ένα άλλο θυσανώδες, που παράγεται κυρίως από τους σφαιροβλάστες που σχηματίζονται στο λαιμό του ελαιοδένδρου, λίγο κάτω από την επιφάνεια του εδάφους. Ο κύριος όγκος του ριζικού συστήματος βρίσκεται σε βάθος μεταξύ 20-70 cm, σε ελαιώνες αρδευόμενους και με εδάφη πλούσια σε θρεπτικές ουσίες. Σε άγονα, πετρώδη εδάφη και ξηροθερμικές συνθήκες οι ρίζες προχωρούν σε βάθη αρκετά μεγαλύτερα του ενός μέτρου, προκειμένου να αναζητήσουν νερό σε πολύ χαμηλούς ορίζοντες. Αυτή η ιδιότητα βοηθά το δένδρο να επιβιώνει κάτω από δύσκολες συνθήκες (Πετροπούλου- Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).



Εικόνα 3: Ριζικό σύστημα ελιάς (πηγή: bordonia.blogspot.com).

Οι **βλαστοί** (Εικόνα 4) της διακρίνονται σε: α) ξυλοφόρους, που θα συνεχίσουν την ανάπτυξη του δένδρου δίνοντας φύλλα και βλαστούς, β) ανθοφόρους, που θα δώσουν άνθη και καρπούς τον επόμενο χρόνο, γ) μεικτούς, που θα δώσουν βλάστηση, άνθη και καρπούς, δ) λαίμαργους, που δίνουν μόνο υπέρμετρα αναπτυγμένη βλάστηση, χωρίς καρπούς (Fooks R., 2002).



Εικόνα 4: Βλαστοί ελιάς (πηγή: giorgoskatsadonis.blogspot.com)

Τα **φύλλα** (Εικόνα 5) της ελιάς είναι απλά, λειόχειλα, λογχοειδή, με υφή δερματώδη και με μικρό μίσχο. Εκφύονται ανά δύο σε κάθε κόμπο- γόνατο, σε αντίθετη ταξιφυλλία και παραμένουν από δύο έως τρία χρόνια πάνω στο δένδρο. Η πάνω επιφάνεια τους είναι βαθυπράσινη με δερματώδη υφή, ενώ η κάτω είναι γκριζοπράσινη φέροντας μεγάλο αριθμό τριχών, οι οποίες τα προστατεύουν από την υπερβολική απώλεια υγρασίας (Πετροπούλου-Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).



Εικόνα 5: Φύλλα ελιάς (πηγή: faidra111.blogspot.com).

Οι **οφθαλμοί** (Εικόνα 6) της απαντώνται στις μασχάλες των φύλλων ανά δύο, τοποθετημένοι κατακόρυφα ο ένας πάνω στον άλλο. Ο ανώτερος οφθαλμός ονομάζεται υπεράριθμος και είναι πολύ μικρός, ενώ ο κατώτερος είναι πιο ογκώδης. Ο ανώτερος οφθαλμός παραμένει συνήθως σε λήθαργο και εκπτύσσεται μετά από 2-3 χρόνια σε βλαστό, μέσου μήκους (20-30 cm), με μακρά μεσογονάτια διαστήματα (περίπου 2 cm). Ο κατώτερος οφθαλμός μπορεί να εκπτυχθεί τον ίδιο χρόνο του σχηματισμού του ή τον επόμενο, επίσης μπορεί να μην εκπτυχθεί και καθόλου όποτε και πέφτει. Συνήθως πέφτει το καλοκαίρι του δεύτερου έτους. Εάν εκπτυχθεί τον ίδιο χρόνο του σχηματισμού του συμπεριφέρεται σαν ταχυφυής και δίνει ένα μικρό βλαστό περιορισμένου μήκους (15-30 cm). Εάν εκπτυχθεί τον επόμενο χρόνο του σχηματισμού του, τότε μπορεί να εξελιχθεί σε ανθοταξία ή εφόσον δεν έχει διαφοροποιηθεί και βρίσκεται στους 4-5 κόμβους κάτω από την κορυφή του ετήσιου βλαστού, μπορεί να εξελιχθεί σε ένα βλαστό μικρού μήκους (5-15cm).

Η διαδικασία διαφοροποίησης των οφθαλμών, σε καρποφόρους, ξεκινά στα τέλη καλοκαιριού με αρχές φθινοπώρου. Η καλή παραγωγικότητα (καρποφορία) της ελιάς προϋποθέτει αρχικά την ύπαρξη ικανοποιητικού αριθμού ανθοφόρων οφθαλμών, που θα δώσουν μια καλή ανθοφορία την άνοιξη. Οι σπουδαιότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία της διαφοροποίησης είναι η ένταση του φωτισμού, η θερμοκρασία, η θρέψη, το μέγεθος της φυλλικής επιφάνειας και η σχέση ώριμα/νέα φύλλα (Πετροπούλου-Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).



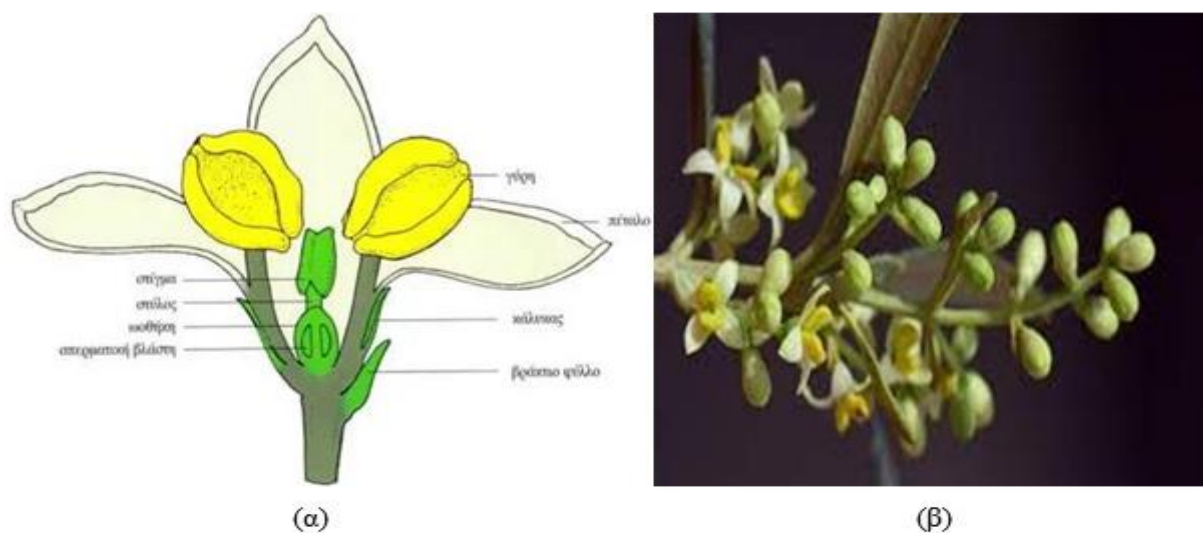
Εικόνα 6: Έκπτυξη οφθαλμών ελιάς (πηγή: sedik.gr).

Τα **άνθη** (Εικόνα 7) της φέρονται σε βοτρυώδεις ταξιανθίες στις μασχάλες αντίθετων φύλλων και σε βλαστούς της προηγούμενης βλαστικής περιόδου κυρίως, αλλά και κάποιες φορές προέρχονται και από λανθάνοντες οφθαλμούς που βρίσκονται σε βλαστούς ηλικίας 1-2 ετών. Τα άνθη είναι περίγυνα, μικρού μεγέθους, βραχύμισχα και χρώματος κιτρινόλευκου. Τα δύο ανθικά μέρη, ο κάλυκας και η στεφάνη, σχηματίζουν έναν κώδωνα, ο οποίος φέρει στο εσωτερικό του δύο βραχείς στήμονες και έναν ύπερο. Ο ύπερος αποτελείται από μία δίχωρη ωοθήκη, έναν βραχύ στύλο και ένα διπλό κεφαλωτό στίγμα. Τα είδη των ανθών που απαντώνται στην ελιά είναι δύο:

α) τα τέλεια, όταν περιλαμβάνουν αναπτυγμένους και τους στήμονες και τον ύπερο και

β) τα ατελή ή στημονώδη ή στημονοφόρα, όταν περιλαμβάνουν μόνο τους στήμονες και τα οποία δεν είναι δυνατόν να γονιμοποιηθούν, για να δώσουν καρπό.

Οι ελιές συνήθως σχηματίζουν υπερβολικά μεγάλο αριθμό ανθών από τα οποία ένα μικρό ποσοστό, 1-2% περίπου, είναι αρκετό για να δώσει μια ικανοποιητική παραγωγή. Η πλήρης άνθηση της ελιάς στη χώρα μας πραγματοποιείται συνήθως από τα τέλη Απριλίου μέχρι τα τέλη Μαΐου, αναλόγως της ποικιλίας, της περιοχής καλλιέργειας και των κλιματικών συνθηκών (Πετροπούλου- Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).



Εικόνα 7: (α) Μορφολογία άνθους ελιάς (πηγή: myoliveplant.gr)- (β) Βοτρυώδης ταξιανθία ελιάς (πηγή: giorgoskatsadonis.blogspot.com).

Ο **καρπός** (Εικόνα 8) είναι δρύπη και σχηματίζεται από τους ιστούς των καρπόφυλλων. Αποτελείται από το εξωκάρπιο, το σαρκώδες μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο ή πυρήνα. Το ενδοκάρπιο εξωτερικά εμφανίζει χαρακτηριστικές αυλακώσεις που καλούνται

γλυφές, ενώ στο εσωτερικό του βρίσκεται το σπέρμα το οποίο αποτελείται από την επιδερμίδα, το ενδοσπέρμιο, τις κοτυληδόνες και το έμβρυο. Οι καρποί αρχικά έχουν χρώμα πράσινο, το οποίο κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, συνήθως από τον μήνα Οκτώβριο, γίνεται ιώδες και μαύρο. Η ελαιοπεριεκτικότητα των καρπών αρχίζει από τον μήνα Αύγουστο, αυξάνεται το φθινόπωρο και φθάνει στο μέγιστο το Δεκέμβριο-Ιανουάριο με την πλήρη ωρίμανση του καρπού (Πετροπούλου- Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).



Εικόνα 8: Καρποί ελιάς ποικιλίας Μεγάρων (πηγή: fytorio-olympus.gr).

1.1.4 Οικολογικό περιβάλλον- Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις ελιάς

Η εμπορική καλλιέργεια της ελιάς εντοπίζεται σε δύο ζώνες, την ζεστή εύκρατη και την υποτροπική, ανάμεσα σε 30° και 45° βόρειου και νότιου γεωγραφικού πλάτους. Σε ψηλότερα πλάτη η καλλιέργεια της δεν είναι δυνατή, γιατί τα ελαιόδενδρα καταστρέφονται από τις χαμηλές θερμοκρασίες των χειμερινών μηνών. Σε περιοχές με χαμηλότερα γεωγραφικά πλάτη η ελιά δεν μπορεί να αναπτυχθεί πλήρως παρά μόνο βλαστικά, λόγω της μη υποβολής της σε χαμηλές θερμοκρασίες που είναι απαραίτητες για την διαφοροποίηση των οφθαλμών (Πετροπούλου- Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).

Πιο συγκεκριμένα, η ελιά αν και είναι υποτροπικό είδος έχει κάποια μορφή σκληραγώγησης στο ψύχος. Είναι ευαίσθητη στους πρώιμους φθινοπωρινούς παγετούς και στους χειμερινούς παγετούς και έτσι έως το Δεκέμβριο οι καρποί παγώνουν στους -3°C, τα φύλλα στους -3°C έως -6°C, ο φλοιός στους -7°C και το ξύλο στους μεγαλύτερης ηλικίας βλαστούς στους -13°C. Τον Ιανουάριο τα ελαιόδενδρα έχουν σκληραγωγηθεί (εάν έχει συλλεχθεί ο καρπός) και οι οφθαλμοί και οι μεγάλης ηλικίας βλαστοί αντέχουν κατά 2-3°C

χαμηλότερα, από τις παραπάνω θερμοκρασίες. Με το πέρας του ληθάργου η αντοχή στο ψύχος μειώνεται και ξεκινά η ανοιξιάτικη βλάστηση (Πετροπούλου- Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).

Κατά τη βλαστική περίοδο, την άνοιξη και το καλοκαίρι, η ελιά έχει ανάγκη από υψηλές θερμοκρασίες για να δημιουργήσει καινούργια βλάστηση και καρποφορία. Οι υψηλές θερμοκρασίες είναι επίσης απαραίτητες για την κανονική αύξηση και ωρίμανση του καρπού. Η ανώτατη θερμοκρασία το καλοκαίρι δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 36°C, γιατί τα δένδρα αφυδατώνονται (Πετροπούλου- Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).

Άλλος σημαντικός παράγοντας, που επηρεάζει την ανάπτυξη και την καρποφορία της ελιάς, ιδιαίτερα εκεί που δεν υπάρχει δυνατότητα για άρδευση, είναι η σχετική ατμοσφαιρική υγρασία και το ύψος των βροχοπτώσεων. Η σχετική ατμοσφαιρική υγρασία πρέπει να είναι ελαφρώς ξηρή, διότι η υψηλή υγρασία ευνοεί την ανάπτυξη ασθενειών και εχθρών. Επίσης, σε ξηρές περιοχές της χώρας όπου το ύψος βροχής περιορίζεται στα 200-300 mm το έτος οι αποδόσεις είναι καλές, εκεί μόνο που το έδαφος συγκρατεί το νερό. Σε αντίθεση με περιοχές όπου το ύψος βροχής φτάνει τα 400-600 mm, οι αποδόσεις είναι καλές εφόσον δεν δημιουργείται πρόβλημα από περίσσεια εδαφικής υγρασίας (Πετροπούλου- Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).

Οι χαλαζοπτώσεις προκαλούν ζημιές στην βλάστηση και στους καρπούς της ελιάς και ευνοούν την ανάπτυξη και εξάπλωση της φυματίωσης, που προκαλείται από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi*, σαν αποτέλεσμα των πληγών στα όργανα του ελαιόδενδρου. Επίσης, το χιόνι προκαλεί συνήθως μόνο μηχανικές ζημιές όπως σπάσιμο βλαστών ή και βραχιόνων (Πετροπούλου- Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).

Όσον αφορά την επίδραση των ανέμων, οι ζεστοί και ξηροί ή ψυχροί και υγροί άνεμοι κατά την περίοδο της ανθοφορίας της ελιάς έχουν αποτέλεσμα το χαμηλό βαθμό καρπόδεσης, άρα και την μειωμένη κατά πολύ παραγωγή. Επίσης, οι ζεστοί και ξηροί άνεμοι αποξηραίνουν τα στίγματα των ανθέων και δυσκολεύουν την γονιμοποίηση τους (Πετροπούλου- Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).

Οι εδαφικές απαιτήσεις της ελιάς δεν φαίνεται να είναι σημαντικές. Καλλιεργείται σε όλους τους τύπους των εδαφών, ακόμα και στα άγονα πετρώδη εδάφη και αλατούχα εδάφη, εκεί που άλλα οπωροφόρα δεν μπορούν να επιβιώσουν. Αποδίδει καλύτερα όμως σε ασβεστοαργιλώδη εδάφη, που περιέχουν άργιλο σε ποσοστό 10-30%, πλούσια σε ασβέστιο, βόριο, και κάλιο με ουδέτερο ή αλκαλικό pH (7-8) (Πετροπούλου- Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).

1.1.5 Ποικιλίες ελιάς

Η ελιά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έχει υποείδη, τύπους και ποικιλίες, που δημιουργήθηκαν από φυσικές συνθήκες, με την πάροδο του χρόνου. Σε αυτό βοήθησε πολύ το ότι το δένδρο είναι αιωνόβιο και έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται πολύ εύκολα. Η ελιά πολλαπλασιάζεται με κουκούτσια, παραφυάδες, μοσχεύματα, που είναι τεχνικές παλιές, παραδοσιακές. Οι μεταλλαγές των ματιών όμως, που έγιναν μέσα στους αιώνες, αύξησαν τον αριθμό των ποικιλιών και των τύπων, συμβάλλοντας παράλληλα και στη βελτίωση τους. Ακόμα, δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι πολλές από τις σημερινές ποικιλίες προέρχονται από αυτοφυή δένδρα που διασταυρώθηκαν και μετά διασκορπίστηκαν τα κουκούτσια τους, δίνοντας καινούργια δένδρα, τα οποία εξελισσόμενα έδωσαν καινούργιες ποικιλίες, που στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν από τον άνθρωπο και παρέμειναν μέχρι σήμερα. Στις παραλλαγές αυτές πρέπει να προσθέσουμε και την προσαρμογή του δένδρου στις διάφορες συνθήκες περιβάλλοντος, που μπορούν να τροποποιήσουν τον φυτικό και παραγωγικό χαρακτήρα μιας ποικιλίας (Fooks R.,2002).

Στην Ελλάδα σήμερα καλλιεργούνται γύρω στις 40 ποικιλίες ελιάς. Οι περιοχές καλλιέργειας δεν παρουσιάζουν ομοιομορφία και έτσι το ελαιόδενδρο καλλιεργείται σε παράλια και ηπειρωτικά μέρη της χώρας μας, επίσης στα νησιά, με εξαίρεση μόνο ορισμένων ψυχρών περιοχών των βόρειων νομών. Η επιλογή μιας ποικιλίας για εγκατάσταση σε μια περιοχή γίνεται κυρίως με βάση την προσαρμογή της στο περιβάλλον, αλλά και την παραγωγική της ικανότητα. Είναι λοιπόν οι ειδικές κλιματολογικές συνθήκες που χαρακτηρίζουν τις ελαιοπαραγωγικές περιοχές της χώρας, ορίζουν τις μικροκλιματικές και τις μακροκλιματικές συνθήκες που επιδρούν αποφασιστικά στην προσαρμογή και την τυπολογία των ποικιλιών (Fooks R.,2002).

Οι κυριότερες ποικιλίες, που καλλιεργούνται σήμερα στη χώρα μας, βάσει του προορισμού χρήσης τους είναι οι εξής (Fooks R.,2002):

A) Ποικιλίες για ελαιοποίηση:

1) Αγουρομανακολιά (*Olea europaea* var. *ovalis*): Καλλιεργείται στην Αργολίδα, Κορινθία, Αρκαδία, Σπέτσες, Ερμιονίδα. Είναι γνωστή και ως Αγουρομάνικο και Αγουρομανάκι. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε υψόμετρο μέχρι 650 m, λόγω της ευαισθησίας της στο ψύχος. Αναπτύσσεται σε δένδρο ύψους 5-7m, με ζωνρή βλάστηση. Τα φύλλα είναι μέτρια, λογχοειδή και καταλήγουν σε μικρή ακίδα. Ο καρπός είναι μέτριου μεγέθους, με μέσο βάρος 2,5 g, χωρίς θηλή. Ωριμάζει όψημα (τέλος Ιανουαρίου με Φεβρουάριο), παίρνοντας χρώμα κόκκινο-μωβ. Η περιεκτικότητα σε λάδι φτάνει το 25%.

2) Αδραμυτινή (*Olea europaea* var. *media subrotunda*): Καλλιεργείται κυρίως στη Μυτιλήνη, Χίο, Εύβοια και στην Άνδρο. Είναι γνωστή και ως Αϊβαλιώτικη, Κασδαγλίτισσα, Μυτιληνιά, Φραγκολιά. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε υψόμετρο μέχρι 500-600 m. Αναπτύσσεται σε δένδρο ύψους 6-8 m. Τα φύλλα είναι μέτρια, στενά, σκληρά με στιλπνή την πάνω επιφάνεια. Ο καρπός μοιάζει με βελανίδι, με μέσο βάρος 3-4 g. Ωριμάζει Νοέμβριο με Δεκέμβριο, παίρνοντας χρώμα μελανό. Η περιεκτικότητα σε λάδι κυμαίνεται από 22-25%.

3) Βαλανολιά (*Olea europaea* var. *pyriformis*): Καλλιεργείται στη Μυτιλήνη, Χίο και Σκύρο. Είναι γνωστή και ως Κολοβή και Βαλάνα. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε υψόμετρο μέχρι 500m. Αναπτύσσεται σε ζωνικό δένδρο, ακανόνιστου σχήματος. Τα φύλλα είναι μεγάλα, σκληρά και πλατιά. Ο καρπός μοιάζει με βελανίδι, με μέσο βάρος 3-4,5g που ωριμάζει όψιμα (Φεβρουάριο-Μάρτιο), παίρνοντας χρώμα μελανό. Η περιεκτικότητα σε λάδι κυμαίνεται από 25-30%.

4) Κορωνέικη (*Olea europaea* var. *mastoides*) (Εικόνα 9^α): Καλλιεργείται στην Πελοπόννησο, Κρήτη, στα Ιόνια νησιά, στη Δυτική Στερεά, στη Σάμο, Ικαρία και αλλού. Είναι γνωστή και ως Μικρόκαρπη, Ψιλολιά, Λιανολιά, Κρητικιά και Βάτσικη. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε υψόμετρο μέχρι 500m. Αναπτύσσεται σε δένδρο με μεγάλο ύψος, με σχήμα κόμης ημισφαιρικό ή κυπελλοειδές. Τα φύλλα είναι μικρά και λογχοειδή. Ο καρπός είναι μαστοειδής, με μέσο βάρος 0,5g. Η ωρίμανση του καρπού αρχίζει νωρίς τον Οκτώβριο και τελειώνει αργά το Δεκέμβριο. Η περιεκτικότητα σε λάδι φτάνει το 22%.

5) Κουτσουρελιά (*Olea europaea* var. *microphylla*): Καλλιεργείται στην Αχαΐα, Κορινθία και Αιτωλοακαρνανία. Είναι γνωστή και ως Λαδολιά, Πατρινή και Κουρτελιά. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε υψόμετρο μέχρι 500m. Αναπτύσσεται σε δένδρο με μεγάλο ύψος. Τα φύλλα είναι μικρά και λογχοειδή. Ο καρπός είναι μικρός, σφαιρικός, με μέσο βάρος 1,2g, που ωριμάζει περί τα τέλη Νοεμβρίου. Η περιεκτικότητα σε λάδι φτάνει στο 24%.

6) Λιανολιά Κερκύρας (*Olea europaea* var. *craneomorpha*): Καλλιεργείται στα Ιόνια νησιά και στα παράλια της Ηπείρου. Είναι γνωστή και ως Δαφνόφυλλη, Στριφτολιά, Νερολιά και Πρεβεζάνα. Αναπτύσσεται σε μεγάλο και ζωνικό δένδρο, ύψους έως 20m. Τα φύλλα είναι μεγάλα, πλατιά και κυματοειδή. Ο καρπός είναι μικρός και επιμήκης, με μέσο βάρος 1g, που ωριμάζει την Άνοιξη. Η περιεκτικότητα σε λάδι φτάνει το 20%.

7) Μεγαρίτικη (*Olea europaea* var. *argentata*) (Εικόνα 9β): Καλλιεργείται στην Αττική, στη Βοιωτία, Αιγαλεία, Αργοναυπλία και Κυνουρία. Είναι γνωστή και ως Περαχωρίτικη, Βοβώδικη και Χοντρολιά. Είναι ευπαθής στις χαμηλές θερμοκρασίες και ανθεκτική στην ξηρασία. Αναπτύσσεται σε δένδρο μετρίου μεγέθους. Τα φύλλα είναι μεγάλα, λογχοειδή,

καταλήγουν σε ακίδα και έχουν χρώμα ανοιχτό πράσινο στην πάνω επιφάνεια και τεφροπράσινο στην κάτω. Ο καρπός είναι κυλινδροκωνικός έως σφαιρικός, με θηλή ή και χωρίς, με μέσο βάρος 4g, που ωριμάζει Νοέμβριο με Δεκέμβριο. Η περιεκτικότητα σε λάδι κυμαίνεται από 20-29%.

8) Μυρτολιά (*Olea europaea* var. *microcarpa subrotunda*): Καλλιεργείται κυρίως στην Λακωνία. Είναι γνωστή και ως Σμερτολιά και Μουρτολιά. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε υψόμετρο μέχρι 900m. Αναπτύσσεται σε ζωνρό δένδρο με λεπτό κορμό. Ο καρπός είναι μικρός και η περιεκτικότητα σε λάδι φτάνει το 25%.

9) Τσουνάτη (*Olea europaea* var. *mamilaris*): Καλλιεργείται στο Ρέθυμνο, στα Χανιά, την Λακωνία και Μεσσηνία. Είναι γνωστή και ως Μαστολιά, Ματσολιά και Μουρατολιά. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε υψόμετρο μέχρι 1000 m. Αναπτύσσεται σε δένδρο μεγάλου ύψους, με ακανόνιστο σχήμα κόμης. Τα φύλλα είναι μετρίου μεγέθους, ανοιχτοπράσινα, με αυλάκωση στο κεντρικό νεύρο. Ο καρπός είναι μετρίου μεγέθους, ωσειδής, βάρους 2 g, που ωριμάζει Δεκέμβριο με Ιανουάριο. Η περιεκτικότητα σε λάδι φτάνει το 25%.



(α)

(β)

Εικόνα 9: (α) Καρπός ελιάς ποικιλίας Κορωνέικη (πηγή: agrotikistegi.gr)- (β) Καρπός ελιάς ποικιλίας Μεγαρίτικη (πηγή: fitoriakonstantinou.gr).

B) Επιτραπέζιες ποικιλίες:

1) Αδρόκαρπη (*Olea europaea* var. *major*): Καλλιεργείται σε όλη την Ελλάδα, με περιορισμένο όμως ενδιαφέρον. Είναι γνωστή και ως Κορομηλολιά, Ισπανική και Δαμασκηνάτη. Ο καρπός είναι πολύ μεγάλος, επιμήκης, που μοιάζει με δαμάσκηνο. Χρησιμοποιείται για πράσινη και μαύρη επιτραπέζια ελιά.

2) Βασιλικάδα (*Olea europaea var. regalis*): Καλλιεργείται στην Κέρκυρα, στις Ροβιές Ευβοίας και στη Χαλκιδική. Είναι γνωστή και ως Βασιλική, Κολοκυθάτη, Ροβιάτικη. Είναι ανθεκτική στο ψύχος. Αναπτύσσεται σε δένδρο ύψους 4-8 m. Ο καρπός είναι μεγάλος, ωοειδής, χωρίς θηλή. Είναι κατάλληλη για παραγωγή μαύρης και πράσινης επιτραπέζιας ελιάς.

3) Καλαμών (*Olea europaea var. ceraticarpa*) (Εικόνα 10α): Καλλιεργείται κυρίως στην Μεσσηνία, Λακωνία και Αχαΐα. Είναι γνωστή και ως Καλαματιανή, Αετονύχι και Χοντρολιά. Έχει απαιτήσεις σε νερό και ευδοκιμεί σε περιοχές με μεγάλη ατμοσφαιρική υγρασία. Αναπτύσσεται σε ζωνιό δένδρο μέτριου ως μεγάλου μεγέθους. Τα φύλλα της είναι τα μεγαλύτερα από όλες τις ελληνικές ποικιλίες. Ο καρπός είναι μεγάλος, κυρτωμένος μονόπλευρα, με βάρος μέχρι 6 g, που ωριμάζει το Νοέμβριο με Δεκέμβριο. Είναι μια από τις καλύτερες επιτραπέζιες ποικιλίες. Δίνει μαύρες ελιές, χαρακτές, ξιδάτες, ιδιαίτερα κατάλληλες για κονσερβοποίηση.

4) Καρολιά (*Olea europaea var. oblonga*): Καλλιεργείται στη Μυτιλήνη, στην Κέρκυρα και στην Ζάκυνθο, με περιορισμένη σημασία. Είναι γνωστή και ως Στραβολιά και Καρουλιά. Ο καρπός της είναι μεγάλος. Καλλιεργείται για παραγωγή πράσινης και μαύρης ελιάς.

5) Καρυδολιά (*Olea europaea var. maxima*): Καλλιεργείται στην Κέρκυρα, Άμφισσα, Λαμία, Εύβοια, Χαλκιδική και Αττική. Είναι γνωστή και ως Κωνική, Κολυμπάδα και Καρυδοραχάτη. Αναπτύσσεται σε ζωνιό δένδρο, μετρίου μεγέθους και ορθόκλαδο. Ο καρπός είναι μεγάλος, με δύο ραφές και καταλήγει σε θηλή. Είναι ποικιλία κατάλληλη για παραγωγή πράσινης και μαύρης επιτραπέζιας ελιάς.

6) Κολυμπάδα (*Olea europaea var. uberina*): Καλλιεργείται περιορισμένα στην Αττική, Φωκίδα, Κυκλάδες, Μεσσηνία, Εύβοια και αλλού. Είναι γνωστή και ως Κολυμπάτη, Μηλολιά, και Στρουμπουλιά. Αναπτύσσεται σε δένδρο μετρίου μεγέθους. Ο καρπός είναι μεγάλος και σφαιρικός.

7) Κονσερβολιά (*Olea europaea var. rotunda*) (Εικόνα 10β): Καλλιεργείται κυρίως στο Αργίνιο, Άμφισσα, Άρτα, Εύβοια, Λαμία, Πάτρα, Πήλιο και σε πολλές άλλες περιοχές της χώρας. Είναι γνωστή και ως Αργινίου, Άμφισσας, Βολιώτικη, Πατριλιά και Στρογγυλολιά. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε υψόμετρο μέχρι 600 m και απαιτεί γόνιμα εδάφη. Αναπτύσσεται σε δένδρο ύψους έως 10 m. Ο καρπός είναι σφαιρικός ή ωοειδής, από τους μεγαλύτερους των ελληνικών ποικιλιών, βάρους έως 8 g. Δίνει πράσινες και μαύρες επιτραπέζιες ελιές άριστης ποιότητας, ιδιαίτερα κατάλληλες για κονσερβοποίηση.

8) Στρογγυλολιά (*Olea europaea* var. *rubrotunda*): Καλλιεργείται κυρίως στη Χαλκιδική. Είναι γνωστή και ως Γαλανή, Πρασινολιά και Μηλολιά. Είναι δένδρο με σημαντική ανθεκτικότητα στο ψύχος και στην ξηρασία. Ο καρπός είναι μεγάλος. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή πράσινης επιτραπέζιας ελιάς.



Εικόνα 10: (α) Καρπός ελιάς ποικιλίας Καλαμών (πηγή: agrotikistegi.gr)- (β) Καρπός ελιάς ποικιλίας Κονσερβολιά (Αμφίσης) (πηγή: fytoriaikonstantinou.gr).

Γ) Μεικτές ποικιλίες:

1) Αμυγδαλολιά (*Olea europaea* var. *amygdaliformis*): Καλλιεργείται στην Άμφισσα για λάδι και στην Αττική και αλλού για παραγωγή επιτραπέζιας πράσινης ελιάς. Είναι γνωστή και ως Κουρομούτα και Στραβομούτα. Αναπτύσσεται σε δένδρο μικρού έως μέτριου μεγέθους, με σφαιρική κόμη. Τα φύλλα είναι μεγάλα και επιμήκη. Ο καρπός μοιάζει με αμύγδαλο, είναι μεγάλος, μακρόστενος και καταλήγει σε θηλή. Η περιεκτικότητα σε λάδι φτάνει το 22%.

2) Θρουμπολιά (*Olea europaea* var. *media oblonga*) (Εικόνα 11β): Καλλιεργείται κυρίως στη Χίο, Σάμο, Κυκλάδες, αλλά και στην Κρήτη, Αττική, Εύβοια, Θάσο, Ρόδο και αλλού. Είναι γνωστή και ως Θρούμπα, Ασκούδα, Θασίτικη και Ξανθολιά. Είναι μια από τις πιο διαδεδομένες ποικιλίες της χώρας μας. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε υψόμετρο έως 700 m. Είναι δένδρο μέτριου έως μεγάλου μεγέθους, ορθόκλαδο, απαιτητικό σε υγρασία. Ευδοκίμει σε εδάφη βαθιά, γόνιμα. Τα φύλλα είναι λεπτά και μακρόστενα. Ο καρπός έχει μέτριο μέγεθος, με μέσο βάρος 3g και περιεκτικότητα σε λάδι φτάνει το 28%. Χρησιμοποιείται και για παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς, της Θρούμπας.

3) Κοθρέικη (*Olea europaea* var. *minor rotunda*) (Εικόνα 11β): Καλλιεργείται στην Άμφισσα, Δελφούς, Ιτέα, Αράχωβα, Λαμία, Κυνουρία, Ερμιόνη και Πόρο. Είναι γνωστή και ως Μανάκι, Κορινθιακή και Γλυκομανάκι. Αντέχει στην ξηρασία και το ψύχος. Μπορεί να

καλλιεργηθεί σε υψόμετρο μέχρι 800 m. Είναι δένδρο με μέτρια έως μεγάλη ανάπτυξη, ορθόκλαδο, με μέτρια φύλλα, βαθυπράσινα. Ο καρπός είναι σφαιρικός ή ωοειδής, βάρους 4-4,5 g και ελαιοπεριεκτικότητα 25%, που ωριμάζει το Νοέμβριο με Δεκέμβριο. Δίνει λάδι καλής ποιότητας, αλλά και μαύρη επιτραπέζια ελιά που είναι γευστική και αρωματική.

4) Ματολιά: Καλλιεργείται στην Ηλεία. Είναι γνωστή και ως Ρουσολιά, Νυχάκι και Νταμουρελιά. Ποικιλία μέτριας παραγωγικότητας. Τα φύλλα της είναι άφθονα, λογχοειδή, βαθυπράσινα. Ο καρπός είναι μέτριος, κυρτωμένος και καταλήγει σε θηλή, που ωριμάζει το Νοέμβριο. Το βάρος του είναι 2,5-3 g και η περιεκτικότητά του σε λάδι κυμαίνεται από 17-19%. Χρησιμοποιείται για ελαιοποίηση, αλλά και για επιτραπέζια ελιά.



Εικόνα 11: (α) Καρπός ελιάς ποικιλίας Κοθρέικη (πηγη: agrotikistegi.gr)- (β) Καρπός ελιάς ποικιλίας Θρουμπολιά (πηγη: agrotikistegi.gr).

Δ) Ξένες ποικιλίες που καλλιεργούνται στην Ελλάδα:

1) Arbequina (*Olea europaea* var. *lierdensis*) (Εικόνα 12α): Ισπανική ποικιλία, με αντοχή στο ψύχος και πρώιμη. Δένδρο μέσης ζωνρότητας, με κλαδιά που κρέμονται. Τα φύλλα είναι μικρά, με έντονο πράσινο χρώμα. Ο καρπός είναι μικρός, σχεδόν σφαιρικός ή επιμήκης. Είναι πολύ παραγωγική ποικιλία, που ωριμάζει τον καρπό σταδιακά. Η περιεκτικότητά σε λάδι κυμαίνεται από 17-20% και είναι καλής ποιότητας.

2) Ascolana: Ιταλική ποικιλία. Αναπτύσσεται σε μεγάλο δένδρο, ορθόκλαδο, με πυκνό φύλλωμα, που έχει μεγάλες απαιτήσεις σε ψύχος. Τα φύλλα είναι φαρδιά, ελλειπτικά, με πράσινο λαμπερό χρώμα στην πάνω επιφάνεια και γκριζοπράσινο στην κάτω. Ο καρπός της

είναι μεγάλος, ελλειπτικός, με ελαιοπεριεκτικότητα που φτάνει το 17%. Χρησιμοποιείται κυρίως για παραγωγή πράσινης επιτραπέζιας ελιάς σε άλμη.

3) Frantoio: Ιταλική ποικιλία, με ευκολία προσαρμογής. Το δένδρο παίρνει μεγάλο ύψος, είναι πλαγιόκλαδο, με μέτρια ζωηρότητα. Ο καρπός είναι μικρός, ωοειδής, ωριμάζει κλιμακωτά και έχει 20% περιεκτικότητα σε λάδι εξαιρετικής ποιότητας.

4) Gordal (*Olea europaea* var. *regalis*): Ισπανική ποικιλία, με ανθεκτικότητα στο ψύχος. Το δένδρο γίνεται μεγάλο, με απλωμένο φύλλωμα και κρεμαστά καρποφόρα κλαδιά. Τα φύλλα είναι σχετικά μεγάλα, λογχοειδή, με σκούρο πράσινο χρώμα στην πάνω επιφάνεια και γκριζοπράσινο στην κάτω. Ο καρπός είναι πολύ μεγάλος, ασύμμετρος, με βάρος που μπορεί να φτάσει τα 10 g, που παίρνει βαθύ μαύρο χρώμα κατά την ωρίμανση. Δίνει επιτραπέζια πράσινη και μαύρη ελιά, καλής ποιότητας, σε άλμη.

5) Leccino: Ιταλική ποικιλία, ανθεκτική στο ψύχος. Ο καρπός είναι μεγάλος, ωοειδής-κυλινδρικός, με χρώμα βαθύ-ιώδες. Καλλιεργείται για παραγωγή λαδιού, το οποίο είναι καλής ποιότητας.

6) Manzanilla (*Olea europaea* var. *pomiformis*) (Εικόνα 12β): Ιταλική ποικιλία, με καρπό μεγάλο και στρογγυλό. Χρησιμοποιείται κυρίως για παραγωγή μαύρης επιτραπέζιας ελιάς, αλλά είναι επίσης κατάλληλος για ελαιοποίηση (περιεκτικότητα σε λάδι 20%).

7) Picholine: Γαλλική ποικιλία. Εξαιρετική για παραγωγή πράσινης επιτραπέζιας ελιάς. Ο καρπός είναι μέτριος, με περιεκτικότητα σε λάδι 17%.



Εικόνα 12: (α) Καρπός ελιάς ποικιλίας Arbequina (πηγή: fitoriakonstantinou.gr)- (β) Καρπός ελιάς ποικιλίας Manzanilla (πηγή: SlidePlayer.gr).

1.1.6 Χρήσεις ελιάς-Θρεπτική αξία ελαιόλαδου

Το κύριο προϊόν το οποίο προσφέρει απλόχερα η ελιά είναι το λάδι που προκύπτει από τον ελαιόκαρπο. Το ελαιόλαδο αποτελεί μία από τις πρώτες λιπαρές ουσίες που χρησιμοποιήθηκε από τους μεσογειακούς λαούς, τόσο στη διατροφή όσο και στην ιατρική και την κοσμητολογία, ως φάρμακο και καλλυντικό.

Το ελαιόλαδο (παρθένο και έξτρα παρθένο) αποτελεί το φυσικό χυμό του καρπού της ελιάς. Αυτός παραλαμβάνεται αποκλειστικά και μόνο με φυσικές μεθόδους και κάτω από συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας τέτοιες που να μην αλλοιώνεται το τελικό προϊόν. Οι μοναδικές μέθοδοι που επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή του ελαιόλαδου είναι η μηχανική σύνθλιψη, η μετάγγιση, η φυγοκέντρωση και το φιλτράρισμα (Fooks R.,2002).

Το ελαιόλαδο αποτελείται κατά 99% από λιπαρές ύλες (τριγλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα) και κατά 1% από πολικά συστατικά (πολυφαινόλες, τοκοφερόλες και άλλα φυσικά αντιοξειδωτικά). Ως λιπαρή ουσία αποτελεί συμπυκνωμένη μορφή ενέργειας (1g παρέχει 9 θερμίδες) και ως φυτικό λάδι πλούσιο σε καλά λιπαρά (μονοακόρεστα) και φυσικά αντιοξειδωτικά, προστατεύει από πολλές ασθένειες και συμβάλλει στη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας. Συγκεκριμένα, το ελαιόλαδο περιέχει (Boskou D., et al., 2006, www.moh.gov.cy/sgl):

1) Λιπαρά Οξέα:

- α) Μονοακόρεστα λιπαρά (π.χ. 63%-83% ελαϊκό οξύ) που συμβάλλουν στη μείωση της «κακής» LDL-χοληστερόλης στο αίμα και στη διατήρηση της φυσιολογικής συγκέντρωσης της «καλής» HDL-χοληστερόλης, και
- β) Πολυακόρεστα λιπαρά (6-8% ω-6 λινελαϊκό) και 0,8% ω-3 λινολενικό) που συντίθενται από τον ανθρώπινο οργανισμό (απαραίτητα) και μειώνουν την πιθανότητα εκδήλωσης στεφανιαίας νόσου, αθηροσκλήρωσης και καρδιοπάθειας.

2) Λιποδιαλυτές προβιταμίνες και βιταμίνες: Βιταμίνες E (α-Τοκοφερόλη), Προβιταμίνη A (καροτίνη), Βιταμίνες Δ και Κ.

3) Αντιοξειδωτικά: Φαινόλες και τοκοφερόλες (π.χ. ολευρωπαΐνη) που συνεισφέρουν στην επιβράδυνση της πορείας γήρανσης του οργανισμού και έχουν ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες, αφού δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό και εμποδίζουν τον σχηματισμό υπεροξειδίων και υδροϋπεροξειδίων με καρκινογόνο δράση.

4) Βιοδραστικές ουσίες:

α) Ελαιοκανθανάλη: Ουσία με σημαντικές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, δρα προστατευτικά κατά του κινδύνου εμφάνισης άνοιας και της νόσο Αλτσχάιμερ.

β) Ελαιασίνη: Αποτελεί την πιο αντιοξειδωτική ουσία του ελαιολάδου και είναι παράγωγο της φαινόλης ολευρωπαϊνης.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η καθημερινή κατανάλωση εύλογης ποσότητας ελαιόλαδου έχει ευεργετικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Το συμπέρασμα αυτό αποδεικνύεται από πολυάριθμες επιστημονικές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί και συνδέουν την κατανάλωση ελαιόλαδου, όπως και επιτραπέζιων ελιών, με την μακροζωία και την προστασία της ανθρώπινης υγείας από διάφορα νοσήματα. Κάποιες από αυτές τις ευεργετικές επιπτώσεις, που συνδέονται με την κατανάλωση σημαντικών ποσοτήτων ελαιόλαδου είναι οι ακόλουθες (Lopez- Miranda J., et al., 2010):

- 1) Προστασία από καρδιαγγειακά νοσήματα (υπέρταση, στεφανιαία νόσο, αθηροσκλήρωση, κ.α.).
- 2) Προστασία από διάφορες μορφές καρκίνου (γαστρεντερικού συστήματος, μαστού, προστάτη).
- 3) Προστασία από ασθένειες του γήρατος (Αλτσχάιμερ, νόσος Πάρκινσον, γεροντική άνοια, κ.α.).
- 4) Εξισορρόπηση της έκκρισης ινσουλίνης στον οργανισμό.
- 5) Αντιμετώπιση προβλημάτων πεπτικού συστήματος και της λειτουργίας του παχέος εντέρου.
- 6) Προστασία από την έντονη ηλιακή ακτινοβολία και τα εγκαύματα.
- 7) Βοηθά στην καλή ανάπτυξη του εγκεφάλου και του σκελετού των βρεφών.

Εκτός από το ελαιόλαδο, άλλο κύριο προϊόν που προκύπτει από την καλλιέργεια της ελιάς είναι οι επιτραπέζιες (βρώσιμες) ελιές. Οι επιτραπέζιες ελιές καταναλώνονται ως πράσινες ή ώριμες μαύρες. Οι πράσινες επιτραπέζιες ελιές λαμβάνονται από καρπούς που συγκομίζονται κατά τη διάρκεια του κύκλου ωρίμανσης, όταν έχουν φθάσει στο τελικό περίπου μέγεθος. Συγκομίζονται κυρίως με το χέρι, μετά από μια μικρή αλλαγή στο χρώμα από το έντονο πράσινο σε ελαφρώς κιτρινοπράσινο και όταν η συνοχή της σάρκας αρχίζει να αλλάζει, αλλά πριν μαλακώσει σημαντικά. Η επεξεργασία των πράσινων ελιών γίνεται με ζύμωση (Ισπανικού τύπου) ή χωρίς ζύμωση (Αμερικανικού τύπου). Για την παραγωγή μαύρων ώριμων επιτραπέζιων ελιών, ο καρπός συγκομίζεται όταν έχει φτάσει σχεδόν στην πλήρη ωρίμανση και έχει αποκτήσει το χαρακτηριστικό χρώμα και ελαιοπεριεκτικότητα της

ποικιλίας. Έπειτα, οι καρποί υποβάλλονται σε επεξεργασία είτε βυθιζόμενοι σε άλμη είτε διατηρούνται σε ξηρό αλάτι (www.moh.gov.cy).

Από την καλλιέργεια της ελιάς προκύπτουν και άλλα προϊόντα που χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο, όπως το ξύλο της και το πυρηνόξυλο (παραπροϊόν της παραγωγής πυρηνέλαιου) που χρησιμοποιούνται σαν καύσιμη ύλη. Επίσης, το ξύλο της χρησιμοποιείται και στην ξυλογλυπτική. Τα φύλλα της και τα κατάλοιπα της ελαιουργίας (μετά από επεξεργασία) χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή. Ακόμη, τα κατάλοιπα της ελαιουργίας χρησιμοποιούνται (μετά από χουμοποίηση και εμπλουτισμό) για την παραγωγή οργανικών λιπασμάτων. Τέλος, το πυρηνέλαιο χρησιμοποιείται στην σαπωνοποιία, για την παρασκευή σαπουνιού (Fooks R.,2002).

1.2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ – ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

1.2.1 Παγκόσμια στατιστικά στοιχεία

Στις μέρες μας η καλλιέργεια της ελιάς γνωρίζει μεγάλη εξάπλωση και πραγματοποιείται σε χώρες μακριά από τον τόπο καταγωγής της. Έτσι, παραγωγικοί ελαιώνες υπάρχουν πια σε μη παραδοσιακά ελαιοπαραγωγικές χώρες όπως η Αυστραλία, οι Η.Π.Α. (Καλιφόρνια), η Κίνα, κ.α. (Πίνακας 1 και 2). Ο αριθμός των ελαιόδενδρων που καλλιεργούνται σε όλο τον κόσμο ξεπερνά τα 750 εκατομμύρια και οι οποίες καλύπτουν επιφάνεια 7 εκατομμυρίων εκταρίων (International Olive Council, 2021). Επίσης, η διεθνής ελαιοπαραγωγή έχει διπλασιαστεί τα τελευταία χρόνια φτάνοντας τα 3 εκατομμύρια τόνους από 1,5 εκατομμύρια τόνους το 1990 (ΣΕΒΙΤΕΛ, 2021).

Οι χώρες της Μεσογείου συνεχίζουν να είναι οι σημαντικότερες ελαιοπαραγωγικές χώρες του κόσμου και ειδικότερα η Ισπανία, η Ιταλία και η Ελλάδα, καθιστώντας την Ε.Ε. παγκόσμιο ηγέτη της παραγωγής. Η Ε.Ε. παράγει το 70% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιόλαδου και το 29% της παγκόσμιας παραγωγής επιτραπέζιων ελιών. Επίσης, η Ε.Ε. είναι και ο βασικός εξαγωγέας στις μη ελαιοπαραγωγικές περιοχές, όπως η βόρεια Αμερική (International Olive Council, 2021).

Πίνακας 1: Παγκόσμια παραγωγή ελαιόλαδων 2020/21 (τροποποιημένος από IOC, 2021).

ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ (παραγωγή σε 1000tm)	
	2020/21
ΑΛΒΑΝΙΑ	11,5

ΑΛΓΕΡΙΑ	89,5
ΑΡΓΕΝΤΙΝΗ	27,0
ΑΙΓΥΠΤΟΣ	40,0
ΙΡΑΝ	17,5
ΙΣΡΑΗΛ	11,0
ΙΟΡΔΑΝΙΑ	25,0
ΛΙΒΑΝΟΣ	26,0
ΛΙΒΥΗ	16,5
ΜΑΡΟΚΟ	160,0
ΜΑΥΡΟΒΟΥΝΙΟ	0,5
ΠΑΛΑΙΣΤΙΝΗ	12,0
ΤΥΝΗΣΙΑ	120,0
ΤΟΥΡΚΙΑ	210,0
Ε.Ε.	2.232,5
ΟΥΡΟΥΓΟΥΑΗ	0,5
ΣΑΟΥΔΙΚΗ ΑΡΑΒΙΑ	3,0
ΑΥΣΤΡΑΛΙΑ	20,0
ΧΙΛΗ	20,5
ΚΙΝΑ	7,5
Η.Π.Α.	16,0
ΣΥΡΙΑ	115,0
Άλλες Παραγωγικές Χώρες	15,5
ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΣΥΝΟΛΟ	3.197,0

Πίνακας 2: Παγκόσμια παραγωγή επιτραπέζιων ελιών 2020/2021 (τροποποιημένος από ΙΟС, 2021).

ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΩΝ ΕΛΙΩΝ (παραγωγή σε 1000tm)	
	2020/21
ΑΛΒΑΝΙΑ	30,0
ΑΛΓΕΡΙΑ	309,5
ΑΡΓΕΝΤΙΝΗ	80,0
ΑΙΓΥΠΤΟΣ	800,0
ΙΡΑΝ	97,5
ΙΡΑΚ	9,0
ΙΣΡΑΗΛ	14,0
ΙΟΡΔΑΝΙΑ	32,5
ΛΙΒΑΝΟΣ	20,0
ΛΙΒΥΗ	3,0
ΜΑΡΟΚΟ	130,0
ΠΑΛΑΙΣΤΙΝΗ	7,0

ΤΥΝΗΣΙΑ	20,0
ΤΟΥΡΚΙΑ	430,0
E.E.	891,5
ΣΑΟΥΔΙΚΗ ΑΡΑΒΙΑ	4,5
ΑΥΣΤΡΑΛΙΑ	4,0
ΧΙΛΗ	13,0
Η.Π.Α.	27,0
ΜΕΞΙΚΟ	16,5
ΠΕΡΟΥ	75,0
ΣΥΡΙΑ	105,0
Άλλες Παραγωγικές Χώρες	15,0
ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΣΥΝΟΛΟ	3.134,0

1.2.2 Εγχώρια στατιστικά στοιχεία

Στη χώρα μας καλλιεργούνται πάνω από 150 εκατομμύρια ελαιόδενδρα, σε ελαιώνες που καλύπτουν έκταση 7.930.915 στρεμμάτων (ΕΛΣΤΑΤ 2019). Οι περιφέρειες με τις μεγαλύτερες εκτάσεις ελαιώνων είναι η Πελοπόννησος και η Κρήτη (Πίνακας 3), ενώ οι σημαντικότερες καλλιεργούμενες ποικιλίες είναι η Κορωνέικη, η Καλαμών και η Μαστοειδής (Parioni L. & Proietti P. 2014). Επίσης, εκτιμάται ότι από την ελαιοκομία και την ελαιοπαραγωγή έχουν εισόδημα περίπου 600.000 οικογένειες (ΣΕΒΙΤΕΛ 2020), καταδεικνύοντας έτσι τη μεγάλη οικονομική σημασία της ελαιοκαλλιέργειας, αφού σε αρκετές κυρίως άγονες περιοχές αποτελεί το αποκλειστικό εισόδημα των κατοίκων.

Πίνακας 3: Εκτάσεις συνεχών ελαιώνων κατά Περιφέρεια στην Ελλάδα (τροποποιημένος από ΕΛΣΤΑΤ, 2019).

ΕΛΑΙΩΝΕΣ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΩΝ ΕΛΛΑΔΟΣ (έκταση σε στρέμματα)	
Ανατολική Μακεδονία και Θράκη	148.991
Κεντρική Μακεδονία	400.431
Δυτική Μακεδονία	3.210
Ήπειρος	193.781
Θεσσαλία	268.151
Στερεά Ελλάδα	806.548
Ιόνιοι Νήσοι	337.072
Δυτική Ελλάδα	832.722
Πελοπόννησος	2.207.038
Αττική	158.096
Βόρειο Αιγαίο	530.373
Νότιο Αιγαίο	147.838
Κρήτη	1.896.664

ΣΥΝΟΛΟ ΕΛΛΑΔΟΣ	7.930.915
-----------------------	------------------

Η Ελλάδα είναι η τρίτη ελαιοπαραγωγός χώρα του κόσμου, μετά την Ισπανία και την Ιταλία, με παραγωγή 265.000 mt την καλλιεργητική περίοδο 2020/21 (Πίνακας 4), έχοντας όμως το πλεονέκτημα ότι το 80% του ελαιόλαδου που παράγει ανήκει στην κατηγορία «εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο» (ΣΕΒΙΤΕΛ 2020). Όσον αφορά τις επιτραπέζιες ελιές, η Ελλάδα εμφάνισε παραγωγή 230.000 mt την καλλιεργητική περίοδο 2020/21, την 5η μεγαλύτερη στον κόσμο και 2η μεγαλύτερη στην Ε.Ε., μετά την Ισπανία (Πίνακας 5).

Πίνακας 4: Παραγωγή ελαιόλαδων των χωρών της Ε.Ε., την καλλιεργητική περίοδο 2020/21 (τροποποιημένος από ΙΟΟ 2021).

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ ΣΤΗΝ Ε.Ε. (παραγωγή σε 1000tm)	
	2020/21
ΚΥΠΡΟΣ	6,1
ΚΡΟΑΤΙΑ	4,6
ΙΣΠΑΝΙΑ	1.596,1
ΓΑΛΛΙΑ	5,2
ΕΛΛΑΔΑ	265,0
ΙΤΑΛΙΑ	255,0
ΠΟΡΤΟΓΑΛΙΑ	100,0
ΣΛΟΒΕΝΙΑ	0,8
ΣΥΝΟΛΟ Ε.Ε.	2.232,8

Πίνακας 5: Παραγωγή επιτραπέζιων ελιών των χωρών της Ε.Ε., την καλλιεργητική περίοδο 2020/21 (τροποποιημένος από ΙΟΟ 2021).

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΩΝ ΕΛΙΩΝ ΣΤΗΝ Ε.Ε. (παραγωγή σε 1000tm)	
	2020/21
ΚΥΠΡΟΣ	4,2
ΚΡΟΑΤΙΑ	0,6
ΙΣΠΑΝΙΑ	590,0

ΓΑΛΛΙΑ	1,2
ΕΛΛΑΔΑ	230,0
ΙΤΑΛΙΑ	50,0
ΠΟΡΤΟΓΑΛΙΑ	15,6
ΣΥΝΟΛΟ Ε.Ε.	891,6

Από τη συνολική παραγωγή ελαιόλαδου της Ελλάδος ένα σημαντικό ποσοστό εξάγεται, σε χώρες της Ε.Ε. αλλά και σε χώρες εκτός Ε.Ε. Οι εξαγωγές του ελληνικού ελαιόλαδου έχουν αυξηθεί κατά 225% την περίοδο 2002-2020, από 14.851 t το 2002 σε 52.735 t το 2020. Οι περισσότερες ποσότητες εξάγονται σε χώρες της Ε.Ε. Η Γερμανία είναι ο μεγαλύτερος εισαγωγέας ελληνικού ελαιόλαδου με 14.907 t το 2020, ακολουθεί η Μεγάλη Βρετανία με 2.698 t, η Αυστρία με 2.578 t, η Γαλλία με 2.032 t, το Βέλγιο με 1.463 t, η Σουηδία με 1.385 t και η Κύπρος με 1.209 t. Από τις χώρες εκτός Ε.Ε. Από τις χώρες που βρίσκονται εκτός Ε.Ε., η Η.Π.Α. είναι ο μεγαλύτερος εισαγωγέας με 9.143 t, ακολουθεί ο Καναδάς με 1.851 t, η Αυστραλία με 1.773 t και η Ρωσία με 1.218 t (ΣΕΒΙΤΕΛ, 2021). Όσον αφορά τις εξαγωγές ελληνικών επιτραπέζιων ελιών, έχει σημειωθεί αύξηση από 32.000 t το 2002 σε 82.500 t το 2020 (ΙΟΚ, 2021).

Εκτός από την οικονομική της διάσταση, η ελαιοκαλλιέργεια έχει για τη χώρα μας, τεράστια κοινωνική και περιβαλλοντική σημασία αφού συμβάλλει καθοριστικά στην βιωσιμότητα μειονεκτικών περιοχών, στη διατήρηση της κοινωνικής συνοχής σε αυτές καθώς και στην προστασία των εδαφών από τη διάβρωση και στη διατήρηση του φυσικού κάλλους του ελληνικού τοπίου. Επίσης, αποτελεί πρωταρχικό παράγοντα ανάπτυξης περιοχών με σοβαρά προβλήματα απασχόλησης και συνοχής (Πετροπούλου- Καραγιαννοπούλου Σ., 2019).

1.3: ΤΟ ΓΛΟΙΟΣΠΟΡΙΟ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

1.3.1 Γενικά

Το Γλοιοσπόριο της ελιάς είναι η πιο σοβαρή μυκητολογική ασθένεια του ελαιόκαρπου σε παγκόσμιο επίπεδο. Προσβάλλει τους καρπούς της ελιάς κατά την ωρίμανση, προκαλώντας σήψη ή μουμιοποίηση. Εκδηλώνεται σε ελαιοπαραγωγικές περιοχές πολλών χωρών, που εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ατμοσφαιρικής υγρασίας, επιφέροντας μεγάλες απώλειες στην παραγωγή και υποβάθμιση της ποιότητας του ελαιόλαδου. Η πρόκληση της ασθένειας του Γλοιοσπορίου στην ελιά, αποδίδεται σε αρκετά είδη ή γενότυπους του ασκομύκητα *Colletotrichum*, συμπεριλαμβανομένου του *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C.*

godetiae, κ.α., σε διαφορετικές χώρες. (Martin M.P. and Garcia- Figueres F., 1999, Talhinhos P. et al., 2005, Cacciola S.O. et al., 2012).

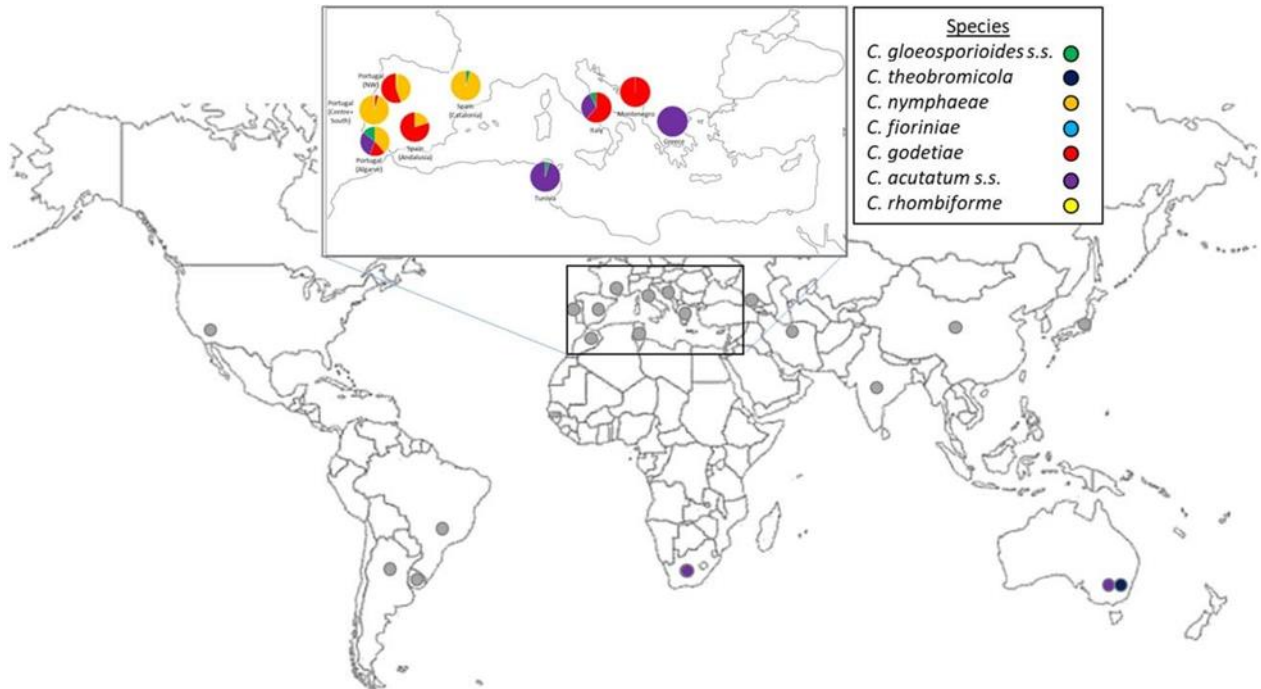
Η πρώτη αναφορά και περιγραφή της ασθένειας με επιστημονικούς όρους έγινε το 1899 στην Πορτογαλία (Almeida J.V., 1899), όμως αναφορές για συμπτώματα που μπορούν να συνδεθούν με την ασθένεια είχαν γίνει γνωστές, στην νοτιοανατολική Ιβηρική Χερσόνησο από τον 11^ο αιώνα, από τον Άραβα γεωπόνο Bu'l- Jayr (Moral et al., 2014). Από τότε έχει παρουσιαστεί σε όλες τις ηπείρους προκαλώντας μεγάλες οικονομικές απώλειες σε πολλές ελαιοπαραγωγικές περιοχές. Στη διεθνή βιβλιογραφία η ασθένεια αναφέρεται ως Ανθράκνωση της Ελιάς (Olive Anthracnose), ενώ κοινές της ονομασίες είναι «aceituna jabonosa», που σημαίνει «σαπουνισμένη ελιά» στην Ισπανία και «lebbra» που σημαίνει «λέπρα», στην Ιταλία (Talhinhos P. et al., 2018).

Στην Ελλάδα η πρώτη αναφορά για την ασθένεια έγινε στην Κέρκυρα, κατά την διάρκεια της δεκαετίας του 1920 (Petri L., 1930) και έκτοτε υπάρχουν πολλές αναφορές ότι το παθογόνο είναι παρών στους ελληνικούς ελαιώνες. Στις μέρες μας και μετά την επιδημιολογική έξαρση της ασθένειας το 2018, θεωρείται η πιο σοβαρή μυκητολογική, προσυλλεκτική και μετά-συλλεκτική, ασθένεια του ελαιόκαρπου, επιφέροντας τεράστιες απώλειες στη παραγωγή (Biraghi A., 1934, Zachos and Makris, 1963, Iliadi M.K. et al., 2018, Azevedo- Nogueira F. et al., 2020).

1.3.2 Γεωγραφική εξάπλωση ασθένειας

Αν και η ασθένεια πρωτοεμφανίστηκε και συνεχίζει να εμφανίζεται συχνότερα και με μεγαλύτερη ένταση στους ελαιώνες της νοτιοδυτικής πλευράς της λεκάνης της Μεσογείου, εντούτοις υπάρχουν αναφορές για την ύπαρξη της σε όλες τις ηπείρους. Η μεγάλη γεωγραφική εξάπλωση αυτή συμβαίνει κυρίως λόγω της μη εξειδίκευσης σε συγκεκριμένο ξενιστή που παρουσιάζουν τα είδη του γένους *Colletotrichum*, της μεγάλης εξάπλωσης της ελαιοκαλλιέργειας αλλά και της διακίνησης του πολλαπλασιαστικού υλικού (Talhinhos P. et al., 2018). Έτσι, η ασθένεια έχει αναφερθεί ότι δημιουργεί απώλειες στην ελαιοπαραγωγή πολλών χωρών, όπως η Αμπχαζία (Nagorny P. I. and Eristavi E. M., 1929), η Αργεντινή (Brancher N. et al., 2008), η Αυστραλία (Schena L. et al., 2014; Whitelaw-Weckert M. et al., 2007), η Βραζιλία (Duarte H. S. S. et al., 2010), η Κίνα (Margarita L. et al., 1986), η Αίγυπτος (Embaby E.-S., 2014), η Γαλλία (Bompeix G. et al., 1988), η Ελλάδα (Iliadi M. K. et al., 2018, Sarejanni J. A., 1939), η Ινδία (Mugnai L. et al., 1993), το Ιράν (Sanei S. J. and Razavi S. E., 2011, 2012), η Ιταλία (Agosteo G. E. et al., 2002; Ciccarone A., 1950; Mosca S.

et al., 2014), η Ιαπωνία (Hemmi T. and Kurata S., 1935), το Μαυροβούνιο (Vucinic Z. et al., 1999), το Μαρόκο (Achbani E. A. et al., 2013), η Πορτογαλία (Talhinhas P. et al., 2009, 2011, 2015), η Νότια Αφρική (Gorter G. J. M. A., 1956), η Ισπανία (Martin M. P. and Garcia-Figueres F., 1999), η Τυνησία (Chattaoui M. et al., 2016, Rhouma A. et al., 2010), η Ουρουγουάη (Acosta D. R., 1932) και οι Η.Π.Α. (Pontis R. E. and Hansen H.N., 1942).



Εικόνα 13: Γεωγραφική εξάπλωση της ασθένειας του Γλοιοσπορίου (Talhinhas P. et al., 2018).

1.3.3 Συμπτώματα ασθένειας

Στην ελιά, η ασθένεια του Γλοιοσπορίου εκδηλώνεται κυρίως στον ελαιόκαρπο και λιγότερο στα φύλλα και στα στελέχη. Σε μικρότερη έκταση, μπορεί επίσης να εκδηλωθεί και σε άλλες δομές του δένδρου (άνθη, ποδίσκοι, μίσχοι και βλαστοί), όπου και αποτελεί πηγή μολύσματος για κατοπινές εξάρσεις της ασθένειας (Moral J. et al., 2009, Sergeeva V., 2014).

Τα πιο τυπικά συμπτώματα της ασθένειας είναι η σήψη και η μουμιοποίηση των καρπών (Εικόνα 14a). Σε υγρές συνθήκες, οι προσβεβλημένοι ελαιόκαρποι εκδηλώνουν ανοιχτή καφετί έως σκούρα καφέ σήψη, με μεγάλη παραγωγή ζελατινώδους μάζας χρώματος πορτοκαλί, που περιέχει κονίδια που παράγονται από ακέρβουλα. Σε ξηρές συνθήκες, οι προσβεβλημένοι καρποί μουμιοποιούνται και χάνουν βάρος λόγω αφυδάτωσης. Οι καρποί που έχουν προσβληθεί πέφτουν πρόωρα και μόνο μερικοί μουμιοποιημένοι παραμένουν στο δένδρο. Η καρπόπτωση αυτή μπορεί επίσης να οφείλεται και σε προσβολές των ποδίσκων (Oliveira R. et al., 2005).

Η ασθένεια εκδηλώνεται περισσότερο στους ώριμους καρπούς, όμως σε ευνοϊκές συνθήκες οι πράσινοι καρποί ευαίσθητων ποικιλιών μπορεί επίσης να προσβληθούν με σφοδρότητα. Σε ποικιλίες με επιμήκεις καρπούς η σήψη συχνά ξεκινάει από το κάτω άκρο (Εικόνα 14c) του καρπού, αλλά σε ποικιλίες με μεγάλους ελλειψοειδείς καρπούς τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται σαν κυκλικές, βυθισμένες, αλλοιωμένες περιοχές, με ακέρβουλα που σχηματίζουν ομόκεντρους κύκλους, που ξεκινούν από το κέντρο των αλλοιωμένων περιοχών (Εικόνα 14b). Σε καρπούς που βρίσκονται στη διαδικασία της ωρίμανσης μπορεί να εμφανιστεί εσωτερική καφέ σήψη γύρω από τη βυθισμένη περιοχή, πριν από την εμφάνιση των εξωτερικών συμπτωμάτων (Agosteo G.E. et al., 2005).

Τα δένδρα που προσβάλλονται από το Γλοιοσπόριο παρουσιάζουν χλώρωση και ξήρανση φύλλων, φυλλόπτωση και ξηράνσεις βλαστών και κλαδιών (Graniti A. et al., 1993, Prota U., 1995). Την άνοιξη, τα προσβεβλημένα φύλλα παρουσιάζουν εκτεταμένο κιτρίνισμα του ελάσματος και σε αυτό το στάδιο το παθογόνο μπορεί να απομονωθεί από τους προσβεβλημένους ιστούς, με μεγάλη συχνότητα (Cacciola S. O. et al., 1996). Αργότερα την άνοιξη και στις αρχές του καλοκαιριού τα μολυσμένα φύλλα πέφτουν και τα δένδρα παρουσιάζονται αποφυλλωμένα. Καφέ νεκρωτικές περιοχές με ακανόνιστα περιθώρια, που ξεκινούν από το περιθώριο του ελάσματος (Εικόνα 14d) και που στη συνέχεια μεγεθύνονται και ενοποιούνται, μπορούν να παρατηρηθούν στα πεσμένα φύλλα, όπως επίσης, λιγότερο συχνά όμως και σε αυτά που παραμένουν στο δένδρο (Martelli G. P., 1961, Bompeix G. et al., 1988, Cacciola S. O. et al., 1996, Sergeeva V. et al., 2008b). Τα συμπτώματα στην κόμη του δένδρου αποδίδονται στην τοξική δράση μεταβολιτών του παθογόνου, που παράγονται στους μολυσμένους καρπούς (Ballio A. et al., 1969). Και πράγματι, τα έντονα συμπτώματα παρατηρούνται μόνο σε βλαστούς που φέρουν μεγάλο αριθμό μολυσμένων καρπών (Moral J. et al., 2009b). Η αποφύλλωση του δένδρου μπορεί να είναι μεγάλη και να έχει δραστική επίδραση στην παραγωγή καρπών την επόμενη χρονιά (Bompeix G. et al., 1988). Αυτές οι επιπτώσεις της ασθένειας είχαν αρχικά αναφερθεί στην Ιταλία, στην Ελλάδα και στην Πορτογαλία (Saronaro A., 1953, Martelli G. P., 1959, Avezedo A. R., 1976, Zachos D. G. and Makris S. A., 1963) και αργότερα στην Ισπανία, όπου είχαν παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια του μεγάλου επιδημικού ξεσπάσματος του 1997 (Moral J. et al., 2008, Oliveira R. et al., 2005, Trapero A. et al., 1998, Trapero Casas A., 2003).

Στα άνθη (Εικόνα 15), μολύνσεις από την ασθένεια είχαν αναφερθεί πρώτα στη Νότια Αφρική (Gorter G. J. M. A., 1956) και πιο πρόσφατα στην Αυστραλία (Sergeeva V. et al., 2008a). Σε μελέτη όπου έλαβε χώρα τεχνητή μόλυνση νεαρών δένδρων (Moral J. et al.,

2009b), δείχθηκε ότι η ασθένεια μπορεί να προκαλέσει μαρασμό στα άνθη. Επίσης, σε αυτά τα πειράματα δείχθηκε ότι οι περισσότεροι καρποί που παρήχθησαν από δένδρα, που μολύνθηκαν κατά το στάδιο της άνθησης ήταν μολυσμένοι, όμως η μόλυνση παρέμενε λανθάνουσα μέχρι την ωρίμανση.

Η ασθένεια του Γλοιοσπορίου είναι επίσης και μετασυλλεκτική ασθένεια, προκαλώντας σήψεις στους συγκομισμένους καρπούς από μη εκδηλωμένες προσβολές στον αγρό. Οι μολύνσεις αυτές έχουν αρνητική επίδραση τόσο στο μέγεθος της παραγωγής, όσο και στην ποιότητα του παραγόμενου ελαιόλαδου. Το ελαιόλαδο που παράγεται από μολυσμένες ελιές έχει αλλοιωμένη γεύση, κοκκινωπό χρώμα (Εικόνα 16) και παρουσιάζει χημικές μεταβολές όπως υψηλή οξύτητα και μείωση της β-σιτοστερόλης, των πολυφαινόλων και της α-τοκοφερόλης (Mincione A. et al., 2004, Trapero A. and Blanco-López M. A., 2008a, 2008b).

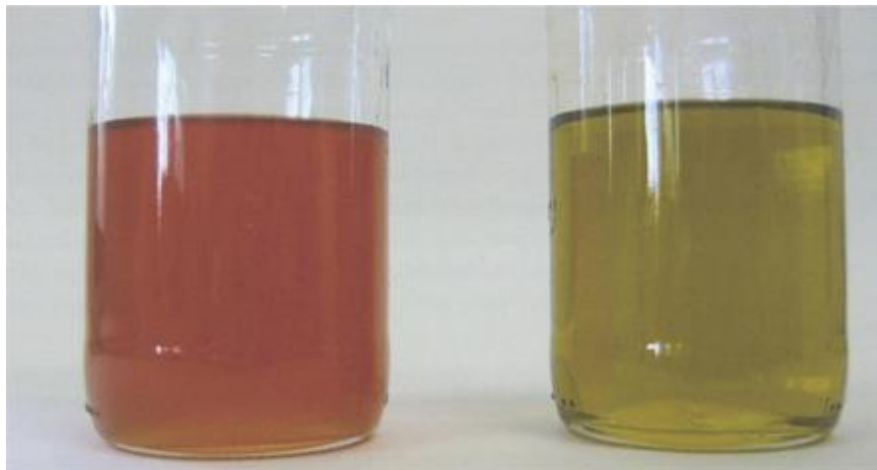
Τέλος, αρκετά πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι μολύνσεις στον καρπό επιφέρουν σημαντική μείωση της βλάστησης του σπέρματος (Moral J. et al., 2009a).



Εικόνα 14: (a) Σήψη και μουμιοποίηση πράσινων καρπών ελιάς, προσβεβλημένων από Γλοιοσπόριο. (b) Καρποί ελιάς με κυκλικές, βυθισμένες, αλλοιωμένες περιοχές. (c) Συμπτώματα Γλοιοσπορίου, σε πράσινους καρπούς ελιάς, που προκλήθηκαν από τον μύκητα *Colletotrichum clavatum*. (d) Μόλυνση από Γλοιοσπόριο σε φύλλο ελιάς (πηγή: Cacciola S.O. et al., 2012).



Εικόνα 15: Άνθος ελιάς μολυσμένο από *Colletotrichum* spp. (πηγή: ulivita.it)



Εικόνα 16: Ελαιόλαδο με κοκκινωπό χρώμα, που παράχθηκε από ελιές προσβεβλημένες από Γλοιοσπόριο (πηγή: Moral J. et al., 2014).

1.3.4 Παθογόνο αίτιο ασθένειας- Σύμπλοκα

Το παθογόνο αίτιο της ασθένειας του Γλοιοσπορίου στην ελιά είχε αρχικά ταυτοποιηθεί ως *Gloeosporium olivarum* Alm. (Almeida J. V., 1899) και στη συνέχεια κατατάχθηκε ως *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (von Arx, 1970). Ο μύκητας *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) αποτελεί την ατελή και παρασιτική φάση (anamorph) του Ασκομύκητα *Glomerella cingulata* (Stonem.) (Sordariomycetidae, Glomerellaceae) (Cacciola S.O. et al., 2012). Έπειτα, περιγράφηκαν και άλλα είδη σαν υπεύθυνα για την ασθένεια, όμως ως προς την ομοιότητά τους με τον *Colletotrichum gloeosporioides*. Με την ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης και διάγνωσης, που ήταν βασισμένοι κυρίως στην περιοχή rDNA-ITS, έγινε εφικτή η πιο λεπτομερής

ταυτοποίηση. Ο μύκητας *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1968 και σύντομα θεωρήθηκε σαν πολύ σημαντικό είδος του γένους *Colletotrichum*, με έναν αυξανόμενο αριθμό μυκήτων να αντιστοιχίζονται με αυτόν (Baroncelli R. et al., 2017). Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, οι Martin M. P. and Garcia-Figueres F. (1999) αναγνώρισαν δύο παθογόνους μύκητες ως υπεύθυνους για την ασθένεια του Γλοιοσπορίου στην ελιά, τον *C. acutatum* και τον *C. gloeosporioides*. Σε κατοπινές μελέτες, που βασίστηκαν στην rDNA-ITS περιοχή και στη νουκλεοτιδιακή αλληλουχία της β-tubulin, διαπιστώθηκε γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των ειδών που αντιστοιχίζονταν με τον *C. acutatum* (Talhinhas P. et al., 2005, Sreenivasaprasad and Talhinhas, 2005, Whitelaw-Weckert, et al., 2007), τα οποία στη συνέχεια αναγνωρίστηκαν σαν ξεχωριστά είδη (Damm U. et al., 2012, Shivas R.G. and Tan Y. P., 2009).

Κατά την παρούσα χρονική περίοδο έχουν ταυτοποιηθεί 6 είδη (*C. acutatum* s. s., *C. fioriniae*, *C. godetiae*, *C. nymphaeae*, *C. rhombiforme*, *C. simmondsii*) στο σύμπλοκο ειδών του *C. acutatum* (Baroncelli R. et al., 2017), 6 είδη (*C. gloeosporioides* s. s., *C. theobromicola*, *C. kahawae* subsp. *ciggaro*, *C. aenigma*, *C. queenslandicum*, *C. siamense*) στο σύμπλοκο ειδών του *C. gloeosporioides* (Mosca S. et al., 2014, Schena L., et al., 2014, Weir B. et al., 2012, Azevedo- Nogueira F. et al., 2020) και 1 είδος στο σύμπλοκο ειδών του *C. boninense* (*C. karstii*) (Azevedo- Nogueira F. et al., 2020), που θεωρούνται σαν τα παθογόνα αίτια της ασθένειας του Γλοιοσπορίου, στην ελιά. Τα παραπάνω είδη θεωρούνται υπεύθυνα για σοβαρά επιδημιολογικά ξεσπάσματα της ασθένειας σε πολλές χώρες, με την παρουσία του εκάστοτε είδους να συνδέεται με την τοποθεσία (Πίνακας 6) (Azevedo- Nogueira F. et al., 2020).

Πίνακας 6: Αναφορές επιδημικών ξεσπασμάτων του Γλοιοσπορίου ανά τον κόσμο και παθογόνο αίτιο (Achbani E. A. et al., 2013, Antelmi I. et al., 2019, Chattaoui M. et al., 2016, Martin M. P. and García-Figueres F., 1999, Mosca S. et al., 2014, Rhouma A. et al., 2010, Schena L. et al., 2014,

Talhinhas P. et al., 2005, 2015, 2018). Κάποια επιδημικά επεισόδια που έχουν αναφερθεί από τον Talhinhas P. et al. (2018) δεν συμπεριλαμβάνονται, διότι δεν είχαν σοβαρές επιπτώσεις (πηγή: Azevedo- Nogueira F. et al., 2020).

Είδη <i>Colletotrichum</i>		Τοποθεσία επιδημικού ξεσπάσματος							
Σύμπλοκα <i>Colletotrichum</i>		Πορτογαλία	Ισπανία	Ιταλία	Τυνησία	Μαρόκο	Μαυροβούνιο	Ελλάδα	Αυστραλία
<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i> s.s.	x		x	x			x	
	<i>C. nymphphaeae</i>	x	x	x					
	<i>C. godetiae</i>	x	x	x			x	x	
	<i>C. fiorinae</i>	x							
	<i>C. rhombiforme</i>	x							
	<i>C. simondsii</i>	x							
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. gloeosporioides</i> s.s.	x	x	x	x	x			
	<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>			x					
	<i>C. aenigma</i>			x					
	<i>C. queenslandicum</i>						x		
	<i>C. theobromicola</i>								x
	<i>C. siamense</i>								x
<i>C. boninense</i>	<i>C. karstii</i>			x					

Επίσης, σε πρόσφατες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στην Ελλάδα, όπου και ταυτοποιήθηκαν μοριακά οι παθογόνοι μύκητες που απομονώθηκαν από ελαιώνες διάφορων περιοχών της χώρας, επιβεβαιώθηκε ότι η ασθένεια του Γλοιοσπορίου της ελιάς οφείλεται κυρίως στο είδος *C. acutatum* και σε πολύ μικρό ποσοστό στον *C. gloeosporioides* (Piadi et al. 2017, Kolainis S. et al., 2020).

1.3.5 Επιδημιολογία και βιολογικός κύκλος των ειδών *Colletotrichum* spp.

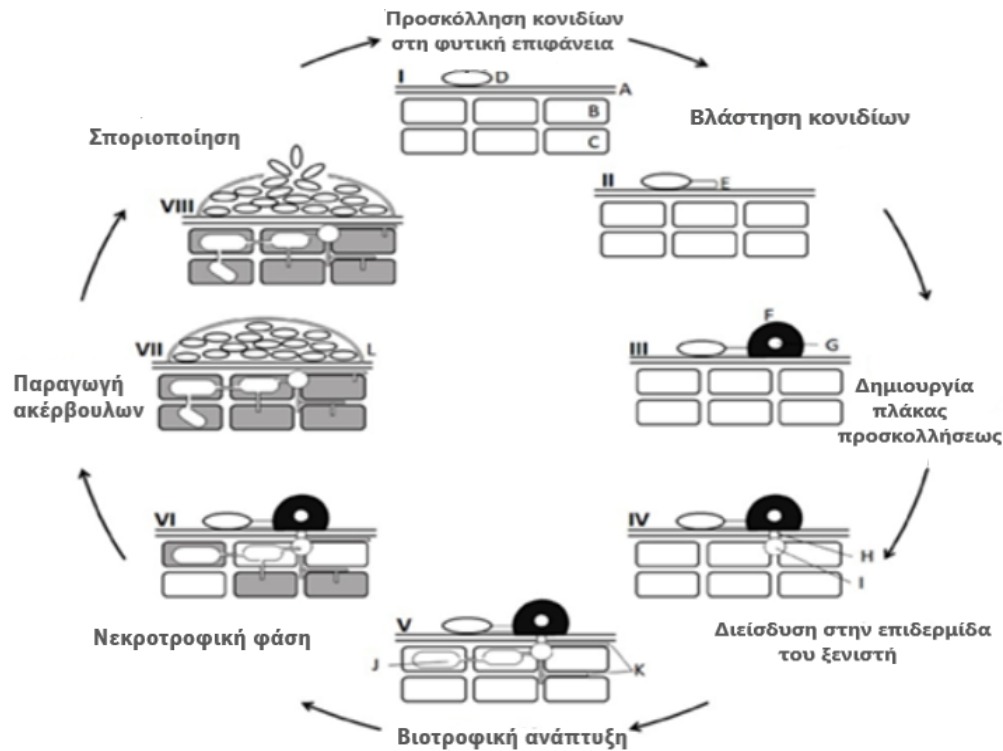
Τα είδη του γένους *Colletotrichum* χρησιμοποιούν διάφορους μηχανισμούς για να μολύνουν τον ξενιστή τους, που μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τη μολυσματικότητα του παθογόνου και την ευαισθησία του ξενιστή. Στην ελιά, η εισβολή και ο αποικισμός από τον παθογόνο *Colletotrichum* είναι πιθανότερο ότι συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού (Mugnai L. et al., 1993, Schena L. et al., 2014). Παρόμοια με άλλους ξενιστές

που προσβάλλονται από μύκητες *Colletotrichum* spp., οι ανώριμοι καρποί ελιάς είναι πλουσιότεροι σε διάφορα συστατικά, όπως φαινόλες, φυτοαλεξίνες και δευτερογενείς μεταβολίτες, τα οποία είναι τοξικά για τον μύκητα και παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του (Gomes S. et al., 2012c, Gounihnas I. et al., 2019). Η ωρίμανση των καρπών της ελιάς αναφέρεται ότι είναι το αίτιο της αύξησης της ευαισθησίας των καρπών στην ασθένεια του Γλοιοσπορίου, καθώς η ωρίμανση ευνοεί την ανάπτυξη των *Colletotrichum* spp. (Moral J. et al., 2008).

Οι αλληλεπιδράσεις φυτού- παθογόνου περιγράφονται ως βιοτροφικές, νεκροτροφικές και ημιβιοτροφικές (προαιρετικά βιοτροφικές) και εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως η ανθεκτικότητα του ξενιστή, η σύσταση των ιστών του ξενιστή και οι περιβαλλοντικές συνθήκες (Perfect S. E. et al., 1999). Αρκετά είδη μυκήτων, από διαφορετικά γένη, είναι υποχρεωτικά βιότροφα απαιτώντας έναν ζωντανό ξενιστή για να αναπτυχθούν πλήρως και να εξαπλωθούν, μη έχοντας την ικανότητα για αυτόνομη ανάπτυξη. Όμως, αυτού του είδους η αλληλεπίδραση δεν έχει παρατηρηθεί ακόμα σε κανένα είδος *Colletotrichum* (Gomes S. et al., 2012c, Perfect S. E. et al., 1999). Τα ανταγωνιστικά, υποχρεωτικά νεκροτροφικά *Colletotrichum* spp. τρέφονται καταστρέφοντας τα κύτταρα του ξενιστή, χρησιμοποιώντας το περιεχόμενό τους για να καλύψουν τις ανάγκες της ανάπτυξής τους (Gomes S. et al., 2012c). Εκτός από αυτές τις παραπάνω δύο στρατηγικές μόλυνσης του ξενιστή, μια τρίτη είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη από τα είδη του γένους *Colletotrichum*. Το παθογόνο χρησιμοποιεί και τις δύο προηγούμενες στρατηγικές για να μολύνει τον ξενιστή, έτσι η νεκροτροφική φάση ακολουθεί την βιοτροφική (Εικόνα 17).

Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση του μύκητα *C. acutatum* με τους διάφορους ξενιστές του, κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, ακολουθεί την παρακάτω πορεία (Εικόνα 17): **I-** προσκόλληση του κονιδίου (D) στην επιφάνεια του ξενιστή (A) (Gomes S. et al., 2012c). **II-** Βλάστηση του κονιδίου και σχηματισμός βλαστικού σωλήνα (E) διαφόρων μηκών (Gomes S. et al., 2012c). **III-** Από τον βλαστικό σωλήνα σχηματίζεται πλάκα προσκόλλησης (F), που ωριμάζει και χρησιμοποιεί μελανίνη για να δημιουργήσει την απαραίτητη πίεση σπαργής, προκειμένου να διαπεράσει την επιδερμίδα του ξενιστή (Perfect S. E. et al., 1999). Στη συνέχεια, εμφανίζεται μια κηλίδα με ελαφρύ μεταχρωματισμό (G) πάνω στην φυτική επιφάνεια, που συμπίπτει με το σημείο όπου ασκείται πίεση από τον μύκητα (Peres N. A. et al., 2005). **IV-** Στη βάση της κηλίδας, σχηματίζεται διατρητική υφή (H) και διατρύπα την φυτική επιφάνεια (Wharton P. S. and Dieguez- Uribeondo J., 2004). Στη συνέχεια, η διατρητική υφή διογκώνεται σχηματίζοντας μια κύστη (I) (Gomes S. et al., 2009) που

εισβάλλει στα επιδερμικά κύτταρα (B). V- Μέσω αυτής της κύστης ο μύκητας εισβάλλει και αποικίζει τους ιστούς του ξενιστή, σχηματίζοντας υφές που αναπτύσσονται ενδοκυτταρικά (πρωτογενής υφή- J) ή υφές που αναπτύσσονται μεσοκυττάρια (μεσοκυττάρια υφή- K), ανάλογα με την στρατηγική αποικισμού που ακολουθείται (Wharton P. S. and Dieguez-Uribeondo J., 2004). Παρ' όλα αυτά, το παθογόνο τρέφεται χωρίς να καταστρέφει τα κύτταρα του ξενιστή. Οι παραπάνω στρατηγικές μπορεί να εφαρμόζονται ταυτόχρονα και ίσως σχετίζονται με την ανεκτικότητα του ξενιστή (Gomes S. et al., 2009). VI- Ο μύκητας εξαπλώνεται ακόμα περισσότερο, σχηματίζοντας δευτερογενείς υφές (L), από την πρωτογενή, εισβάλλοντας και σε άλλα επιδερμικά κύτταρα, όπως και σε κύτταρα του μεσόφυλλου (C) (Wharton P. S. and Dieguez- Uribeondo J., 2004). Σε αυτό το σημείο οι μεσοκυττάρια υφές (K) αρχίζουν να διεισδύουν στα κύτταρα, εκεί που αρχικά αναπτύσσονταν μεσοκυττάρια. Αυτή είναι η φάση, αν και δεν έχει ταυτοποιηθεί μοριακά, στην οποία υπάρχει αλλαγή από την βιοτροφική κατάσταση στη νεκροτροφική και παρατηρείται ανάπτυξη συμπτωμάτων. Έτσι, αρκετά κύτταρα καταστρέφονται, με το παθογόνο να τρέφεται από τα κύτταρα που βρίσκονται σε αποσύνθεση (γκρίζα) (Gomes S. et al., 2012c). VII- Οι αλλοιωμένες περιοχές επεκτείνονται γρήγορα στους ιστούς του ξενιστή, μέχρι να αποικιστούν όλα τα κύτταρα. Στις περιοχές που βρίσκονται σε κατάσταση σήψης σχηματίζονται ακέρβουλα (L) (Cacciola S.O. et al., 2012), που περιέχουν καινούργια κονίδια (Gomes S. et al., 2012c). VIII- Όταν τα ακέρβουλα αναπτυχθούν πλήρως εκρήγνυνται και τα κονίδια διασπείρονται (Cacciola S.O. et al., 2012).



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της εξέλιξης της μόλυνσης από τον ημιβιοτροφικό μύκητα *Colletotrichum acutatum* s.s. (τροποποιημένη από Azevedo- Nogueira F. et al., 2020).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ασθένεια του Γλοιοσπορίου της ελιάς εκδηλώνεται περισσότερο στους ώριμους καρπούς. Όταν οι ώριμοι καρποί απουσιάζουν, οι μύκητες *Colletotrichum* είναι ικανοί να επιβιώνουν πάνω στα φύλλα και στους βλαστούς της ελιάς, με τη βοήθεια κονιδίων που βρίσκονται σε κατάσταση ληθάργου. Σε αυτά τα όργανα μη-στόχους οι μύκητες *Colletotrichum*, έχουν την δυνατότητα για επιφυτική ανάπτυξη και σποριοποίηση (Talhinhas P. et al., 2011). Έτσι, σε φύλλα και βλαστούς, τα κονίδια και του *C. nymphaeae* και του *C. gloeosporioides*, βλαστάνουν (σε μικρότερο ποσοστό όμως από ότι στους καρπούς) και σχηματίζουν επιμήκεις βλαστικούς σωλήνες (σε αντίθεση με τους βραχείς που δημιουργούνται στους καρπούς), που συχνά οδηγούν στην παραγωγή δευτερογενών κονιδίων. Επίσης, αντί των δευτερογενών κονιδίων μπορεί να σχηματιστεί πλάκα προσκόλλησης, χωρίς όμως την εμφάνιση της κηλίδας με τον ελαφρύ μεταχρωματισμό ή την διείσδυση στην επιδερμίδα του ξενιστή (Talhinhas P. et al., 2011). Επιπλέον, το μήκος του βλαστικού σωλήνα και η ευκολία σχηματισμού της πλάκας προσκολλησεως εξαρτώνται ακόμα από τα θρεπτικά στοιχεία και άλλους μικροοργανισμούς που βρίσκονται πάνω στην φυτική επιφάνεια (Agosteo G.E. et al., 2015).

Κατά την άνθηση, τα άνθη της ελιάς μπορεί να προσβληθούν ασυμπτωματικά από τα αρχικά στάδια της άνθησης μέχρι την καρπόδεση. Και ο *C. acutatum lato sensu l.s.* όπως και ο *C. gloeosporioides l.s.*, μπορούν να είναι παρόντες στον κάλυκα, στα πέταλα, στους στήμονες και στον ύπερο (Iliadi M. et al., 2018, Sergeeva V. et al., 2008) και είναι ικανοί για σποριοποίηση (Moral J. et al., 2009b, Talhinhos P. et al., 2011). Αν τα άνθη δεν καταστραφούν από την προσβολή, η μόλυνση μπορεί να παραμείνει λανθάνουσα μέχρι την ωρίμανση των καρπών, ωστόσο η επίδραση αυτού του τύπου μολύνσεων στην απώλεια παραγωγής δεν έχει υπολογιστεί (Moral J. et al., 2009b). Επίσης, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε δύο ελαιώνες κατά τη διάρκεια δύο περιόδων ανάπτυξης, οι Talhinhos P. et al. (2011) έδειξαν ότι η ένταση της ασθένειας συνδέεται περισσότερο με τις καιρικές συνθήκες του φθινοπώρου, από ότι της άνοιξης, υποδεικνύοντας έτσι ότι οι μολύνσεις των ανθών και των νεαρών καρπών ίσως να μην είναι η εξήγηση για το τελικό ξέσπασμα της ασθένειας. Η διαπίστωση αυτή υποδεικνύει ότι η καλλιέργεια ελιάς σε μη Μεσογειακά κλίματα, όπως υποτροπικά, μπορεί να αντιμετωπίσει επιπλέον κινδύνους, καθώς οι καλοκαιρινές βροχοπτώσεις ευνοούν την διατήρηση και ανάπτυξη του μολύσματος.

Κάτω από ευνοϊκές συνθήκες, ειδικά τα ήπια φθινόπωρα με συχνές βροχοπτώσεις και παρατεταμένες περιόδους υψηλής υγρασίας, η ένταση της ασθένειας μπορεί να είναι πολύ υψηλή, ωστόσο, αυτό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την καλλιεργούμενη ποικιλία της ελιάς (Talhinhos P. et al., 2011, 2015) και πιθανόν από το είδος του μύκητα (Azevedo-Nogueira F. et al., 2020). Έχει παρατηρηθεί ότι το παθογόνο παράγει μια φυτοτοξίνη, την ασπεργιλλομαρασμίνη Β (λυκομαρασμικό οξύ) (Ballio A. et al., 1969) και από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει προταθεί ότι μια τοξική ουσία εμπλέκεται στις ξηράνσεις βλαστών και φύλλων, κατά τη διάρκεια της προσβολής (Moral J. et al., 2009a.). Επίσης, ο μύκητας είναι ικανός να προσεγγίσει το σπέρμα μέσω του αγγειακού συστήματος, προκαλώντας σήψη του σπέρματος ή τήξη των νεαρών σπορόφυτων (Moral J. et al., 2009a.).

Οι προσβεβλημένοι καρποί είναι δυνατό να αφυδατωθούν, σαν αποτέλεσμα της σήψης των ιστών τους και μουμιοποιούνται. Οι μουμιοποιημένοι καρποί είτε παραμένουν στο δένδρο είτε πέφτουν στο έδαφος. Η επιδημιολογική σημασία των μουμιοποιημένων καρπών στο χώμα είναι μικρή, καθώς γρήγορα αποσυντίθενται (Moral J. and Trapero A., 2012, Talhinhos P. et al., 2011, Zachos D. G. and Makris S. A., 1963). Ωστόσο, οι μουμιοποιημένοι καρποί που παραμένουν στο δένδρο είναι σημαντικές πηγές μολύσματος, καθώς έχουν την ικανότητα να απελευθερώνουν κονίδια σε σταθερούς ρυθμούς, για τουλάχιστον 6 μήνες (Moral J. and Trapero A., 2012, Sergeeva V., 2014). Παρ' όλα αυτά, οι μουμιοποιημένοι

καρποί σπάνια παραμένουν στο δένδρο για πολύ. Οι Moral J. and Trapero A. (2012) υπολόγισαν ότι κατά μέσο όρο μόνο ένας μουμιοποιημένος καρπός μπορεί να παραμείνει στο δένδρο μέχρι την επόμενη άνοιξη, υποδηλώνοντας έτσι ότι τα βλαστικά μέρη του δένδρου είναι η κύριες πηγές μολύσματος.

Σε άλλη μελέτη που αφορούσε τους *C. nymphaeae* και *C. godetiae* δείχθηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για την βλάστηση των κονιδίων κυμαίνεται μεταξύ 20 και 25°C (Moral J. et al., 2012), ωστόσο, σε συνθήκες Μεσογειακού φθινοπώρου τέτοιες θερμοκρασίες σπάνια συμβαίνουν ταυτόχρονα με βροχοπτώσεις και υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία. Η υψηλή μεταβλητότητα των επεισοδίων εμφάνισης και σφοδρότητας της ασθένειας του Γλοιοσπορίου της ελιάς, μπορεί να συσχετιστεί με την χωρική και χρονική μεταβλητότητα στις μετεωρολογικές παραμέτρους στην περιοχή της Μεσογείου, μαζί με άλλους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η μόλυνση του ξενιστή απαιτεί νερό ή σχετική υγρασία υψηλότερη από 98%, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάμεσα στους 17 και 20°C, επίσης, η μόλυνση μπορεί να συμβεί και σε θερμοκρασίες μεταξύ 5 και 30°C, όμως η περίοδος όπου η μόλυνση παραμένει λανθάνουσα αυξάνεται (Moral J. et al., 2012). Ακόμα, τα έντομα που προξενούν πληγές στους καρπούς, όπως η Μύγα της Μεσογείου (*Ceratitidis capitata*), ο Δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) και η φρουτόμυγα της Κούνισλαντ (*Bactrocera tryoni*), μπορούν να λειτουργήσουν σαν εναλλακτικές δίοδοι για την είσοδο του παθογόνου, συνεισφέροντας έτσι στην υψηλότερη ένταση της ασθένειας (Graniti A. et al., 1993, Sergeeva V. and Spooner-Hart R., 2010).

Η πυκνότητα φύτευσης παίζει επίσης σπουδαίο ρόλο στην επιδημιολογία της ασθένειας. Οι Moral et al. (2012) κατέγραψαν υψηλότερη ένταση σε ελαιώνες υπέρπυκνης φύτευσης (2000 δένδρα/ha) σε σχέση με ελαιώνες πυκνής φύτευσης (800 δένδρα/ha), ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο σύνολο των καρπών που προσβλήθηκαν (συμπτωματικοί και λανθάνουσες μολύνσεις). Αυτό αποδεικνύει ότι οι εστίες μόλυνσης και οι παράγοντες εξάπλωσης είναι ισοδύναμες και στις δύο πυκνότητες, όμως η μικρότερη κυκλοφορία του ανέμου που συνεπάγεται με υψηλότερη σχετική υγρασία στους υπέρπυκνης φύτευσης ελαιώνες, ευνοεί την πρόοδο της ασθένειας και την ανάπτυξη των συμπτωμάτων.

Τέλος, όσον αφορά τα θρεπτικά στοιχεία οι Xavier et al. (2014) έδειξαν ότι το ασβέστιο παρεμποδίζει τον σχηματισμό πλάκας προσκόλλησης των *Colletotrichum sp.* σε *in vitro* δοκιμές και ότι οι καρποί με λιγότερο από 0.8 ppm Ca^{2+} παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ασθένεια, μια κατάσταση η οποία μπορεί να συνδεθεί με την μικρότερη περιεκτικότητα του ασβεστίου στο χώμα. Αυτό οδήγησε τους Moral J. et al. (2014) να

υποθέσουν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ των επεισοδίων έξαρσης της ασθένειας και του χαμηλού pH του εδάφους, σε κάποιες περιοχές της Πορτογαλίας και της νοτιοδυτικής Ισπανίας.

1.3.6 Μέθοδοι αναγνώρισης των παθογόνων *Colletotrichum* spp.

Το αυξημένο ενδιαφέρον των ανθρώπων προς τα παθογόνα των τροφίμων οδήγησε στη εξέλιξη αρκετών μεθόδων ανίχνευσης, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά στην ταυτοποίηση των παθογόνων σε προϊόντα που προορίζονται για βρώση. Η πλειοψηφία των μεθόδων που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μυκήτων και βακτηρίων βασίζονται σε φαινοτυπικές, χημικές και βιοχημικές μεθόδους, καθώς και στη χρήση μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης (Denoyes-Rothan B. et al., 2003). Κάποιες από αυτές τις μεθόδους δεν εφαρμόζονται ακόμα για τα είδη *Colletotrichum*, που επιφέρουν την ασθένεια του Γλοιοσπορίου της ελιάς και ειδικά του *C. acutatum* (Azevedo- Nogueira F. et al., 2020), ωστόσο θα αναφερθούν καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν πρόσθετα εργαλεία για την ταυτοποίηση των παθογόνων αιτιών της ασθένειας στην ελιά. Οι μέθοδοι αυτοί είναι οι παρακάτω:

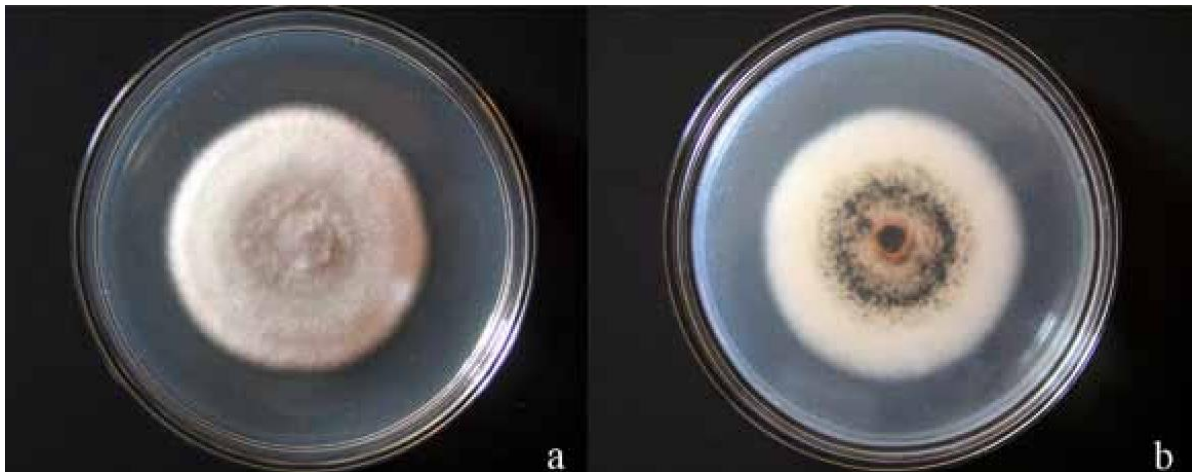
1) Φαινοτυπικές μέθοδοι:

Αρχικά οι απομονώσεις του *C. acutatum* επιλέγονταν με βάση το χρώμα της αποικίας, που μπορούσε να είναι ροζ ή/και πορτοκαλί (Εικόνα 18). Από το 1999, η αναγνώριση και απομόνωση του *C. acutatum* βασίζεται ταυτόχρονα στους παρακάτω φαινοτυπικούς δείκτες (Forster H. and Adaskaveg J. E., 1999, Gomes S. et al., 2012c, Lardner R. et al., 1999, Peres N. A. R. et al., 2004, 2005, Sreenivasaprasad S. and Talhinhos P., 2005, Wharton P. S. and Dieguez-Uribeondo J., 2004):

- Χρώμα αποικίας (ροζ, πορτοκαλί, γκρι και σομόν),
- Ανοχή στο benomyl
- Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης οι 25°C
- Κονίδια με ελλειπτικό ή κυλινδρικό σχήμα, με στρογγυλεμένα ή μυτερά άκρα και εύρος μεγεθών 6,5 μm- 24,5 μm μήκος και 3,0μm - 6,0μm πλάτος (Εικόνα 19).
- Αργό ρυθμό ανάπτυξης, που κυμαίνεται μεταξύ 2,2 και 6,5mm ανά ημέρα, στην βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης.

Παρ' όλα αυτά, οι απομονώσεις που αποκτήθηκαν από διαφορετικούς ξενιστές μπορεί να ποικίλουν σε κάποια από τα χαρακτηριστικά τους (Wharton P. S. and Dieguez-Uribeondo J., 2004). Επίσης, η κατηγοριοποίηση με βάση τα παραπάνω χαρακτηριστικά μπορεί να

οδηγήσει σε σφάλμα, ιδίως όταν επιχειρείται σύγκριση στενά συγγενικών ειδών (Cannon P. F. et al., 2012, Raja H. A. et al., 2017, Talhinhos P. et al., 2005).



Εικόνα 18: Μορφολογία αποικίας του *C. acutatum*, που αναπτύσσεται σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA: (a) πάνω μέρος αποικίας, (b) κάτω μέρος αποικίας (πηγή: Zinkovic S. et al., 2010).



Εικόνα 19: Κονίδια *C. acutatum* (πηγή: Damm U. et al., 2012).

2) Χημικές και βιοχημικές μέθοδοι:

Η χρήση χημικών ουσιών για την αύξηση της ανάπτυξης των μυκήτων, εφαρμόζεται στον χαρακτηρισμό των μυκήτων. Οι Cerkauskas R. F. and Sinclair J. B. 1980 χρησιμοποίησαν paraquat (ζιζανιοκτόνο που θεωρείται τοξικό και απαγορεύτηκε στην Ε.Ε.) (Romero J. et al., 2018) στη σόγια (*Glycine max* L.) για να αξιολογήσουν πιθανή μόλυνση από τον *C. dematium*. Ομοίως, ο Biggs (1995) χρησιμοποίησε paraquat για να διαπιστώσει την ύπαρξη του *C. acutatum* στη μηλιά (*Malus pumila* Mill.). Λόγω της τοξικής επίδρασης του paraquat, ο Romero J. et al., (2018) χρησιμοποίησε ασφαλέστερα χημικά, όπως NaOH, αιθυλένιο και χαμηλές θερμοκρασίες, για να επιβεβαιώσει την ύπαρξη του *Colletotrichum*

godetiae σε μολυσμένους καρπούς ελιάς. Παρ' όλο που αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν για να ανιχνεύσουν λανθάνουσες μολύνσεις, έχουν περιορισμένη εφαρμογή στην ταυτοποίηση των παθογόνων.

3) Φασματοσκοπία υπέρυθρου:

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου είχε αρχικά χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και ταξινόμηση του *C. coccodes* (Erukhimovitch V. et al., 2007, Salman A. et al., 2010, Salman A. et al., 2014). Έπειτα, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του *C. acutatum* σε καρπούς ελιάς (Gouvinhas I. et al. 2016) και βασίζεται στην ταυτοποίηση διάφορων χημικών ουσιών, που διαφοροποιούνται μεταξύ των ποικιλιών ελιάς και πιθανόν να σχετίζονται με τους μηχανισμούς άμυνας. Παρ' όλα αυτά, η χημική ταυτοποίηση συγκεκριμένων ουσιών δεν μπορεί να θεωρηθεί ακριβής μέθοδος ταξινόμησης παθογόνων, διότι οι χημικές ουσίες που παράγονται μπορεί να είναι παρόμοιες, μεταξύ των ειδών (Azevedo- Nogueira F. et al., 2020).

4) Χρωματογραφικές τεχνικές:

Με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών είναι εφικτή η ταυτοποίηση, μέτρηση και σύγκριση μίας ή περισσότερων χημικών ουσιών, που υπάρχουν σε τρόφιμα ή παράγονται από κάποιο ξενιστή μολυσμένο από *Colletotrichum* spp., σε σχέση με υγιή δείγματα. Μεταξύ αυτών των μεθόδων, η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) και παραλλαγές της, χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση διάφορων *Colletotrichum* spp. σε τρόφιμα και φυτά. Ο Park S. et al. (2012) χρησιμοποίησε την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Συζευγμένης με Φασματομετρία Μαζών (HPLC-MS/MS) για να ταυτοποιήσει μόλυνση από τον *C. gloeosporioides* σε κίτρινες πιπεριές (*Capsicum annuum* L.), μέσα από την ανίχνευση 7 φαινολικών ενώσεων (N-caffeoyl putrescine, caffeoyl O-hexoside, feruloyl O-glucoside, kaempferol O-pentosyldihexoside, luteolin 7-O-(2-ariosyl) glucoside, quercetin 3-O-rhamnoside και dihydroxyflavone O-hexoside), που παράγονται από τον ξενιστή σε περίπτωση μόλυνσης. Αυτού του είδους η στρατηγική χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες μελέτες, όπως οι παρακάτω:

α) Όταν ο *C. gloeosporioides* προσβάλλει την πιπεριά (*Capsicum annuum* L.), επάγεται η παραγωγή caffeoylserotonin, η οποία ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας HPLC (Kang K. et al., 2010),

β) Σε βλαστημένα σπέρματα σόγιας αναγνωρίστηκαν 9 χημικές ενώσεις που παράγονται μετά από μόλυνση από τον *C. gloeosporioides*, οι οποίες ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας HPLC-MS/MS (Lee J.-H. et al. 2013),

γ) Ανίχνευση δύο συστατικών (apigeninidin και luteolinidin) χρησιμοποιώντας HPLC στο ζαχαροκάλαμο (*Saccharum officinarum* L.), μετά από μόλυνση από τον *Colletotrichum falcatum*. Η χημική ένωση apigeninidin ανιχνεύθηκε μόνο στην ανθεκτική ποικιλία ζαχαροκάλαμου (Malathi P. et al., 2008),

δ) Σε φύλλα μουριάς (*Morus alba* L.) προσβεβλημένων από τον *Colletotrichum dematium* αναγνωρίστηκαν 4 άγνωστες χημικές ενώσεις δύο ημέρες μετά την μόλυνση με τη χρήση HPLC, σε συνδυασμό με ατομικό συντονισμό (NMR) και βομβαρδισμό ατόμων ακολουθούμενου από φασματομετρία μαζών (FAB-MS). Οι ερευνητές ανέφεραν ότι οι συγκεκριμένες χημικές ενώσεις χαρακτηρίστηκαν και κατηγοριοποιήθηκαν ως πιθανές φυτοαλεξίνες. Η ποσότητα αυτών των ουσιών αυξανόταν με την πρόοδο της μόλυνσης (Yoshida S. et al., 2000),

ε) Καρποί ελιάς μολυσμένοι από τον *C. acutatum* αναλύθηκαν για την συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες, χρησιμοποιώντας HPLC αντίστροφης φάσης (RP-HPLC-PDA). Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις μειώθηκε, καθώς η μόλυνση εξελισσόταν (Gouvinhas I. et al., 2016).

Η πλειοψηφία των φυτοχημικών που ταυτοποιήθηκαν στις προηγούμενες μελέτες παράγονται από τους ξενιστές και πιστεύεται ότι έχουν ανταγωνιστική επίδραση προς το παθογόνο *Colletotrichum*. Παρ' όλο όμως το διακριτό χημικό προφίλ των υγιών και των μολυσμένων φυτικών ιστών, αυτές οι μεθοδολογικές προσεγγίσεις δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ταυτοποιήσουν στο επίπεδο του είδους, τα παθογόνα *Colletotrichum*. Επιπροσθέτως, κάποιες από τις φαινολικές ενώσεις που αναγνωρίστηκαν δεν παράγονται μόνο σε κάποια προσβολή από παθογόνο, αλλά συντίθενται και υπό την επίδραση αβιοτικών καταπονήσεων (Verpoorte R. et al., 2002).

5) Ορρολογικές δοκιμές:

Αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών και/ή δομές ενός συγκεκριμένου παθογόνου, μέσα από την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA. Σε μελέτη που είχε πραγματοποιηθεί με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων σε κόρμους ανεμώνης (*Anemone* spp.), έγινε δυνατή η ανίχνευση των *C. gloeosporioides* και *C. acutatum* μεταξύ άλλων παθογόνων (Barker I. και Pitt D., 1988). Επίσης, σε άλλη μελέτη, για την ανίχνευση του *Colletotrichum musae* στην μπανάνα (*Musa* spp.) χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα που παράχθηκαν από μία μυκηλιακή πρωτεΐνη, του μύκητα (Faisal P.M. et al., 2011). Με τη μέθοδο αυτή έγινε δυνατή η ανίχνευση του *C. musae*, παρότι ήταν παρόντα και άλλα είδη του γένους *Colletotrichum*.

Οι ορολογικές μέθοδοι παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως ευαισθησία, εξειδίκευση και δυνατότητα για πολλαπλή ανάλυση (Bukhari K.A.I.M. et al., 2012, Faisal P. M. et al., 2011) και είναι πιο αξιόπιστες από τις φαινοτυπικές μεθόδους (Azevedo- Nogueira F. et al., 2020).

6) Μοριακές μέθοδοι:

α) Ισοθερμική Αντίδραση Μέσω Βρόγχου (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP): Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ενίσχυση τμημάτων DNA, με τη χρήση εκκινητών του υβριδίζουν σε διαφορετικές θέσεις, πάνω στην αλληλουχία στόχο. Η μέθοδος αυτή περιγράφεται ως απλούστερη και φθηνότερη από τις PCR και qPCR και έχει εφαρμοστεί στην ταυτοποίηση του *Colletotrichum falcatum* στο ζαχαροκάλαμο (Chandra A. et al., 2015), καθώς και στην ανίχνευση του *C. acutatum s.l.* στην φράουλα (Zhang X. et al. 2016).

β) PCR με χρήση μοριακών δεικτών:

Για την ανίχνευση των ειδών *Colletotrichum*, όπως και για τον καθορισμό των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ τους, χρησιμοποιούνται αλληλουχίες DNA (ITS1 και ITS2), καθώς και καλά συντηρημένα γονίδια (HIS3, TUB2, GAPDH, ACT), όπου ενισχύονται με μεθόδους PCR (Hillis D. M. and Dixon M.T., 1991, Damm U. et al., 2012, Jayawardena R.S. et al., 2016). Οι μέθοδοι αυτοί παρουσιάζουν ακρίβεια, ευαισθησία και υψηλή εξειδίκευση (Nithya K. et al., 2012, Raj M. et al., 2012, Serra et al., 2011, Tao G. et al., 2013).

γ) Συγκριτική γονιδιωματική:

Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, ανιχνεύεται και συγκρίνεται η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση του παθογόνου με τον ξενιστή, κατά την εξέλιξη της μόλυνσης. Η γνώση του μονοπατιού μόλυνσης και των παραγόντων που εμπλέκονται μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση των *Colletotrichum*, στο επίπεδο του είδους. Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες που σχετίζονται με το μονοπάτι μόλυνσης των ειδών *Colletotrichum* έχουν χαρακτηριστεί και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αυτό τον σκοπό. Για παράδειγμα, η βλάστηση των κονιδίων και ο σχηματισμός βλαστικού σωλήνα, που απαιτείται για την πρόοδο της μόλυνσης, περιλαμβάνει την έκφραση των γονιδίων CgMeK1 (Kim Y. K. et al., 2000) και CoMeKK1 (Sakaguchi A. et al., 2010), που και τα δύο ανήκουν στο μονοπάτι των MAP κινασών.

1.3.7 Αντιμετώπιση ασθένειας

Η αντιμετώπιση της ασθένειας του Γλοιοσπορίου στην ελιά επιτυγχάνεται με συνδυασμό καλλιεργητικών πρακτικών, χημικών επεμβάσεων ή χρήση βιολογικών

παραγόντων. Οι καλλιεργητικές πρακτικές περιλαμβάνουν πρωτίστως την επιλογή ανθεκτικών ποικιλιών, καθώς η ευαισθησία των καλλιεργούμενων ποικιλιών στην ασθένεια εμφανίζει μεγάλη διαφοροποίηση (Cacciola S. O. et al., 2012, Moral J. et al., 2017). Σε μελέτη που είχε πραγματοποιηθεί στην Ισπανία, όπου και διερευνήθηκε η ευαισθησία πολλών καλλιεργούμενων ποικιλιών, στη μόλυνση από τον *C. acutatum* s. lat. (Moral J. et al., 2017), δείχθηκε ότι από τις ελληνικές ποικιλίες η Αγουρομανακολιά είναι πολύ ευαίσθητη, η Αδραμυτινή, η Αμυγδαλολιά, η Κολυμπάδα και η Μαστοειδής χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητες. Η Μυρτολιά και η Βαλανολιά παρουσιάζουν μέτρια ευαισθησία. Η Χαλκιδικής είναι ανθεκτική και η Κορωνέικη, η Μεγαρίτικη και η Μαυρελιά είναι πολύ ανθεκτικές. Παρ' όλο όμως τα χρήσιμα συμπεράσματα που εξάγονται από τη συγκεκριμένη μελέτη, οι τεχνητές μολύνσεις στις ποικιλίες πραγματοποιήθηκαν με πληθυσμούς τοπικών παθογόνων. Η παραλλακτικότητα των παθογόνων που προκαλούν την ασθένεια του Γλοιοσπορίου απαιτεί τοπικές μελέτες, με τους πληθυσμούς των παθογόνων που κυριαρχούν στην εκάστοτε περιοχή. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι σε πρόσφατο ξέσπασμα της ασθένειας στην Ελλάδα, που προκλήθηκε από τον *C. acutatum* s.s., το μέγεθος της προσβολής έφτασε στο 50% του ελαιόκαρπου της ποικιλίας Καλαμών και στο 50% των ανθών της ποικιλίας Κορωνέικη, που χαρακτηρίζεται ως πολύ ανθεκτική (Talhinhas P. et al., 2018). Άλλες καλλιεργητικές τεχνικές οι οποίες μπορεί να βοηθήσουν στον περιορισμό της ασθένειας είναι αυτές που στοχεύουν στην εξασφάλιση της καλής φυσικής κατάστασης των δένδρων, όπως η ισορροπημένη λίπανση, η επαρκής άρδευση και το κατάλληλο κλάδεμα (Moral J. et al., 2014, Sergeeva V., 2011). Ειδικότερα το κλάδεμα μπορεί είναι πολύ αποτελεσματικό έναντι της ασθένειας, μειώνοντας το φορτίο μολύσματος (π.χ. προσβεβλημένους βλαστούς), δημιουργώντας δυσμενείς συνθήκες για την ανάπτυξη του παθογόνου (η καλύτερη διείσδυση του φωτός και η κυκλοφορία του αέρα στην κόμη του δένδρου, έχει σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση της περίσσειας υγρασίας από το φύλλωμα και τους καρπούς) και διευκολύνοντας τις χημικές επεμβάσεις (Sergeeva V., 2011).

Όσον αφορά την χημική καταπολέμηση της ασθένειας, σε περιοχές με συχνά επιδημικά επεισόδια, πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση χαλκούχων μυκητοκτόνων επιλέγοντας ταυτόχρονα τον χρόνο συγκομιδής, βάσει της ελαιοπεριεκτικότητας του καρπού και του ποσοστού των φαινολικών ενώσεων που περιέχει. Επίσης, λαμβάνονται υπόψη οι μετεωρολογικές συνθήκες (π.χ. συγκομιδή πριν την περίοδο βροχοπτώσεων) και αγρονομικοί παράγοντες (π.χ. η μηχανική συγκομιδή των ανώριμων καρπών είναι δύσκολη). Παρ' όλα αυτά, οι επεμβάσεις με χαλκούχα μυκητοκτόνα μπορεί να καταστούν αναποτελεσματικές,

λόγω έκπλυσης από τις βροχοπτώσεις και επίσης μπορεί να έχουν αρνητικές επιδράσεις λόγω συσσώρευσης ιόντων Cu^{2+} στο χώμα και στο νερό (Komárek M. et al., 2010). Εναλλακτικά, προτείνεται η εφαρμογή οργανικών μυκητοκτόνων. Σε παλιότερες αλλά και σε πιο πρόσφατες έρευνες έχει δειχθεί ότι μυκητοκτόνα της ομάδας των στρουμπιλουρινών (π.χ. azoxystrobin, pyraclostrobin, κ.α.) και της ομάδας των τριαζολών (π.χ. hexaconazole, κ.α.), μπορεί να είναι πολύ αποτελεσματικά έναντι της ασθένειας (Pennisi M. et al., 1993, Agosteo G.E. et al. 2007, Moral J. et al., 2018). Όμως η μακροχρόνια χρήση οργανικών μυκητοκτόνων και σε ακατάλληλες περιόδους μπορεί να καταστεί αναποτελεσματική, αντικοινωνική και να οδηγήσει στην ανάπτυξη πιο μολυσματικών στελεχών (Materatski P. et al., 2019). Επίσης, κάποιοι άλλοι ερευνητές δίνουν έμφαση στην χρονική περίοδο εφαρμογής των μυκητοκτόνων (χαλκούχων ή οργανικών) και προτείνουν δύο χημικές επεμβάσεις, μία πριν την άνθηση και μία κατά την έναρξη της καρπώδεσης, προκειμένου να μειωθεί το φορτίο μολύσματος, το φθινόπωρο (Roca L.F. et al., 2007, Cacciola S.O. et al., 2012, Sergeeva V., 2011).

Ταυτόχρονα με τα καλλιεργητικά μέτρα και τις επεμβάσεις φυτοπροστασίας, η πρώιμη συγκομιδή είναι η πιο σημαντική πρακτική που μπορεί να εφαρμοστεί για την αντιμετώπιση της ασθένειας, διότι επιτρέπει στους καρπούς να αποφύγουν τη μόλυνση, καθώς είναι γνωστό ότι η ευαισθησία των καρπών αυξάνεται κατά την ωρίμανση. Η ανθεκτικότητα στην ασθένεια εξαρτάται από την περιεκτικότητα του καρπού σε φαιολικές ενώσεις και οι καρποί που συγκομίζονται νωρίτερα από την ωρίμανση, περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό των ενώσεων αυτών (Moral J. et al., 2015).

Τέλος, οι περιορισμοί στη χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, ταυτόχρονα με το αυξημένο ενδιαφέρον προς τη δημόσια υγεία και την προστασία του περιβάλλοντος, έχουν στρέψει την έρευνα για την αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών προς την ανάπτυξη πιο οικολογικών πρακτικών (Landum M. C. et al., 2016, Preto G. et al., 2017). Για παράδειγμα, σε πρόσφατη έρευνα δείχθηκε ότι το εκχύλισμα περικαρπίου (φλούδας) του ροδιού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα ασφαλές και αποτελεσματικό μυκητοκτόνο, καθώς τόσο σε *in vitro* πειράματα όσο και σε τεχνητές μολύνσεις ελαιόκαρπων, έδειξε μεγάλη παρεμποδιστική δράση έναντι του *C. acutatum* s.s. (Pangallo S. et al., 2017).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως προαναφέρθηκε παραπάνω, το Γλοιοσπόριο της ελιάς είναι η πιο σοβαρή μυκητολογική ασθένεια του ελαιόκαρπου, σε παγκόσμια κλίμακα. Η ασθένεια προξενείται από διάφορους μύκητες του γένους *Colletotrichum* που ανήκουν σε δύο σύμπλοκα, το *C. acutatum lato sensu (l.s.)* και το *C. gloeosporioides l.s.* που διαφοροποιούνται ως προς την μολυσματικότητα που επιδεικνύουν, αλλά και στην περιοχή ελαιοκαλλιέργειας όπου εμφανίζονται. Στην Ελλάδα η ασθένεια εκδηλώνεται σε πολλές ελαιοπαραγωγικές περιοχές και σύμφωνα με μελέτες κυρίαρχο παθογόνο αίτιο είναι ο *C. acutatum s.s.* Η σφοδρότητα με την οποία εκδηλώνεται η ασθένεια εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (ατμοσφαιρική υγρασία, θερμοκρασία, βροχοπτώσεις) που επικρατούν κατά την περίοδο της ωρίμανσης των καρπών, το φθινόπωρο, αλλά και την άνοιξη, κατά την άνθηση. Άλλοι παράγοντες που ευνοούν την ασθένεια, είναι η πίεση μολύσματος, η καλλιεργούμενη ποικιλία και οι προσβολές από έντομα που προξενούν πληγές στους καρπούς (κυρίως ο Δάκος της ελιάς). Ανάλογα με την ένταση εκδήλωσης της ασθένειας οι απώλειες στην παραγωγή μπορεί να είναι τεράστιες, όπως επίσης πολύ σημαντική μπορεί να είναι και η υποβάθμιση της ποιότητας του παραγόμενου ελαιόλαδου. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της πληθυσμιακής δομής των παθογόνων που προκαλούν την ασθένεια, όπως και η ανάπτυξη καινοτόμων εργαλείων για την διάγνωση και αντιμετώπισή της.

Πιο συγκεκριμένα οι στόχοι της παρούσας μελέτης είναι οι εξής:

- 1) Δειγματοληψίες ταξιανθιών, καρπών και βλαστών ελιάς από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, για την απομόνωση και τη μελέτη της πληθυσμιακής διακύμανσης των παθογόνων στελεχών *Colletotrichum* spp.
- 2) Μοριακή ανίχνευση του παθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* σε δείγματα ταξιανθιών και καρπών ελιάς, με τη μέθοδο RT-PCR TaqMan probe.
- 3) *In vitro* αξιολόγηση μυκοτοξικότητας χημικών σκευασμάτων έναντι παθογόνων στελεχών *Colletotrichum* spp.
- 4) Αξιολόγηση χημικών σκευασμάτων ως προς την αποτελεσματικότητα τους να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και κονιδιογένεση του παθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum*, σε καρπούς ελιάς.
- 5) *In vitro* αξιολόγηση της ικανότητας του βιολογικού παράγοντα *Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 (εμπορική ονομασία Serifel-BASF) να παρεμποδίζει την ανάπτυξη των παθογόνων μυκήτων *Colletotrichum* spp.

- 6) Διερεύνηση των συνθηκών εγκατάστασης και ανάπτυξης του βακτηρίου *B. amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 σε καρπούς ελιάς.
- 7) Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του βιολογικού σκευάσματος Serifel να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum*, σε καρπούς ελιάς.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ

Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης εστάλησαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, δείγματα ταξιανθιών, καρπών και βλαστών ελιάς από διάφορες ελαιοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας, με σκοπό την απομόνωση στελεχών *Colletotrichum* spp. και τη μελέτη της πληθυσμιακής διακύμανσης τους. Οι περιοχές από όπου προέρχονταν τα δείγματα ήταν η Εύβοια, η Κρήτη, η Μεσσηνία, η Αχαΐα, η Ηλεία και η Αιτωλ/νία (Πίνακας 7). Τα δείγματα περιελάμβαναν υγιείς φυτικούς ιστούς (ταξιανθίες, καρπίδια, καρπούς, βλαστούς), αλλά και συμπτωματικούς, με μεταχρωματισμούς και αλλοιωμένες περιοχές.

3.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Για την απομόνωση των διαφόρων ειδών *Colletotrichum* spp. όπως και για τις δοκιμές αξιολόγησης των χημικών και βιολογικών σκευασμάτων της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υλικά:

1) Dichloran rose Bengal chloramphenicol agar (DRBC)

Για τη Παρασκευή 1 λίτρο DRBC:

- Γλυκόζη 10 g
- Πεπτόνη 5 g
- K_2HPO_4 1 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g
- Agar Oxoid No3 15 g
- Απεσταγμένο νερό 1000 ml
- Rose Bengal (αποστείρωση και αυτό) 25 mg
- Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline) 2 mg
- Chloramphenicol 100 mg

Γίνεται αποστείρωση της κωνικής φιάλης με το θρεπτικό υπόστρωμα σε κλίβανο, στους 120°C για 15 min. Μετά την αποστείρωση, αφήνουμε λίγο το υλικό να κρυώσει και τότε προσθέτουμε τα αντιβιοτικά Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline) και Chloramphenicol.

2) V8

Για τη Παρασκευή 1 λίτρο V8:

- V8 50 ml
- Απεσταγμένο νερό 950 ml
- Agar Oxoid No3 20 g

Για τη παρασκευή αυτού του υλικού πρέπει να ρυθμιστεί το pH του διαλύματος στο 6 πριν προσθέσουμε το άγαρ.

3) PDA (Potato Dextrose Agar):

Για τη παρασκευή 1 λίτρου PDA:

Σε μία κωνική φιάλη τοποθετήθηκε απιονισμένο νερό και προστέθηκαν 200 g πατάτας, κομμένα σε κυβάκια και στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε σε δοχείο με βραστό νερό για 45 min. Έπειτα ακολούθησε φιλτράρισμα του εκχυλίσματος, προσθήκη 20g άγαρ και 20g δεξτρόζης. Τέλος πραγματοποιήθηκε ογκομέτρηση του τελικού προϊόντος έως όγκου 1 λίτρου και ακολούθησε αποστείρωση στους 120°C, για 20min.

4) NAG

Για τη παρασκευή 1 λίτρου NAG προστέθηκαν 8 g Nutrient Broth, 20 g Glycerol και 20 g άγαρ σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό και το διάλυμα αποστειρώθηκε στους 120°C για 20 min.

5) WATER AGAR

Για τη παρασκευή 1 λίτρου Water Agar προστέθηκαν 20 g άγαρ σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό και το διάλυμα αποστειρώθηκε στους 120°C για 20 min.

6) MEB (Malt Extract Broth)

Για την παρασκευή 1 λίτρου MEB προστέθηκαν 30 g malt extract και 3 g mycological peptone σε 1 λίτρο απιονισμένο νερό και το διάλυμα αποστειρώθηκε στους 120 °C για 20 min.

3.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ *COLLETOTRICHUM* SPP.

Για την απομόνωση των παθογόνων του γένους *Colletotrichum* αρχικά αποστειρώνονται όλα τα απαραίτητα υλικά και σκεύη (ποτήρια ζέσεως, νυστέρι, λαβίδα, κτλ.). Στη συνέχεια πραγματοποιείται απολύμανση των φυτικών ιστών (ταξιανθιών, καρπιδίων, καρπών, βλαστών) με εμβάπτιση σε διάλυμα χλωρίνης του εμπορίου 10% για 5min με συνεχή ανάδευση και έπειτα σε διάλυμα αιθανόλης 70% για 1min και τέλος οι φυτικοί ιστοί ξεπλένονται με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Ακολούθως, οι φυτικοί ιστοί κόβονται σε μικρά τεμάχια και τοποθετούνται σε τρυβλία Petri που περιέχουν θρεπτικό υλικό

(Rose Bengal), προκειμένου να αναπτυχθεί ο μύκητας. Στα τρυβλία αναγράφεται η προέλευση του δείγματος και τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο, στους 28°C με 12h φωτοπερίοδο.

Στη συνέχεια, τα τρυβλία εξετάζονται κάθε 2 ημέρες μακροσκοπικά για την ανάπτυξη κάποιου μικροοργανισμού. Όταν παρατηρείται ανάπτυξη αποικίας, ιδίως με χαρακτηριστικά αποικίας Γλοιοσπορίου (λευκορόδινο μυκήλιο ή ρόδινη ζελατινώδης μάζα) που αναπτυσσόταν σε επαφή και περιμετρικά με τα κομμάτια του φυτικού ιστού, γίνονταν παρασκευάσματα για μικροσκοπική παρατήρηση. Κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση ελέγχονταν αν υπάρχουν κονίδια με το χαρακτηριστικό σχήμα και μέγεθος, όπως αυτά των ειδών *Colletotrichum* spp. (Εικόνα 19). Εφόσον ο μύκητας αναπτυχθεί μεταφέρεται με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα σε τρυβλίο Petri που περιέχει το θρεπτικό υλικό V8, για τον Α' καθαρισμό και τοποθετείται στον επωαστικό θάλαμο για 2 ημέρες. Έπειτα πραγματοποιείται Β' καθαρισμός, επαναλαμβάνοντας την ίδια διαδικασία και ακολούθως ο μύκητας μεταφέρεται σε τρυβλία Petri που περιέχουν PDA για την ανάπτυξη μονής αποικίας.

Τα στελέχη *Colletotrichum* spp. που απομονώθηκαν και αναπτύχθηκαν ως μονή αποικία, με την παραπάνω διαδικασία, διατηρούνται σε υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 25% στους -80°C, στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και αποτελούν μέρος της συλλογής του εργαστηρίου.

3.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ

Για την ταυτοποίηση των στελεχών των μυκήτων που απομονώθηκαν από τα δείγματα των ιστών ελιάς, πραγματοποιήθηκε η τεχνική της αλληλούχισης γονιδίων. Μέσω της τεχνικής αυτής και ανατρέχοντας σε μια παγκόσμια βάση δεδομένων, γίνεται εφικτή η ακριβής αναγνώριση των οργανισμών σε επίπεδο γένους, είδους και στελέχους. Η διαδικασία της αλληλούχισης περιελάμβανε διάφορα στάδια. Αρχικά τα στελέχη που απομονώθηκαν καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό MEB και διατηρήθηκαν για 48 h στο σκοτάδι, προκειμένου να επιτύχουμε ανάπτυξη μυκηλίου χωρίς την παραγωγή κονιδίων. Έπειτα το μυκήλιο συλλέχθηκε και ακολούθησε λυοφιλίωση (κρυοξήρανση) αυτού για 24 h. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εξαγωγή γενωματικού DNA χρησιμοποιώντας το παρακάτω πρωτόκολλο: 0,1 g λυοφιλιωμένου μυκηλίου τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια (ependorf tubes) των 1,5 mL, προσθέτοντας σε κάθε σωληνάριο 700 μL Lets-buffer για την λύση των κυτταρικών μεμβρανών και ακολούθησε ανάδευση για 5 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 700 μL φαινόλης χλωροφορμίου (Phe-Chl-IAA 15:14:1) και τα δείγματα διατηρήθηκαν για 5

min σε θερμοκρασία δωματίου, για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 min σε θερμοκρασία 4 °C και στις 13000 rpm. Έπειτα, τα υπερκείμενα των δειγμάτων μεταφέρθηκε σε καινούργια σωληνάρια και προστέθηκε ίση ποσότητα Phe-Chl-IAA με αυτήν του υπερκειμένου και ακολούθησε ανάδευση και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε πάλι σε νέα σωληνάρια και προστέθηκε 1mL αιθανόλης 95%, πραγματοποιώντας μια ακόμα φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, για την κατακρήμιση του DNA. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 500 μL αιθανόλης 70%, πραγματοποιώντας φυγοκέντρηση για 2min σε θερμοκρασία 4°C και στις 13000 rpm, για τον καθαρισμό του DNA. Ακολούθως, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min και απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιθανόλης, με την βοήθεια πιπέτας. Τα δείγματα αφήθηκαν με ανοιχτά σωληνάρια ώστε να στεγνώσουν και στη συνέχεια στο κάθε σωληνάριο, όπου το γενωμικό DNA της εξαγωγής βρίσκεται πια σε μορφή ιζήματος (pellet), προστέθηκαν 40 μL Tris-Buffer (pH=8) και 2 μl RNase. Τέλος, τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο, στους 50 °C για 15 λεπτά ώστε να καταστραφεί το RNA.

Με το γενωμικό DNA που λάβαμε από τα στελέχη των απομονώσεων πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση, προκειμένου να ενισχυθεί το γονίδιο-στόχος της αλληλούχισης. Στην αντίδραση μας το γονίδιο-στόχο αποτελεί το γονίδιο GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), από το οποίο κωδικοποιεί ένα ένζυμο που παίζει ρόλο στην γλυκόλυση. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

α) **GDF1** (GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA) και

β) **GDR1** (GGGTGGAGTCGTACTIONTGGAGCATGT),

η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 3 στάδια που περιελάμβαναν 37 κύκλους με εναλλαγές θερμοκρασίας (**Στάδιο 1:** 1min-94°C-1 κύκλος, **Στάδιο 2:** 30sec-54°C, 30sec-50°C, 1min-72°C-35 κύκλοι, **Στάδιο 3:** 10min-72°C- 1 κύκλος).

Μετά το τέλος της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης, για τον ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο των προϊόντων. Στη συνέχεια ακολούθησε καθαρισμός σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο (QIAGEN Gel Purification kit): Προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα PB1, στο πενταπλάσιο του όγκου του ενισχυμένου προϊόντος και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 30sec. Στη συνέχεια απορρίφθηκε το υπόλειμμα της καθίζησης και προστέθηκαν 750 μL buffer PE, φυγοκεντρώντας εκ νέου για 30 sec. Το επιπλέον διάλυμα απορρίφθηκε και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min. Τέλος, προστέθηκαν 50 μL buffer EB και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 1 min.

Το τελικό προϊόν αποστέλλεται για αλληλούχιση και ακολουθεί ανάλυση BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), για την ταυτοποίηση του είδους, του κάθε στελέχους των απομονώσεων.

3.5 ΕΞΑΓΩΓΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΑΞΙΑΝΘΙΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΠΩΝ ΕΛΙΑΣ

Για να μπορέσουμε να ανιχνεύσουμε και να ταυτοποιήσουμε τους παθογόνους μύκητες *Colletotrichum* spp. χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές, λαμβάνουμε DNA από τις ταξιανθίες και τους καρπούς της ελιάς. Η εξαγωγή ολικού DNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το CTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide) DNA extraction protocol (Busconi et al. 2003) και η διαδικασία έλαβε χώρα ως εξής:

Λαμβάνουμε τμήματα φυτικού ιστού από το κάθε δείγμα για να διενεργηθεί η διαδικασία εξαγωγής DNA. Τα τμήματα φυτικού ιστού κόβονται προσεκτικά με ένα νυστέρι μέσα σε γουδί. Ξεκινάει έντονη λειοτρίβηση με το γουδοχέρι, με προσθήκη υγρού αζώτου μέχρι να υπάρξει ομογενοποίηση του δείγματος. Εν συνεχεία, ζυγίζουμε σε αναλυτικό ζυγό 0,5 g δείγματος και το τοποθετούμε σε eppendorf tube των 2 ml. Τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 65 °C για 10 min. Στη συνέχεια στο κάθε δείγμα μας προστίθονται με πιπέτα 750 µl CTAB extraction buffer (0,8g 2% w/v CTAB, 6mL 150mM Tris-HCl pH 8, 8mL 0,5mM EDTA pH 8, 1 M NaCl, 400 µL 1% v/v b-mercaptoethanol) που είχε προθερμανθεί στους 65 °C. Έπειτα, οι σωλήνες με τα δείγματα βυθίζονται σε υδατόλουτρο στους 65 °C και επωάζονται για 1,5 h με δυναμική ανακίνηση περιοδικά ανά 10 min χωρίς τη χρήση vortex. Μετά το πέρας της επώασης, ακολουθεί προσθήκη 750 ml chloroform:octanol (24:1—v/v), με αναστροφή για 5 min και φυγοκέντρηση στις 14,000 x g στροφές για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε καθαρό eppendorf tube των 2 ml και η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά. Στο τελικό υπερκείμενο υγρό του δείγματος που προκύπτει, προστίθεται 0,1g CTAB (in water) 10% (w/v) και πραγματοποιείται ανακίνηση (vortex) για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα πραγματοποιείται προσθήκη 1,5 mL του υπερκείμενου όγκου του CTAB precipitation buffer (1% w/v CTAB, 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) και ανάμιξη ξανά με αναστροφή για 10 min. Μετά από φυγοκέντρηση στις 14.000 για 20min σε θερμοκρασία δωματίου, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30 min. Στο σωλήνα, ακολουθεί προσθήκη 200µL H₂O και 20µL CH₃COONa 3M, καθώς και αντίστοιχης ποσότητας (CH₃)₂CHOH. Ύστερα από φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, πραγματοποιείται πλύση με 70% CH₃CH₂OH και το

ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η τελική προσθήκη 50 μ L TE buffer στο ίζημα και η ακόλουθη επώαση του για 20min σε θερμοκρασία δωματίου, αποδίδουν το επιθυμητό DNA solution.

Μετά την απομόνωση του ολικού DNA από τους φυτικούς ιστούς ελιάς, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος με τη χρήση φασματοφωτόμετρου Nanodrop. Ο λόγος 260/280 αποτελεί μέτρηση της καθαρότητας του δείγματος DNA και πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2, για να έχουμε καθαρά νουκλεϊκά οξέα χωρίς προσμίξεις.

Τέλος, για να είναι τα δείγματα DNA απαλλαγμένα από RNA πριν τη χρήση τους, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός με RNAase A ως εξής:

- Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 2 μ L RNAase A
- Ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία 37° C.

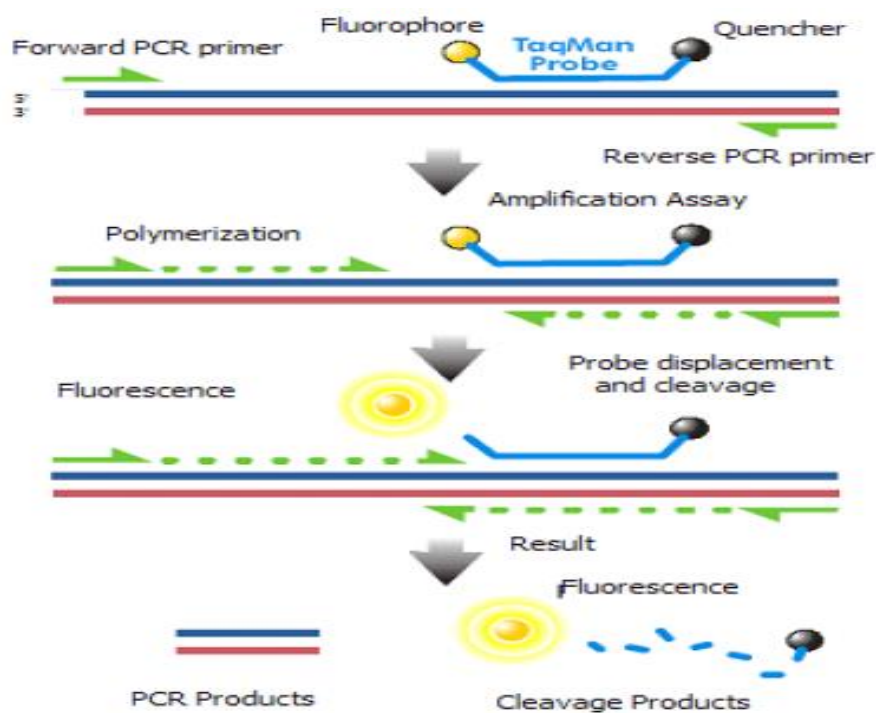
3.6 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *COLLETOTRICHUM ACUTATUM*

Οι μελέτες των τελευταίων χρόνων καταδεικνύουν το *Colletotrichum acutatum* ως το κύριο παθογόνο αίτιο, που προκαλεί την ασθένεια του Γλοιοσπορίου (Ανθράκνωση), στους ελαιώνες της Ελλάδος, αλλά και της υπόλοιπης λεκάνης της Μεσογείου (Talhinhas P. et al. 2004, Moral and Trapero 2009, Pliadi M. et al., 2018, Kolainis S. et al., 2020). Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η ανίχνευση του *C. acutatum*, σε δείγματα ολικού DNA που προέρχονται από ιστούς ελιάς. Για να το επιτύχουμε αυτό χρησιμοποιήσαμε την τεχνολογία RT-PCR TaqMan probe, που μας δίνει την δυνατότητα να ταυτοποιήσουμε με ακρίβεια τον *C.acutatum* στα δείγματα μας.

Για να πραγματοποιήσουμε την RT-PCR TaqMan probe χρησιμοποιήσαμε τους εκκινητές Acu-his-F (5'-TCCAGCGTCTGGTAAGTTGAGAA-3') και Acu-his-R (5'-AGAAGTGTTAGCCGATGCGATT-3') που στοχεύουν στην ενίσχυση του γονιδίου της ιστόνης H3 του *C.acutatum*, μαζί με τον ιχνηθέτη (probe) Acu-his-Probe (5'-VIC-CACAGCGCGTCACC-BHQ1-3') σε RT-PCR (Schena L. et al., 2017). Ο ιχνηθέτης αυτός υβριδίζει σε εσωτερικό σημείο της περιοχής που ενισχύουν οι εκκινητές και έχει την ιδιότητα να φθορίζει, από τη δράση της Taq πολυμεράσης. Ο φθορισμός επιτυγχάνεται όταν η Taq πολυμεράση, ενισχύοντας το τμήμα που ορίζεται από τους εκκινητές, κόβει τα άκρα (5' και 3') του ιχνηθέτη απομακρύνοντας τα, το ένα από το άλλο. Το 5' άκρο του ιχνηθέτη (reporter) φέρει ουσίες ικανές για φθορισμό (FAM, TET) και το 3' άκρο (quencher) φέρει ουσίες που

καταστέλλουν το φθορισμό (TAMRA), έτσι όταν τα δύο άκρα απομακρύνονται παράγεται φθορισμός (Εικόνα 20). Η παραγωγή φθορισμού συμβαίνει μόνο όταν η περιοχή που ενισχύεται είναι συμπληρωματική με τον ιχνηθέτη και μπορεί να παρακολουθηθεί σε πραγματικό χρόνο με την RT-PCR.

Η RT-PCR αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (StepOne Plus™ Real-Time PCR System). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε προσθέτοντας σε κάθε δείγμα 2,5 μL 2x One-Step RT-qPCR Master Mix, 7 ng / μL ολικό DNA των δειγμάτων, από 0,3 μL για τον κάθε εκκινητή και 0,1 μL ιχνηθέτη (probe). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA του στελέχους αναφοράς *C. acutatum* (7ng / μL) σαν θετικός μάρτυρας και γενωμικό DNA (7 ng / μL) του μύκητα *Botryosphaeria dothidea*, σαν αρνητικός μάρτυρας. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 5 μL . Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 40 κύκλους και ο κάθε κύκλος περιελάμβανε: 10 sec στους 95°C για την αποδιάταξη της διπλής αλυσίδας DNA, 15 sec στους 95°C για τον υβριδισμό των εκκινητών και 20 sec στους 61°C για την επιμήκυνση της αλυσίδας.



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση και περιγραφή της τεχνολογίας TaqMan probe (πηγή: differencebetween.com).

3.7 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΕΠΩΑΣΗ ΜΟΛΥΣΜΑΤΩΝ

Τα στελέχη *Colletotrichum* spp. που χρησιμοποιούνται στον πειραματισμό, απομονώθηκαν από δείγματα ιστών ελιάς, που είχαν σταλεί στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών από διάφορες ελαιοκομικές περιοχές της Ελλάδος και αποτελούν μέρος της συλλογής του εργαστηρίου. Τα στελέχη της συλλογής φυλάσσονται στους -80°C σε υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 25%.

Για τις ανάγκες των πειραμάτων της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν απομονώσεις του μύκητα *Colletotrichum acutatum*, που προέρχονταν από την Μεσσηνία, την Ηλεία και την Αιτωλ/ία. Τα στελέχη αυτά ενεργοποιούνταν απλώνοντας μια ποσότητα από το υδατικό διάλυμα γλυκερόλης, με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας, σε τρυβλία Petri που περιείχαν θρεπτικό μέσο PDA. Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης, στους 28°C με 12 h φωτοπερίοδο, για 4-5 ημέρες προκειμένου να αναπτυχθεί ο μύκητας. Στη συνέχεια και ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων μικρή ποσότητα μυκηλίου και κονιδίων από τα αναπτυγμένα στελέχη μεταφέρονταν, με τη χρήση οδοντογλυφίδας, είτε εκ νέου σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο PDA για την παραγωγή μολύσματος κονιδίων, είτε σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο WA για την παραγωγή μολύσματος μυκηλίου και τοποθετούνταν στο θάλαμο για επώαση.

3.8 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

3.8.1. *In vitro* αξιολόγηση χημικών σκευασμάτων

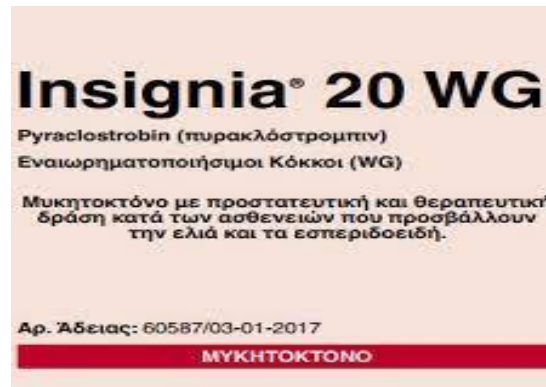
Στη συγκεκριμένη μελέτη αξιολογήθηκε επίσης, η μυκητοτοξική δράση έναντι των παθογόνων *Colletotrichum* spp. των δραστικών ουσιών pyraclostrobin (στρομπιλουρίνη, παρεμποδιστής αναπνοής με εμπορικό όνομα σκευάσματος Insignia[®]) και mefentrifluconazole (τριαζόλη, παρεμποδιστής βιοσύνθεσης εργοστερόλης με εμπορικό όνομα σκευάσματος Revyona[®] και εμπορικό όνομα δραστικής ουσίας Revysol[®]). Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά σκευάσματα Insignia[®] 20 WG (20% pyraclostrobin β/β) και Revyona[®] (7,5 % revysol β/ο). Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το χαλκούχο σκευάσμα Nordox[®] 75 WG (75% copper oxide β/β). Οι δοκιμές περιελάμβαναν πειράματα σε καρπούς ελιάς και *in vitro* πειράματα μυκοτοξικότητας με επιλεγμένες δόσεις των δ.ο., ώστε να αξιολογηθεί η δυνατότητα των σκευασμάτων να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των μυκήτων *Colletotrichum* spp. και να καθοριστεί η EC_{50} , των δ.ο.

Η συγκέντρωση EC_{50} (Half maximal effective concentration) που προκαλεί 50% παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού υπολογίστηκε μέσω του λογισμικού Excel.

Με βάση την καμπύλη παρεμπόδισης ανάπτυξης, επιλέχθηκε η συνάρτηση με το υψηλότερο συντελεστή προσδιορισμού (R^2 , Coefficient of determination). Με βάση αυτή την συνάρτηση υπολογίστηκε η συγκέντρωση που προκαλεί παρεμπόδιση 50%, λύνοντας ως προς την συγκέντρωση που προκαλεί αυτή την παρεμπόδιση.

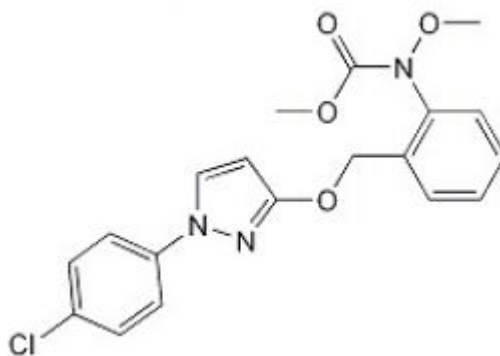
Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά αυτά τα σκευάσματα:

3.8.1.1 Insignia®



Εικόνα 21: Ετικέτα του σκευάσματος Insignia® (πηγή: plantpro.gr).

Είναι ένα μυκητοκτόνο με προστατευτική και θεραπευτική δράση, που είναι εγκεκριμένο για χρήση κατά των ασθενειών που προσβάλλουν την ελιά (*Γλοιοσπόριο-Colletotrichum* spp., *Κυκλοκόνιο-Spilocaea oleagina*). Περιέχει την δραστική ουσία pyraclostrobin που ανήκει στη χημική ομάδα των μεθόξυ-καρβαμιδικών (στρομπιλουρινών) και παρεμποδίζει την κυτταρική αναπνοή στη θέση Q₀ του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας. Επίσης, παρουσιάζει δραστική και γρήγορη αποπλαστική και διελασματική κίνηση εντός των φυτικών ιστών, υψηλή αντοχή στην έκπλυση από τη βροχή και επεμβαίνει στους τρεις πυλώνες της φυτοπροστασίας (έλεγχος του παθογόνου, βελτίωση των φυσιολογικών διεργασιών του δένδρου, αύξηση αντοχής στο στρες) βελτιώνοντας το δυναμικό παραγωγής και τη συνολική ποιότητα των καρπών.



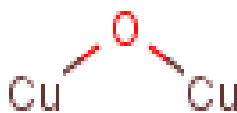
Εικόνα 22: Χημικός τύπος της δραστικής ουσίας pyraclostrobin (πηγή: hpc-standards.com).

3.8.1.2 Nordox® 75 WG



Εικόνα 23: Σκεύασμα Nordox® 75 WG (πηγή: Agroplace.gr).

Είναι ένα ανόργανο μυκητοκτόνο επαφής με προστατευτική δράση. Έχει έγκριση χρήσης για τους μύκητες που απειλούν την καλλιέργεια της ελιάς, δηλαδή το Κυκλοκόνιο (*Cycloconium oleaginum*, *Spiloceae oleagina*) και το Γλοιοσπόριο (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum clavatum*). Ανήκει στη χημική ομάδα των ανόργανων αλάτων του χαλκού και δρα μυκοτοξικά δια της ιονικής μορφής του χαλκού (Cu^{++}). Τα ιόντα του χαλκού απελευθερώνονται επάνω στη φυλλική επιφάνεια, όπου απορροφώνται από τα παθογόνα και τα οποία έτσι θανατώνονται. Ο στόχος είναι τα σπόρια των μυκήτων.



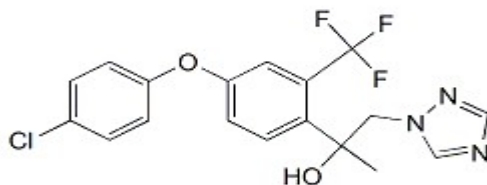
Εικόνα 24: Χημικός τύπος μεταλλικού χαλκού (πηγή: haz-map.com).

3.8.1.3 Revyona® SC



Εικόνα 25: Δραστική ουσία mefentrifluconazole (Revysol®) (πηγή: agro.basf.gr).

Το Revyona® SC, είναι ένα νέο μυκητοκτόνο που προσφέρει προστασία στα μηλοειδή, τα πυρηνόκαρπα και το αμπέλι, από κύριες μυκητολογικές ασθένειες όπως φουζικλάδιο, ωίδιο, μονίλια, αλτερνάρια και μαύρη σήψη. Περιέχει την νέα δραστική ουσία mefentrifluconazole (εμπορική ονομασία δ.ο. Revysol®), που ανήκει στη χημική ομάδα των τριαζολών. Δρα ως παρεμποδιστής βιοσύνθεσης εργοστερόλης, που βρίσκεται στις μεμβράνες των περισσότερων φυτοπαθολόγων μυκήτων, διαταράσσοντας έτσι όχι μόνο τη σταθερότητα και ρευστότητα των μεμβρανών αλλά και τη λειτουργικότητα διαφόρων ενζυμικών συστημάτων που είναι συνδεδεμένα με αυτές. Το mefentrifluconazole παρουσιάζει διασυστηματική και διελασματική κίνηση.



Εικόνα 26: Χημικός τύπος της δραστικής ουσίας mefentrifluconazole (πηγή: hpc-standards.com).

Για τα παραπάνω χημικά σκευάσματα έγιναν δοκιμές στις παρακάτω συγκεντρώσεις δραστικών ουσιών: Nordox® (5 ppm, 20 ppm, 60 ppm, 120 ppm, 240 ppm), Insignia® (1

ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 10ppm, 20ppm), Revysol® (1,5 ppm, 3ppm, 7,5 ppm, 15 ppm, 30 ppm) για να αξιολογηθεί η δυνατότητα των σκευασμάτων να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των μυκήτων *Colletotrichum* spp., όπως επίσης και για να καθοριστεί η EC₅₀ των δραστικών ουσιών. Οι διάφορες συγκεντρώσεις ενσωματώθηκαν σε κωνικές φιάλες των 1000 mL στις οποίες υπήρχαν από 500 mL θρεπτικού υλικού Potato Dextrose Agar (PDA). Τα σκευάσματα προστέθηκαν όταν το υλικό είχε ήδη αποστειρωθεί και ήταν σε θερμοκρασία περίπου 50 °C. Ακολούθως, για τα χημικά σκευάσματα Nordox® και Revysol® δημιουργήθηκαν αντίστοιχα τρυβλία για κάθε δραστική ουσία και συγκέντρωση και ο μύκητας μεταφέρθηκε στο κέντρο τους σε μικρά τμήματα διαμέτρου 6mm, αφού πρώτα είχε ενεργοποιηθεί σε θρεπτικό υλικό Water Agar (WA). Τα τρυβλία διατηρούνταν στους 28 °C με 12 h φωτοπερίοδο και οι διάμετροι μετρούνταν κάθε δύο ημέρες, για να καταγραφεί η παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μύκητα. Για το χημικό σκεύασμα Insignia® προετοιμάστηκαν τα αντίστοιχα τρυβλία για κάθε συγκέντρωση δραστικής ουσίας, προετοιμάστηκε αιώρημα κονιδίων (10⁶ κονίδια/mL) του μύκητα και 50 μL του αιωρήματος στρωματώθηκαν (plating) σε κάθε τρυβλίο προκειμένου να μετρηθεί η βλαστικότητα των κονιδίων. Η βλαστικότητα των κονιδίων μετρήθηκε, με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου, ως αριθμός βλαστημένων κονιδίων στα 100 κονίδια, 18h (στους 28°C με 12h φωτοπερίοδο) μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων. Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα StatGraphics με βάση τη μέθοδο ANOVA (p<0,05).

3.8.2. Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας χημικών σκευασμάτων σε καρπούς ελιάς

Για την διεξαγωγή της *in vivo* δοκιμής αποτελεσματικότητας των χημικών σκευασμάτων χρησιμοποιήθηκαν καρποί ελιάς, ποικιλίας Αμφίσσης. Οι καρποί αρχικά απολυμάνθηκαν με εμβάπτιση 10 min σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνη εμπορίου) 10%, μετά το πέρας των 10 min ακολούθησε η εμβάπτιση σε διάλυμα αιθανόλης 70% για 3 min και τέλος έγινε πλύση των καρπών με αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια, προετοιμάστηκαν υδατικά διαλύματα των χημικών σκευασμάτων, σε συγκεντρώσεις αντίστοιχες με αυτές της εκάστοτε ετικέτας: Insignia® (20% δ.ο.) 50g/100L, Revyona® (7,5% δ.ο.) 200mL/100L και Nordox® (75% δ.ο.) 150 g/100L. Στη συνέχεια οι καρποί ελιάς χωρίστηκαν ανά 24, αριθμός ο οποίος αντιστοιχεί σε 3 επαναλήψεις για κάθε σκεύασμα και τοποθετήθηκαν μέσα στα αντίστοιχα υδατικά διαλύματα όπου ακολούθησε ανάδευση για 30min. Μετά την ανάδευση αφαιρέθηκε από τα μπουκάλια η περίσσεια των διαλυμάτων και αφήθηκαν έτσι για λίγη ώρα οι καρποί. Έπειτα, με τη χρήση λαβίδας τοποθετήθηκαν οι

καρποί στα αντίστοιχα πλαστικά κουτιά (8 καρποί/κουτί) με τις μεταλλικές θήκες, στα οποία είχαμε τοποθετήσει διηθητικό χαρτί στο εσωτερικό κάτω μέρος τους, όπου και με τη χρήση πιπέτας προστέθηκαν 5 mL αποστειρωμένου νερού στην επιφάνεια του χαρτιού, για την εξασφάλιση ικανοποιητικής υγρασίας και στη συνέχεια τα κουτιά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης (28°C, 12h φωτοπερίοδο).

Μετά από 24 ώρες ακολούθησε μόλυνση με τον μύκητα *C. acutatum* στέλεχος Δ4.3. Προετοιμάστηκε αιώρημα κονιδίων συγκέντρωσης 10^6 κονίδια/mL του μύκητα και οι καρποί κάθε κουτιού ψεκάστηκαν με 5 mL αιωρήματος. Εκτός από τις μεταχειρίσεις με τα χημικά σκευάσματα, η δοκιμή περιελάμβανε αρνητικό και θετικό μάρτυρα. Στον αρνητικό μάρτυρα πραγματοποιήθηκε μεταχείριση μόνο με αποστειρωμένο dH₂O, ενώ στον θετικό πραγματοποιήθηκε μόνο ψεκασμός με αιώρημα κονιδίων του μύκητα, χωρίς να προηγηθεί μεταχείριση με τα χημικά σκευάσματα. Στη συνέχεια τα κουτιά τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης (28°C, 12 h φωτοπερίοδο).

Μετά από 2 ημέρες ξεκίνησε η καταγραφή της εξέλιξης της μόλυνσης, που αντιστοιχούσε σε αριθμό μολυσμένων καρπών για κάθε σκεύασμα και τους μάρτυρες. Η καταγραφή της εξέλιξης της μόλυνσης πραγματοποιούνταν κάθε 2 ημέρες και για το διάστημα των 8 ημερών, μετά τη μόλυνση. Μετά το πέρας των 8 ημερών οι καρποί της κάθε επανάληψης απομακρύνθηκαν από τα κουτιά και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια (falcons) με 5 mL αποστειρωμένου dH₂O, όπου μετά από ανάδευση 5 min πραγματοποιήθηκε μέτρηση του αριθμού κονιδίων ανά μεταχείριση, με τη βοήθεια του αιματοκυτταρόμετρου στο μικροσκόπιο.

3.9 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ SERIFEL® (*BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* ΣΤΕΛΕΧΟΣ MBI600)

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε το βιολογικό σκεύασμα Serifel® στέλεχος MBI600, ως προς την αποτελεσματικότητά του να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μύκητα *C. acutatum*. Οι δοκιμές περιελάμβαναν *in vitro* πειράματα, όπως και εφαρμογή του σκευάσματος σε καρπούς ελιάς που είχαν μολυνθεί τεχνητά από τον μύκητα.



Εικόνα 27: Σκεύασμα Serifel (*Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600) (πηγή: agro.basf.gr).

Το Serifel® είναι ένα μυκητοκτόνο που περιέχει τον βιολογικό παράγοντα *Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600, ο οποίος παρέχει προληπτική προστασία δρώντας ανταγωνιστικά εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων, βοτρυτής και σκληρωτίνια. Παρεμποδίζει τη βλάστηση των σπορίων και την μυκηλιακή ανάπτυξη των μυκήτων, τροποποιώντας τη μεμβρανική δομή. Επίσης, σχηματίζει ένα φυσικό φράγμα εμποδίζοντας την προσκόλληση του παθογόνου στο φυτό και προάγει την έκκριση λιποπεπτιδίων, κατά την ανάπτυξη του φυτού, δημιουργώντας μια ζώνη αναστολής της δημιουργίας αποικίας του παθογόνου. Ακόμη, επάγει το μηχανισμό φυσιολογικής αντίστασης του φυτού έναντι των παθογόνων.

3.9.1. Απομόνωση του *Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 από το βιολογικό σκεύασμα Serifel®

Για τις ανάγκες διεξαγωγής των δοκιμών της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε απομόνωση του *B. amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 από το βιολογικό σκεύασμα Serifel® στέλεχος MBI600. Η διαδικασία έλαβε χώρα ως εξής:

Ποσότητα 0,1 g του σκευάσματος Serifel® προστέθηκε μέσα σε σωλήνα Eppendorf, που περιείχε 1 mL αποστειρωμένο dH₂O και ακολούθησε ανάδευση στο vortex. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) του πυκνού αυτού αιωρήματος και έπειτα 50 μ L του αιωρήματος της αραιώσης 10^{-4} μεταφέρθηκε με πιπέτα σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα NAG και στρωματώθηκε (plating) για τη δημιουργία μονών αποικιών. Μετά το πέρας 24h, μονές αποικίες πάρθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας από τα τρυβλία της αραιώσης των 10^{-4} και απλώθηκαν (streaking) εκ νέου σε τρυβλία Petri που περιείχαν NAG, προκειμένου να αναπτυχθεί ο βάκιλος. Μετά το πέρας 4-5

ημερών το περιεχόμενο των τρυβλίων με τις αναπτυγμένες αποικίες του βακίλου μεταφέρθηκε σε σωλήνες Eppendorf των 1,5 mL που περιείχαν υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 25% και έπειτα τοποθετήθηκαν στους -80°C, για την διατήρηση της απομόνωσης.

3.9.2 *In vitro* αξιολόγηση της ικανότητας του *Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600

Από αποικία καλλιέργειας 2-3 ημερών του *Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600, που αναπτυσσόταν σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG, πάρθηκε μικρή ποσότητα με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας και απλώθηκε, διαγράφοντας μια γραμμή, στην άκρη τρυβλίων Petri που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Στη συνέχεια, μικρά τμήματα (0,3x0,3cm) του μύκητα ενεργοποιημένου σε Water Agar (WA), τοποθετήθηκαν στις απέναντι άκρες των τρυβλίων, προκειμένου να αναπτυχθεί στο ίδιο περιβάλλον με τον βάκιλο. Επίσης, ετοιμάστηκαν και τρυβλία στα οποία δεν εφαρμόστηκε ο βάκιλος, παρά μόνο ο μύκητας και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Η κάθε μεταχείριση περιελάμβανε 3 επαναλήψεις και τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον θάλαμο επώασης (28°C, 12h φωτοπερίοδο), όπου καθημερινά και για 10 ημέρες μετρούνταν η ανάπτυξη του μύκητα.

3.9.3 *In vitro* αξιολόγηση του *Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 να παρεμποδίζει το μύκητα *C. acutatum* μέσω πτητικών ενώσεων

Για την δοκιμή αυτή χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία Petri τα οποία έφεραν ένα κάθετο διαχωριστικό, δημιουργώντας έτσι δύο διακριτές περιοχές εσωτερικά του τρυβλίου. Στα τρυβλία αυτά, μικρή ποσότητα από αποικία του *Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 καλλιέργειας 2-3 ημερών, σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG, πάρθηκε και στρωματώθηκε (streaking) με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας, στη μία περιοχή των τρυβλίων, που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Στην άλλη περιοχή τοποθετήθηκαν μικρά τμήματα (0,3 x 0,3cm) του μύκητα ενεργοποιημένου σε Water Agar (WA), έτσι ώστε να αναπτυχθεί ξεχωριστά από τον βάκιλο. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μεταχείριση που περιελάμβανε μόνο την παρουσία του μύκητα στη μία περιοχή των τρυβλίων, χαρακτηριζόμενη ως μάρτυρας. Η κάθε μεταχείριση περιελάμβανε 3 επαναλήψεις και τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης (28°C, 12h φωτοπερίοδο), όπου και κάθε δύο ημέρες μετρούνταν η ανάπτυξη του μύκητα.

3.9.4 *In vitro* αξιολόγηση τ του *Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 να παρεμποδίζει το μύκητα *C. acutatum* μέσω δευτερογενών μεταβολιτών

Για την δοκιμή αυτή χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα τρυβλία Petri, τα οποία είχαν παραμείνει στον κλίβανο αποστείρωσης στους 120°C για 20 min. Στη συνέχεια, από αποικία καλλιέργειας 2-3 ημερών, που αναπτυσσόταν σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG, του *Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600, πάρθηκε μικρή ποσότητα με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας και τοποθετήθηκε στο κέντρο του γυάλινου τρυβλίου, που περιείχε θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Τα τρυβλία παρέμειναν στον θάλαμο επώασης για 24 h (28°C, 12h φωτοπερίοδο). Στη συνέχεια, διηθητικό χαρτί που είχε τοποθετηθεί στα καπάκια των τρυβλίων εμποτίστηκε με 5 mL χλωροφόρμιο και τα τρυβλία τοποθετήθηκαν αναποδογυρισμένα, όπου και παρέμειναν για 50 min σε αυτή τη θέση, προκειμένου να θανατωθεί ο βάκιλος. Ακολούθως, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε κανονική θέση, ανοιχτά για 30 min, προκειμένου να στεγνώσουν. Στη συνέχεια, ετοιμάστηκε αιώρημα κονιδίων (10^6 / mL) του μύκητα *C. acutatum* και 50 μ L από το αιώρημα στρωματώθηκαν (streaking) στα τρυβλία, γύρω από τον θανατωμένο βάκιλο. Η δοκιμή περιελάμβανε και τρυβλία τα οποία έλαβαν την ίδια μεταχείριση, αλλά εμβολιάστηκαν μόνο με το αιώρημα κονιδίων του μύκητα και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης (28°C, 12h φωτοπερίοδο) για 4 ημέρες προκειμένου να διαπιστωθεί εάν ο βάκιλος παράγαγε μεταβολίτες, που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του μύκητα.

3.9.5 Διερεύνηση των συνθηκών εγκατάστασης και ανάπτυξης του βακτηρίου *B. amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 σε καρπούς ελιάς

Η διερεύνηση του χρόνου και των συνθηκών ανάπτυξης του βακτηρίου *B. amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600, πραγματοποιήθηκε με μέτρηση των αποικιών (cfu) που αναπτύσσονται πάνω σε καρπούς ελιάς. Η μέτρηση αφορούσε δύο θερμοκρασίες ανάπτυξης (15°C, 25°C), σε 1, 2, 3, 5 και 7 ημέρες μετά την εφαρμογή (dpi) του βιολογικού σκευάσματος Serifel® σε καρπούς ελιάς. Επίσης, μαζί με το βιολογικό παράγοντα εφαρμόστηκε και το υγρό λίπασμα TriaAlfa Essence® που περιέχει 39,0% οργανική ουσία, 3,0% οξείδιο του Καλίου (K₂O), 3,0% Άζωτο (N), είναι απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς και πιστεύεται ότι βοηθάει την καλύτερη εγκατάσταση και ανάπτυξη του βάκιλου, πάνω στον ελαιόκαρπο.

Οι καρποί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ποικιλίας Κορωνέικη και αρχικά απολυμάνθηκαν με εμβάπτιση 10 min σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνη εμπορίου) 10%, έπειτα ακολούθησε η εμβάπτιση σε διάλυμα αιθανόλης 70% για 3 min και

τέλος έγινε πλύση των καρπών με αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκε υδατικό διάλυμα του βιολογικού σκευάσματος Serifel®, με δοσολογία 50 g/100L και υδατικό διάλυμα (50 g / 100L) του βιολογικού σκευάσματος Serifel® μαζί με το υγρό λίπασμα TriaAlfa Essence®, σε δοσολογία 600 mL / 100L. Στη συνέχεια, οι καρποί ελιάς εμβαπτίστηκαν στα αντίστοιχα υδατικά διαλύματα και ακολούθησε ανάδευση για 30 min. Οι μεταχειρίσεις περιελάμβαναν και καρπούς ελιάς που εμβαπτίστηκαν σε αποστειρωμένο νερό, που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Μετά την ανάδευση αφαιρέθηκε από τα μπουκάλια η περίσσεια των διαλυμάτων και αφέθηκαν έτσι για λίγη ώρα οι καρποί. Ακολούθως, με τη χρήση λαβίδας τοποθετήθηκαν οι καρποί στα αντίστοιχα πλαστικά κουτιά (8 καρποί/κουτί), στα οποία είχε τοποθετηθεί διηθητικό χαρτί στο εσωτερικό κάτω μέρος τους, όπου με τη χρήση πιπέτας προστέθηκαν 5 mL αποστειρωμένου νερού στην επιφάνεια του χαρτιού, για την εξασφάλιση ικανοποιητικής υγρασίας. Έπειτα, 30 κουτιά (15 για κάθε θερμοκρασία) με τις ελιές που είχαν λάβει μεταχείριση με το Serifel® μαζί με το υγρό λίπασμα TriaAlfa Essence® τοποθετήθηκαν σε θαλάμους επώασης με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 15°C και 25°C αντίστοιχα και 12h φωτοπερίοδο. Στους 25°C τοποθετήθηκαν και τα κουτιά με τις ελιές οι οποίες είχαν λάβει μεταχείριση μόνο με το Serifel® και το αποστειρωμένο νερό, που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Στη συνέχεια, κατά τις χρονικές περιόδους 1, 2, 3, 5 και 7 dpi οι ελιές, 3 κουτιών από την κάθε θερμοκρασία, τοποθετούνταν σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες, μία για κάθε κουτί, που περιείχαν ίση ποσότητα (60 mL) αποστειρωμένου νερού και παρέμεναν 30 min σε ανάδευση. Στη συνέχεια, λαμβάνονταν 1 mL, με πιπέτα ακριβείας, από την κάθε κωνική φιάλη και τοποθετούνταν σε σωλήνα Eppendorf. Από αυτό το αρχικό 1 mL (πυκνό αιώρημα) δημιουργήθηκαν αραιώσεις των 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} και 50mL από τις αραιώσεις των 10^{-2} και 10^{-4} στρωματώνονταν (plating) σε τρυβλία Petri, με θρεπτικό υπόστρωμα NAG, για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση των αποικιών που αναπτύσσονταν. Τα τρυβλία διατηρούνταν σε θάλαμο επώασης (28°C, 12h φωτοπερίοδο) και μετά το πέρας 24 h γινόταν η μέτρηση των μονών αποικιών που αναπτύσσονταν στα τρυβλία.

3.9.6 Αξιολόγηση του βιολογικού σκευάσματος Serifel® να παρεμποδίζει το μύκητα *Colletotrichum nymphaeae* σε καρπούς ελιάς

Για την διεξαγωγή της *in vivo* δοκιμής αποτελεσματικότητας του βιολογικού σκευάσματος Serifel® χρησιμοποιήθηκαν καρποί ελιάς, ποικιλίας Κορωνέικη. Οι καρποί αρχικά απολυμάνθηκαν με εμβάπτιση 10 min σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνη εμπορίου) 10%, μετά το πέρας των 10 min ακολούθησε η εμβάπτιση σε διάλυμα αιθανόλης

70% για 3 min και τέλος έγινε πλύση των καρπών με αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκε υδατικό διάλυμα του βιολογικού σκευάσματος Serifel®, με δοσολογία 50 g / 100 L. Επίσης, δημιουργήθηκε υδατικό διάλυμα (50 g / 100 L) του βιολογικού σκευάσματος Serifel® μαζί με το υγρό λίπασμα TriaAlfa Essence®, σε δοσολογία 100 mL / 100 L. Το υγρό λίπασμα TriaAlfa Essence® περιέχει 39,0% οργανική ουσία, 3,0% οξείδιο του Καλίου (K₂O), 3,0% Άζωτο (N), είναι απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς και πιστεύεται ότι βοηθάει την καλύτερη εγκατάσταση και ανάπτυξη του βάκικου, πάνω στον ελαιόκαρπο. Τέλος, προετοιμάστηκε υδατικό διάλυμα, σε δοσολογία 50 g / 100 L, του χημικού σκευάσματος Insignia, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στο πείραμα, επειδή έχει δειχθεί σε προηγούμενες δοκιμές ότι είναι το πιο αποτελεσματικό σκεύασμα, ως προς την παρεμπόδιση που ασκεί στην ασθένεια του Γλοιοσπορίου.

Έπειτα, οι καρποί ελιάς χωρίστηκαν ανά 30, αριθμός ο οποίος αντιστοιχεί σε 3 επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση και τοποθετήθηκαν μέσα στα αντίστοιχα υδατικά διαλύματα, όπου ακολούθησε ανάδευση για 30 min. Μετά την ανάδευση αφαιρέθηκε από τα μπουκάλια η περίσσεια των διαλυμάτων και αφέθηκαν έτσι για λίγη ώρα οι καρποί. Ακολούθως, με τη χρήση λαβίδας τοποθετήθηκαν οι καρποί στα αντίστοιχα πλαστικά κουτιά (10 καρποί / κουτί), στα οποία είχαμε τοποθετήσει διηθητικό χαρτί στο εσωτερικό κάτω μέρος τους, όπου και με τη χρήση πιπέτας προστέθηκαν 5 mL αποστειρωμένου νερού στην επιφάνεια του χαρτιού, για την εξασφάλιση ικανοποιητικής υγρασίας και στη συνέχεια τα κουτιά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης (28°C, 12h φωτοπερίοδο).

Μετά από 24 ώρες ακολούθησε μόλυνση με τον μύκητα *Colletotrichum nymphaeae* (ανήκει στο σύμπλοκο ειδών του *C.acutatum*), στέλεχος Χώρα Συγκριτικός Παραγωγού (ΧΣΠ), που είχε απομονωθεί από δείγμα καρπού ελιάς, προερχόμενο από περιοχή του νομού Μεσσηνίας. Αφού προετοιμάστηκε αιώρημα κονιδίων συγκέντρωσης 10⁶ κονίδια / mL του μύκητα και οι καρποί κάθε κουτιού ψεκάστηκαν με 5mL αιωρήματος. Εκτός από τις μεταχειρίσεις με το Serifel® και το Serifel® μαζί με το TriaAlfa Essence®, η δοκιμή περιελάμβανε αρνητικό και θετικό μάρτυρα. Στον αρνητικό μάρτυρα πραγματοποιήθηκε μεταχείριση μόνο με αποστειρωμένο dH₂O, ενώ στον θετικό πραγματοποιήθηκε μόνο ψεκάσμός με αιώρημα κονιδίων (10⁶ κονίδια/mL) του μύκητα, χωρίς να προηγηθεί μεταχείριση με τα σκευάσματα. Στη συνέχεια τα κουτιά τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης (28°C, 12h φωτοπερίοδο).

Μετά από 2 ημέρες ξεκίνησε η καταγραφή της εξέλιξης της μόλυνσης, που αντιστοιχούσε σε αριθμό μολυσμένων καρπών για κάθε μεταχείριση και τους μάρτυρες. Η

καταγραφή της εξέλιξης της μόλυνσης πραγματοποιούνταν κάθε 2 ημέρες και για το διάστημα των 10 ημερών, μετά τη μόλυνση. Μετά το πέρας των 10 ημερών οι καρποί της κάθε μεταχείρισης απομακρύνθηκαν από τα κουτιά και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια (falcons) με 5 mL αποστειρωμένου dH₂O, όπου μετά από ανάδευση 5 min πραγματοποιήθηκε μέτρηση του αριθμού κονιδίων ανά μεταχείριση, με τη βοήθεια του αιματοκυτταρόμετρου στο μικροσκόπιο.

3.9.7 Αξιολόγηση του βιολογικού σκευάσματος Serifel® να παρεμποδίζει το μύκητα *C. acutatum* σε μικρότερες συγκεντρώσεις μολύσματος σε καρπούς ελιάς

Για την διεξαγωγή αυτής της *in vivo* δοκιμής χρησιμοποιήθηκαν αιωρήματα κονιδίων του μύκητα σε συγκεντρώσεις μικρότερες από τα 10⁶ κονίδια/mL, που προσομοιάζουν καλύτερα την παρουσία αυτού σε φυσικές συνθήκες. Οι συγκεντρώσεις των αιωρημάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η 10⁴ και η 5x10⁴ κονίδια / mL, όπου και εφαρμόστηκαν σε καρπούς ελιάς ποικιλίας Κορωνέικη. Οι καρποί αρχικά απολυμάνθηκαν με εμβάπτιση 10 min σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνη εμπορίου) 10%, μετά το πέρας των 10 min ακολούθησε η εμβάπτιση σε διάλυμα αιθανόλης 70% για 3 min και τέλος έγινε πλύση των καρπών με αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκε υδατικό διάλυμα του βιολογικού σκευάσματος Serifel® μαζί με το υγρό λίπασμα TriaAlfa Essence®, σε δοσολογία 50g/100L και 600mL/100L αντίστοιχα. Έπειτα, οι καρποί ελιάς εμβαπτίστηκαν μέσα στο υδατικό διάλυμα και ακολούθησε ανάδευση για 30 min. Μετά την ανάδευση αφαιρέθηκε η περίσσεια του διαλύματος και αφέθηκαν έτσι για λίγη ώρα οι καρποί. Ακολούθως, με τη χρήση λαβίδας τοποθετήθηκαν οι καρποί στα αντίστοιχα πλαστικά κουτιά (8 καρποί/κουτί), στα οποία είχαμε τοποθετήσει διηθητικό χαρτί στο εσωτερικό κάτω μέρος τους, όπου και με τη χρήση πιπέτας προστέθηκαν 5 mL αποστειρωμένου νερού στην επιφάνεια του χαρτιού, για την εξασφάλιση ικανοποιητικής υγρασίας και στη συνέχεια τα κουτιά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης (28°C, 12h φωτοπερίοδο).

Μετά από 24 ώρες ακολούθησε μόλυνση με τον μύκητα *C. acutatum*- Στέλεχος αναφοράς. Αφού προετοιμάστηκαν αιωρήματα κονιδίων συγκεντρώσεων 10⁴ και 5x10⁴ κονίδια/mL του μύκητα, οι καρποί κάθε κουτιού ψεκάστηκαν με 5mL αιωρήματος. Εκτός από τις δύο παραπάνω συγκεντρώσεις κονιδίων του μύκητα χρησιμοποιήθηκε και αιώρημα συγκέντρωσης 10⁶ κονίδια/mL, το οποίο θεωρήθηκε σαν θετικός μάρτυρας. Η κάθε μεταχείριση περιελάμβανε 3 επαναλήψεις και τα κουτιά τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης (28°C, 12h φωτοπερίοδο).

Στη συνέχεια το πείραμα επαναλήφθηκε με εφαρμογή μόνο του βιολογικού σκευάσματος Serifel®, σε καρπούς ελιάς ποικιλίας Καλαμών. Οι συγκεντρώσεις μολύσματος που εφαρμόστηκαν παρέμειναν οι ίδιες (10^4 , 5×10^4 και 10^6 κονίδια/mL) και το βιολογικό σκευάσμα Serifel® εφαρμόστηκε σε δοσολογία 50 g/100L. Οι διαφορές με το προηγούμενο πείραμα βρίσκονται στο χρόνο πραγματοποίησης της τεχνητής μόλυνσης (5 ημέρες μετά από την εμφύτευση των ελιών στο Serifel®) και στο ότι υπήρξαν μεταχειρίσεις θετικοί μάρτυρες, για όλες τις συγκεντρώσεις των μολυσμάτων. Η κάθε μεταχείριση περιελάμβανε 3 επαναλήψεις και τα κουτιά τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης (28°C , 12h φωτοπερίοδο).

Και για τα δύο πειράματα, η καταγραφή της εξέλιξης της ασθένειας ξεκίνησε 2 ημέρες μετά από την τεχνητή μόλυνση και αντιστοιχούσε σε αριθμό μολυσμένων καρπών για κάθε μεταχείριση και τους μάρτυρες. Η καταγραφή της εξέλιξης της ασθένειας πραγματοποιούνταν κάθε 2 ημέρες και για το διάστημα των 8 ημερών, μετά την μόλυνση. Μετά το πέρας των 8 ημερών οι καρποί της κάθε μεταχείρισης απομακρύνθηκαν από τα κουτιά και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια (falcons) με 5 mL αποστειρωμένου dH_2O , όπου μετά από ανάδευση 5 min πραγματοποιήθηκε μέτρηση του αριθμού κονιδίων ανά μεταχείριση, με τη βοήθεια του αιματοκυτταρόμετρου στο μικροσκόπιο.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ

Μετά την αποστολή των δειγμάτων ταξιανθιών, καρπών και βλαστών ελιάς, στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, ακολουθούσε η διαδικασία απομόνωσης που περιγράφηκε παραπάνω.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7) αναφέρονται τα αποτελέσματα των απομονώσεων μυκήτων *Colletotrichum* spp., από φυτικούς ιστούς ελιάς. Τα δείγματα ελιάς είχαν απεσταλεί από ελαιοκομικές περιοχές των νομών Ευβοίας, Μεσσηνίας, Αιτωλ/νίας, Ηλείας, Αχαΐας, Ηρακλείου, Ρεθύμνου και Χανίων.

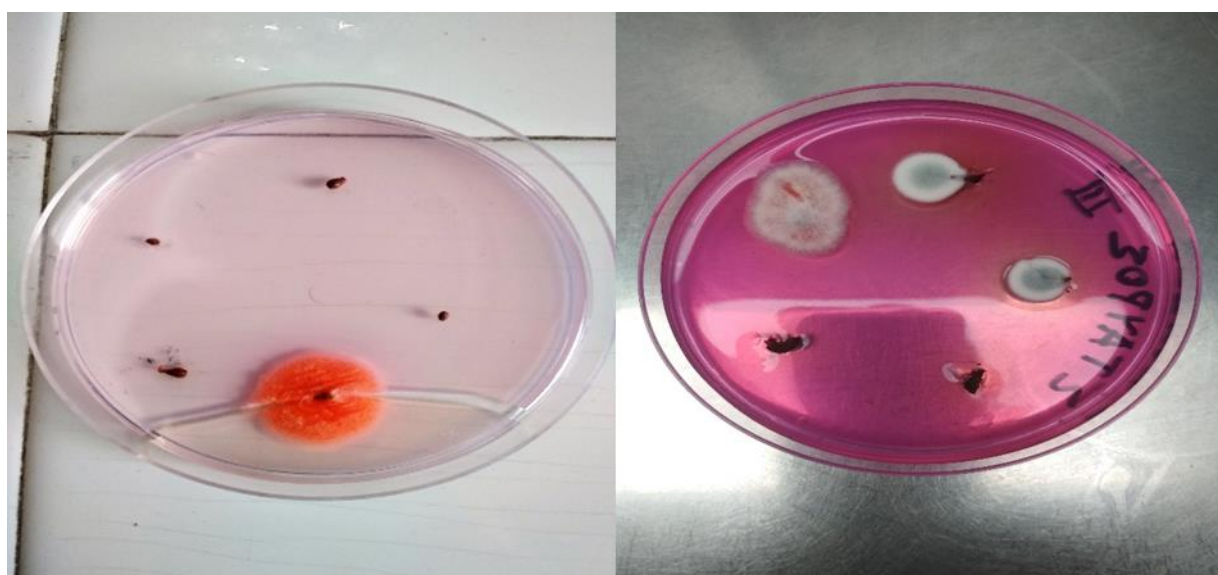
Από τα αποτελέσματα των απομονώσεων, που καταγράφονται στον Πίνακα 7, φαίνεται ότι απομονώθηκαν μυκήτες *Colletotrichum* spp. ή άλλου παθογόνου με παρόμοια μορφολογία αποικίας και κονιδίων, από τα εξής δείγματα: Δ6.4 (αρ.1, Ζαχάρω, Ηλείας, οφθαλμοί), Δ5.1 και Δ4.3 (αρ. 2-3, Ίκλαινα, Μεσσηνίας, άνθη), Εύβοια 6 (αρ.4, καρπίδια), Μεσκλά 1 (αρ.5, καρπίδια), Ζυμβραγό 2 (αρ.6, καρπίδια) Ζυμβραγό, Ορεινό (αρ.16-17, Κρήτη, άνθη), Συγκριτικός Παραγωγού (αρ.25, Χώρα, Μεσσηνίας, καρποί) και Νικολόπουλος (αρ.31, Κεφαλόβρυσο, Αιτωλ/νίας, καρποί). Οι απομονώσεις, όπως καταγράφεται, αφορούσαν πολλές ελαιοκομικές περιοχές (Μεσσηνία, Ηλεία, Αιτωλ/νία και Κρήτη) και επίσης, προέκυψαν από διάφορους φυτικούς ιστούς της ελιάς (οφθαλμούς, άνθη, καρπούς) και διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα απομονώσεων μυκήτων *Colletotrichum* spp. από φυτικούς ιστούς ελιάς.

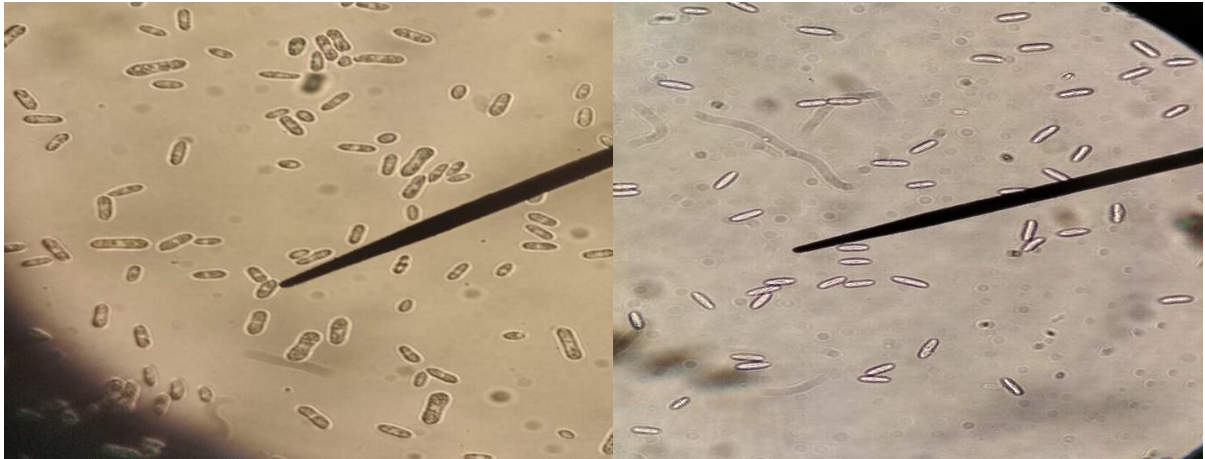
A/A	Όνομα δείγματος	Προέλευση δείγματος	Ημερομηνία	Ποικιλία	Επεμβάσεις	Φυτικός ιστός	Απομόνωση <i>Colletotrichum</i> spp. ή άλλου παθογόνου
1	Δ6.4	Ζαχάρω, Ηλείας	Μάιος-19	-	-	Οφθαλμοί	NAI
2	Δ5.1	Ίκλαινα, Μεσσηνίας	Μάιος-19	-	-	Άνθη	NAI
3	Δ4.3	Ίκλαινα, Μεσσηνίας	Μάιος-19	-	-	Άνθη	NAI
4	Εύβοια 6	Εύβοια	Ιούν-19	-	-	Μαύρα καρπίδια	NAI
5	Μεσκλά 1	Χανιά, Κρήτης	Ιούν-19	-	-	Μαύρα καρπίδια	NAI
6	Ζυμβράγο 2	Χανιά, Κρήτης	Ιούν-19	-	-	Μαύρα καρπίδια	NAI
7	Λουτρά	Ρέθυμνο, Κρήτης	Μάιος20	-	-	Άνθη	OXI
8	Άδελε	Ρέθυμνο, Κρήτης	Μάιος20	-	-	Άνθη	OXI
9	Επισκοπή	Ρέθυμνο, Κρήτης	Μάιος20	-	-	Άνθη	OXI
10	Κρούσωνας	Ηράκλειο, Κρήτης	Μάιος20	-	-	Άνθη	OXI
11	Αγ.Μύρωνας	Ηράκλειο, Κρήτης	Μάιος20	-	-	Άνθη	OXI
12	Βιάννος	Ηράκλειο, Κρήτης	Μάιος20	-	-	Άνθη	OXI
13	Ρούματα	Χανιά, Κρήτης	Μάιος20	-	-	Άνθη	OXI
14	Περιβόλια	Χανιά, Κρήτης	Μάιος20	-	-	Άνθη	OXI
15	Μεσκλά	Χανιά, Κρήτης	Μάιος20	-	-	Άνθη	OXI
16	Ζυμβράγο	Χανιά, Κρήτης	Μάιος20	-	-	Άνθη	NAI
17	Ορεινό	Λασιθι, Κρήτης	Μάιος20	-	-	Άνθη	NAI
18	Δείγμα 1	Βλαχόπουλο, Μεσσηνία	Ιούν-20	-	-	Μαύρα καρπίδια	OXI
19	Δείγμα 2	Βλαχόπουλο, Μεσσηνία	Ιούν-20	-	-	Μαύρα καρπίδια	OXI
20	Δείγμα 3	Βλαχόπουλο, Μεσσηνία	Ιούν-20	-	-	Μαύρα καρπίδια	OXI
21	Δείγμα 4	Χώρα, Μεσσηνίας	Ιούν-20	-	-	Πράσινα καρπίδια	OXI
22	Δείγμα 5	Δ. Σέρβης	Ιούν-20	-	-	Πράσινα καρπίδια	OXI
23	Λινάρδος	Κουκουνάρα, Μεσσηνία	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
24	Ρίζος	Κουκουνάρα, Μεσσηνία	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
25	Ζωντανός Γ., Μάρτυρας	Κουκουνάρα, Μεσσηνία	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
26	Αποδεικτικός BASF	Κυπαρισσία, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
27	Συγκριτικός Παραγωγού	Κυπαρισσία, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
28	Καράμπελας Κώστας	Ίκλαινα, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
29	Αποδεικτικός BASF	Ίκλαινα, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
30	Αποδεικτικός BASF	Χώρα, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
31	Συγκριτικός Παραγωγού	Χώρα, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	NAI
32	Αποδεικτικός BASF, Μάρτυρας	Χώρα, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
33	Συγκριτικός Παραγωγού	Βλαχόπουλο, Μεσσηνία	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
34	Ζωντανός Γιάννης	Βλαχόπουλο, Μεσσηνία	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
35	Αποδεικτικός BASF	Βλαχόπουλο, Μεσσηνία	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
36	Συγκριτικός Παραγωγού	Μεσολόγγι, Αιτωλοακαρ	Οκτ-20	-	-	Ωριμοί καρποί	OXI
37	Αποδεικτικός BASF	Μεσολόγγι, Αιτωλοακαρ	Οκτ-20	-	-	Ωριμοί καρποί	OXI
38	Μπαλτάς Θανάσης	Κεφαλόβρυσο, Αιτ/νίας,	Οκτ-20	Καλαμών	Cu, Insignia	Ωριμοί καρποί	OXI
39	Στεργίου	Κεφαλόβρυσο, Αιτ/νίας,	Οκτ-20	Καλαμών	Cu, Flint max	Ωριμοί κ' πράσινοι καρποί	OXI
40	Νικολόπουλος	Κεφαλόβρυσο, Αιτ/νίας,	Οκτ-20	Καλαμών	Cu	Ωριμοί κ' πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	NAI
41	Αποδεικτικός Αγίου 1	Σελινούντας Αγίου, Αχαρ	Οκτ-20	Κορωνεϊκή	Insignia,Dithane,Cu	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
42	Αποδεικτικός Αγίου 2	Σελινούντας Αγίου, Αχαρ	Οκτ-20	Μαυροελιά	Insignia,Dithane,Cu	Ωριμοί καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
43	Αποδεικτικός Αγίου Μάρτυρας	Σελινούντας Αγίου, Αχαρ	Οκτ-20	Κορωνεϊκή	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI
44	Αγγελής Γιώργος	Μεταμόρφωση,Πύλου,Μ	Νοε-20	Κορωνεϊκή	-	Καρποί προς την ωρίμανση(αλλοιώμενες περιοχές)	OXI



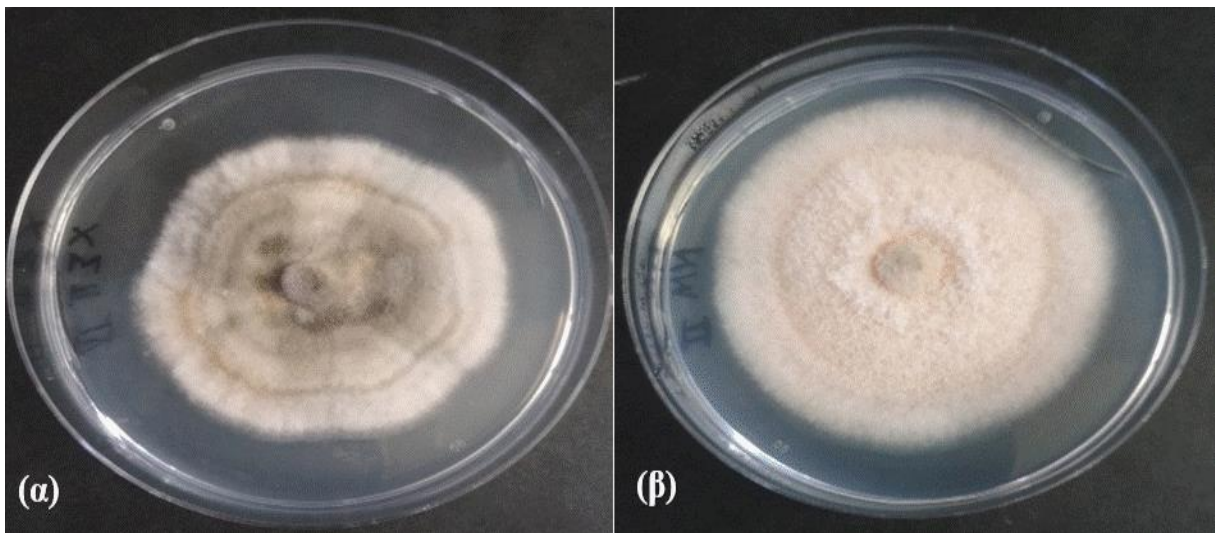
Εικόνα 28: Δείγματα ταξιανθιών, καρπών και βλαστών ελιάς.



Εικόνα 29: Απομονώσεις στελεχών *Colletotrichum* spp. σε DRBC.



Εικόνα 30: Κονίδια *Colletotrichum* spp. σε μικροσκοπική παρατήρηση.



Εικόνα 31: (α) *C. nymphaeae* απομόνωση ΧΣΠ (αρ.20), (β) *C. acutatum* απομόνωση ΝΜ (αρ.26), σε καθαρή καλλιέργεια.

4.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ- ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗ

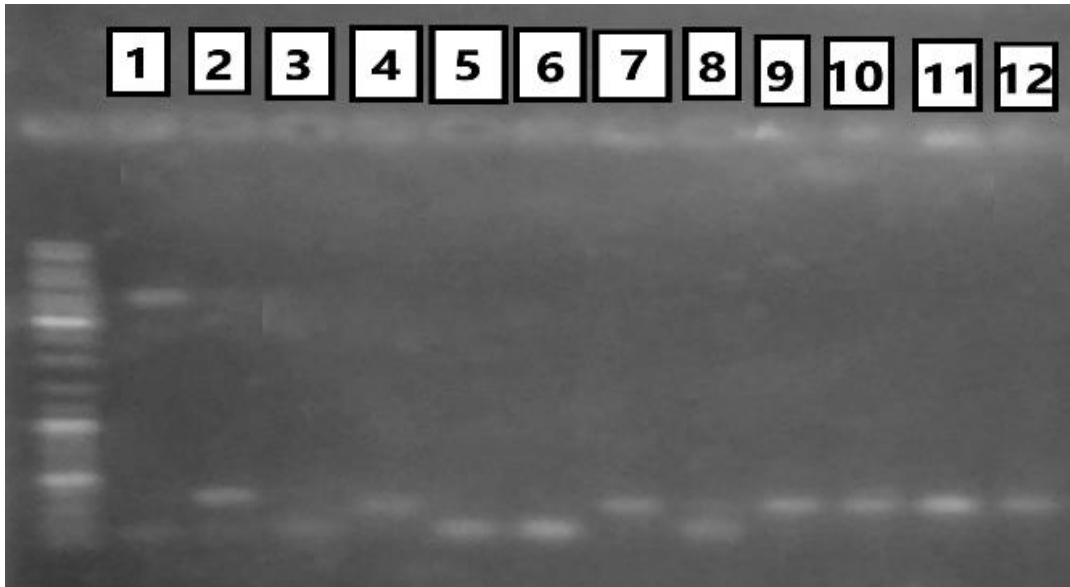
Στον Πίνακα 8 εμφανίζονται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των στελεχών που απομονώθηκαν, από τους φυτικούς ιστούς ελιάς.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα αλληλούχισης των απομονώσεων.

A/A	Απομόνωση	Γονίδιο αλληλούχισης	bp γονιδίου	bp αλληλούχισης	% ταυτοποίηση
1	Εύβοια 6	GAPDH	550	109	<i>Fusarium neocosmosporiellum</i> (84% 54bp) ή <i>Colletotrichum ignotum</i> (79%, 70bp)
2	Μεσκλά 1	GAPDH	550	248	<i>Colletotrichum acutatum</i> (97%, 124bp)
3	Ζυμβράγο 2	GAPDH	550	82	<i>Fusarium neocosmosporiellum</i> (82%, 82bp)
4	Δ6.4	GAPDH	550	238	<i>Colletotrichum acutatum</i> (98%, 221bp)
5	Δ5.1	GAPDH	550	242	<i>Colletotrichum acutatum</i> (98,26%, 221bp)
6	Δ4.3	GAPDH	550	247	<i>Colletotrichum acutatum</i> (98%, 221bp)
7	Ζυμβράγο άνθη	GAPDH	550	315	<i>Colletotrichum coelogyne</i> (84%, 55bp)
8	Ορεινό άνθη	GAPDH	550	92	<i>Fusarium neocosmosporiellum</i> (91%,78bp) ή <i>Fusarium keratoplasticum</i> (89%,91bp)
9	ΧΣΠ	GAPDH	550	246	<i>Colletotrichum nymphaeae</i> (99%, 237bp)
10	NM	GAPDH	550	247	<i>Colletotrichum acutatum</i> (98%, 218bp)
11	C.acutatum	GAPDH	550	240	<i>Colletotrichum acutatum</i> (99%, 227bp)

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 8, η απομόνωση Ζυμβράγο 2 (αρ.3 και αριθμός 6 στον Πίνακα 7) ταυτοποιήθηκε ως *Fusarium neocosmosporiellum* με ποσοστό ταυτοποίησης 82%, σε 82bp. Η απομόνωση Ορεινό άνθη (αρ.8 και αριθμός 17 στον Πίνακα 7) επίσης εμφανίζεται να ανήκει στα παθογόνα του γένους *Fusarium*. Όσον αφορά την απομόνωση Εύβοια 6 (αρ.1 και αριθμός 4 στον Πίνακα 7), εμφανίζεται ταυτοποίηση 84% ως *F. neocosmosporiellum* σε 54bp, αλλά και ταυτοποίηση 79% ως *Colletotrichum ignotum* σε 70bp. Οι απομονώσεις Μεσκλά 1 (αρ.2 και αριθμός 5 στον Πίνακα 7), Δ6.4 (αρ.4 και αριθμός 1 στον Πίνακα 7), Δ5.1 (αρ.5 και αριθμός 2 στον Πίνακα 7), Δ4.3 (αρ.6 και αριθμός 3 στον Πίνακα 7), NM (αρ.10 και αριθμός 40 στον Πίνακα 7) και *C. acutatum*-Στέλεχος αναφοράς (αρ.11) ταυτοποιήθηκαν ως *Colletotrichum acutatum*. Η απομόνωση ΧΣΠ (αρ.9 και αριθμός 31 στον Πίνακα 7) ταυτοποιήθηκε ως *Colletotrichum nymphaeae*. Τέλος, η απομόνωση Ζυμβράγο άνθη (αρ.7 και αριθμός 16 στον Πίνακα 7) ταυτοποιήθηκε ως *Colletotrichum coelogyne*.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 32) φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των στελεχών που είχαν απομονωθεί και εστάλησαν για αλληλούχιση.



Εικόνα 32: Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των στελεχών που απομονώθηκαν από φυτικούς ιστούς ελιάς: (1) Εύβοια 6, (2) Ζυμβράγο άνθη, (3) Ζυμβράγο 2, (4) *C. acutatum*-Στέλεχος αναφοράς, (6) Ορεινό άνθη, (7) Δ6.4, (8) Μεσκλά 1, (9) Χώρα Συγκριτικός Παραγωγού (ΧΣΠ), (10) Δ4.3, (11) Νικολόπουλος Μπελούσι (NM), (12) Δ5.1. Γονίδιο-στόχο αποτελούσε το γονίδιο GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι **GDF1** (GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA) και **GDR1** (GGGTGGAGTCGTACTIONTGGAGCATGT). Το προϊόν ενίσχυσης ήταν 550bp.

4.3 ΤΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ *COLLETOTRICHUM ACUTATUM* ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΕ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ RT-PCR ΤΑQΜΑΝ PROBE ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΕΛΙΑΣ

Παρακάτω αναφέρονται τα αποτελέσματα των αντιδράσεων RT-PCR TaqMan probe, για την ανίχνευση του παθογόνου μύκητα *C. acutatum* σε δείγματα ταξιανθιών (Πίνακας 9) και καρπών ελιάς (Πίνακας 10).

Η αντίδραση χαρακτηρίζεται επιτυχής, βάσει της ανίχνευσης του μύκητα στον θετικό μάρτυρα (γενωμικό DNA του *C. acutatum*, αρ.10 Πίνακας 9) και της μη ανίχνευσης στον αρνητικό μάρτυρα (γενωμικό DNA του *B. dothidea*, αρ. 14 Πίνακας 9). Στην στήλη C_T αναφέρεται ο κύκλος ανίχνευσης του παθογόνου μύκητα *C. acutatum*, σε δείγματα ταξιανθιών ελιάς από περιοχές της Κρήτης. Ο μύκητας ανιχνεύθηκε στα δείγματα από τα Λουτρά Ρεθύμνου (αρ.1 και αρ.7 στον Πίνακα 7), τον Αγ. Μύρωνα Ηρακλείου (αρ. 3 και αρ.11 στον Πίνακα 7), το Άδελε Ρεθύμνου (αρ. 4 και αρ.8 στον Πίνακα 7), το Ζυμβραγό Χανίων (αρ. 9 και αρ.16 στον Πίνακα 7), τον Βιάννο Ηρακλείου (αρ. 11 και αρ.12 στον Πίνακα 7) και το Ορεινό Λασιθίου (αρ. 13 και αρ.17 στον Πίνακα 7).

Πίνακας 9: Αποτελέσματα RT-PCR TaqMan probe σε δείγματα ταξιανθιών ελιάς από ελαιοπαραγωγικές περιοχές της Κρήτης. Στην στήλη NAME αναφέρεται η περιοχή προέλευσης του δείγματος. Στην στήλη C_T αναφέρεται ο κύκλος ανίχνευσης του παθογόνου. Με κόκκινα γράμματα είναι σημειωμένα τα δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε απομόνωση του παθογόνου, σε θρεπτικό υλικό.

A/A	Well	Sample Name	NAME	ΑΠΟΜ. ΣΕ ΥΛΙΚΟ	Target Name	Task	Reporter	Quencher	C _T
1	A1	Sample 1	ΛΟΥΤΡΑ	OXI	Target 1	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	34,25730133
2	A2	Sample 9	ΚΡΟΥΣΩΝΑΣ	OXI	Target 1	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined
3	B1	Sample 2	ΑΓ. ΜΥΡΩΝΑΣ	OXI	Target 1	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32,1917038
4	B2	Sample 10	ΑΔΕΛΕ	OXI	Target 1	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	34,19158936
5	C1	Sample 3	ΡΟΥΜΑΤΑ	OXI	Target 1	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined
6	C2	Sample 11	ΕΠΙΣΚΟΠΗ	OXI	Target 1	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined
7	D1	Sample 4	ΠΕΡΒΟΛΙΑ	OXI	Target 1	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined
8	E1	Sample 5	ΜΕΣΚΛΑ	OXI	Target 1	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined
9	F1	Sample 6	ΖΥΜΒΡΑΓΟ	NAI	Target 1	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32,40530014
10	F2	Sample 12	C. acutatum		Target 1	NTC	FAM	NFQ-MGB	15,60630989
11	G1	Sample 7	ΒΙΑΝΝΟΣ	OXI	Target 1	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32,17700577
12	G2		NTC1		Target 1	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined
13	H1	Sample 8	ΟΡΕΙΝΟ	NAI	Target 1	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	34,83895111
14	D2	Sample 13	Botryosphaeria d.			UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	Undetermined

Από τα αποτελέσματα της μοριακής μεθόδου RT-PCR TaqMan probe φαίνεται ότι ο μύκητας *C. acutatum* είναι το κυρίαρχο είδος, καθώς ανιχνεύθηκε σε 5 δείγματα, ενισχύοντας προηγούμενες μελέτες που καταδεικνύουν το συγκεκριμένο είδος ως κυρίαρχο, στην Ελλάδα (Iiadi M. et al., 2018, Kolainis S. et al., 2020). Επίσης, η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε κατά το στάδιο της άνθησης, πράγμα πολύ σημαντικό για την γνώση της επιδημιολογίας του μύκητα, αλλά και για το επίκαιρο των επεμβάσεων, στον αγρό. Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί ότι σε 2 δείγματα (Ζυμβραγό, Χανίων, αρ. 9 και Ορεινό, Λασιθίου, αρ.13) από τα 6 δείγματα, στα οποία ανιχνεύθηκε ο μύκητας με την μοριακή μέθοδο, πραγματοποιήθηκε απομόνωση *Colletotrichum* spp. σε θρεπτικό υλικό (Πίνακας 9). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την ευαισθησία και την αξιοπιστία της μοριακής αυτής μεθόδου, καθώς και την υπεροχή της έναντι των κλασσικών, πάνω στην ανίχνευση και διάγνωση των παθογόνων.

Σε άλλη δοκιμή ανίχνευσης, του παθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* με την μέθοδο RT-PCR TaqMan probe, που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα καρπών ελιάς, που βρίσκονταν σε διάφορα στάδια ανάπτυξης (καρποί πριν τη σκλήρυνση του πυρήνα, ώριμοι καρποί). Η προέλευση των δειγμάτων ήταν από ελαιοπαραγωγικές περιοχές των νομών Μεσσηνίας, Αιτωλοακαρνανίας και Αχαΐας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Αποτελέσματα RT-PCR TaqMan probe σε δείγματα καρπών ελιάς από ελαιοπαραγωγικές περιοχές των νομών Μεσσηνίας, Αιτωλοακαρνανίας και Αχαΐας. Στην στήλη TaqMan probe είναι σημειωμένα με κόκκινο τα δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε ανίχνευση του παθογόνου. Στην στήλη C_T αναφέρεται ο κύκλος ανίχνευσης. Στην στήλη «Απομ. Σε Υλικό», είναι σημειωμένα με κόκκινα γράμματα τα δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε και απομόνωση σε θρεπτικό υλικό.

A/A	Όνομα δείγματος	Προέλευση δείγματος	Ημερο	Ποικιλία	Επεμβάσεις	Φυτικός ιστός	Απομ. σε Υλικό	TaqMan probe	C _T
1	Δείγμα 1	Βλαχόπουλο, Μεσσηνίας	Ιούν-20	-	-	Μαύρα καρπίδια	ΌΧΙ	+	32,1273
2	Δείγμα 2	Βλαχόπουλο, Μεσσηνίας	Ιούν-20	-	-	Μαύρα καρπίδια	ΌΧΙ	-	
3	Δείγμα 3	Βλαχόπουλο, Μεσσηνίας	Ιούν-20	-	-	Μαύρα καρπίδια	ΌΧΙ	+	31,8317
4	Δείγμα 4	Χώρα, Μεσσηνίας	Ιούν-20	-	-	Πράσινα καρπίδια	ΌΧΙ	-	
5	Δείγμα 5	Δ. Σέρβης	Ιούν-20	-	-	Πράσινα καρπίδια	ΌΧΙ	-	
6	Λινάρδος	Κουκουνάρα, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	-	
7	Ρίζος	Κουκουνάρα, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	-	
8	Ζωντανός Γ., Μάρτυρας	Κουκουνάρα, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	-	
9	Αποδεικτικός BASF	Κυπαρισσία, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	+	19,7069
10	Συγκριτικός Παραγωγού	Κυπαρισσία, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	-	
11	Καράμπελας Κώστας	Ίκλαινα, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	-	
12	Αποδεικτικός BASF	Ίκλαινα, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	+	25,4303
13	Αποδεικτικός BASF	Χώρα, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	-	
14	Συγκριτικός Παραγωγού	Χώρα, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	NAI	+	36,4369
15	Αποδεικτικός BASF, Μάρτι	Χώρα, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	-	
16	Συγκριτικός Παραγωγού	Βλαχόπουλο, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	-	
17	Ζωντανός Γιάννης	Βλαχόπουλο, Μεσσηνίας, (Δενδρ	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	+	20,218
18	Αποδεικτικός BASF	Βλαχόπουλο, Μεσσηνίας	Οκτ-20	-	-	Πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	-	
19	Συγκριτικός Παραγωγού	Μεσολόγγι, Αιτωλοακαρνανίας	Οκτ-20	-	-	Ώριμοι καρποί	ΌΧΙ	-	
20	Αποδεικτικός BASF	Μεσολόγγι, Αιτωλοακαρνανίας	Οκτ-20	-	-	Ώριμοι καρποί	ΌΧΙ	-	
21	Μπαλτάς Θανάσης	Κεφαλόβρυσο, Αιτίνιας, (Κλεισούη	Οκτ-20	Καλαμών	Cu, Insignia	Ώριμοι καρποί	ΌΧΙ	-	
22	Στεργίου	Κεφαλόβρυσο, Αιτίνιας, (Μαγούλι	Οκτ-20	Καλαμών	Cu, Flint max	Ώριμοι κ' πράσινοι καρποί	ΌΧΙ	-	
23	Νικολόπουλος	Κεφαλόβρυσο, Αιτίνιας, (Μπελού	Οκτ-20	Καλαμών	Cu	Ώριμοι κ' πράσινοι καρποί(αλλοιώμενες περιοχές)	NAI	+	33,1594
24	Αποδεικτικός Αγίου 1	Σελινόυτας Αγίου, Αχαΐα	Οκτ-20	Κορωνεϊκή	Insignia, Dithane, Cu	Πράσινοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	-	
25	Αποδεικτικός Αγίου 2	Σελινόυτας Αγίου, Αχαΐα	Οκτ-20	Μαυροελιά	Insignia, Dithane, Cu	Ώριμοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	-	
26	Αποδεικτικός Αγίου Μάρτι	Σελινόυτας Αγίου, Αχαΐα	Οκτ-20	Κορωνεϊκή	-	Πράσινοι καρποί (αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	-	
27	Αγγελής Γιώργος	Μεταμόρφωση, Πύλου, Μεσσηνία	Νοε-20	Κορωνεϊκή	-	Καρποί προς την ωρίμανση(αλλοιώμενες περιοχές)	ΌΧΙ	-	

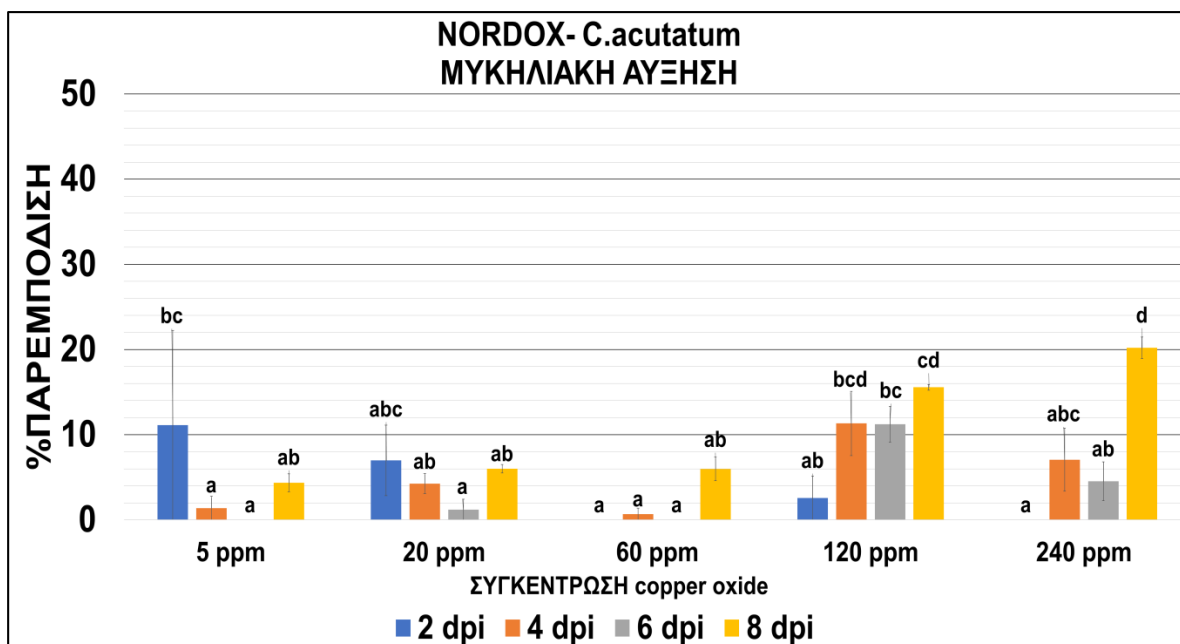
Από τα αποτελέσματα της αντίδρασης, που καταγράφονται στον Πίνακα 10, φαίνεται ότι υπάρχει ανίχνευση του παθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* σε 7 από τα δείγματα καρπών ελιάς. Η ανίχνευση αφορά δείγματα από το Βλαχόπουλο Μεσσηνίας (αρ. 1, 3, 17 και αρ. 18, 20, 34 αντίστοιχα στον Πίνακα 7) Κυπαρισσία Μεσσηνίας (αρ. 9 και αρ. 26 στον Πίνακα 7), Ίκλαινα Μεσσηνίας (αρ. 12 και αρ. 29 στον Πίνακα 7), Χώρα Μεσσηνίας (αρ. 14 και αρ. 31 στον Πίνακα 7) και από το Κεφαλόβρυσο Αιτωλ/νίας (αρ. 23 και αρ. 40 στον Πίνακα 7), φανερώνοντας την εξάπλωση της ασθένειας σε τοπικό αλλά και σε Πανελλαδικό επίπεδο. Η ανίχνευση και ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του καρπού, γεγονός πολύ σημαντικό για τη γνώση της επιδημιολογίας του μύκητα, όπως και για το σχεδιασμό της στρατηγικής αντιμετώπισης του, στον αγρό. Τέλος, σε μόλις 2, από τα 7 δείγματα στα οποία ταυτοποιήθηκε ο μύκητας με την μοριακή μέθοδο, είχαμε απομόνωση του παθογόνου σε θρεπτικό υλικό. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την ευαισθησία της

μεθόδου αλλά και την χρησιμότητα της, για την έγκυρη διάγνωση και αντιμετώπιση της ασθένειας.

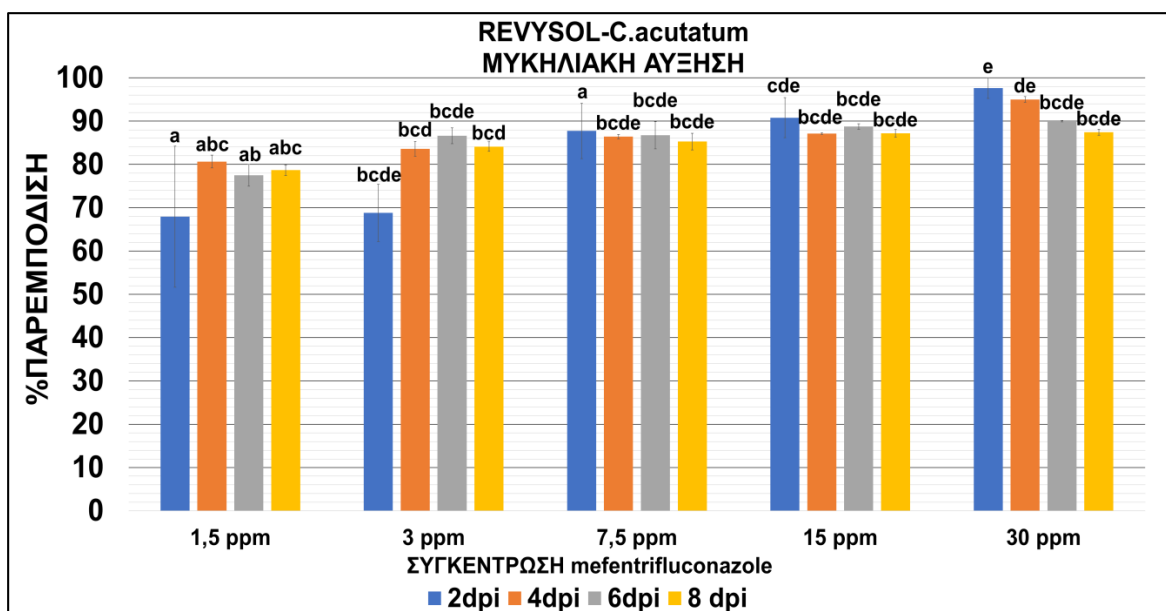
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ *IN VITRO* ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ENANTIION ΜΥΚΗΤΩΝ *COLLETOTRICHUM SPP.*

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης αξιολογήθηκε η μυκητοτοξική δράση των δραστικών ουσιών pyraclostrobin (στρομπιλουρίνη, παρεμποδιστής αναπνοής με εμπορικό όνομα σκευάσματος Insignia) και mefentrifluconazole (τριαζόλη, παρεμποδιστής βιοσύνθεσης εργοστερόλης με εμπορικό όνομα σκευάσματος Revyona και εμπορικό όνομα δραστικής ουσίας Revysol). Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά σκευάσματα Insignia® 20 WG (20% pyraclostrobin β/β) και Revyona (7,5 % revysol β/ο). Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το χαλκούχο σκευάσμα Nordox 75 WG (75% β/β).

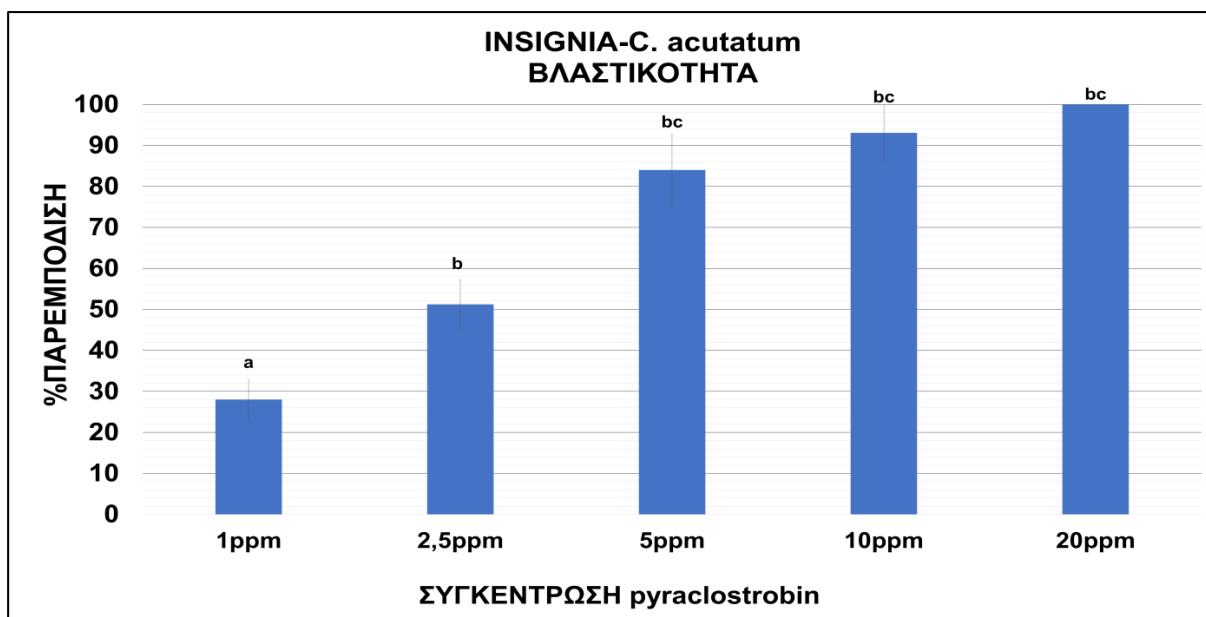
Για τα παραπάνω χημικά σκευάσματα έγιναν δοκιμές στις παρακάτω συγκεντρώσεις δραστικών ουσιών: Nordox® (5 ppm, 20 ppm, 60 ppm, 120 ppm, 240 ppm), Insignia® (1 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 10ppm, 20ppm), Revyona® (1,5 ppm, 3ppm, 7,5 ppm, 15 ppm, 30 ppm) για να αξιολογηθεί η δυνατότητα των σκευασμάτων να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των μυκήτων *Colletotrichum spp.* Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν απομονωθεί από δείγματα φυτικού ιστού ελιάς και αποτελούν μέρος της συλλογής Εργ. Φυτοπαθολογίας. Τα στελέχη αυτά ήταν: Ζυμβραγό άνθη (αρ.16 στον Πίνακα 7), Εύβοια 6 (αρ.4 στον Πίνακα 7), Ζυμβραγό 2 (αρ.6 στον Πίνακα 7), Στέλεχος Δ5.1 (αρ.2 στον Πίνακα7), Ορεινό άνθη (αρ.17 στον Πίνακα 7), Στέλεχος Δ6.4 (αρ.1 στον Πίνακα 7), Μεσκλά 1 (αρ.5 στον Πίνακα 7). Επιπρόσθετα, ως στέλεχος αναφοράς αποτέλεσε σε όλα τα πειράματα ο μύκητας *C. acutatum*- Στέλεχος αναφοράς, που ανήκει και αυτός στη συλλογή του Εργ. Φυτοπαθολογίας. Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα των αποτελεσμάτων και αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες της δοκιμής.



Διαγ.1: Αξιολόγηση της δ.ο. copper oxide στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου του στελέχους αναφοράς *C. acutatum*, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.

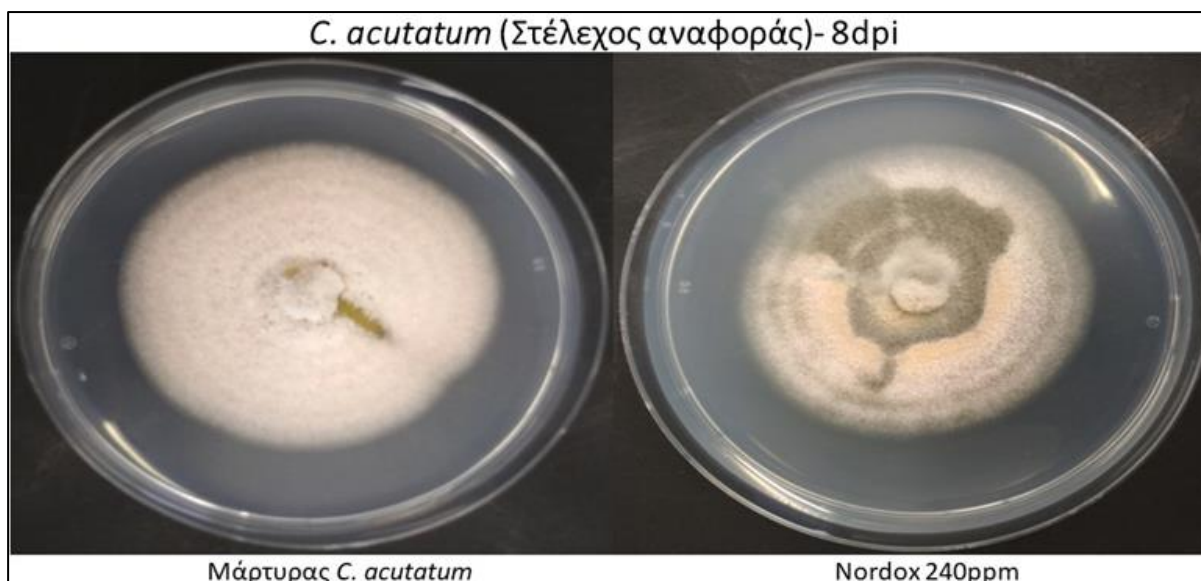


Διαγ.2: Αξιολόγηση της δ.ο. mefentrifluconazole στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου του στελέχους αναφοράς *C. acutatum*, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.



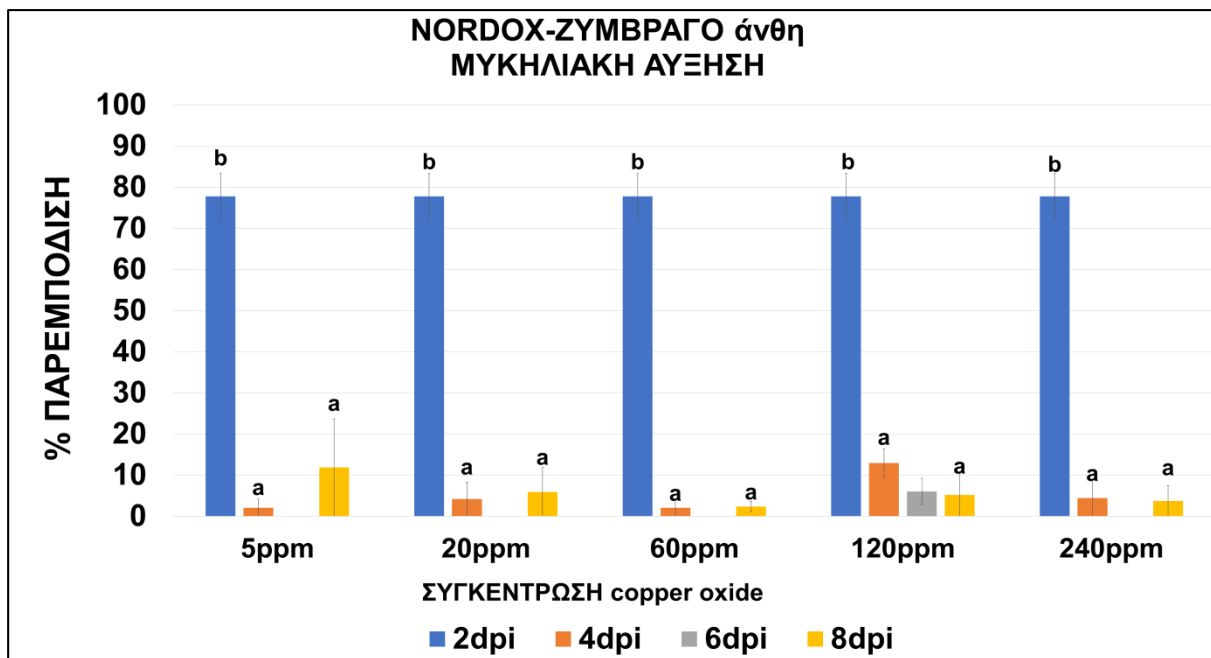
Διαγ.3: Αξιολόγηση του εμπορικού σκευάσματος Insignia (δ.ο. pyraclostrobin) στην παρεμπόδιση βλάστησης κονιδίων του στελέχους αναφοράς *C. acutatum* σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 18 h μετά την τεχνητή μόλυνση. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.

Στα Διαγράμματα 1-2 φαίνεται πως το αποτελεσματικότερο χημικό σκεύασμα, ως προς την παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης, είναι το Revyona (δ.ο. mefentrifluconazole, εμπορικό όνομα Revysol), καθώς επέφερε παρεμπόδιση έως και 88% στις 8 dpi. Στο Διάγραμμα 3 φαίνεται ότι το χημικό σκεύασμα Insignia (δ.ο. pyraclostrobin) παρουσιάστηκε πάρα πολύ αποτελεσματικό, ως προς την παρεμπόδιση βλάστησης κονιδίων, καθώς επέφερε παρεμπόδιση έως και 100%, την 18 h μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το χαλκούχο σκεύασμα Nordox (δ.ο. copper oxide) παρουσίασε χαμηλά ποσοστά παρεμπόδισης, τόσο στις χαμηλότερες (4% στις 8dpi στα 5 ppm), αλλά και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (20% στις 8dpi στα 240 ppm) δραστικής ουσίας (Εικόνα 33, Διάγραμμα 1).

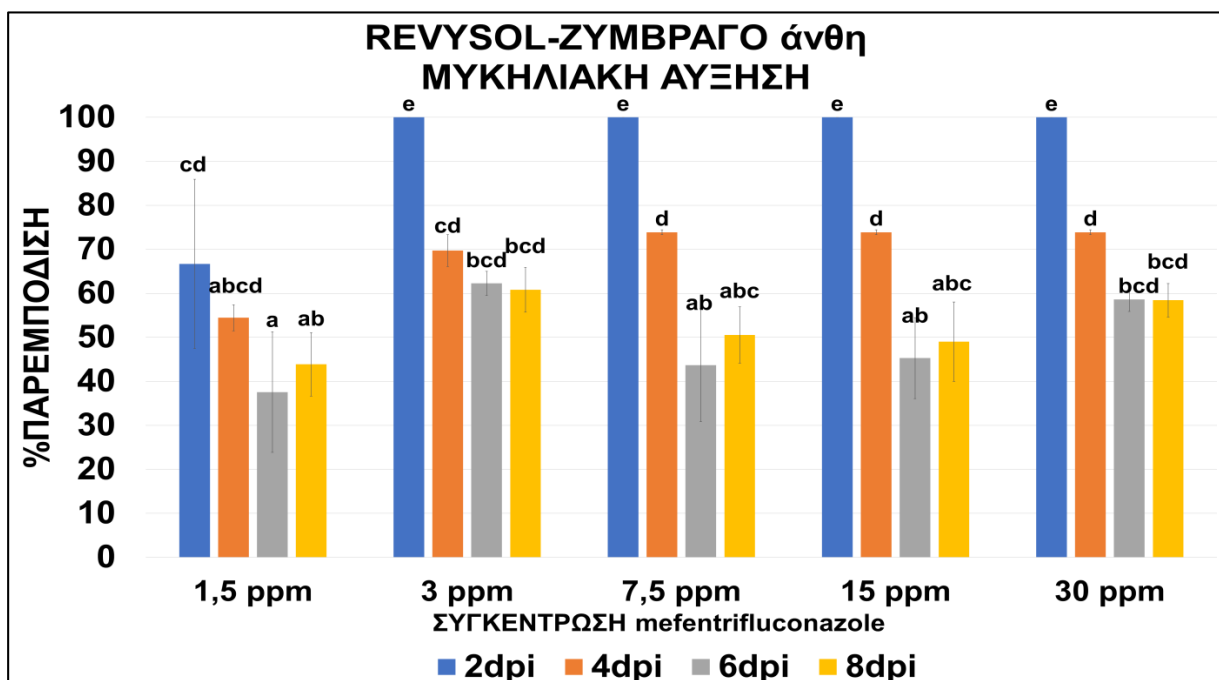


Εικόνα 33: Αποτελέσματα παρεμπόδισης μυκηλιακής ανάπτυξης του στελέχους αναφοράς *C. acutatum* σε θρεπτικό υλικό PDA, που περιείχε Nordox 240 ppm, σε σύγκριση με το μάρτυρα μετά από 8 μέρες ανάπτυξης στους 28°C.

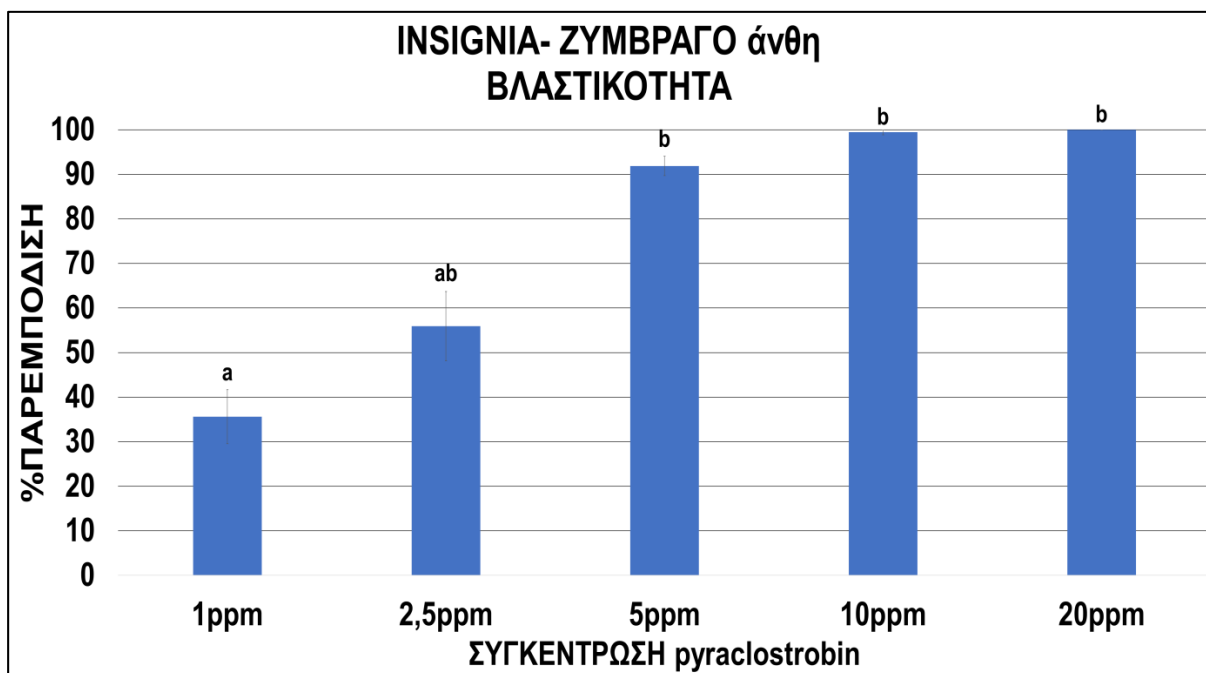
Στα παρακάτω Διαγράμματα (Διαγράμματα 4-5) φαίνεται πως το αποτελεσματικότερο σκεύασμα, ως προς την παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης, είναι το Revyona (δ.ο. mefentrifluconazole, εμπορικό όνομα Revysol), επιφέροντας μέτρια παρεμπόδιση έως και 58% στις 8 dpi (Εικόνα 34). Το χαλκούχο σκεύασμα Nordox (δ.ο. copper oxide) παρουσίασε κάποια αποτελεσματικότητα μόνο κατά την 2 dpi (κοντά στο 80%) όμως τις υπόλοιπες μέρες των μετρήσεων κινήθηκε σε πολύ χαμηλά ποσοστά παρεμπόδισης (12-4%). Στην Εικόνα 34 απεικονίζεται η παρεμπόδιση που ασκούν τα δύο χημικά σκευάσματα, σε σχέση με τον μάρτυρα, στις 8 dpi. Στο Διάγραμμα 6 φαίνεται ότι το χημικό σκεύασμα Insignia (δ.ο. pyraclostrobin) παρουσιάστηκε πάρα πολύ αποτελεσματικό, ως προς την παρεμπόδιση βλάστησης κονιδίων, καθώς επέφερε παρεμπόδιση έως και 100%, την 18 h μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων, στην απομόνωση Ζυβράγο-άνθη.



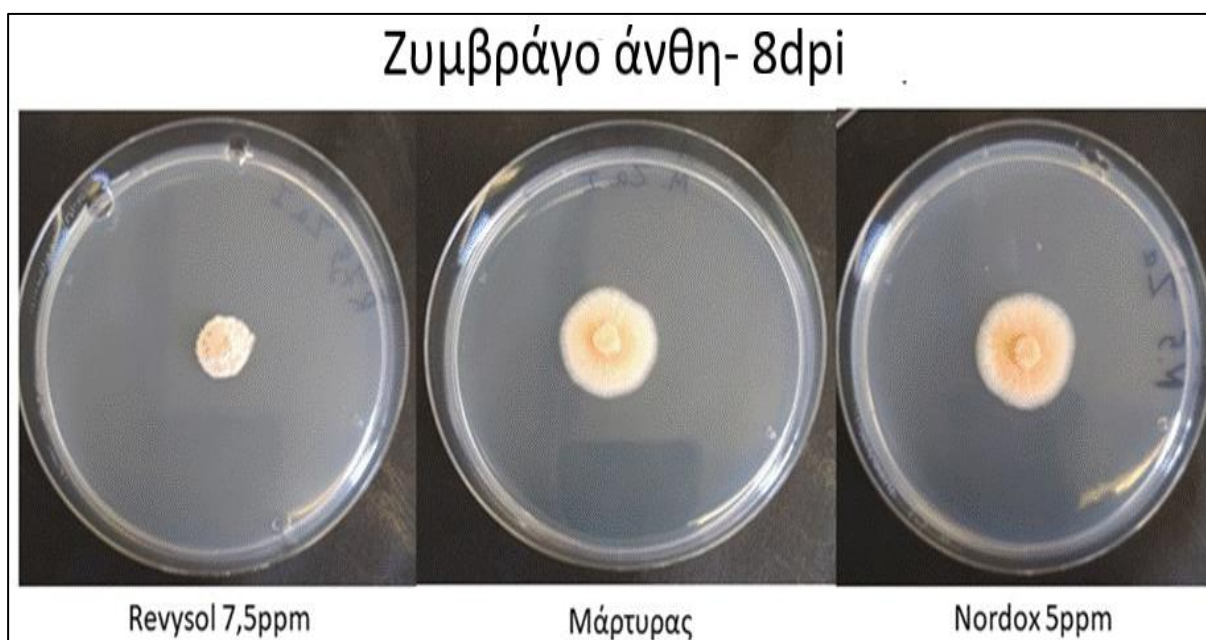
Διαγ.4: Αξιολόγηση της δ.ο. copper oxide στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου της απομόνωσης Ζυμβράγο άνθη, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.



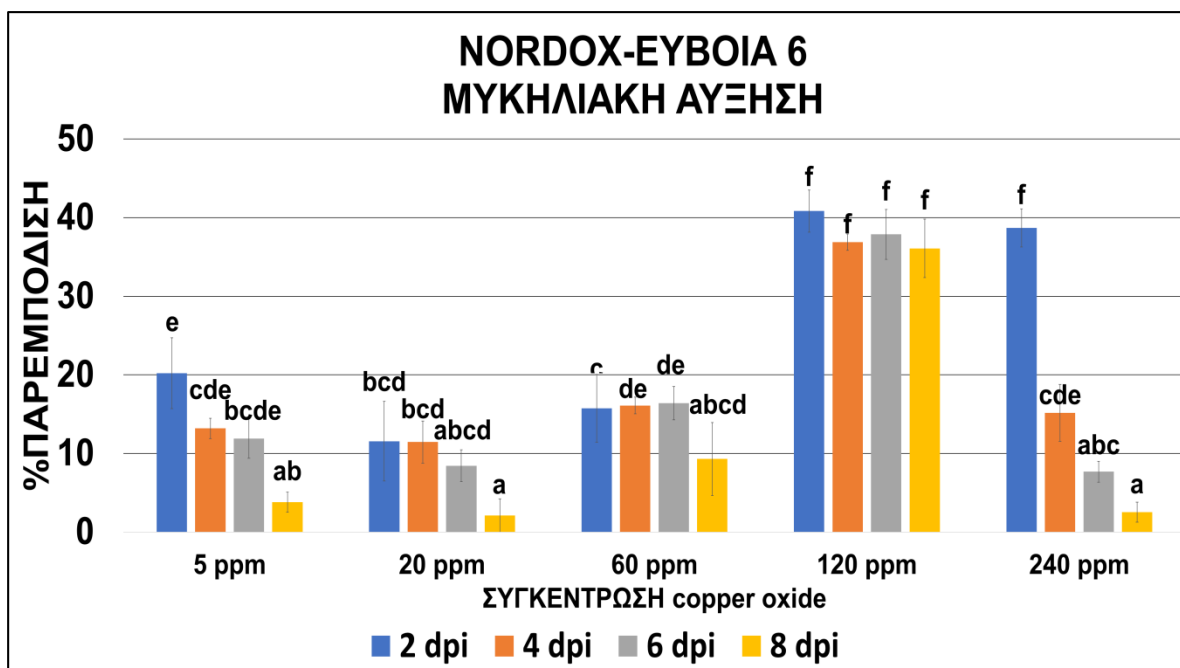
Διαγ.5: Αξιολόγηση της δ.ο. mefentrifluconazole στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου της απομόνωσης Ζυμβράγο άνθη, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.



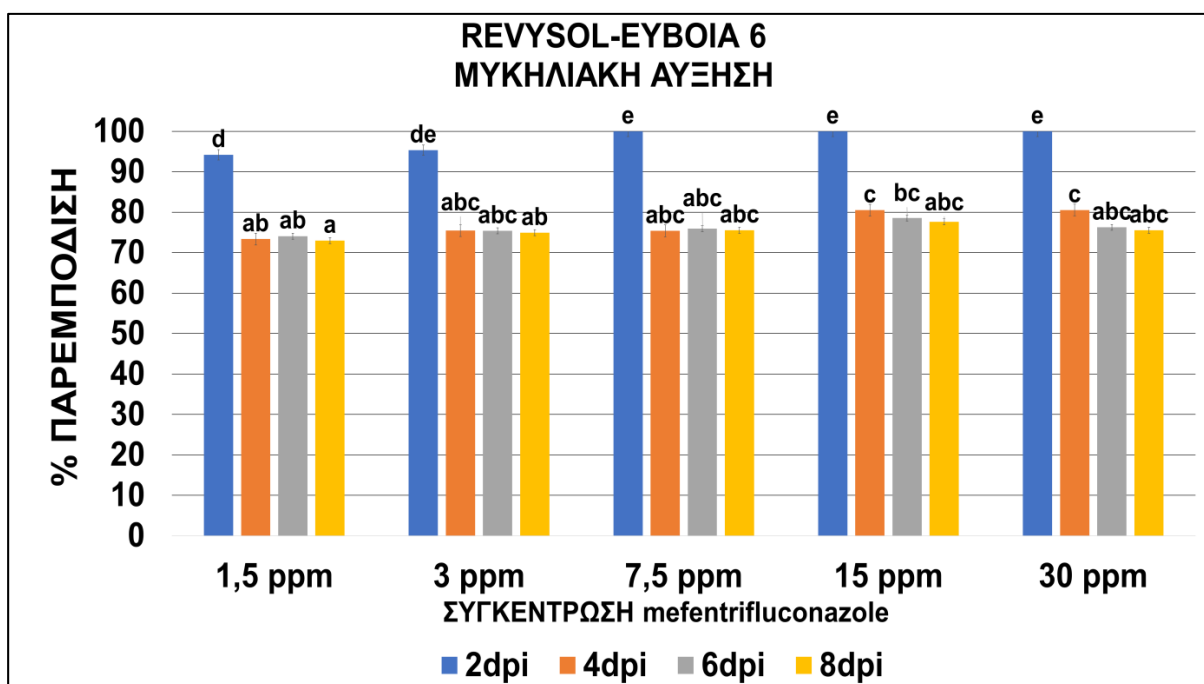
Διαγ.6: Αξιολόγηση της δ.ο. pyraclostrobin στην παρεμπόδιση βλάστησης κονιδίων της απομόνωσης Ζυμβράγο άνθη σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 18h μετά την τεχνητή μόλυνση. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.



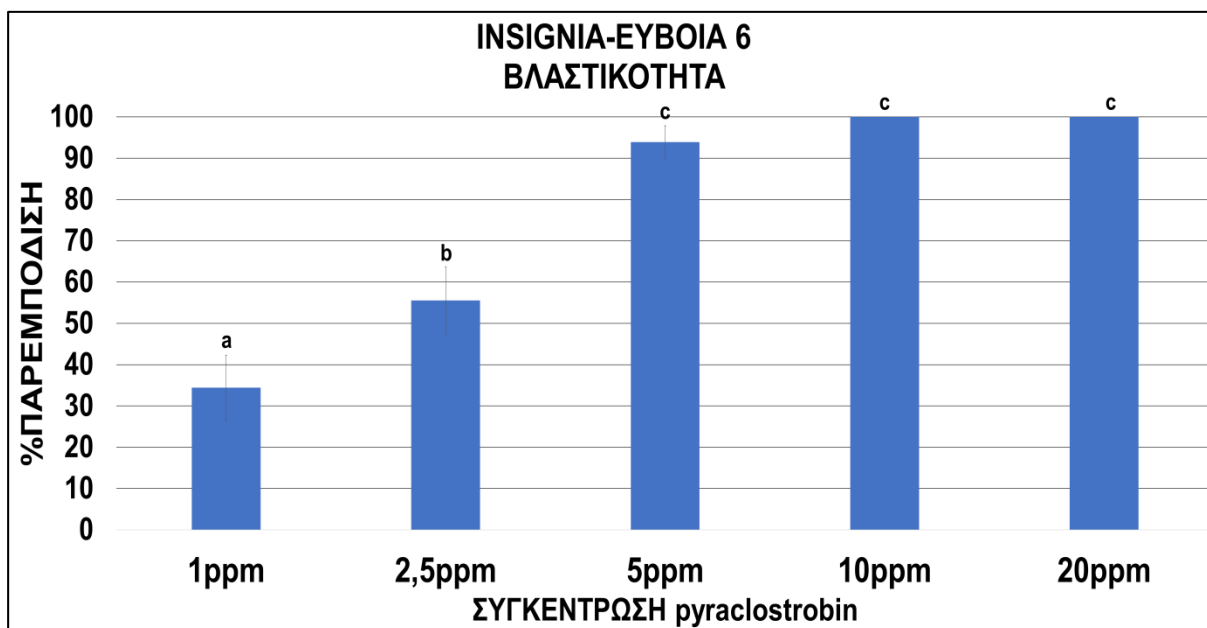
Εικόνα 34: Παρεμπόδιση ανάπτυξης της απομόνωσης Ζυμβράγο άνθη σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, 8 μέρες μετά την μόλυνση. Από αριστερά: Revysol 7,5ppm, Μάρτυρας Ζυμβράγο άνθη, Nordox 5ppm, αντίστοιχα.



Διαγ.7: Αξιολόγηση της δ.ο. copper oxide στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου της απομόνωσης Εύβοια 6, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσω με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.



Διαγ.8: Αξιολόγηση της δ.ο. mefentrifluconazole στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου της απομόνωσης Εύβοια 6, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσω με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.

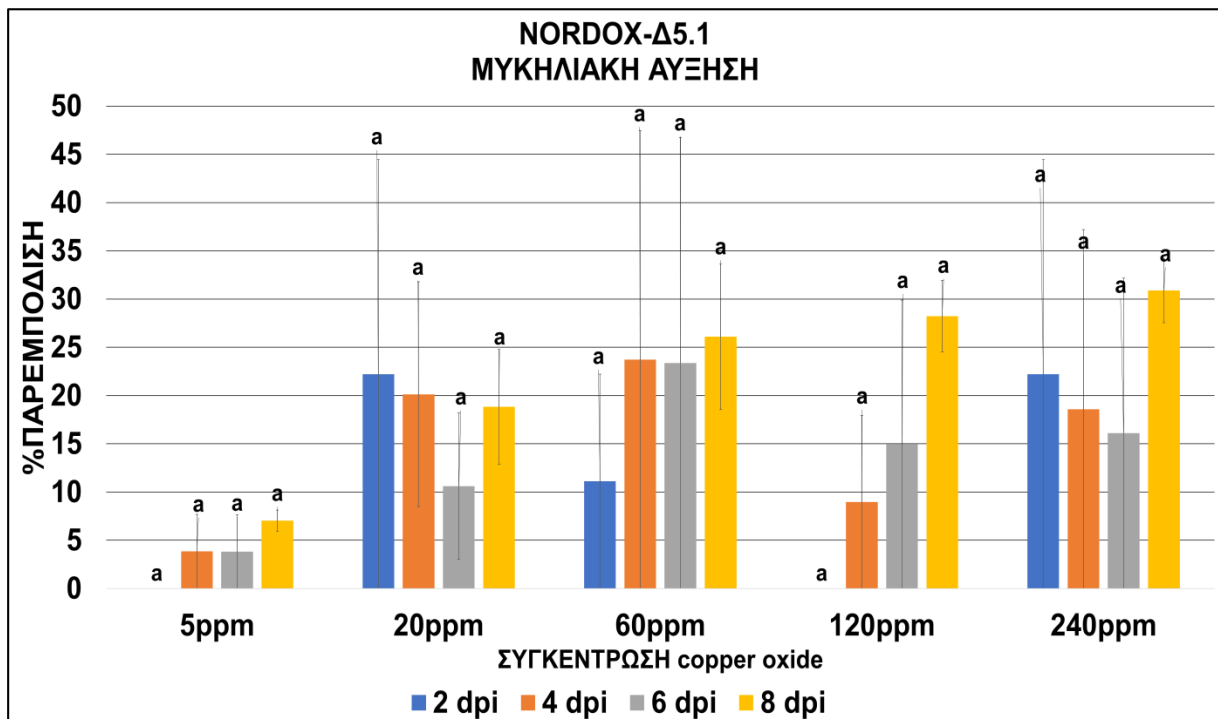


Διαγ.9: Αξιολόγηση της δ.ο. pyraclostrobin στην παρεμπόδιση βλάστησης κονιδίων της απομόνωσης Εύβοια 6 σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 18h μετά την τεχνητή μόλυνση. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.

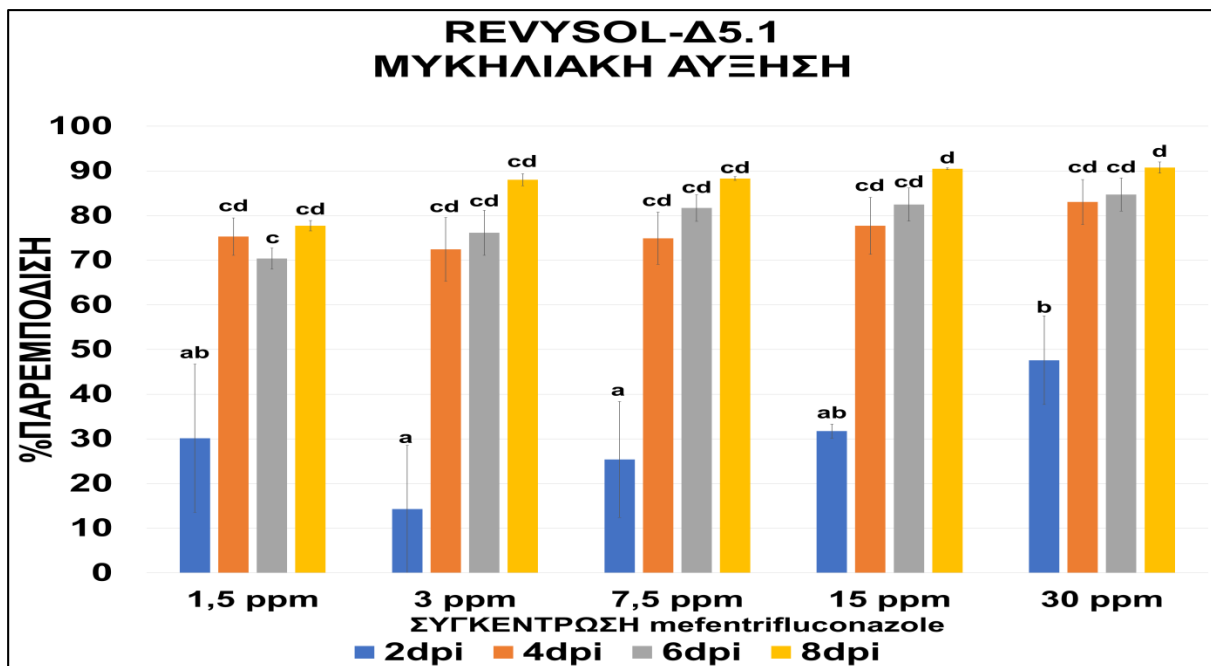
Στα Διαγράμματα 7 και 8 φαίνεται πως το αποτελεσματικότερο σκεύασμα, ως προς την παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης, είναι το Revyona (δ.ο. mefentrifluconazole, εμπορικό όνομα Revysol), επιφέροντας παρεμπόδιση 100% στις 2dpi έως 75% στις 8dpi, στα 30 ppm. Το χαλκούχο σκεύασμα Nordox (δ.ο. copper oxide) παρουσίασε χαμηλή αποτελεσματικότητα. Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζονται στην Εικόνα 35, όπου φαίνεται η υψηλή παρεμπόδιση που ασκεί το χημικό σκεύασμα Revyona, έναντι της χαμύλης του Nordox, σε σχέση με τον μάρτυρα. Στο Διάγραμμα 9 φαίνεται ότι το χημικό σκεύασμα Insignia (δ.ο. pyraclostrobin) παρουσιάστηκε πάρα πολύ αποτελεσματικό, ως προς την παρεμπόδιση βλάστησης κονιδίων, καθώς επέφερε παρεμπόδιση έως και 100%, την 18 h μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων, στην απομόνωση Εύβοια 6.



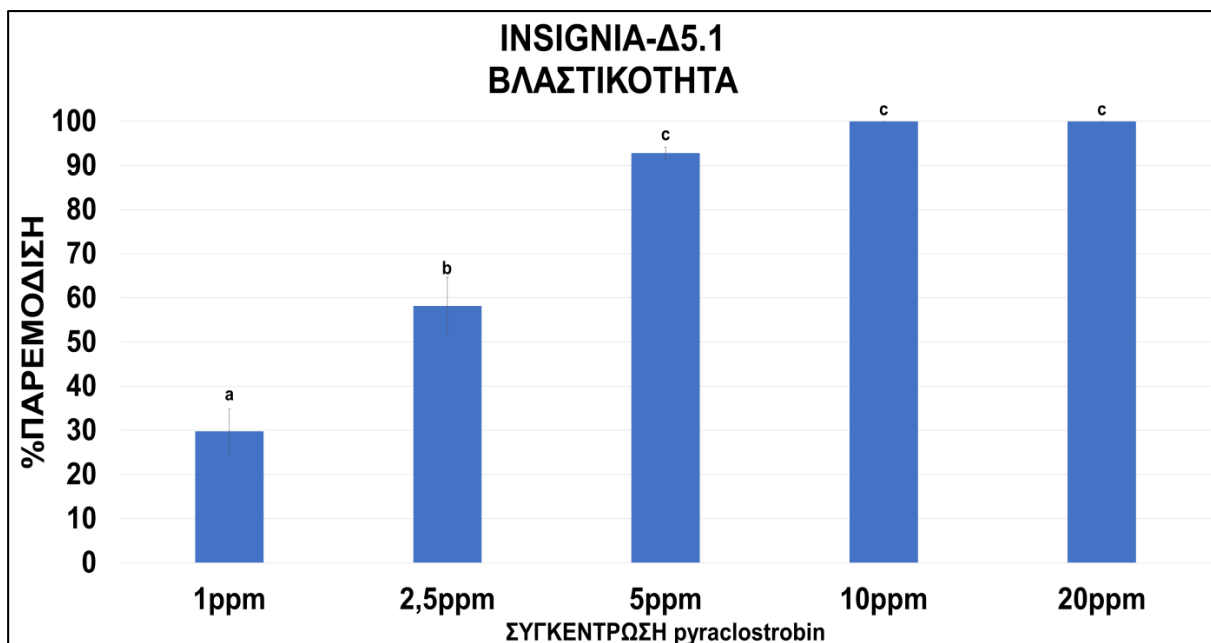
Εικόνα 35: Παρεμπόδιση ανάπτυξης της απομόνωσης Εύβοια 6 μετά από 8 μέρες ανάπτυξης σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA που περιείχε (από αριστερά), Revysol 1,5ppm, Μάρτυρας Εύβοια 6, Nordox 120ppm, αντίστοιχα.



Διαγ.10: Αξιολόγηση της δ.ο. copper oxide στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου του μύκητα *C. acutatum*- Δ5.1, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.



Διαγ.11: Αξιολόγηση της δ.ο. mefentrifluconazole στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου του μύκητα *C. acutatum*- Δ5.1, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.

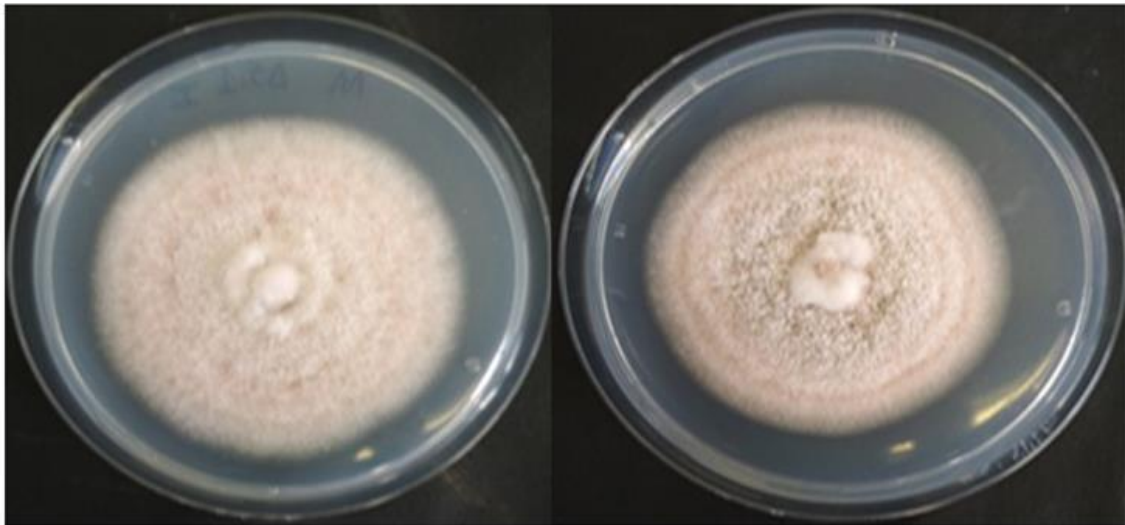


Διαγ.12: Αξιολόγηση της δ.ο. pyraclostrobin στην παρεμπόδιση βλάστησης κονιδίων του μύκητα *C. acutatum*- Δ5.1 σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 18h μετά την τεχνητή μόλυνση. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε

διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.

Στα Διαγράμματα 10 και 11 φαίνεται πως το αποτελεσματικότερο σκεύασμα, ως προς την παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης, είναι το Revyona (δ.ο. mefentrifluconazole, εμπορικό όνομα Revysol), επιφέροντας παρεμπόδιση της τάξης του 85%, ήδη από τη χαμηλότερη συγκέντρωση των 3 ppm. Το χαλκούχο σκεύασμα Nordox (δ.ο. copper oxide), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 36, παρουσίασε χαμηλή αποτελεσματικότητα. Στο Διάγραμμα 12 φαίνεται ότι το χημικό σκεύασμα Insignia (δ.ο. pyraclostrobin) παρουσιάστηκε πάρα πολύ αποτελεσματικό, καθώς επέφερε παρεμπόδιση στην βλάστηση των κονιδίων >90% και ήδη από τη συγκέντρωση των 10 ppm, 18 h μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων, στην απομόνωση Δ5.1.

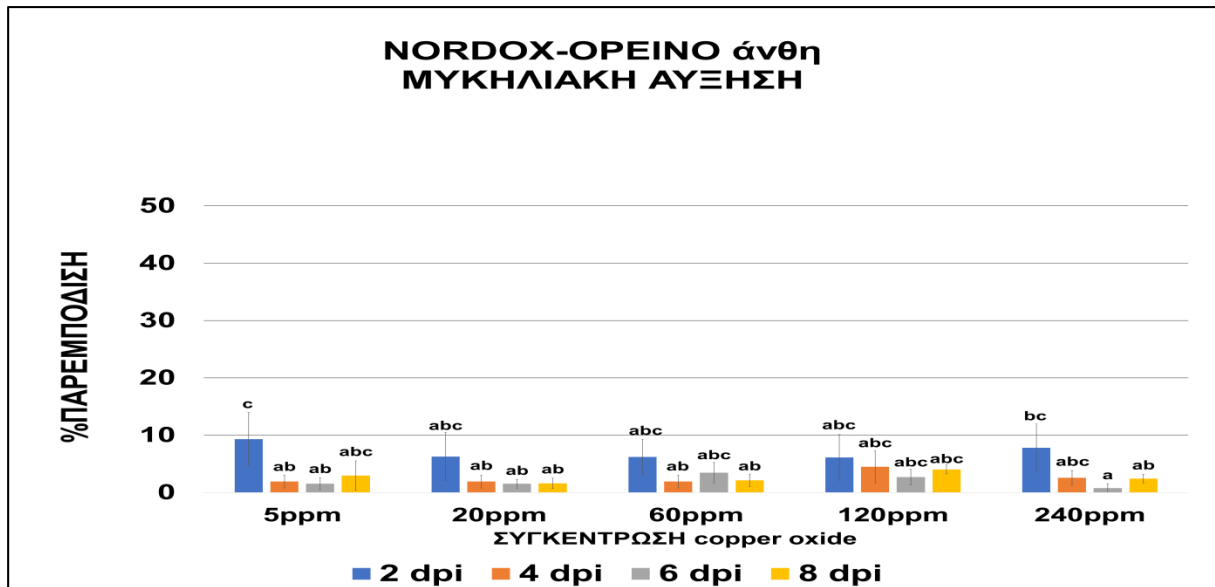
C.acutatum-Δ5.1-8dpi



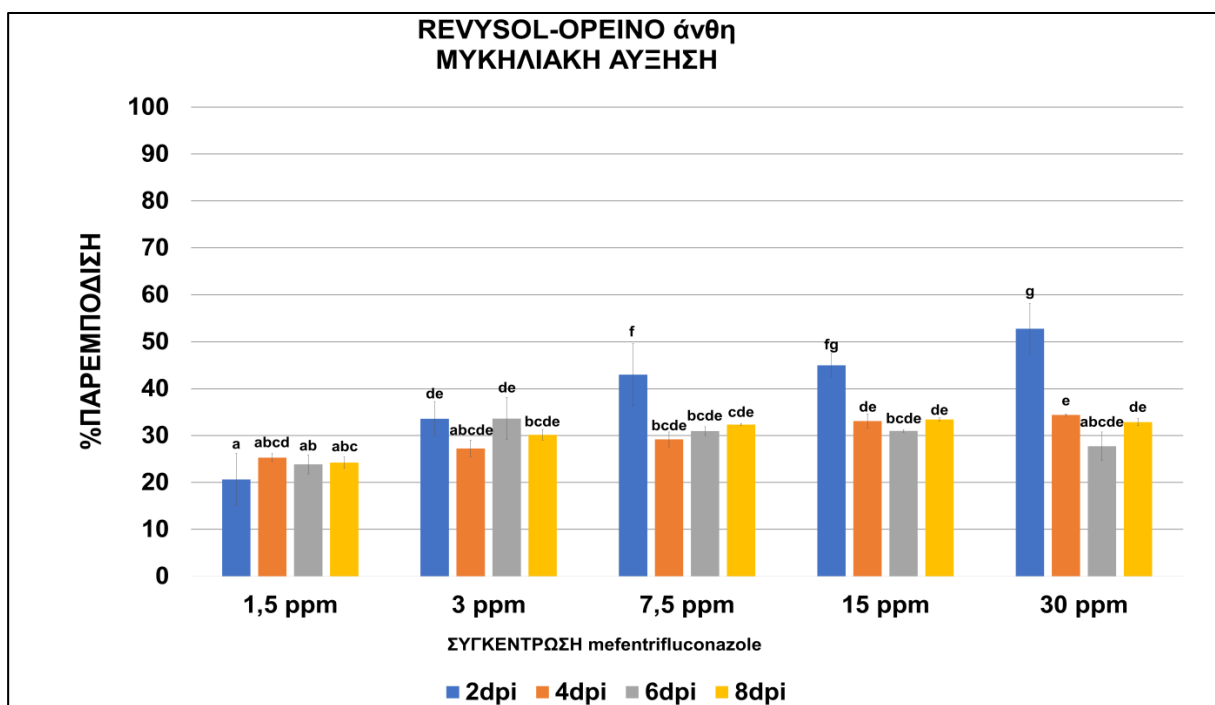
Μάρτυρας

Nordox 5ppm

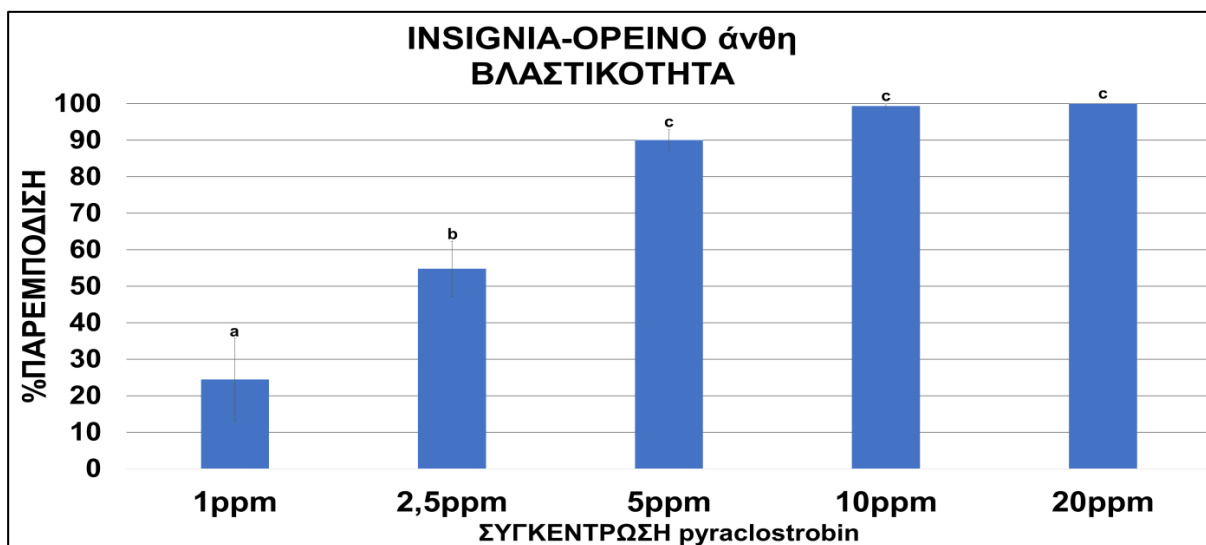
Εικόνα 36: Παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα *C. acutatum*-Δ5.1, μετά από 8 μέρες ανάπτυξης σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Από αριστερά, Μάρτυρας Δ5.1, Nordox 5ppm, αντίστοιχα.



Διαγ.13: Αξιολόγηση της δ.ο. copper oxide στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου της απομόνωσης Ορεινό άνθη, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσω με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.



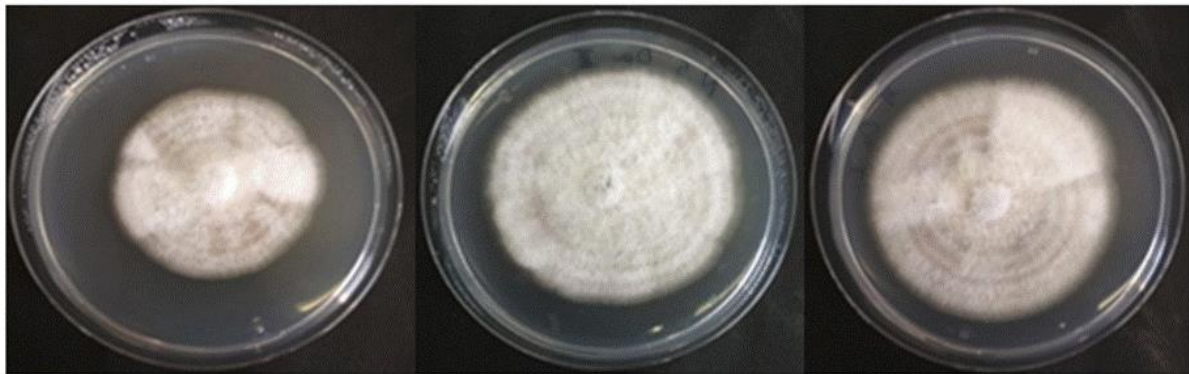
Διαγ.14: Αξιολόγηση της δ.ο. mefentrifluconazole στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου της απομόνωσης Ορεινό άνθη, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσω με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.



Διαγ.15: Αξιολόγηση της δ.ο. pyraclostrobin στην παρεμπόδιση βλάστησης κονιδίων της απομόνωσης Ορεινό άνθη σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 18h μετά την τεχνητή μόλυνση. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσω με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.

Στα Διαγράμματα 13 και 14 φαίνεται πως το αποτελεσματικότερο σκεύασμα, ως προς την παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης, είναι το Revyona (δ.ο. mefentrifluconazole, εμπορικό όνομα Revysol), επιφέροντας όμως μέτρια έως χαμηλά επίπεδα παρεμπόδισης (53%-33%, 2 με 8 dpi αντίστοιχα, στα 30 ppm). Το χαλκούχο σκεύασμα Nordox (δ.ο. copper oxide) παρουσίασε πάρα πολύ χαμηλή αποτελεσματικότητα (>10% σε όλες τις συγκεντρώσεις και dpi). Στην Εικόνα 37 απεικονίζονται τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτών, κατά την 8 dpi. Στο Διάγραμμα 15 φαίνεται ότι το χημικό σκεύασμα Insignia (δ.ο. pyraclostrobin) παρουσιάστηκε πάρα πολύ αποτελεσματικό, καθώς επέφερε παρεμπόδιση στην βλάστηση των κονιδίων >90% και ήδη από τη συγκέντρωση των 10 ppm, 18 h μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων, στην απομόνωση Ορεινό άνθη.

Ορεινό άνθη- 8dpi

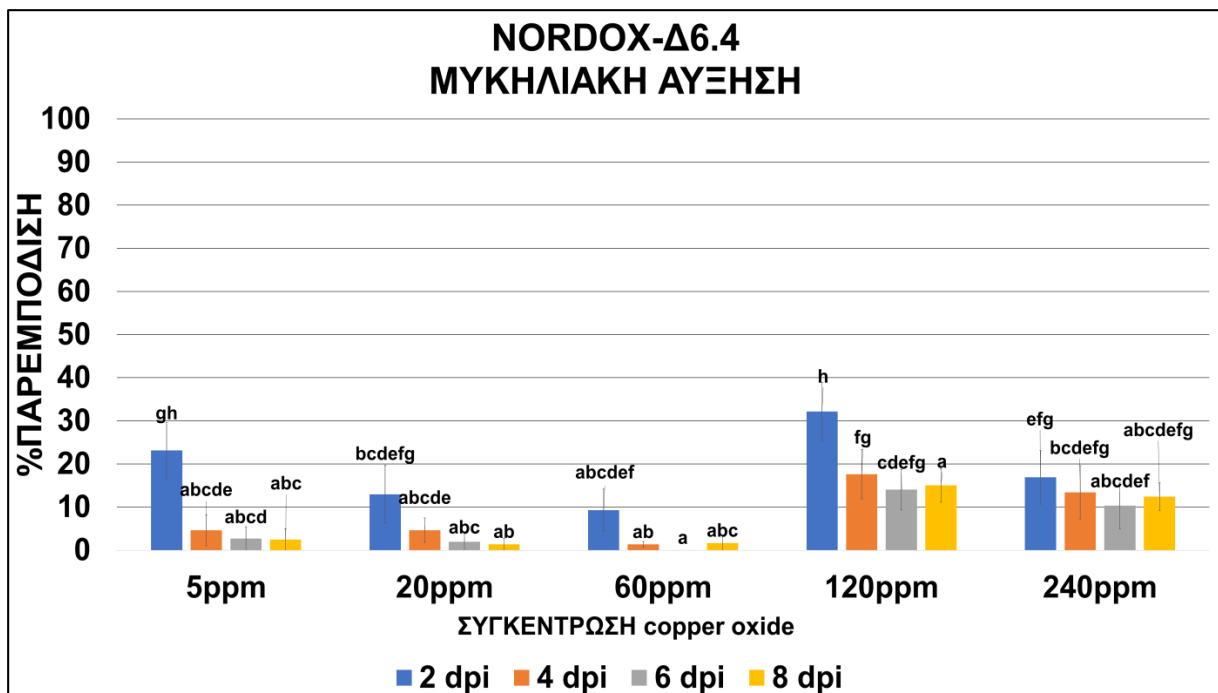


Revysol 1,5ppm

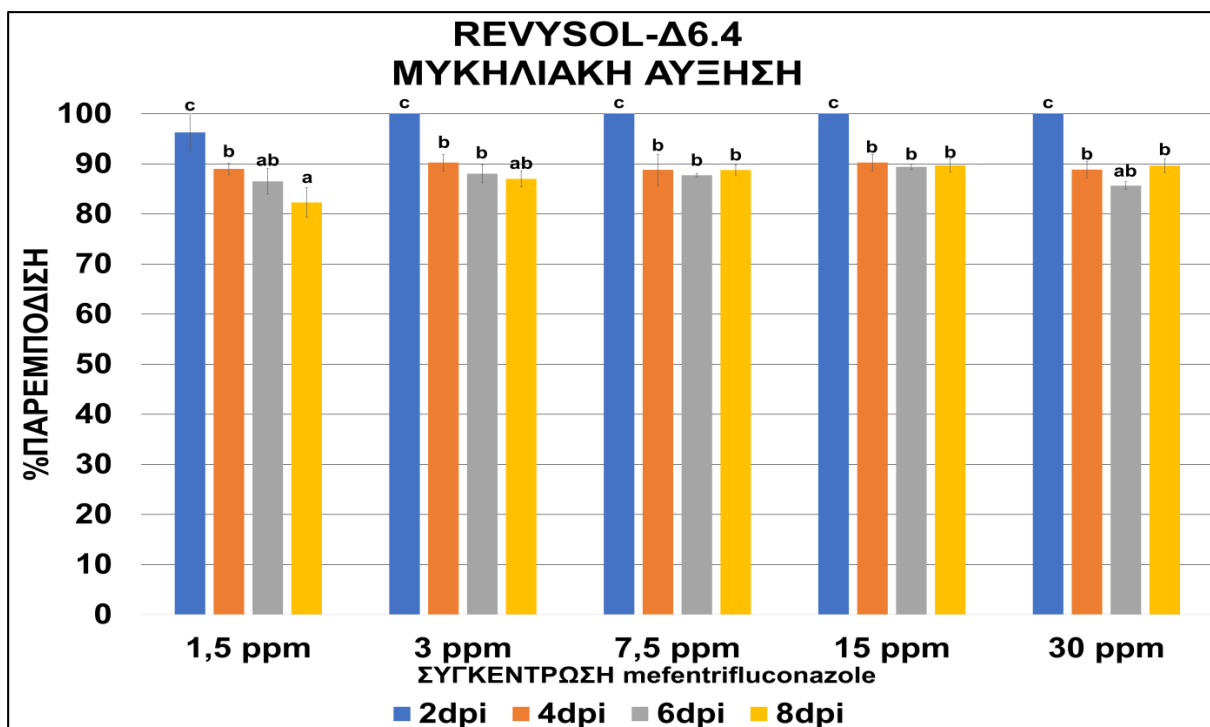
Μάρτυρας

Nordox 5ppm

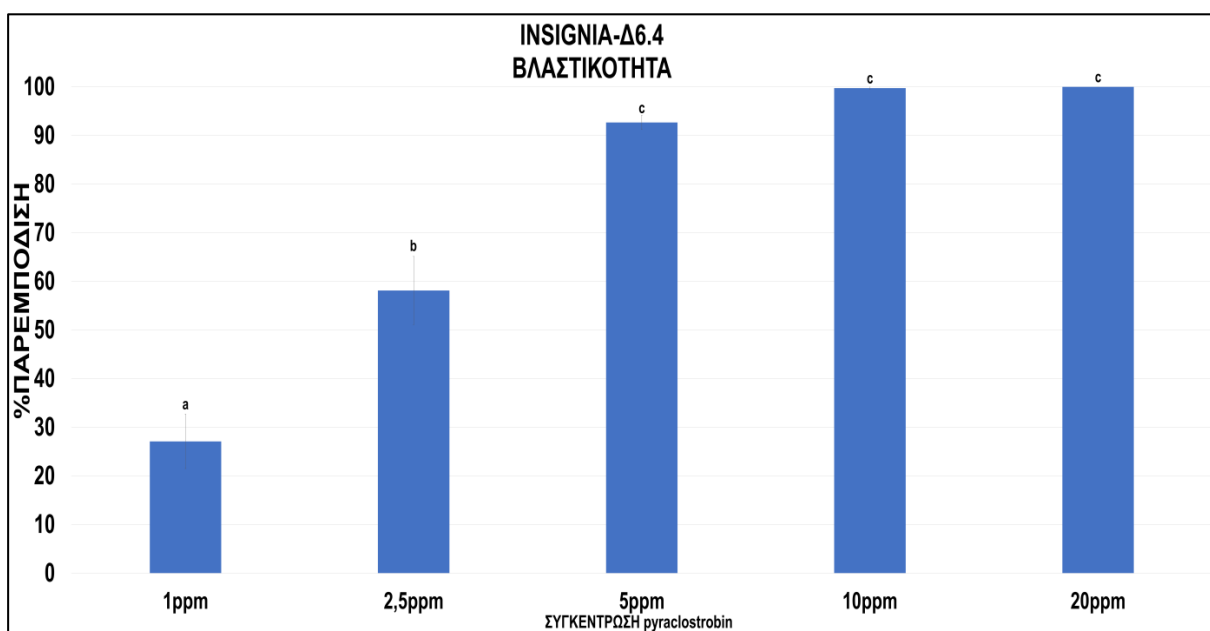
Εικόνα 37: Παρεμπόδιση ανάπτυξης της απομόνωσης Ορεινό άνθη, μετά από 8 μέρες ανάπτυξης (8dpi) σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Από αριστερά, Revysol 1,5ppm, Μάρτυρας Ορεινό άνθη, Nordox 5ppm αντίστοιχα.



Διαγ.16: Αξιολόγηση της δ.ο. copper oxide στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου του μύκητα *C. acutatum*- Δ6.4, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.

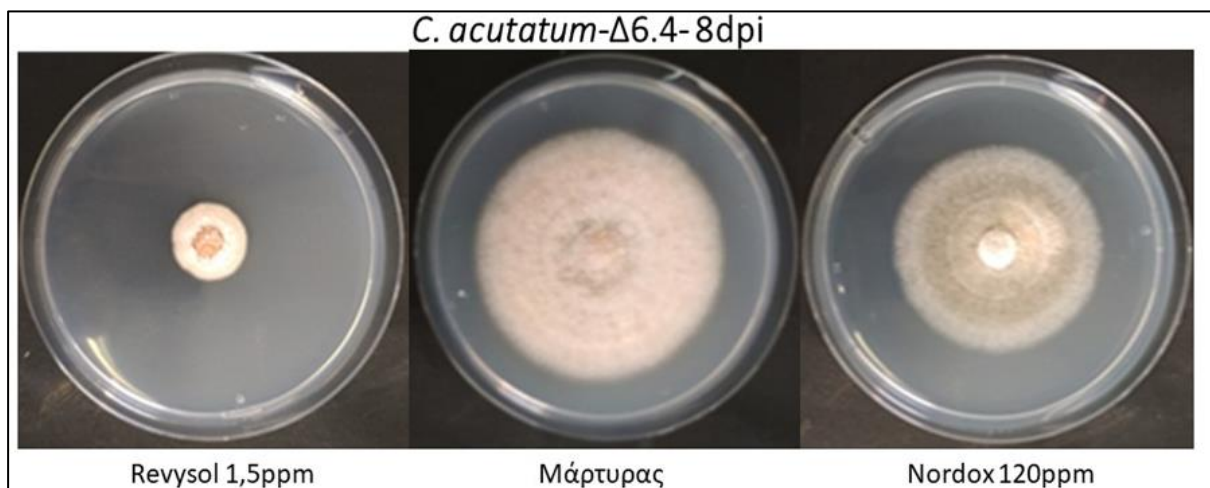


Διαγ.17: Αξιολόγηση της δ.ο. mefenitrifluconazole στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου του μύκητα *C. acutatum*- Δ6.4, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.

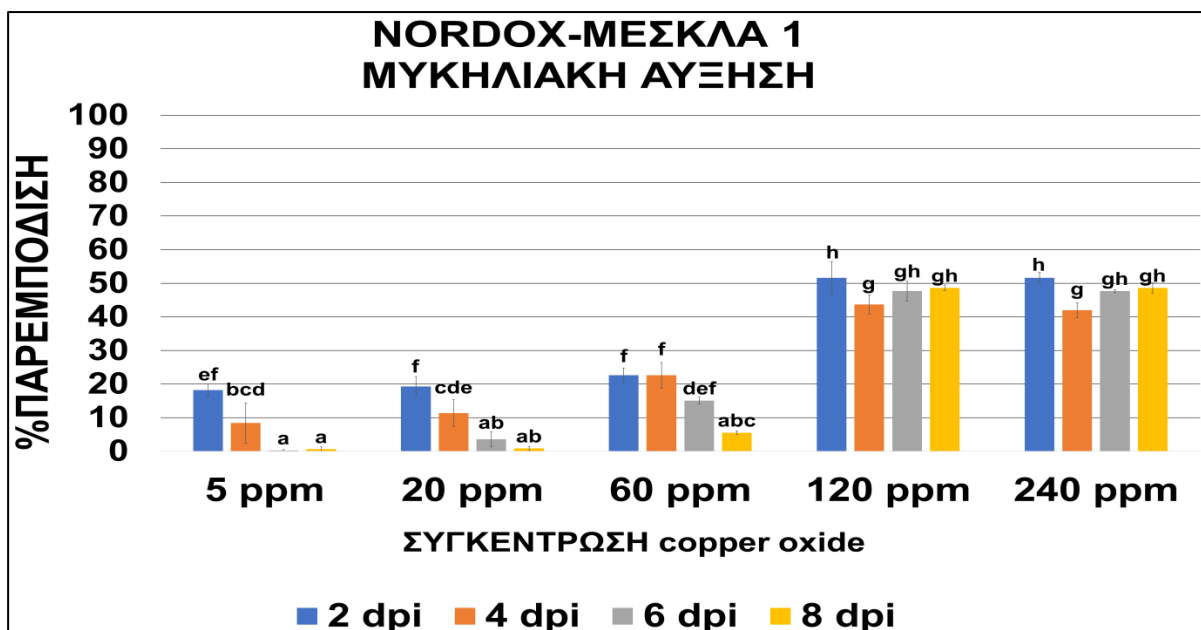


Διαγ.18: Αξιολόγηση της δ.ο. pyraclostrobin στην παρεμπόδιση βλάστησης κονιδίων του μύκητα *C. acutatum*- Δ6.4 σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 18h μετά την τεχνητή μόλυνση. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.

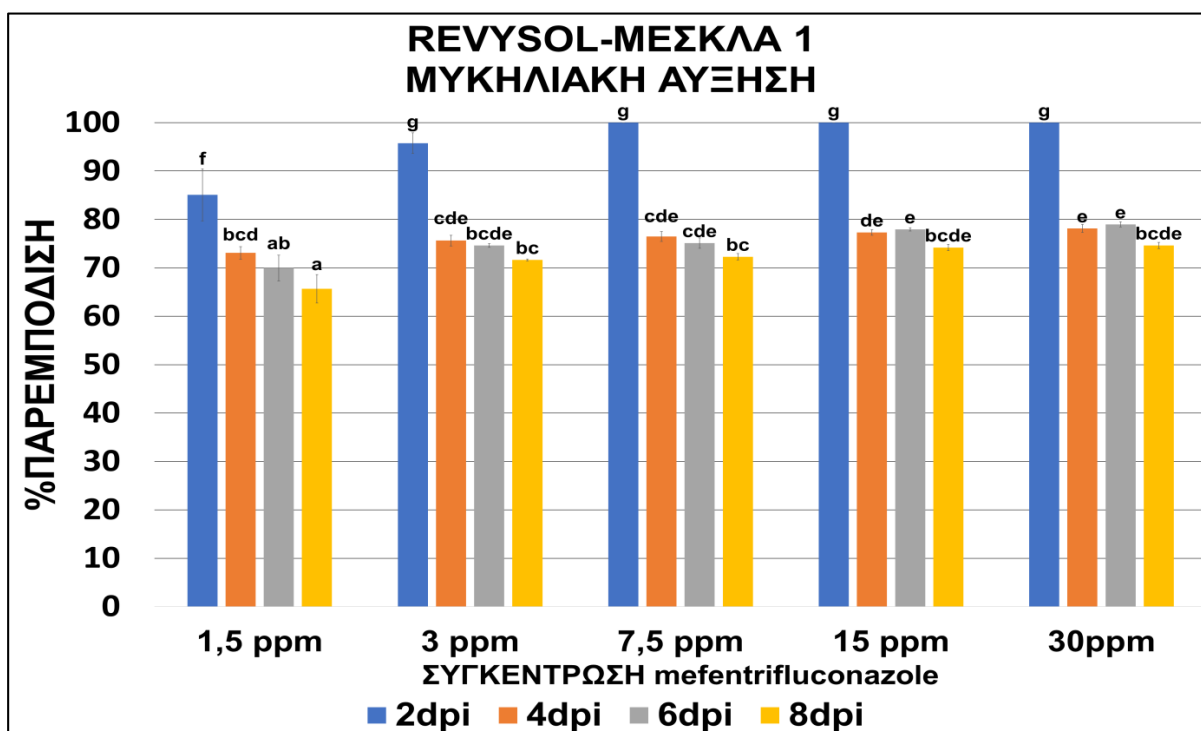
Στα Διαγράμματα 16 και 17 φαίνεται πως το αποτελεσματικότερο σκεύασμα, ως προς την παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης, είναι το Revyona (δ.ο. mefentrifluconazole, εμπορικό όνομα Revysol), καθώς από τη συγκέντρωση του 1,5 ppm στις 8 μέρες μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων επέφερε παρεμπόδιση μυκηλιακής αύξησης έως και 80%. Το χαλκούχο σκεύασμα Nordox (δ.ο. copper oxide) παρουσίασε αποτελεσματικότητα >20%, ακόμα και στη συγκέντρωση των 240ppm. Στην Εικόνα 38 απεικονίζεται η μειωμένη ανάπτυξη του μύκητα υπο την επίδραση του Revyona, όπως και η χαμηλή αποτελεσματικότητα του Nordox, στις 8dpi. Στο Διάγραμμα 18 φαίνεται ότι το χημικό σκεύασμα Insignia (δ.ο. pyraclostrobin) παρουσιάστηκε πάρα πολύ αποτελεσματικό, καθώς επέφερε παρεμπόδιση στην βλάστηση των κονιδίων έως και 100% και ήδη από τη συγκέντρωση των 10 ppm, 18 h μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων, στην απομόνωση Δ6.4.



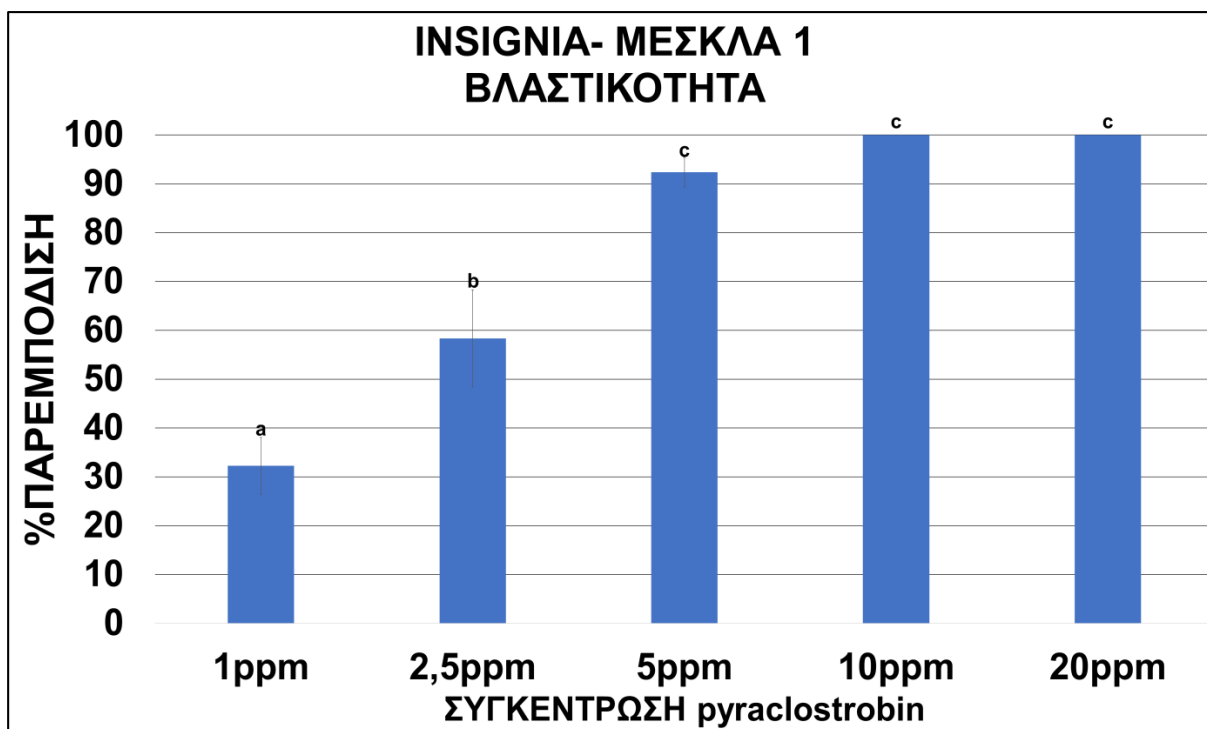
Εικόνα 38: Παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα *C. acutatum*-Δ6.4, μετά από 8 μέρες ανάπτυξης (8dpi) σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Από αριστερά, Revysol 1,5ppm, Μάρτυρας Δ6.4, Nordox 120ppm, αντίστοιχα.



Διαγ.19: Αξιολόγηση της δ.ο. copper oxide στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου της απομόνωσης Μεσκλά 1, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσω με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.



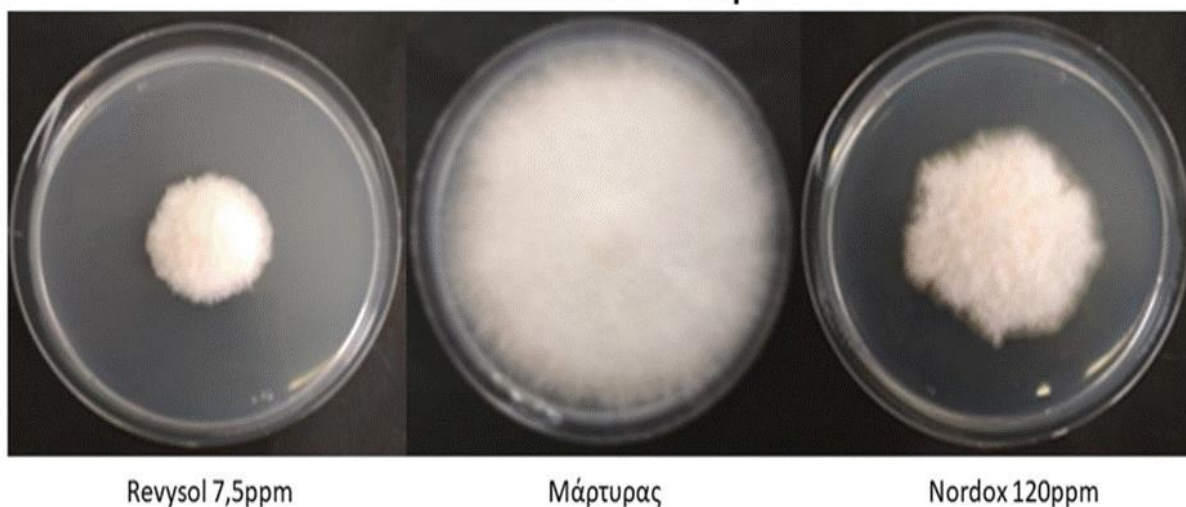
Διαγ.20: Αξιολόγηση της δ.ο. mefentrifluconazole στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου της απομόνωσης Μεσκλά 1, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσω με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.



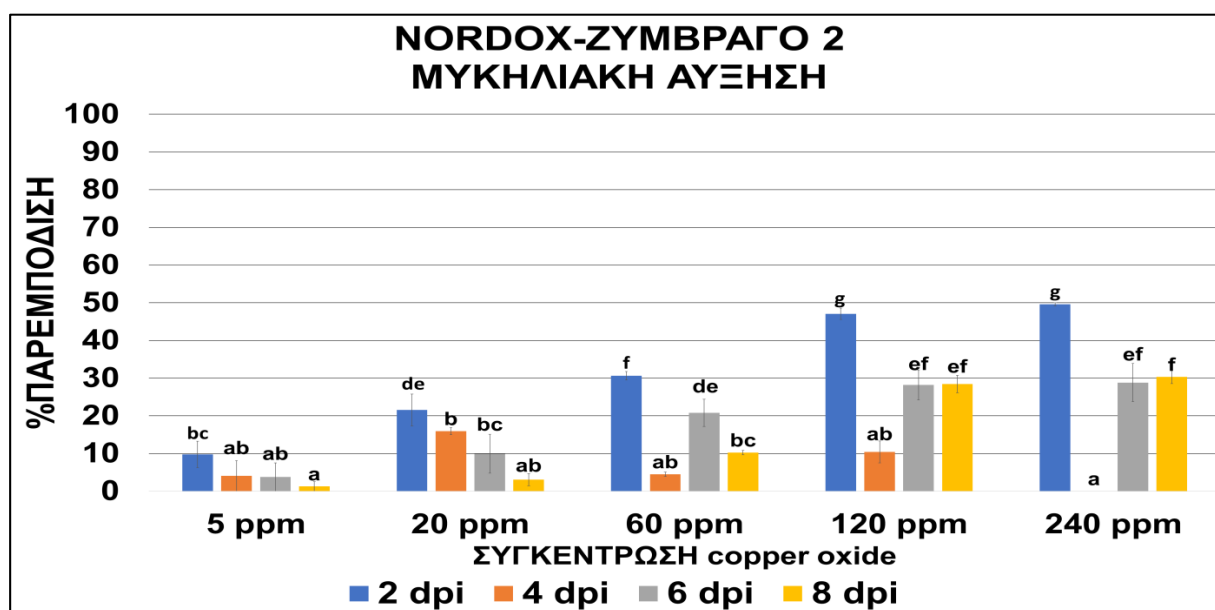
Διαγ.21: Αξιολόγηση της δ.ο. pyraclostrobin στην παρεμπόδιση βλάστησης κονιδίων της απομόνωσης Μεσκλά 1 σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 18h μετά την τεχνητή μόλυνση. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσω της μεθόδου LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.

Στα Διαγράμματα 19 και 20 φαίνεται πως το αποτελεσματικότερο σκεύασμα, ως προς την παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης, είναι το Revyona (δ.ο. mefentrifluconazole, εμπορικό όνομα Revysol), καθώς επέφερε παρεμπόδιση μυκηλιακής αύξησης >70% στις συγκεντρώσεις των 3 έως 30 ppm. Το χαλκούχο σκεύασμα Nordox (δ.ο. copper oxide) παρουσίασε μέτρια αποτελεσματικότητα (41-51%) μόνο στις δόσεις των 120 και 240 ppm. Στην Εικόνα 39 απεικονίζεται η μειωμένη ανάπτυξη του μύκητα υπο την επίδραση του Revyona, όπως και η χαμηλή αποτελεσματικότητα του Nordox, στις 8dpi. Στο Διάγραμμα 21 φαίνεται ότι το χημικό σκεύασμα Insignia (δ.ο. pyraclostrobin) παρουσιάστηκε πάρα πολύ αποτελεσματικό, καθώς επέφερε παρεμπόδιση στην βλάστηση των κονιδίων έως και 100% στις συγκεντρώσεις των 10 και 20 ppm, 18 h μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων, στην απομόνωση Μεσκλά 1.

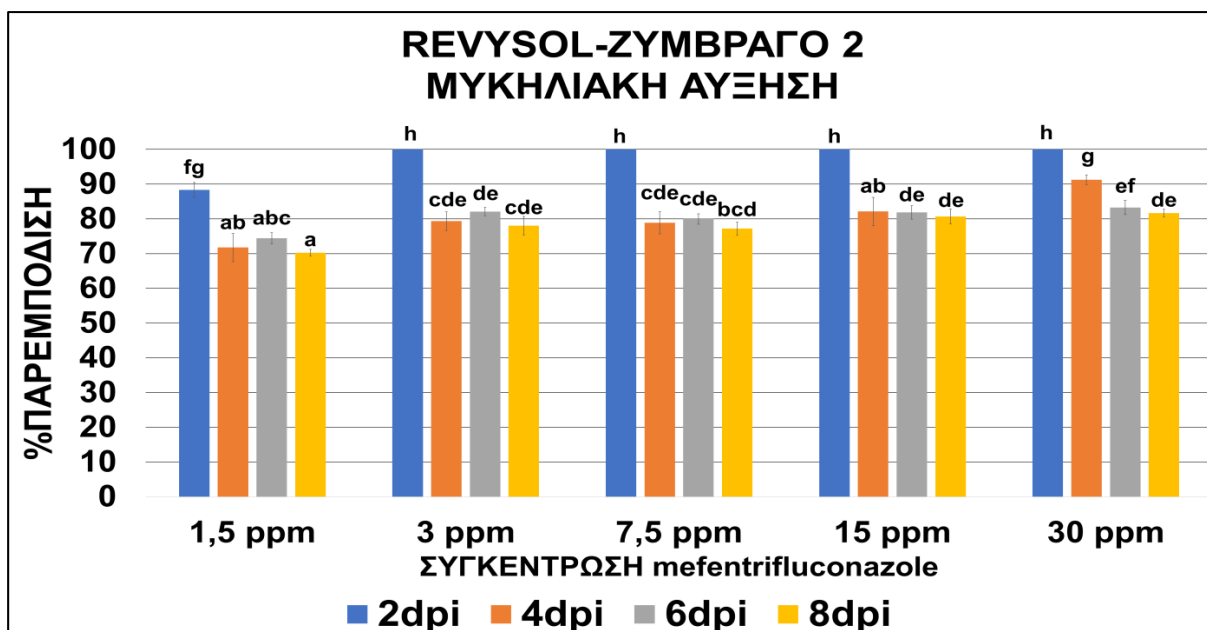
Μεσκλά 1- 8dpi



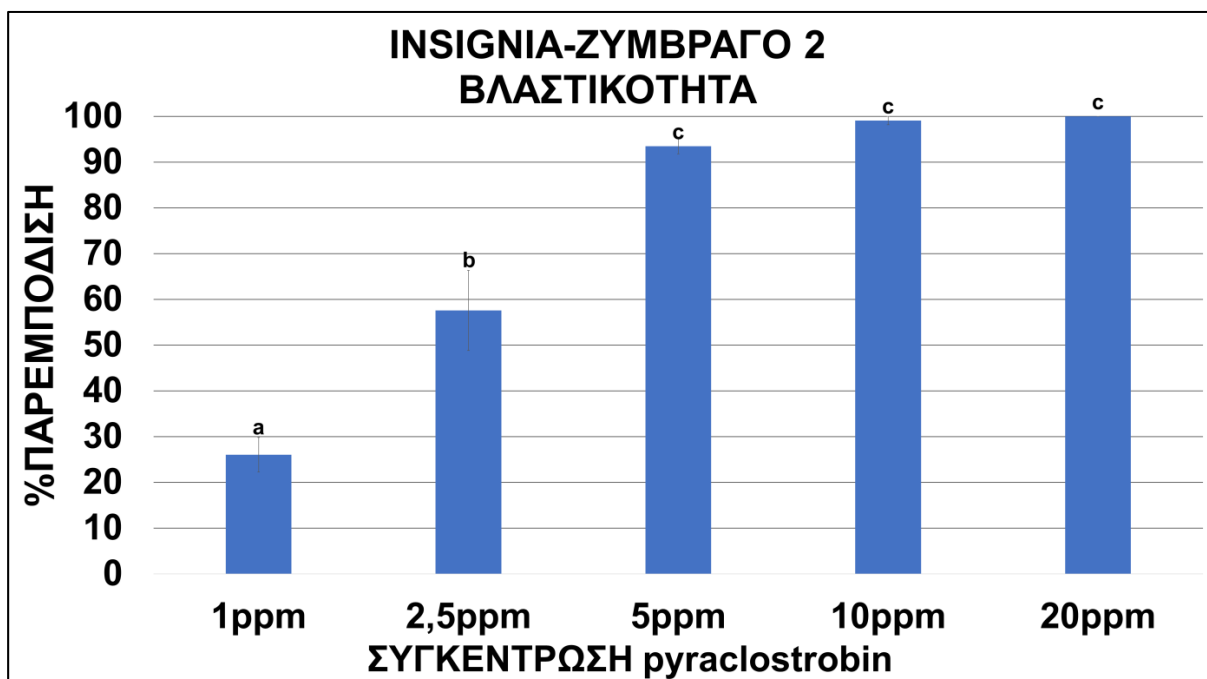
Εικόνα 39: Παρεμπόδιση ανάπτυξης της απομόνωσης Μεσκλά 1, μετά από 8 μέρες ανάπτυξης (8dpi) σε υλικό PDA. Από αριστερά, Revysol 7,5ppm, Μάρτυρας Μεσκλά 1, Nordox 120ppm, αντίστοιχα.



Διαγ. 22: Αξιολόγηση της δ.ο. copper oxide στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου της απομόνωσης Ζυμβράγο 2, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.



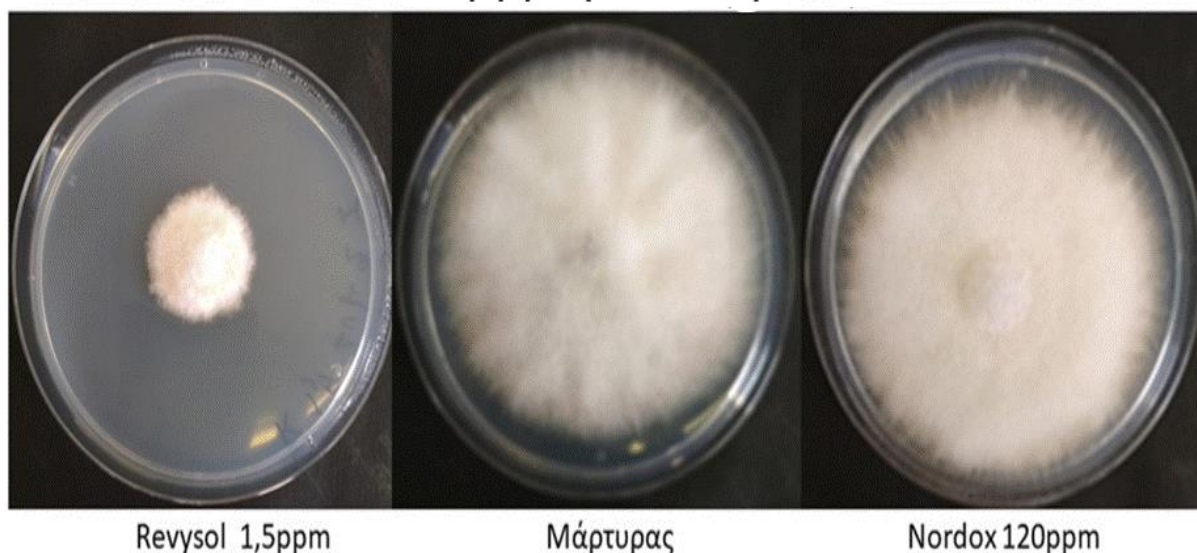
Διαγ.23: Αξιολόγηση της δ.ο. mefentrifluconazole στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου της απομόνωσης Ζυμβράγο 2, σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 8 ημέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσω της μεθόδου LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.



Διαγ.24: Αξιολόγηση της δ.ο. pyraclostrobin στην παρεμπόδιση βλάστησης κονιδίων της απομόνωσης Ζυμβράγο 2 σε θρεπτικό υλικό PDA, στις 18h μετά την τεχνητή μόλυνση. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσω της μεθόδου LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις. Σε κάθε διάγραμμα η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των εφαρμογών (διαφορετικά ppm) και όχι εντός τους.

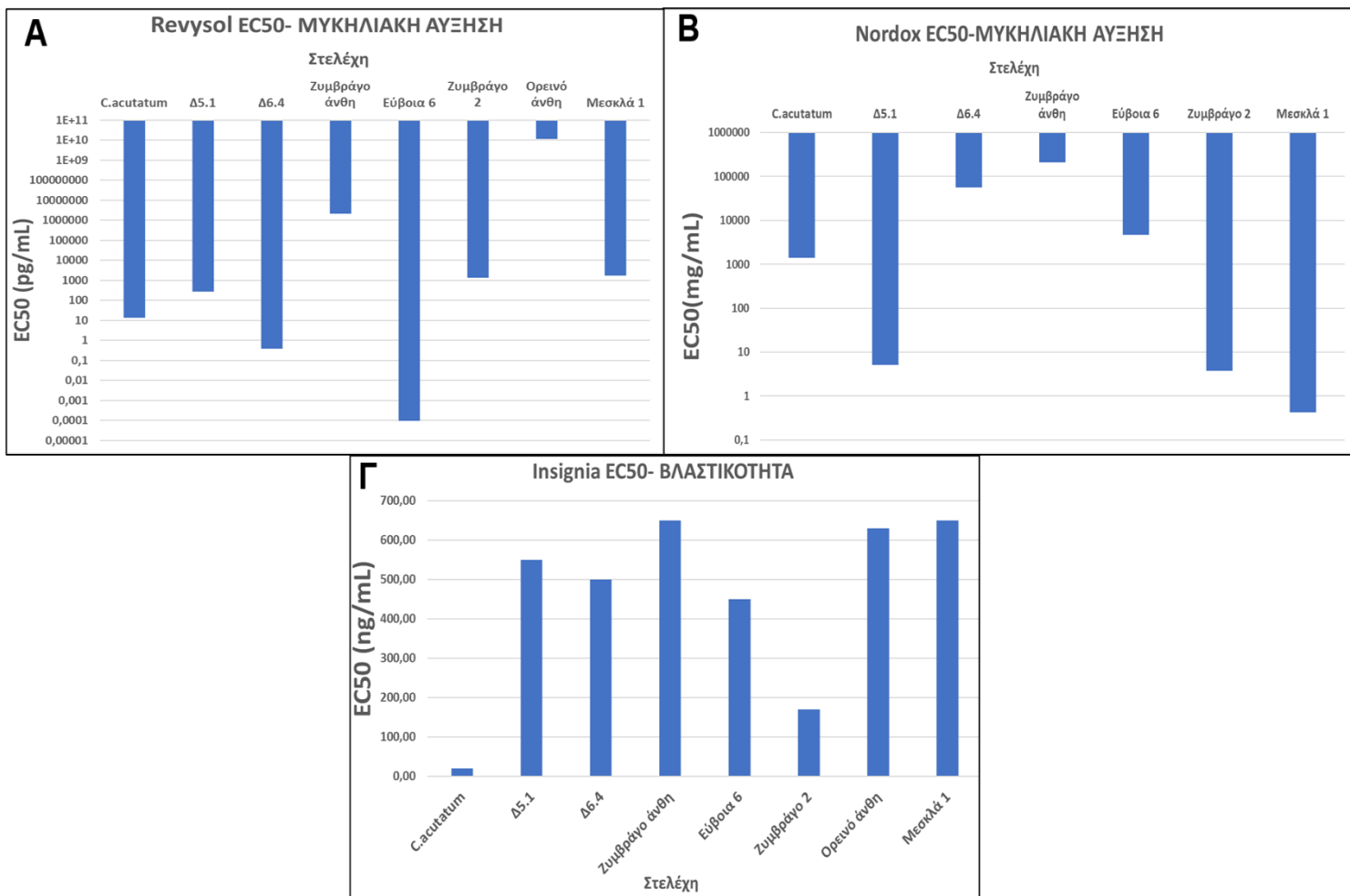
Στα Διαγράμματα 22 και 23 φαίνεται πως το αποτελεσματικότερο σκεύασμα, ως προς την παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης, είναι το Revyona (δ.ο. mefentrifluconazole, εμπορικό όνομα Revysol), καθώς επέφερε παρεμπόδιση μυκηλιακής αύξησης >70%, σε όλες τις συγκεντρώσεις και μέρες μετά τον εμβολιασμό (dpi). Η αποτελεσματικότητα που επέδειξε το χαλκούχο σκεύασμα Nordox (δ.ο. copper oxide) κινήθηκε σε πάρα πολύ χαμηλά επίπεδα. Στην Εικόνα 40 απεικονίζεται η μειωμένη ανάπτυξη του μύκητα υπο την επίδραση του Revyona, όπως και η πολύ χαμηλή αποτελεσματικότητα του Nordox, στις 8dpi. Στο Διάγραμμα 24 φαίνεται ότι το χημικό σκεύασμα Insignia (δ.ο. pyraclostrobin) παρουσιάστηκε πάρα πολύ αποτελεσματικό, καθώς επέφερε παρεμπόδιση στην βλάστηση των κονιδίων >90% στις συγκεντρώσεις των 10 και 20 ppm, 18 h μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων, στην απομόνωση Ζυμβράγο 2.

Ζυμβράγο 2- 8dpi

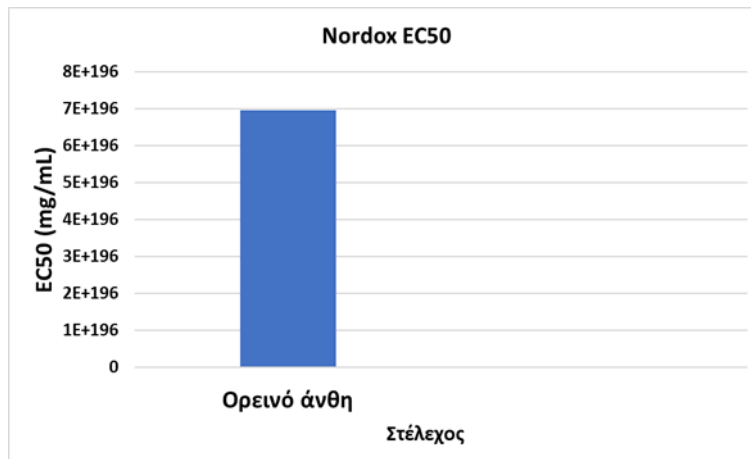


Εικόνα 40: Παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα της απομόνωσης Ζυμβραγό 2, μετά από 8 μέρες καλλιέργειας (8dpi) σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Από αριστερά, Revysol 1,5ppm, Μάρτυρας Ζυμβραγό 2, Nordox 120ppm, αντίστοιχα.

Από τις μετρήσεις και την ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος, υπολογίστηκε η EC_{50} των δραστικών ουσιών, όπως επίσης και ο δείκτης ανθεκτικότητας των στελεχών. Οι τιμές στις οποίες κυμάνθηκε η EC_{50} των δ.ο. (Διαγράμματα 25Α-Γ) και ο δείκτης ανθεκτικότητας (Διαγράμματα 27Α-Γ) απεικονίζονται παρακάτω. Επίσης, η απομόνωση Ορεινό άνθη εμφάνισε πολύ υψηλές τιμές EC_{50} και δείκτη ανθεκτικότητας στο χημικό σκεύασμα Nordox® (δ.ο. copper oxide), που απεικονίζονται σε ξεχωριστά διαγράμματα (Διαγράμματα 26 και 28).

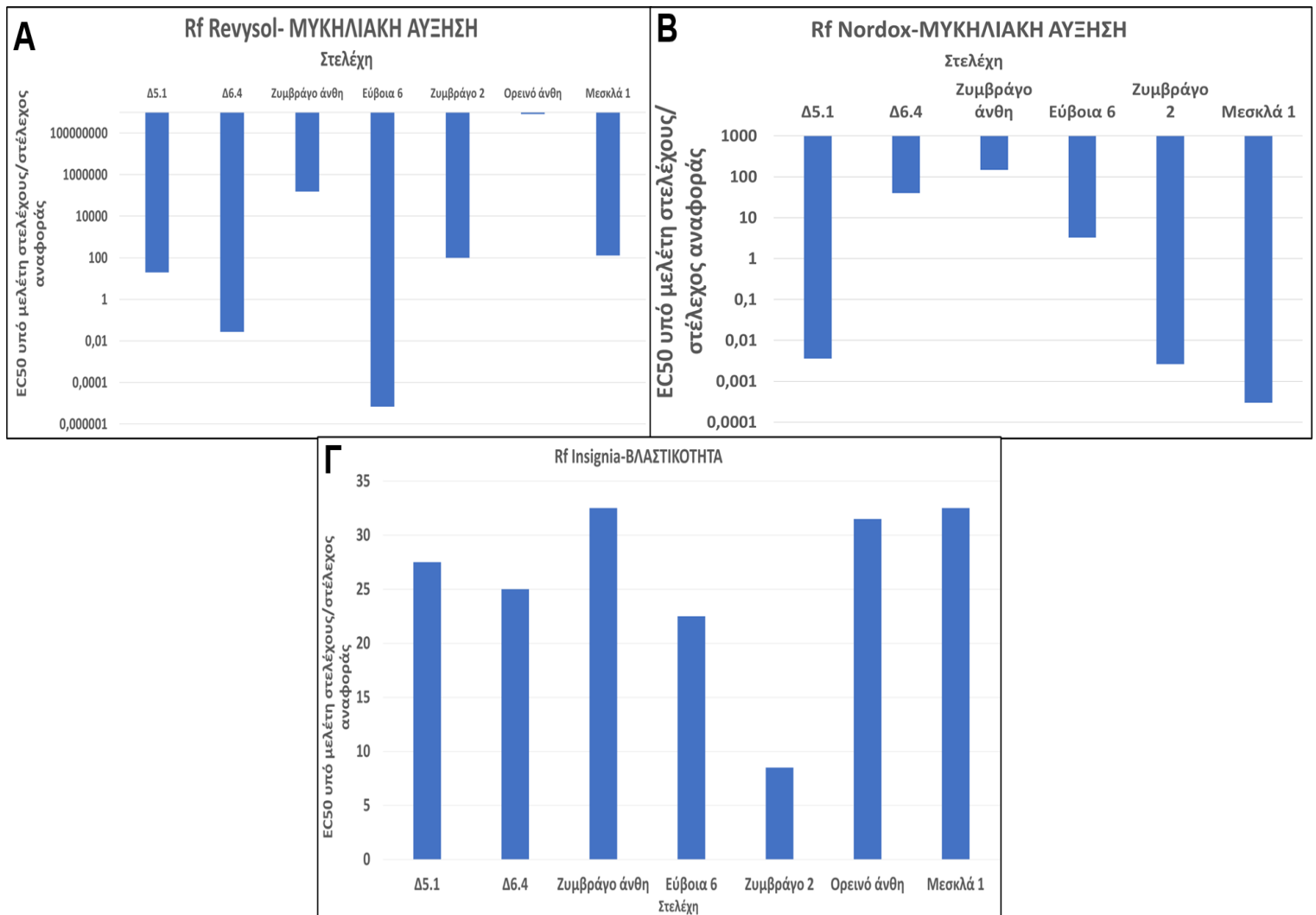


Διαγ.25(A-Γ): Τιμές EC₅₀ των δ.ο. mefentrifluconazole (Revyona®, εμπορικό όνομα δ.ο. Revysol®), copper oxide (Nordox®) που δοκιμάστηκαν ως προς την παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης και pyraclostrobin (Insignia®) που δοκιμάστηκε ως προς την παρεμπόδιση βλαστικότητας κονιδίων, για τις απομονώσεις που ελέγχθηκαν ανωτέρω. Οι τιμές του διαγράμματος προέκυψαν από λογισμικό excel, λύνοντας ως προς χ με το ψ=50, την λογαριθμική συνάρτηση της καμπύλης (ποσοστό παρεμπόδισης στον άξονα των ψ' και συγκέντρωση δ.ο. στον άξονα των χ').

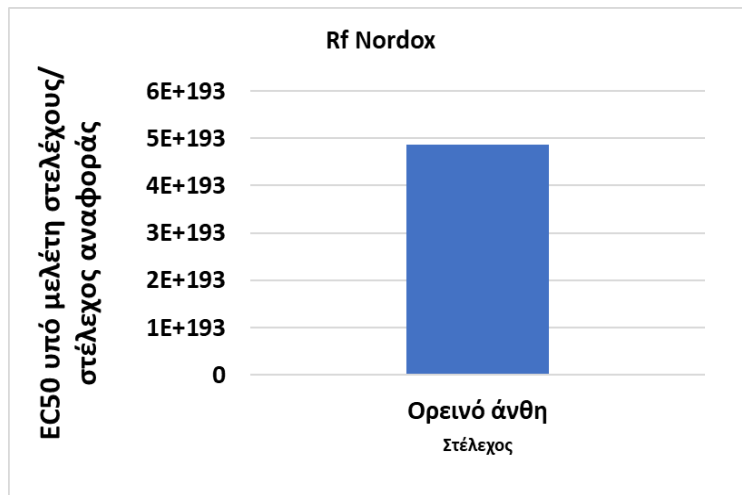


Διαγ.26: Τιμή EC₅₀ της δ.ο. copper oxide (Nordox®) για την απομόνωση Ορεινό άνθη. Οι τιμές του διαγράμματος προέκυψαν από λογισμικό excel, λύνοντας ως προς χ με το ψ=50, την λογαριθμική συνάρτηση της καμπύλης (ποσοστό παρεμπόδισης στον άξονα των ψ' και συγκέντρωση δ.ο. στον άξονα των χ').

Στα Διαγράμματα 25Α-Γ φαίνεται ότι η απομόνωση Μεσκλά 1 εμφάνισε την μεγαλύτερη ευαισθησία στο χημικό σκεύασμα Nordox® που αξιολογήθηκε για την παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης, με τιμή EC₅₀ να είναι 0,43 mg/mL. Επίσης, οι απομονώσεις Ζυμβράγο 2 και Δ5.1 παρουσιάστηκαν με αρκετά μεγάλη ευαισθησία, με τιμές 3,75 και 5,11 mg/mL αντίστοιχα. Η μικρότερη ευαισθησία στο Nordox® παρουσιάστηκε στις απομονώσεις Ορεινό άνθη και Ζυμβράγο άνθη με τιμές 6,950 × 10¹⁹⁶ και 207774 mg/mL αντίστοιχα. Όσον αφορά το Revysol®, που ελέγχθηκε και αυτό για την παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης, η απομόνωση Εύβοια 6 παρουσίασε τη μεγαλύτερη ευαισθησία με τιμή 9,42 × 10⁻⁵ pg/mL. Η απομόνωση Δ6.4 παρουσίασε επίσης μεγάλη ευαισθησία, με τιμή 0,37pg/mL. Μειωμένη ευαισθησία στο Revysol® παρουσίασαν οι απομονώσεις Ορεινό άνθη και Ζυμβράγο άνθη, με τιμές 1,14 × 10¹⁰ και 2,07 × 10⁶ pg/mL αντίστοιχα. Για το Insignia®, που αξιολογήθηκε για την παρεμπόδιση της βλαστικότητας, το στέλεχος αναφοράς *C. acutatum* παρουσίασε την μεγαλύτερη ευαισθησία και εμφάνισε τιμή EC₅₀ 0,02 μg/mL. Επίσης, μεγάλη ευαισθησία επέδειξε και η απομόνωση Ζυμβράγο 2, με τιμή 0,17 μg/mL. Την μικρότερη ευαισθησία επέδειξαν οι απομονώσεις Μεσκλά 1 και Ζυμβράγο άνθη με τιμή 650ng/mL. Ειδική αναφορά γίνεται για την απομόνωση Ορεινό άνθη, όπου παρουσίασε πολύ μεγάλη ανθεκτικότητα στο χημικό σκεύασμα Nordox®, με τιμή 6,95 × 10¹⁹⁶ mg/mL (Διάγραμμα 26). Επίσης, η συγκεκριμένη απομόνωση παρουσίασε υψηλή ανθεκτικότητα και στα άλλα δύο χημικά σκευάσματα, με τιμές 1,14 × 10¹⁰ pg/mL για το Revysol®, που ήταν και η υψηλότερη από όλες τις υπόλοιπες απομονώσεις και 630ng/mL για το Insignia®, που ήταν η δεύτερη υψηλότερη (Διαγράμματα 25Α-Γ).



Διάγ. 27Α-Γ: Δείκτης ανθεκτικότητας Rf των δ.ο. copper oxide (Nordox®), mefentrifluconazole (Revyona®, εμπορικό όνομα δ.ο. Revysol®), pyraclostrobin (Insignia®) για όλες τις απομονώσεις που ελέγχθηκαν ανωτέρω. Τα διαγράμματα προέκυψαν από τον λόγο των EC₅₀ των υπό μελέτη στελεχών προς την EC₅₀ του στελέχους αναφοράς (*C. acutatum*).



Διάγ. 28: Δείκτης ανθεκτικότητας της δ.ο. copper oxide (Nordox®), της απομόνωσης Ορεινό άνθη. Το διάγραμμα προέκυψε από τον λόγο των EC₅₀ του υπό μελέτη στελέχους προς την EC₅₀ του στελέχους αναφοράς (*C. acutatum*).

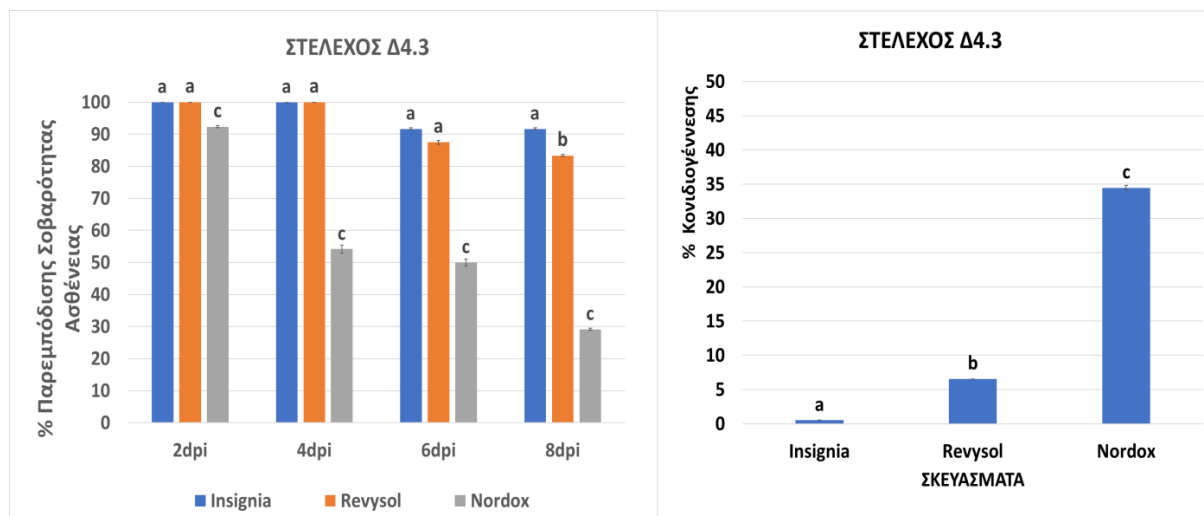
Ο δείκτης ανθεκτικότητας Rf (Διαγράμματα 27Α-Γ) (λόγος των EC₅₀ των υπό μελέτη στελεχών προς την EC₅₀ του στελέχους αναφοράς) κυμάνθηκε από $6,9 \times 10^{-6}$ έως $8,33 \times 10^8$ για το Revysol®, από 8,5 έως 32,5 για το Insignia® και από 0,0026 έως 146 για το Nordox®. Αξιοσημείωτη ήταν η μειωμένη ευαισθησία στο Nordox® (Διάγραμμα 28) και στο Revysol®, που εμφάνισε η απομόνωση Ορεινό Άνθη, με τιμές $4,8 \times 10^{193}$ και 33×10^8 αντίστοιχα.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων κρίνεται σκόπιμο να επανεκτιμηθούν οι τιμές EC₅₀ και Rf των στελεχών σε πειράματα μυκοτοξικότητας, με την εφαρμογή μικρότερων συγκεντρώσεων των δ.ο.

4.5 ΤΑ ΧΗΜΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ INSIGNIA ΚΑΙ REYVONA ΠΑΡΕΜΠΟΛΙΖΟΥΝ ΤΟ ΜΥΚΗΤΑ *COLLETOTRICHUM ACUTATUM* ΣΕ ΚΑΡΠΟΥΣ ΕΛΙΑΣ

Για την διεξαγωγή της δοκιμής αποτελεσματικότητας των χημικών σκευασμάτων χρησιμοποιήθηκαν καρποί ελιάς, ποικιλίας Αμφίσσης. Τα χημικά σκευάσματα εφαρμόστηκαν σε συγκεντρώσεις αντίστοιχες με αυτές της εκάστοτε ετικέτας: Insignia® (20% δ.ο.) 50 g/100L (100 ppm δ.ο) και Revyona® (7,5% δ.ο.) 200mL/100L (150 ppm δ.ο), Nordox® (75% δ.ο.) 150 g/100L (1.125 ppm δ.ο). Μετά από 2 ημέρες ξεκίνησε η καταγραφή της εξέλιξης της μόλυνσης, που αντιστοιχούσε σε αριθμό μολυσμένων καρπών για κάθε σκεύασμα και τους μάρτυρες. Η καταγραφή της μόλυνσης πραγματοποιούνταν κάθε 2 ημέρες.

Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζεται η παρεμπόδιση που ασκούν τα χημικά σκευάσματα πάνω στην ανάπτυξη (Διάγραμμα 29) και κονιδιογένεση (Διάγραμμα 30) του μύκητα, έπειτα από εμβάπτιση των ελαιόκαρπων στα υδατικά διαλύματα των σκευασμάτων και μόλυνση τους μετά από 24 h, με αιώρημα κονιδίων του μύκητα. Η ανάπτυξη του μύκητα καταγράφηκε μέχρι την 8^η ημέρα μετά τη μόλυνση και η μέτρηση των κονιδίων ανά σκεύασμα πραγματοποιήθηκε στο τέλος του πειράματος. Το πείραμα διεξήχθη σε 3 επαναλήψεις και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα StatGraphics, με βάση τη μέθοδο ANOVA ($p < 0,05$).



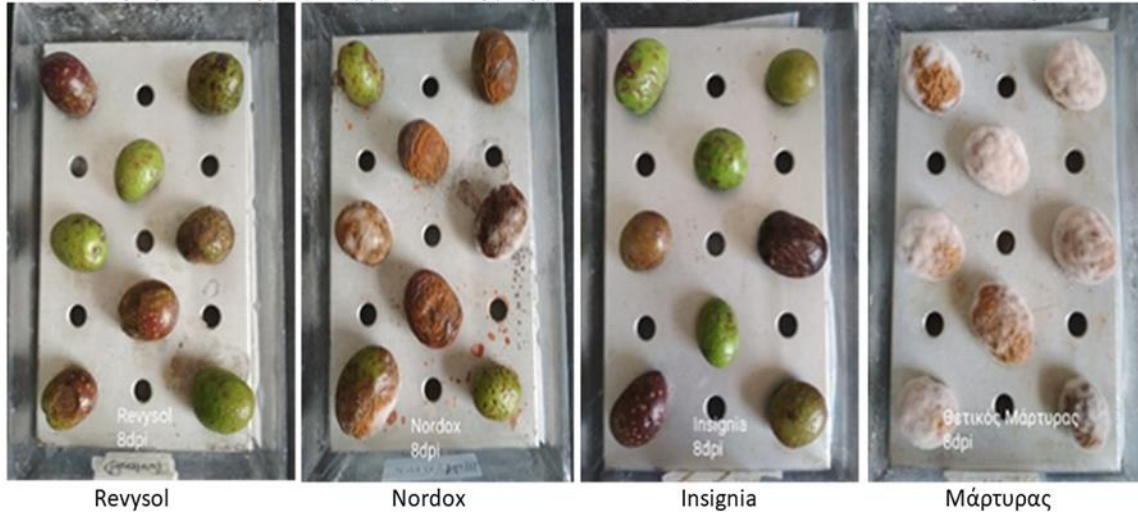
Διαγ. 29-30: Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των χημικών σκευασμάτων να παρεμποδίζουν την σοβαρότητα της ασθένειας (συχνότητα προσβολής καρπών ελιάς) και την κονιδιογένεση, όπως υπολογίστηκε από την τεχνητή μόλυνση καρπών, με το στέλεχος *C. acutatum*- Δ4.3. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και τον διαχωρισμό μέσω των που υπολογίστηκε με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις.

Από το διάγραμμα παρεμπόδισης της σοβαρότητας της ασθένειας φαίνεται ότι το Insignia® είναι το πιο αποτελεσματικό χημικό σκεύασμα, παρέχοντας προστασία της τάξης του 92%, ακόμα και την 8^η ημέρα μετά την μόλυνση. Το σκεύασμα Revyona® (δ.ο. Revysol®) επίσης παρουσιάζει πολύ καλή αποτελεσματικότητα, διατηρώντας υψηλά ποσοστά παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μύκητα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, παραμένοντας στο 83% κατά την 8^η ημέρα μετά την μόλυνση. Όσον αφορά το Nordox®, η προστασία που παρέχει κυμαίνεται σε μέτρια επίπεδα (Εικόνα 41).

Παρόμοια συμπεράσματα με τα παραπάνω εξάγονται και από το διάγραμμα της μέτρησης κονιδίων. Το Insignia® παρουσιάζεται αποτελεσματικότερο εφόσον επέδειξε

ποσοστό κονιδιογένεσης της τάξης του 2%. Το Revyona® (δ.ο. Revysol®) επίσης παρουσιάζει πολύ υψηλή παρεμπόδιση στη παραγωγή κονιδίων, παρουσιάζοντας ποσοστό κονιδιογένεσης 6%. Το Nordox® φαίνεται να παρεμποδίζει την κονιδιογένεση σε μικρότερο ποσοστό από τα υπόλοιπα.

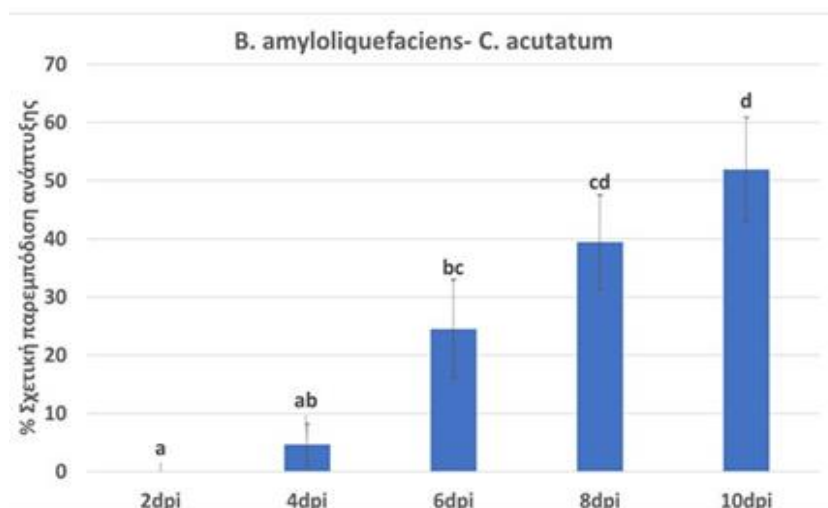
Παρεμπόδισης εξέλιξης έντασης της ασθένειας του *C. acutatum*-Δ4.3-8dpi



Εικόνα 41: Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των χημικών σκευασμάτων Insignia®, Revyona® (δ.ο. Revysol®) και Nordox® να παρεμποδίζουν την εξέλιξη της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *C. acutatum*- Δ4.3, σε καρπούς ελιάς.

4.6 ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ MBI600 *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΖΕΙ *IN VITRO* ΤΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *C. ACUTATUM* ΜΕΣΩ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ ΓΙΑ ΧΩΡΟ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

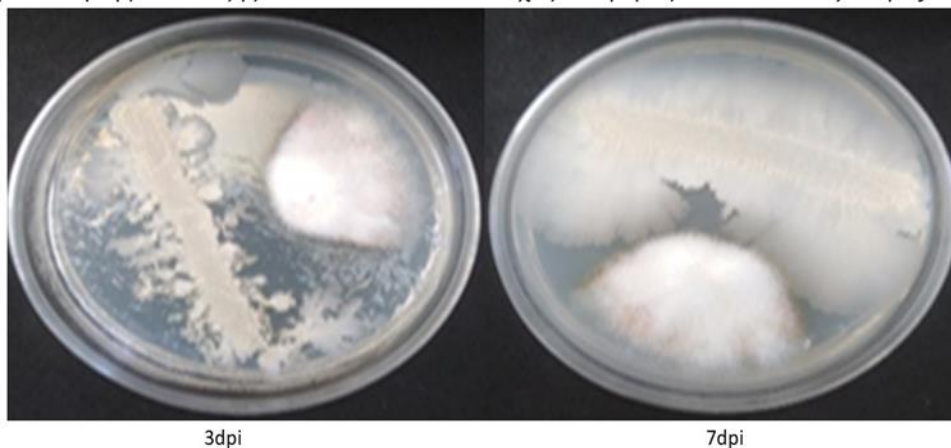
Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 31) απεικονίζεται η παρεμπόδιση που ασκεί ο *B. amyloliquefaciens* πάνω στην ανάπτυξη του μύκητα *C. acutatum*, όταν αναπτύσσονται στον ίδιο χώρο. Η ανάπτυξη του μύκητα μετρούνταν για 10 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων και το πείραμα περιελάμβανε 3 επαναλήψεις.



Διάγ. 31: Η παρεμπόδιση που ασκείται στην ανάπτυξη του μύκητα *C. acutatum*, από τον ανταγωνισμό του *Bacillus amyloliquefaciens* για χώρο και θρεπτικά στοιχεία. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και τον διαχωρισμό μέσω του LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις.

Από το Διάγραμμα 31 φαίνεται πως στη δέκατη μέρα μέτρησης του συγκεκριμένου πειράματος, ο βάκιλος παρεμποδίζει έως και 50% την ανάπτυξη του μύκητα *C. acutatum* στο τρυβλίο, λόγω ανταγωνισμού θέσης.

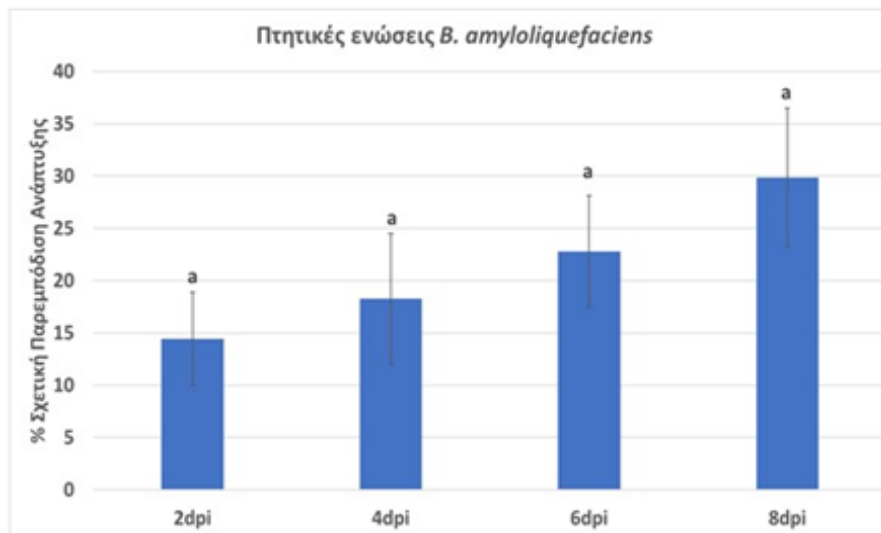
Παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *C. acutatum*- Στέλεχος αναφοράς από τον *B. amyloliquefaciens*



Εικόνα 42: Αξιολόγηση της ικανότητας του *Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα *C. acutatum*- Στέλεχος αναφοράς σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, μέσω ανταγωνισμού για χώρο και θρεπτικά στοιχεία, στις 3 και 7dpi αντίστοιχα.

4.7 ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ MBI600 *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΖΕΙ *IN VITRO* ΤΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ *C. ACUTATUM* ΜΕΣΩ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

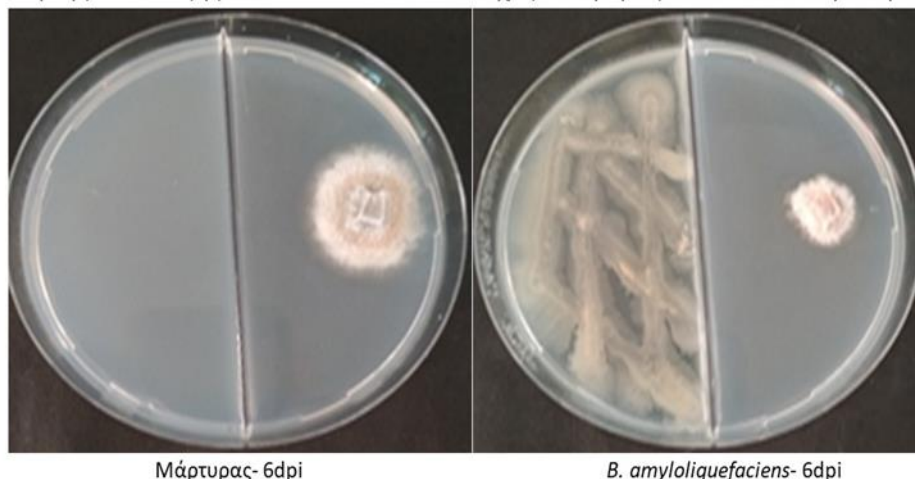
Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 32) απεικονίζεται η παρεμπόδιση που ασκεί ο *B. amyloliquefaciens*, μέσω της παραγωγής πτητικών ενώσεων, πάνω στην ανάπτυξη του μύκητα *C. acutatum*. Η ανάπτυξη του μύκητα μετρούνταν για 8 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων και το πείραμα περιελάμβανε 3 επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα StatGraphics, με βάση τη μέθοδο ANOVA ($p < 0,05$).



Διάγ. 32: Η παρεμπόδιση που ασκείται στην ανάπτυξη του μύκητα *C. acutatum*, λόγω πτητικών ουσιών που παράγονται από τον *Bacillus amyloliquefaciens*. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και τον διαχωρισμό μέσων που υπολογίστηκε με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις.

Από το Διάγραμμα 32 φαίνεται ότι η ανάπτυξη του μύκητα περιορίζεται έως και 30% την 8η μέρα μετά τον εμβολιασμό, παρότι αναπτύσσεται ξεχωριστά από το βάκιλο. Η παρεμπόδιση που ασκείται πιθανόν να οφείλεται σε πτητικές ενώσεις που παράγονται από τον βάκιλο.

Παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *C. acutatum*-Στέλεχος αναφοράς από τον *B. amyloliquefaciens*

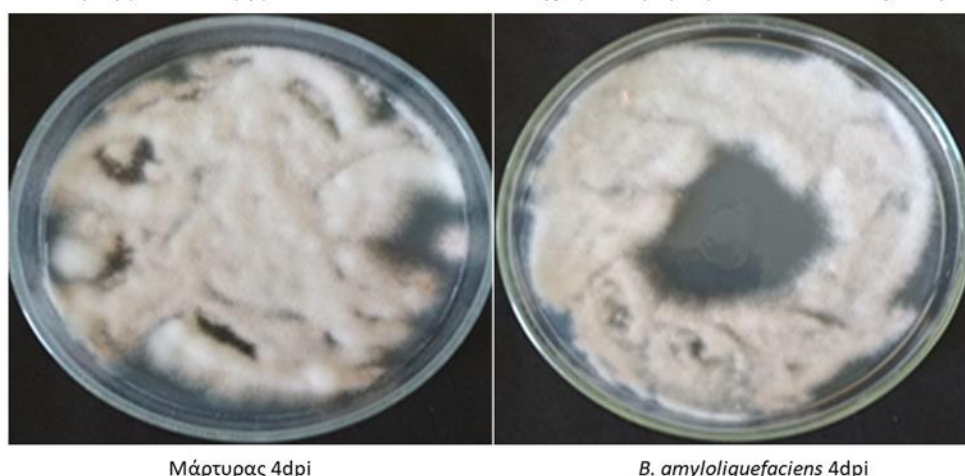


Εικόνα 43: Αξιολόγηση της ικανότητας του *Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα *C. acutatum* (Στέλεχος αναφοράς) σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, μέσω παραγωγής πτητικών ενώσεων, στις 6dpi.

4.8 ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ MBI600 *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΖΕΙ *IN VITRO* ΤΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ *C. ACUTATUM* ΜΕΣΩ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

Κατά τη δοκιμή αυτή στα τρυβλία οπού είχε αναπτυχθεί και θανατωθεί ο βάκιλος, παρατηρήθηκε δημιουργία ζώνης παρεμπόδισης, στην ανάπτυξη του μύκητα (Εικόνα 44). Όπως προαναφέρθηκε, ο βάκιλος μπορεί να δράσει και ανταγωνιστικά ως προς το χώρο και τα θρεπτικά συστατικά. Επίσης, η παρεμποδιστική αυτή επίδραση πιθανόν να οφείλεται και σε δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τον βάκιλο.

Παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *C. acutatum*-Στέλεχος αναφοράς από τον *B. amyloliquefaciens*



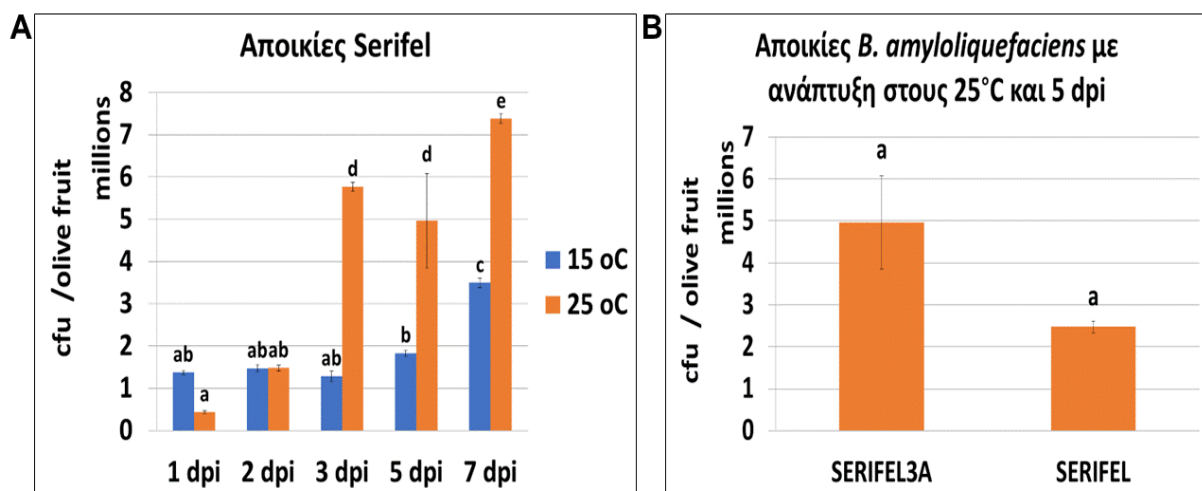
Μάρτυρας 4dpi

B. amyloliquefaciens 4dpi

Εικόνα 44: Αξιολόγηση της ικανότητας του *Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα *C. acutatum*, μέσω παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών στις 4 dpi.

4.9 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *B. AMYLOLIQUEFACIENS* ΣΤΕΛΕΧΟΣ MBI600 ΣΕ ΚΑΡΠΟΥΣ ΕΛΙΑΣ

Στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγράμματα 33A-B) απεικονίζεται η μέτρηση των αποικιών (cfu) του βακτηρίου *B. amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600, που αναπτύχθηκαν πάνω σε καρπούς ελιάς. Η μέτρηση αφορούσε δύο θερμοκρασίες ανάπτυξης (15°C, 25°C), σε 1, 2, 3, 5 και 7 ημέρες μετά την εφαρμογή (dpi) του βιολογικού σκευάσματος Serifel®, μαζί με το υγρό λίπασμα TriaAlfa Essence®, σε καρπούς ελιάς. Το πείραμα περιελάμβανε 3 επαναλήψεις και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα StatGraphics, με βάση τη μέθοδο ANOVA ($p < 0,05$).

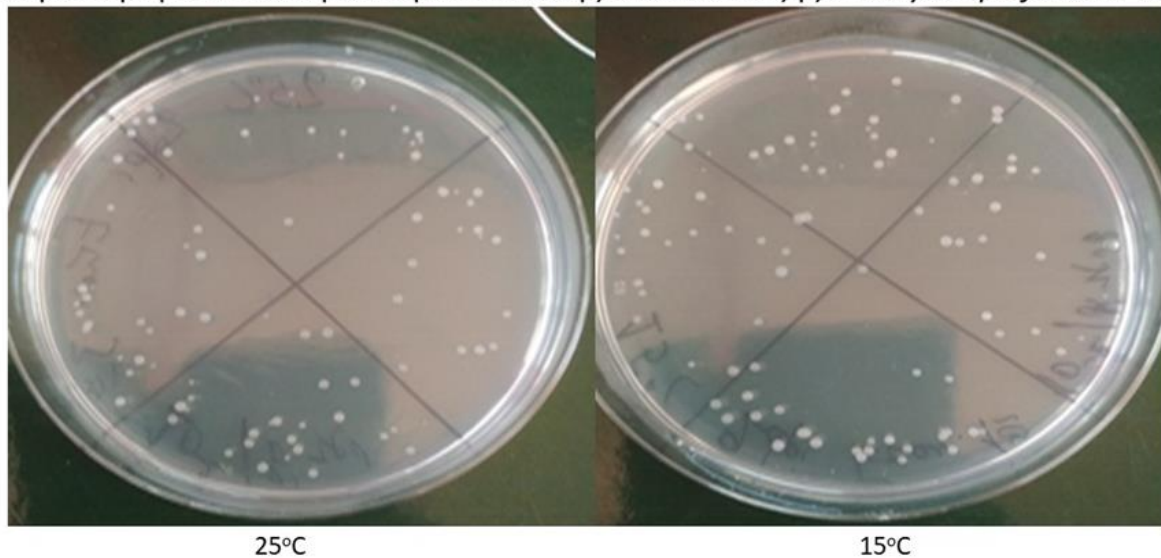


Διαγ. 33A-B: Α) Εγκατάσταση και ανάπτυξη αποικιών του βακίλου *B. amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 παρουσία TriaAlfa Essence® πάνω σε καρπούς ελιάς, υπό την επίδραση δύο θερμοκρασιών, 15°C και 25°C Β) Έλεγχος επίδρασης TriaAlfa Essence® στον πληθυσμό του *B. amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 πάνω σε καρπούς ελιάς, ποικιλίας Κορωνέικη, στους 25°C μετά από 5 μέρες ανάπτυξης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσω της μεθόδου LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις.

Στο διάγραμμα 33A φαίνεται πως ευνοϊκότερη θερμοκρασία είναι αυτή των 25 βαθμών Κελσίου. Στις αρχικές μετρήσεις (1 και 2 μέρες μετά την μόλυνση) δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του πληθυσμού του βακίλου *B. amyloliquefaciens*

στέλεχος MBI600, που αναπτύσσεται στις 2 θερμοκρασιακές συνθήκες (Εικόνα 45). Ωστόσο στις 3dpi, παρατηρείται σημαντική αύξηση του πληθυσμού του βακτηρίου σε θερμοκρασία 25°C η οποία διαφέρει στατιστικά σημαντικά, από τον πληθυσμό σε θερμοκρασία 15°C. Παρόλο που και στις δύο θερμοκρασιακές συνθήκες ο πληθυσμός αυξάνεται σημαντικά με την πάροδο των ημερών η διαφορά μεταξύ των δύο θερμοκρασιών παραμένει σημαντική (7dpi) (Διάγραμμα 33A). Η παρουσία του σκευάσματος TriaAlfa Essence® στους καρπούς ελιάς επιδρά θετικά στην ανάπτυξη του βακτηρίου όπως φαίνεται από τους πληθυσμούς σε θερμοκρασία 25 °C και 5 μέρες μετά την μόλυνση. Ωστόσο η διαφορά στην συγκεκριμένη μέτρηση δεν φαίνεται να διαφέρει σημαντικά (Διάγραμμα 33B).

Διερεύνηση των συνθηκών εγκατάστασης και ανάπτυξης *B. amyloliquefaciens*- 2dpi

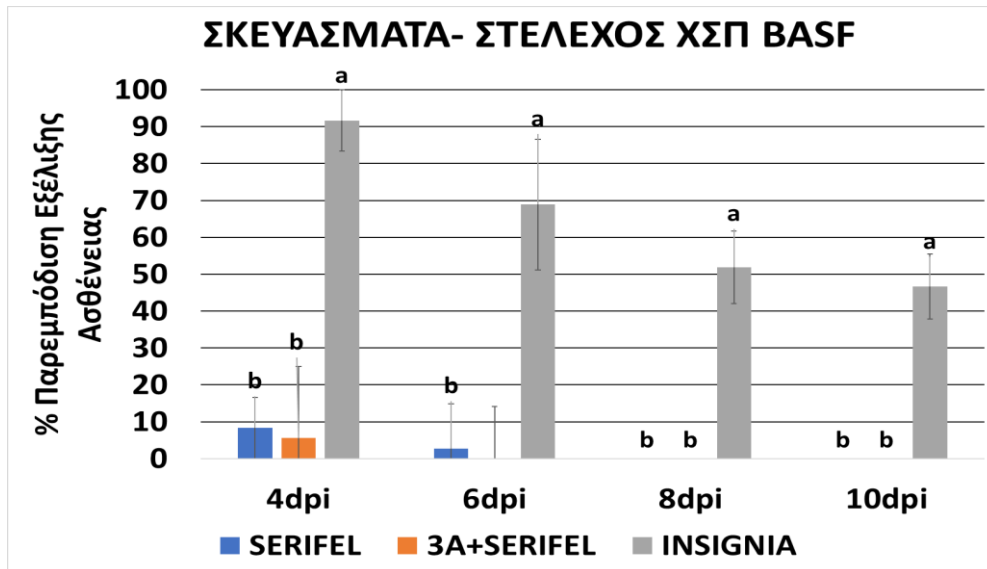


Εικόνα 45: Ενδεικτικές φωτογραφίες από τη διερεύνηση των συνθηκών εγκατάστασης και ανάπτυξης του βακτηρίου *B. amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600, σε καρπούς ελιάς. Η μέτρηση των αποικιών πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, από καρπούς ελιάς που διατηρούνταν σε δύο θερμοκρασίες, 25°C και 15°C αντίστοιχα.

4.10 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ SERIFEL® ΝΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΖΕΙ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΚΟΝΙΔΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *COLLETOTRICHUM NYMPHAEAE* ΣΕ ΚΑΡΠΟΥΣ ΕΛΙΑΣ

Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται η παρεμπόδιση που ασκεί, το βιολογικό σκεύασμα Serifel®, το Serifel® σε συνδυασμό με το υγρό λίπασμα TriaAlfa Essence® και το χημικό σκεύασμα Insignia®, στην ανάπτυξη (Διάγραμμα 34) και κονιδιογένεση (Διάγραμμα 35) του μύκητα *Colletotrichum nymphaeae*. Η παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μύκητα αντιστοιχεί σε αριθμό μολυσμένων ελιών, σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα και η

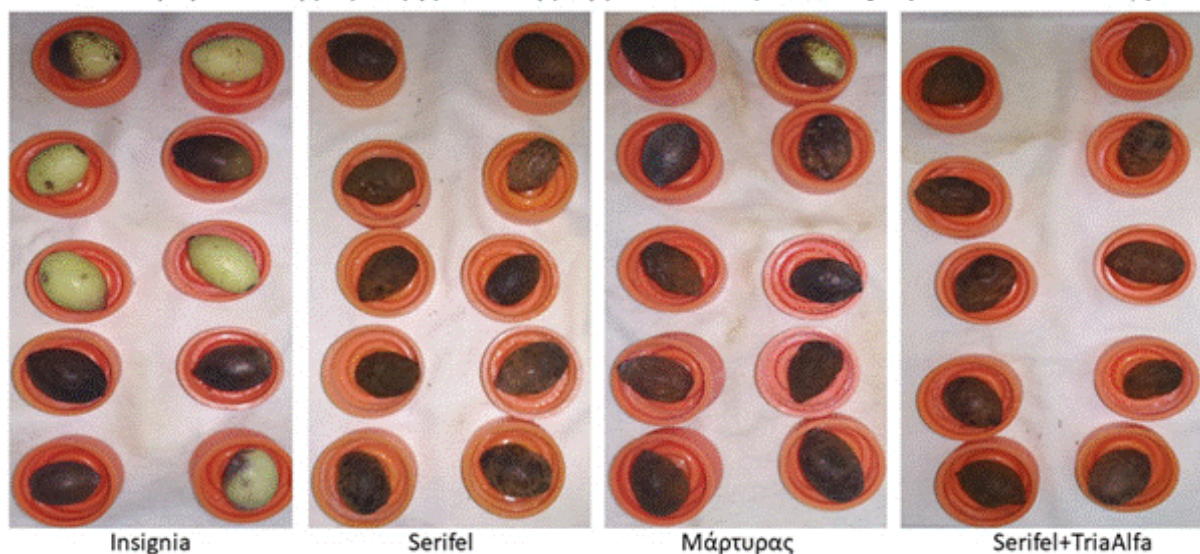
παρεμπόδιση στην κονιδιογένεση εκφράστηκε ως ποσοστό των παραγόμενων κονιδίων, σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα, που μετρήθηκε στη 10^η ημέρα μετά την μόλυνση. Το πείραμα διεξήχθη σε 3 επαναλήψεις και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα StatGraphics, με βάση τη μέθοδο ANOVA ($p < 0,05$).



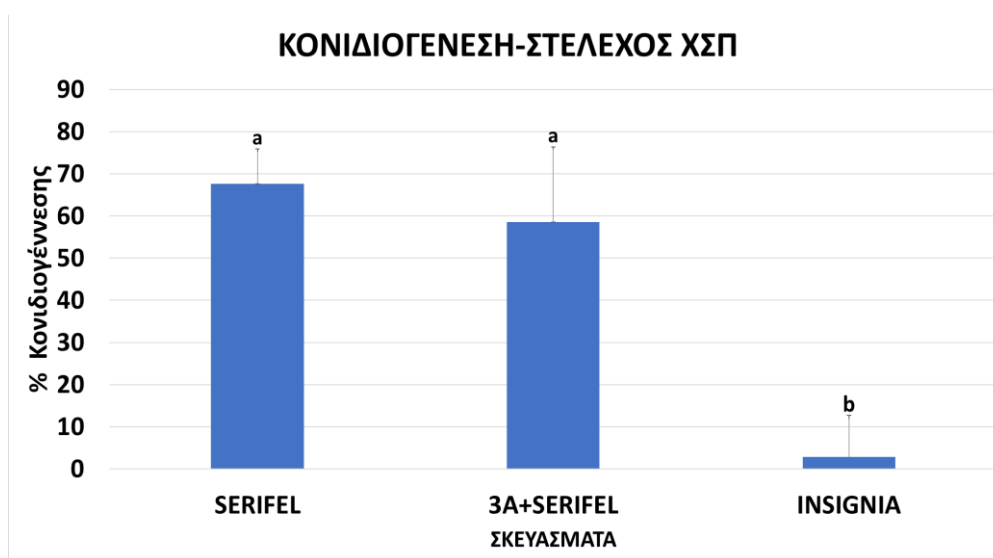
Διάγ. 34: Αξιολόγηση της παρεμπόδισης στην εξέλιξη της ασθένειας, που προκαλεί ο μύκητας *C. nymphaeae*, μετά από εφαρμογή του βιολογικού σκευάσματος Serifel® σε συνδυασμό του με τον παράγοντα TriaAlfa Essence® και το χημικό σκεύασμα Insignia®. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις.

Στο Διάγραμμα 34 απεικονίζεται η αξιολόγηση των σκευασμάτων Insignia®, Serifel® και Serifel®+TriaAlfa®, ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την εξέλιξη της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *C. nymphaeae*- Στέλεχος ΧΣΠ. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως το υψηλότερο επίπεδο παρεμπόδισης προσδίδει το χημικό σκεύασμα Insignia® εμφανίζοντας παρεμπόδιση της ασθένειας 91% σε αρχικά στάδια μόλυνσης (2dpi), που μειώνονται με την πάροδο του χρόνου φτάνοντας σε παρεμπόδιση 46% σε σχέση με τον μάρτυρα, μετά από 10 μέρες από την μόλυνση. Όσον αφορά τις επεμβάσεις με το βιολογικό σκεύασμα, και οι δύο επεμβάσεις (Serifel® και Serifel+TriaAlfa®) προσφέρουν μικρά επίπεδα παρεμπόδισης της ασθένειας σε αρχικά στάδια μόλυνσης (4dpi, 6 dpi). Χαρακτηριστικό είναι ότι οι δύο εφαρμογές με τα βιολογικά σκευάσματα δεν είναι αποτελεσματικές, από την 6 ημέρα μετά τη μόλυνση. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τις φωτογραφίες οι οποίες αναφέρονται στις 10 ημέρες μετά τη μόλυνση και όπου δεν φαίνεται να υπάρχει διαφορά στα συμπτώματα, μεταξύ του μάρτυρα και των βιολογικών εφαρμογών (Εικόνα 46).

Παρεμπόδιση εξέλιξης έντασης της ασθένειας του *C. nymphaeae*- ΧΣΠ-10dpi



Εικ. 46: Αξιολόγηση παρεμπόδισης της εξέλιξης στην ασθένεια που προκαλείται από το στέλεχος του μύκητα *C. nymphaeae*- ΧΣΠ, μετά από εφαρμογή των σκευασμάτων Serifel®, Insignia® και συνδυασμό Serifel®+TriaAlfa®, σε άωρους καρπούς ελιάς ποικιλίας Κορωνέικη.



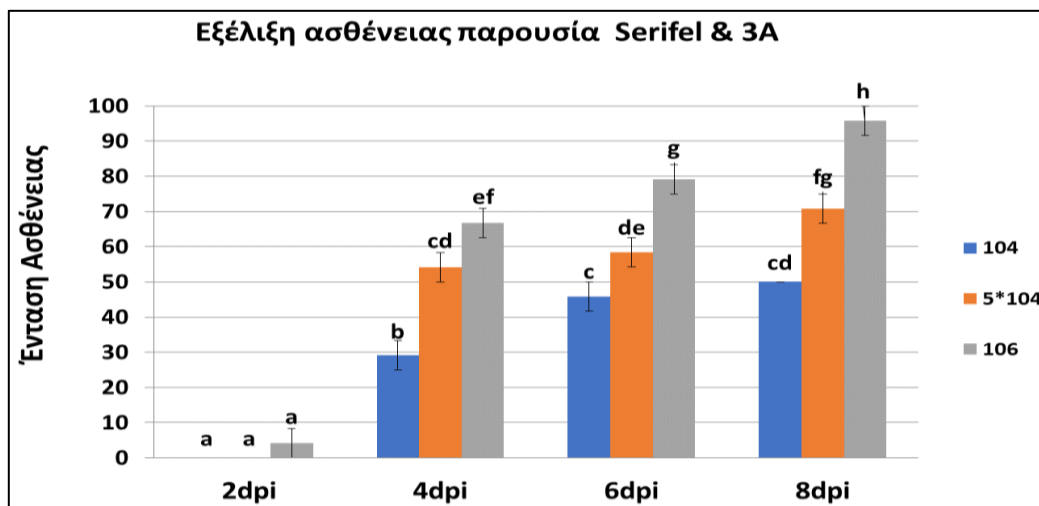
Διάγ.35: Αξιολόγηση της παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του μύκητα *C. nymphaeae*, μετά από εφαρμογή του βιολογικού σκευάσματος Serifel® σε συνδυασμό του με τον παράγοντα TriaAlfa® και το χημικό σκεύασμα Insignia®, τη δέκατη ημέρα μετά τη μόλυνση σε καρπούς ελιάς, σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και τον διαχωρισμό μέσω του υπολογίστηκε με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα της παρεμπόδισης κονιδιογένεσης του παθογόνου και σε αυτήν την περίπτωση το χημικό σκεύασμα Insignia ήταν το αποτελεσματικότερο

εμφανίζοντας 2,9% κονιδιογένεση επί τοις 100% του μάρτυρα (97,1% παρεμπόδιση). Η επέμβαση σε καρπούς ελιάς με το βιολογικό σκεύασμα Serifel® εμφάνισε κονιδιογένεση 67,5% σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ το Serifel® με προσθήκη TriaAlfa® εμφάνισε πιο μειωμένη κονιδιογένεση του παθογόνου μύκητα *C. nymphaeae* (56,6% σε σχέση με το μάρτυρα).

4.11 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ SERIFEL® ΝΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΖΕΙ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΚΟΝΙΔΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *C. ACUTATUM* ΣΕ ΜΙΚΡΟΤΕΡΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΜΟΛΥΣΜΑΤΟΣ

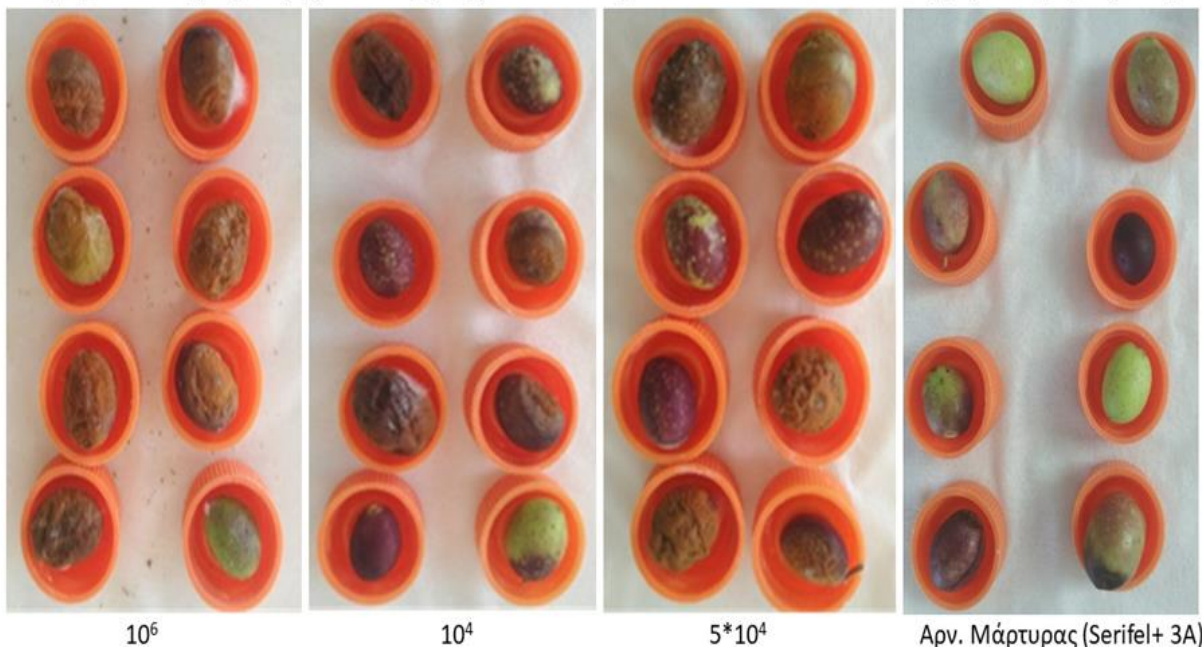
Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται η παρεμπόδιση που ασκεί το βιολογικό σκεύασμα Serifel® σε συνδυασμό με το υγρό λίπασμα TriaAlfa Essence®, στην ανάπτυξη (Διάγραμμα 33) και κονιδιογένεση (Διάγραμμα 34) του μύκητα *Colletotrichum acutatum*-Στέλεχος αναφοράς, σε συγκεντρώσεις μολύσματος μικρότερες από τα 10^6 κονίδια/mL, που προσομοιάζουν καλύτερα την παρουσία αυτού σε φυσικές συνθήκες. Οι συγκεντρώσεις των αιωρημάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η 10^4 και η 5×10^4 κονίδια/mL. Το πείραμα διεξήχθη σε 3 επαναλήψεις και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα StatGraphics, με βάση τη μέθοδο ANOVA ($p < 0,05$).



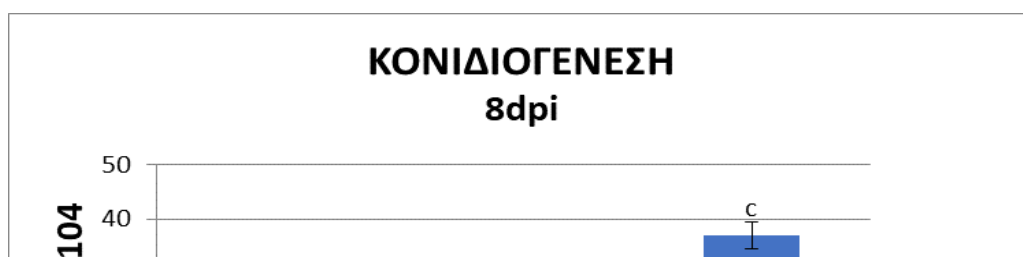
Διαγ. 36: Αξιολόγηση της παρεμπόδισης στην εξέλιξη της ασθένειας, που προκαλεί ο μύκητας *C. acutatum*, σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις μολύσματος, μετά από εφαρμογή του βιολογικού σκευάσματος Serifel® παρουσία του σκευάσματος TriaAlfa Essence® σε καρπούς ποικιλίας Αμφίσσης. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και τον διαχωρισμό μέσων που υπολογίστηκε με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις.

Στο Διάγραμμα 36 φαίνεται ότι όσο πιο μικρή είναι η ποσότητα του εφαρμοζόμενου μολύσματος, τόσο η ασθένεια εξελίσσεται με πιο αργό ρυθμό. Συγκεκριμένα, μετά από μόλυνση με συγκέντρωση 10^4 κονίδια/mL του μύκητα *C. acutatum* το ποσοστό μολυσμένων καρπών κυμάνθηκε από 0 στα 2 dpi έως 50% στα 8 dpi, ενώ μόλυνση με συγκέντρωση 10^6 κονίδια/mL μύκητα *C. acutatum* το ποσοστό μολυσμένων καρπών κυμάνθηκε από 4,2% στα 2 dpi έως 98% στα 8 dpi (Εικόνα 47).

Παρεμπόδιση εξέλιξης έντασης της ασθένειας του *C. acutatum*- Στέλεχος αναφοράς- 8dpi



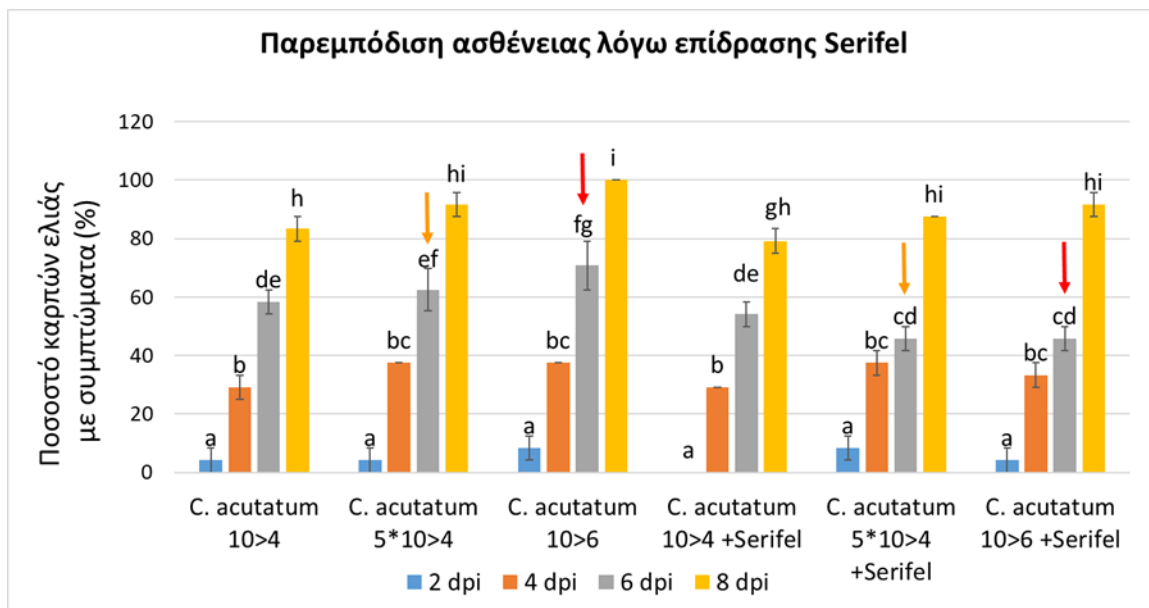
Εικόνα 47: Παρεμπόδιση της εξέλιξης της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *C. acutatum*- Στέλεχος αναφοράς, σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις μολύσματος, μετά από εφαρμογή του βιολογικού σκευάσματος Serifel® σε συνδυασμό με τον παράγοντα TriaAlfa Essence®.



Διαγ.37: Αξιολόγηση της παραγωγής κονιδίων του μύκητα *C. acutatum*, σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις μολύσματος κατά την 8^η μέρα μετά τη μόλυνση, ύστερα από εφαρμογή του βιολογικού σκευάσματος Serifel® και TriaAlfa®. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και τον διαχωρισμό μέσω της μεθόδου LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις.

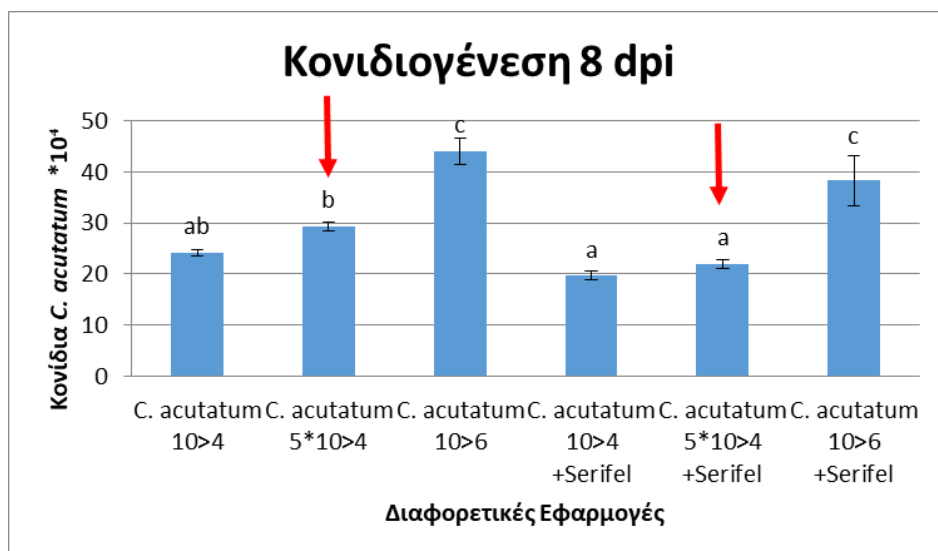
Παρόμοια με την εξέλιξη της ασθένειας στις 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις του μύκητα *C. acutatum*, η κονιδιογένεση του παθογόνου μύκητα μετά από 8 μέρες επώασης ήταν αυξημένη, στην επέμβαση με την εφαρμογή υψηλότερης συγκέντρωσης κονιδίων (Διαγ. 37).

Στη συνέχεια το πείραμα επαναλήφθηκε με τη χρήση μόνο του βιολογικού σκευάσματος Serifel® (50g/100L), χωρίς το υγρό λίπασμα TriaAlfa Essence® σε καρπούς ελιάς ποικιλίας Καλαμών. Οι συγκεντρώσεις μολύσματος του *C. acutatum*- Στέλεχος αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ίδιες με παραπάνω (10^4 , 5×10^4 και 10^6) και η τεχνητή μόλυνση πραγματοποιήθηκε 5 ημέρες μετά την εμβάπτιση των καρπών στον βιολογικό παράγοντα. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα (Διάγραμμα 38 και 39).



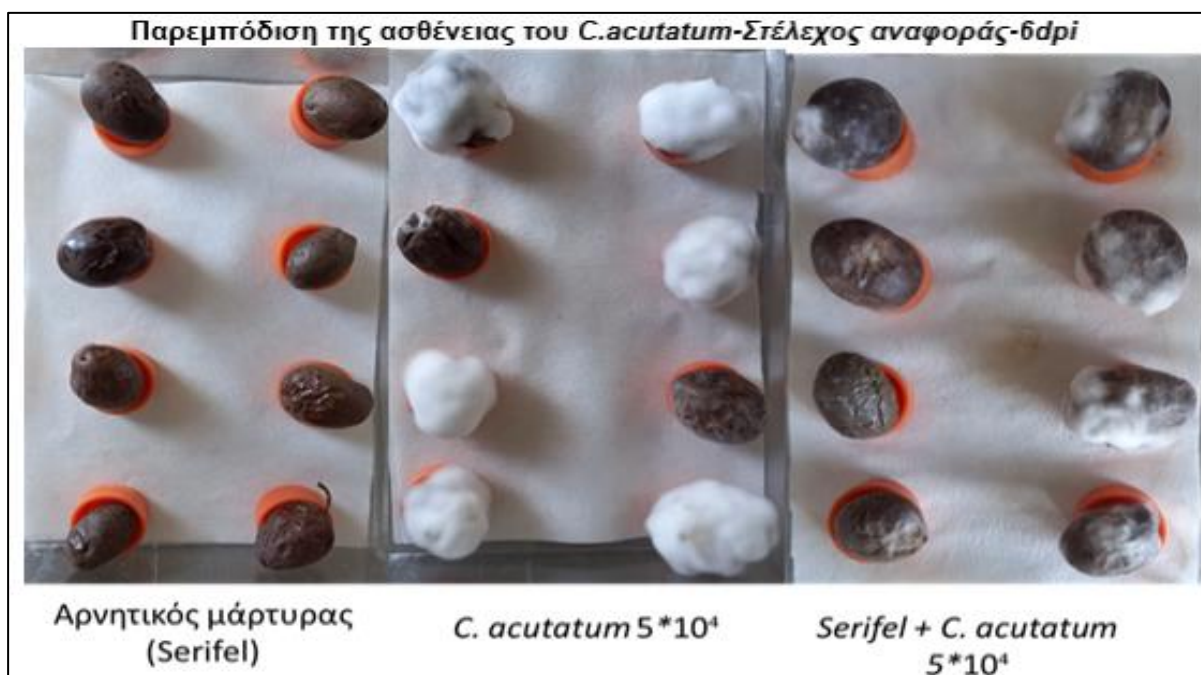
Διαγ.38: Αξιολόγηση της παρεμπόδισης στην εξέλιξη της έντασης της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *C. acutatum*, σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις μολύσματος, μετά από εφαρμογή του βιολογικού σκευάσματος Serifel® σε άωρους καρπούς ποικιλίας Καλαμών. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις.

Στο Διάγραμμα 38 φαίνεται ότι ο χειρισμός με Serifel® μείωσε την ένταση της ασθένειας, σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές και συγκεντρώσεις του παθογόνου. Συγκεκριμένα, μετά από μόλυνση με συγκέντρωση 10^4 κονίδια/mL του μύκητα *C. acutatum* χωρίς χειρισμό με Serifel®, το ποσοστό μολυσμένων καρπών κυμάνθηκε από 4% στα 2 dpi έως 83% στα 8 dpi, ενώ κατά την μόλυνση με συγκέντρωση 10^6 κονίδια/mL του μύκητα το ποσοστό των μολυσμένων καρπών κυμάνθηκε από 8,3% στα 2 dpi έως 100% στα 8 dpi. Όταν είχε προηγηθεί επέμβαση με Serifel®, το ποσοστό των μολυσμένων καρπών μετά από μόλυνση με συγκέντρωση 10^4 κονίδια/mL κυμάνθηκε από 0% στα 2 dpi έως 79% στα 8 dpi, ενώ μετά από μόλυνση με συγκέντρωση 10^6 κονίδια/mL, το ποσοστό μολυσμένων καρπών κυμάνθηκε από 4 % στα 2 dpi έως 91% στα 8 dpi. Επίσης, η εφαρμογή του Serifel® επέφερε στατιστικά σημαντική μείωση της ασθένειας σε σχέση με τον μάρτυρα (από 62,5% ένταση σε 46% παρουσία Serifel®, δηλαδή 26% παρεμπόδιση) στις 6 μέρες μετά την μόλυνση (6 dpi) με εφαρμογή μολύσματος 5×10^4 κονίδια/mL (Εικόνα 48). Παρόμοια και στη συγκέντρωση μολύσματος 10^6 κονίδια/mL, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ασθένειας σε σχέση με τον μάρτυρα (από 70,8% ασθένεια σε 45,8% παρουσία Serifel®, δηλαδή 41% παρεμπόδιση) στις 6 μέρες μετά την μόλυνση (6 dpi).



Διαγ.39: Αξιολόγηση της παρεμπόδισης στην κονιδιογένεση του μύκητα *C. acutatum*, σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις μολύσματος, μετά από εφαρμογή του βιολογικού σκευάσματος Serifel®, την 8^η μέρα μετά τη μόλυνση. Διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων όπως υπολογίστηκε με την μέθοδο ANOVA και διαχωρισμό μέσων με τη μέθοδο LSD (Fisher's least significant difference, LSD) με $P < 0,05$. Οι γραμμές σφάλματος υπολογίστηκαν με βάση 3 επαναλήψεις.

Όσον αφορά την παρεμπόδιση στην κονιδιογένεση του μύκητα, η εφαρμογή του Serifel® μείωσε στατιστικά σημαντικά την παραγωγή κονιδίων στην συγκέντρωση μολύσματος 5×10^4 κονίδια/mL, κατά την μέτρηση που πραγματοποιήθηκε στις 8 μέρες μετά τη μόλυνση (Διάγραμμα 39).



Εικόνα 48: Παρεμπόδιση στην ένταση της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *C. acutatum*- Στέλεχος αναφοράς στις 6 dpi σε συγκέντρωση 5×10^4 κον/mL, μετά από εφαρμογή του βιολογικού σκευάσματος Serifel®.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ-ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗ

Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης εστάλησαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, δείγματα ταξιανθιών και καρπών ελιάς από διάφορες ελαιοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας, με σκοπό την απομόνωση στελεχών *Colletotrichum* spp., τη μελέτη της πληθυσμιακής διακύμανσης τους, όπως και τη δημιουργία μιας εμπεριστατωμένης εικόνας του προβλήματος εξάπλωσης των παθογόνων *Colletotrichum* spp. Οι περιοχές από όπου προέρχονταν τα δείγματα ήταν η Εύβοια, η Κρήτη, η Μεσσηνία, η Αχαΐα, η Ηλεία και η Αιτωλ/νία. Τα δείγματα περιελάμβαναν υγιείς φυτικούς ιστούς (ταξιανθίες, καρπίδια, καρπούς, βλαστούς), αλλά και συμπτωματικούς, με μεταχρωματισμούς και αλλοιωμένες περιοχές. Μόλις λαμβάνονταν τα δείγματα ακολουθούσε η πειραματική διαδικασία απομόνωσης των παθογόνων. Από το σύνολο των δειγμάτων, σε 10 δείγματα απομονώθηκαν στελέχη των οποίων το χρώμα της αποικίας και η μορφολογία των κονιδίων προσομοίαζαν με αυτά των *Colletotrichum* spp. Αυτά αφορούσαν τις περιοχές: Ίκλαινα Μεσσηνίας (Δ5.1, Δ4.3), Χώρα Μεσσηνίας (ΧΣΠ), Κεφαλόβρυσου Αιτωλοακαρνανίας (ΝΜ), Ζαχάρω Ηλείας (Δ6.4), Εύβοια (Εύβοια 6), Κρήτη (Μεσκλά 1, Ζυμβράγο 2, Ορεινό άνθη, Ζυμβράγο άνθη) (Πίνακας 7).

Στη συνέχεια, κατά τη διαδικασία αλληλούχισης, τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους φυτικούς ιστούς της ελιάς ταυτοποιήθηκαν ως εξής: Μεσκλά 1 σε ποσοστό 97% ως *Colletotrichum acutatum*, Δ6.4 σε ποσοστό 98% ως *C. acutatum*, Δ5.1 σε ποσοστό 98,26% ως *C. acutatum*, Δ4.3 σε ποσοστό 98% ως *C. acutatum*, ΝΜ σε ποσοστό 98% ως *C. acutatum*, ΧΣΠ σε ποσοστό 99% ως *C. nymphaeae*, Ζυμβράγο άνθη σε ποσοστό 84% ως *C. coelogyne*, Εύβοια 6 σε ποσοστό 84% ως *C. ignotum* ή ως *Fusarium neocosmosporiellum* σε ποσοστό 84%, Ζυμβράγο 2 σε ποσοστό 82% ως *F. neocosmosporiellum* και Ορεινό άνθη σε ποσοστό 91% ως *Fusarium keratoplasticum* ή ως *F. neocosmosporiellum* σε ποσοστό 89% (Πίνακας 8). Οι φυτικοί ιστοί από τους οποίους απομονώθηκαν τα παθογόνα *Colletotrichum* spp. περιελάμβαναν άνθη, άωρους καρπούς και καρπούς προς την ωρίμανση. Έτσι είναι εμφανές ότι ο μύκητας είναι παρών από το στάδιο της άνθησης, συμφωνώντας με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ότι ο *C. acutatum sensu lato (s.l.)* όπως και ο *C. gloeosporioides s.l.*, μπορούν να είναι παρόντες στον κάλυκα, στα πέταλα, στους στήμονες και στον ύπερο (Iliadi M. et al., 2018, Sergeeva V. et al., 2008). Επίσης, απομόνωση του παθογόνου πραγματοποιήθηκε και από κορυφαίο μερίστωμα ελιάς (οφθαλμοί) στο δείγμα Δ6.4, γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ότι ο μύκητας μπορεί να είναι παρών

σε όλα τα μέρη του δένδρου (Talhinhas P. et al., 2011). Ακόμη, κατά τη διαδικασία αλληλούχισης μέρους των στελεχών που απομονώθηκαν, προέκυψε ότι 4 στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *Colletotrichum acutatum* (Δ6.4, Δ4.3, NM, Δ5.1) και 1 ως *Colletotrichum nymphaeae* (ΧΣΠ), που ανήκει στο σύμπλοκο ειδών του *C. acutatum*. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που καταδεικνύουν τον *C. acutatum* ως το κύριο παθογόνο αίτιο της ασθένειας του Γλοιοσπορίου, στους ελαιώνες της Ελλάδος (Iliadi M. et al., 2018, Kolainis S. et al., 2020).

Τέλος, όσον αφορά τις απομονώσεις που ταυτοποιήθηκαν ως *Fusarium* spp., μπορεί να ειπωθεί ότι η ταυτοποίηση αυτή ίσως οφείλεται σε τεχνικό λάθος κατά την προετοιμασία τους, πριν την αποστολή για αλληλούχιση. Διότι όπως φαίνεται στον Πίνακα 8, τα ζεύγη βάσεων που αλληλουχίστηκαν είναι λίγα σε αριθμό. Από την άλλη όμως, σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη μύκητες του γένους *Fusarium* αναγνωρίστηκαν ως παθογόνα της ελιάς (Markakis E.A. et al., 2021).

5.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *COLLETOTRICHUM ACUTATUM* ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ RT-PCR ΤΑQΜΑΝ PROBE

Η ασθένεια του Γλοιοσπορίου της ελιάς, που προκαλείτε από τους μύκητες *Colletotrichum* spp, εκδηλώνεται περισσότερο στους ώριμους καρπούς (Mungai L. et al., 1993, Schena L. et al., 2014) και η μέγιστη ένταση της συνδέεται με τις καιρικές συνθήκες του φθινοπώρου (Talhinhas P. et al., 2011). Όταν οι ώριμοι καρποί απουσιάζουν, οι μύκητες *Colletotrichum* spp. είναι ικανοί να επιβιώνουν πάνω στα φύλλα και στους βλαστούς της ελιάς, με τη βοήθεια κονιδίων που βρίσκονται σε κατάσταση ληθάργου (Talhinhas P. et al., 2011). Επίσης, όπως προαναφέρθηκε παραπάνω οι μύκητες μπορούν να είναι παρόντες στον κάλυκα, στα πέταλα, στους στήμονες και στον ύπερο, κατά την άνθηση (Sergeeva V. et al., 2008, Iliadi M. et al., 2018). Έχει αποδειχτεί λοιπόν ότι οι μύκητες μπορούν να είναι παρόντες και να έχουν αποικίσει τους διάφορους ιστούς του ελαιόδενδρου, καθ' όλη τη διάρκεια του έτους και πριν από την εκδήλωση των συμπτωμάτων. Έτσι, υπάρχει επιτακτική ανάγκη για έγκαιρη και ακριβή ανίχνευση των παθογόνων, προκειμένου να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά.

Με την μοριακή μέθοδο RT-PCR TaqMan probe (Schena L. et al., 2017) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, είναι δυνατή η ανίχνευση του μύκητα *Colletotrichum acutatum* με ακρίβεια και από διάφορους φυτικούς ιστούς της ελιάς. Πιο συγκεκριμένα, από το σύνολο των δειγμάτων που αναλύθηκαν ο μύκητας ανιχνεύθηκε σε 5 δείγματα ανθών, τα οποία προέρχονταν από τα Λουτρά Ρεθύμνου, τον Αγ. Μύρωνα

Ηρακλείου, το Άδελε Ρεθύμνου, το Ζυμβράγο Χανίων και τον Βιάννο Ηρακλείου (Πίνακας 9). Η κλασική μέθοδος απομόνωσης ήταν ικανή να ανιχνεύσει τον μύκητα σε 1 δείγμα, καταδεικνύοντας έτσι τη μεγαλύτερη έκταση του προβλήματος εξάπλωσης του παθογόνου, όπως και την μεγαλύτερη ακρίβεια της μοριακής μεθόδου. Επίσης, η ποσότητα του ολικού DNA των ιστών ελιάς που χρησιμοποιήθηκε στην RT-PCR TaqMan probe αντίδραση ήταν μόλις 7ng/μL, πράγμα που σημαίνει ότι είναι δυνατή η ανίχνευση του μύκητα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις μολύσματος, ακόμα και πριν την εκδήλωση των συμπτωμάτων.

Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα και στην RT-PCR TaqMan probe αντίδραση, κατά την οποία αναλύθηκαν δείγματα καρπιδίων και καρπών. Σε αυτήν, ο μύκητας ανιχνεύθηκε σε 7 δείγματα τα οποία προέρχονταν από το Βλαχόπουλο Μεσσηνίας (Δείγμα 1, Δείγμα 3 και Ζωντανός Γιάννης), την Κυπαρισσία Μεσσηνίας (Αποδεικτικός BASF), την Ίκλαινα Μεσσηνίας (Αποδεικτικός BASF), την Χώρα Μεσσηνίας (Συγκριτικός Παραγωγού) και το Κεφαλόβρυσο Αιτωλοακαρνανίας (Νικολόπουλος) (Πίνακας 10), ενώ με την κλασική μέθοδο ο μύκητας απομονώθηκε μόνο σε δύο δείγματα. Έτσι φανερώνεται η μεγαλύτερη ευαισθησία της μοριακής μεθόδου και αποτυπώνεται σε μεγαλύτερη έκταση ο βαθμός εξάπλωσης του παθογόνου. Επιπροσθέτως, στα Δείγματα 1 και 3 (Πίνακας 10), η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε από καρπίδια ελιάς, γεγονός που σημαίνει ότι ο μύκητας είναι παρών και κατά το στάδιο της καρπόδεσης. Η γνώση αυτή είναι πολύ σημαντική για την κατανόηση της επιδημιολογίας του μύκητα, αλλά και για την έγκαιρη και αποτελεσματική αντιμετώπιση της ασθένειας που προκαλεί. Επίσης, επιβεβαιώνονται προηγούμενες μελέτες στις οποίες προτείνεται να πραγματοποιούνται δύο χημικές επεμβάσεις καταπολέμησης, μία πριν την άνθηση και μία κατά την έναρξη της καρπόδεσης, προκειμένου να μειωθεί το φορτίο μολύσματος, το φθινόπωρο (Roca L.F. et al., 2007, Cacciola S.O. et al., 2012).

5.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΝΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΚΗΤΩΝ COLLETOTRICHUM SPP.

Απο τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των χημικών σκευασμάτων, της ανθεκτικότητας στελεχών *Colletotrichum* spp. και τον καθορισμό της EC₅₀ των δραστικών ουσιών, δείχθηκε ότι το χημικό σκεύασμα Insignia® (δ.ο. pyraclostrobin, χημική ομάδα στρομπιλουρινών) παρουσιάστηκε πολύ αποτελεσματικό, καθώς επέφερε πολύ υψηλά ποσοστά παρεμπόδισης στην βλάστηση των κονιδίων, όλων των στελέχων που ελέγχθηκαν, όπως και του στέλεχος αναφοράς *C. acutatum*. Το χημικό σκεύασμα Revyona® (δ.ο. mefentrifluconazole ή Revysol, χημική ομάδα τριαζολών) ήταν πολύ δραστικό, στην

παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης, από τις χαμηλότερες δόσεις και δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην παρεμπόδιση με αύξηση της δόσης (dose response). Συγκεκριμένα, στα 1,5 ppm και μετά από 8 μέρες ανάπτυξης, η παρεμπόδιση από το Revysol® κυμαίνονταν από 43-82% ενώ στα 30 ppm κυμαίνονταν από 58-91%. Εξάριεση αποτέλεσαν τα μέτρια ποσοστά παρεμπόδισης του στελέχους Ζυμβράγο άνθη (36% την 6dpi στα 1,5 ppm και 57% στην 8 dpi στα 30 ppm) (Διάγραμμα 5) και τα χαμηλά ποσοστά του στελέχους Ορεινό άνθη (21% στα 1,5 ppm και 32% στα 30 ppm) (Διάγραμμα 14). Η μειωμένη ευαισθησία που επέδειξαν τα στελέχη αυτά, πιθανόν να οφείλεται στην εφαρμογή άλλων σκευασμάτων, με παρόμοιο μηχανισμό δράσης, στις περιοχές προέλευσης τους. Το χαλκούχο σκεύασμα Nordox® (δ.ο. copper oxide), που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, λόγω της ευρείας χρήσης του στην καλλιέργεια της ελιάς, εμφάνισε χαμηλή παρεμπόδιση στην μυκηλιακή αύξηση (0,6-11,8% στα 5 ppm και 2,4 - 48,1% στα 240 ppm). Σε προηγούμενη έρευνα χαλκούχα μυκητοκτόνα αποδείχτηκαν λιγότερο αποτελεσματικά στην παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης μυκήτων *Colletotrichum* spp., από σκευάσματα της χημικής ομάδας των τριαζολών (difeconazole, flusilazole), όπου επέφεραν παρεμπόδιση έως 80% στην χαμηλότερη δόση των 5 ppm, σε απομονώσεις μυκήτων *Colletotrichum* spp (Moral J. et al., 2018).

Όσον αφορά την ανάλυση της EC_{50} (Διάγ. 25Α-Γ), το στέλεχος Μεσκλά 1 εμφάνισε την μεγαλύτερη ευαισθησία στο χημικό σκεύασμα Nordox® που αξιολογήθηκε στην παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης, με τιμή EC_{50} να είναι 0,42 mg/mL. Η απομόνωση Εύβοια 6 παρουσίασε την μεγαλύτερη ευαισθησία στο Revysol®, με τιμή $9,42 \times 10^{-5}$ pg/mL. Ενώ το στέλεχος αναφοράς *C. acutatum* παρουσίασε την μεγαλύτερη ευαισθησία στο Insignia®, που αξιολογήθηκε για την παρεμπόδιση της βλαστικότητας και εμφάνισε τιμή EC_{50} 0,20 ng/mL. Ειδική αναφορά γίνεται για την απομόνωση Ορεινό άνθη, όπου παρουσίασε πολύ μεγάλη ανθεκτικότητα στο χημικό σκεύασμα Nordox®, με τιμή $6,95 \times 10^{196}$ mg/mL (Διάγραμμα 26). Επίσης, η συγκεκριμένη απομόνωση παρουσίασε υψηλή ανθεκτικότητα και στα άλλα δύο χημικά σκευάσματα, με τιμές $1,14 \times 10^{10}$ pg/mL (11.400 ppm) για το Revysol®, που ήταν και η υψηλότερη από όλες τις υπόλοιπες απομονώσεις και 630 ng/mL για το Insignia®, που ήταν η δεύτερη υψηλότερη. Οι Moral J. et al., 2018 στα αποτελέσματα των δοκιμών τους υπολόγισαν δόσεις EC_{50} στα 7,01 με 107,49 ppm (7.000-107.490 ng/ml) για την δ.ο. Kresoxim-methyl (στρομπιλουρίνη) στην παρεμπόδιση βλαστικότητας, $EC_{50}=0,2$ ppm (200 ng / ml) για την δ.ο. tebuconazole (τριαζόλη) και $247,2 \leq EC_{50} \leq 374,4$ ppm για χαλκούχα σκευάσματα, στην παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης.

Με βάση τον δείκτη ανθεκτικότητας Rf που υπολογίστηκε (λόγος των EC₅₀ των υπό μελέτη στελεχών προς την EC₅₀ του στελέχους αναφοράς) (Διάγραμμα 27Α-Γ), φαίνεται ότι μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας διατρέχει το Revyona®, που εμφάνισε τον πιο υψηλό δείκτη (από 0,027 έως 8,33x10⁸). Το Insignia® παρά την γενικευμένη χρήση, του δεν εμφάνισε υψηλό δείκτη ανθεκτικότητας (από 8,5 έως 32,5). Ενώ το Nordox® εμφάνισε δείκτη ανθεκτικότητας από 0,0003 έως 4,87x10¹⁹³. Θα πρέπει ωστόσο να αναφερθεί ότι οι EC₅₀ και Rf στα πλαίσια της παρούσας εργασίας υπολογίστηκαν με υψηλές τιμές παρεμπόδισης ~80-90%. Για μεγαλύτερη ακρίβεια οι δείκτες αυτοί θα πρέπει να εκτιμηθούν και χαμηλότερες συγκεντρώσεις δ.ο.

Όσον αφορά το πείραμα μυκοτοξικότητας σε καρπούς ελιάς, ποικιλίας Αμφίσσης, η δ.ο. pyraclostrobin (χημικό σκεύασμα Insignia®) είναι η πιο αποτελεσματική ως προς την παρεμπόδιση της έντασης της ασθένειας, που προκαλεί ο μύκητας *C. acutatum* στέλεχος Δ4.3 στους καρπούς ελιάς, παρέχοντας προστασία της τάξης του 92%, ακόμα και την 8^η ημέρα μετά την μόλυνση. Η δραστική ουσία mefentrifluconazole ή Revysol® (χημικό σκεύασμα Revyona®) επίσης παρουσιάζει πολύ καλή αποτελεσματικότητα, διατηρώντας υψηλά ποσοστά παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μύκητα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, παραμένοντας στο 83% κατά την 8^η ημέρα μετά την μόλυνση. Όσον αφορά το Nordox® (δ.ο. copper oxide), η προστασία που παρείχε κυμάνθηκε σε μέτρια επίπεδα (Διάγραμμα 29). Παρόμοια αποτελέσματα σημειώθηκαν και κατά την μέτρηση παρεμπόδισης της βλαστικότητας κονιδίων, όπου, η δ.ο. pyraclostrobin (χημικό σκεύασμα Insignia®) εμφάνισε ποσοστό κονιδιογένεσης 1% (99% παρεμπόδιση), η δραστική ουσία mefentrifluconazole ή Revysol® (χημικό σκεύασμα Revyona®) κατέγραψε ποσοστό 7% (93% παρεμπόδιση) και το Nordox® (δ.ο. copper oxide) 34% (66% παρεμπόδιση) (Διάγραμμα 30). Σε πρόσφατη παρόμοια δοκιμή, οι ερευνητές είχαν παρατηρήσει παρεμπόδιση στην ανάπτυξη της ασθένειας, από τις δ.ο. tebuconazole και trifloxystrobin, 40 φορές μεγαλύτερη από του μάρτυρα (Moral J. et al., 2018).

Η ασθένεια του Γλοιοσπορίου στην ελιά παρουσιάζει δυσκολίες ως προς την αντιμετώπιση της και απαιτεί συνδυασμό καλλιεργητικών πρακτικών, χημικών επεμβάσεων ή χρήση βιολογικών παραγόντων. Η χημική καταπολέμηση της ασθένειας πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση χαλκούχων μυκητοκτόνων (Talhinhas P. et al., 2018). Όμως οι επεμβάσεις με χαλκούχα μυκητοκτόνα μπορεί να καταστούν αναποτελεσματικές, λόγω ανάπτυξης ανθεκτικότητας, έκπλυσης από τις βροχοπτώσεις και επίσης μπορεί να έχουν αρνητικές επιδράσεις λόγω συσσώρευσης ιόντων Cu²⁺ στο χώμα και στο νερό (Komárek M.

et al., 2010). Επίσης, από τις υπόλοιπες χημικές ομάδες μόνο τα διθειοκαρβαμιδικά (ziram), τα τριαζολικά (hexaconazole, tebuconazole) και οι στρομπιλουρίνες (azoxystrobin, trifloxystrobin) μπορούν να είναι αποτελεσματικά έναντι της ασθένειας, όμως όλα τους πρέπει να χρησιμοποιούνται σε ένα προληπτικό σχήμα (Pennisi et al., 1993, Sergeeva, 2011, Moral J. et al., 2014, Leoni et al., 2018). Επιπροσθέτως, στις περισσότερες ελαιοπαραγωγικές χώρες μόνο μια-δύο δ.ο. έχουν έγκριση για την καλλιέργεια της ελιάς (Malavolta C., Perdakis D., 2012). Τέλος, βάσει αυτής αλλά και προγενέστερων μελετών (Moral J. et al., 2018), χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση της ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν οι μύκητες *Colletotrichum* spp. στα χαλκούχα μυκητοκτόνα, όπως επίσης κρίνεται αναγκαία η χρησιμοποίηση μυκητοκτόνων από διαφορετικές χημικές ομάδες, για την αντιμετώπιση της ασθένειας στην ελιά.

5.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ SERIFEL® (*BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* ΣΤΕΛΕΧΟΣ MBI600) ΝΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΖΕΙ ΜΥΚΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *COLLETOTRICHUM IN VITRO* ΚΑΙ ΣΕ ΚΑΡΠΟΥΣ ΕΛΙΑΣ

Είναι αποδεδειγμένο ότι η χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον. Η χρήση βιολογικών παραγόντων για την καταπολέμηση των ασθενειών των καλλιεργούμενων φυτών βρίσκεται στο επίκεντρο της έρευνας, ως μια πολλά υποσχόμενη λύση για τον περιορισμό των χημικών φυτοπροστατευτικών και των αρνητικών τους επιπτώσεων. Για την καλλιέργεια της ελιάς και την αντιμετώπιση της ασθένειας του Γλοιοσπορίου η ανάγκη εξεύρεσης φιλικότερων, προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον, τρόπων καταπολέμησης γίνεται πιο επιτακτική λόγω της επιδημιολογίας του μύκητα, όπου όπως έχει αποδειχθεί πλήττει περισσότερο τους καρπούς κατά την ωρίμανση (Moral J. et al., 2014, Talhinhos P. et al., 2018). Έτσι η χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών για την αντιμετώπιση της ασθένειας πραγματοποιείται πριν την συγκομιδή, με κίνδυνο την εμφάνιση υπολειμμάτων Φ.Π. στα παραγόμενα προϊόντα. Το πρόβλημα γίνεται ακόμα μεγαλύτερο λόγω του ότι, δεν υπάρχουν ακόμα εμπορικά βιολογικά σκευάσματα που να χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση του Γλοιοσπορίου της ελιάς (Leoni C. et al., 2018).

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του βιολογικού σκευάσματος Serifel® (*Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600), περιλαμβάνοντας αρχικά *in vitro* πειράματα ανταγωνιστικότητας. Σε αυτά καταγράφηκε ότι ο βάκιλος παρεμποδίζει την μυκηλιακή αύξηση του μύκητα στο τρυβλίο, σε ποσοστό μέχρι και 50% (Διάγραμμα 31,

Εικόνα 42). Στη συνέχεια των *in vitro* πειραμάτων ανταγωνιστικότητας, καταγράφηκε ότι ο βάκιλος παρεμποδίζει την μυκηλιακή αύξηση του μύκητα μέχρι και 30%, μέσω πτητικών ενώσεων που παράγει (Διάγραμμα 32, Εικόνα 43). Επίσης, ο βάκιλος φάνηκε να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μύκητα και μέσω της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών (Εικόνα 44). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, με διαφορετικά στελέχη όμως του *Bacillus amyloliquefaciens*. Σε αυτές αναφέρεται ότι ο *B. amyloliquefaciens* απομόνωση CNU114001 παρεμπόδισε την μυκηλιακή αύξηση του *Colletotrichum acutatum* σε *in vitro* πειράματα ανταγωνιστικότητας, κατά 62,74%(Hyun Ji S. et al., 2013), αλλά και επίσης ότι ο βάκιλος παράγει διάφορες ενώσεις (λιποπεπτίδια και αντιβιοτικά) που παρουσιάζουν ανταγωνιστικές ιδιότητες εναντίον των παθογόνων των φυτών (Shafi J. et al., 2017).

Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν οι συνθήκες εγκατάστασης και ανάπτυξης του *Bacillus amyloliquefaciens* στέλεχος MBI600 σε καρπούς ελιάς. Μαζί με τον βάκιλο εφαρμόστηκε και το υγρό λίπασμα TriaAlfa Essence®, που πιστεύεται ότι βοηθάει την καλύτερη εγκατάσταση και ανάπτυξη του βακίλου πάνω στον ελαιόκαρπο. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση του βακίλου (Serifel®) εντοπίζεται στους 25°C την 7^η μέρα μετά την εφαρμογή του (Διάγραμμα 33A). Ωστόσο, ήδη από την 3^η μέρα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του πληθυσμού στους καρπούς. Κατά την επώαση στους 15°C, σημαντική αύξηση του πληθυσμού του βακτηρίου παρατηρήθηκε στις 5 dpi και κυρίως στις 7 dpi, χωρίς να φτάσει τα επίπεδα πληθυσμού που παρατηρήθηκαν στις 25°C (Διάγραμμα 33A). Στην βιβλιογραφία, από όσο γνωρίζουμε δεν έχει ξαναπραγματοποιηθεί παρόμοιο πείραμα αποικισμού σε καρπούς ελιάς, ωστόσο αναφέρεται ότι γενικά η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *B. amyloliquefaciens* στέλεχος ATCC 23350, κυμαίνεται μεταξύ 30-40°C και ότι η ανάπτυξη αναστέλλεται κάτω από τους 15°C και πάνω από τους 50 °C (Priest F.G. et al.,1987). Επίσης, από το πείραμα φάνηκε ότι η παρουσία του σκευάσματος TriaAlfa Essence® στους καρπούς ελιάς επιδρά θετικά στην ανάπτυξη του βακίλου, όπως φαίνεται από τους πληθυσμούς σε θερμοκρασία 25°C και 5 μέρες μετά την μόλυνση. Αυτό ίσως συνέβει επειδή ευνοείται από την ύπαρξη οργανικής ουσίας στο σκεύασμα, χρησιμοποιώντας τη ως πηγή άνθρακα. Ωστόσο η διαφορά στην συγκεκριμένη μέτρηση δεν φαίνεται να διαφέρει σημαντικά (Διάγραμμα 33B).

Στη συνέχεια των πειραμάτων, το Serifel® αξιολογήθηκε ως προς την ικανότητα του να παρεμποδίζει την εξέλιξη έντασης της ασθένειας και την κονιδιογένεση που προκαλείται από τον μύκητα *C. nymphaeae* (ανήκει στο σύμπλοκο ειδών του *C. acutatum*), σε καρπούς ελιάς ποικιλίας Κορωνέικη. Το Serifel® εφαρμόστηκε μόνο του, αλλά και σε συνδυασμό με

το υγρό λίπασμα TriaAlfa Essence® και επίσης στη δοκιμή χρησιμοποιήθηκε και το χημικό σκεύασμα Insignia® (δ.ο. pyraclostrobin). Η συγκέντρωση μολύσματος του μύκητα που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα 10^6 κονίδια/mL. Από τα αποτελέσματα της δοκιμής φαίνεται ότι το χημικό σκεύασμα Insignia® ήταν το πιο αποτελεσματικό, όπως ήταν αναμενόμενο σαν χημικό. Οι επεμβάσεις με το Serifel® και το Serifel® με το TriaAlfa Essence® προσέφεραν μικρά επίπεδα προστασίας μόνο τις πρώτες μέρες μετά την τεχνητή μόλυνση (2 και 4dpi) και δεν ήταν αποτελεσματικές από την 6^η ημέρα και μετά (Διάγραμμα 34, Εικόνα 46). Επίσης, το υγρό λίπασμα TriaAlfa Essence® δεν φάνηκε να ευνοεί την ανάπτυξη του βράκιλου. Όσον αφορά την κονιδιογένεση, το χημικό σκεύασμα ήταν και πάλι το πιο αποτελεσματικό. Οι επεμβάσεις με το Serifel® και το Serifel® με το TriaAlfa Essence® μείωσαν την κονιδιογένεση σε ποσοστό 32,5% και 43,4% αντίστοιχα (Διάγραμμα 35). Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι η πολύ χαμηλή αποτελεσματικότητα που επέδειξε το βιολογικό σκεύασμα ίσως οφείλεται στη μεγάλη συγκέντρωση μολύσματος που εφαρμόστηκε, στον ελαιόκαρπο, κατά τη διεξαγωγή του πειράματος.

Για να διερευνηθεί το κατά πόσο η μεγάλη συγκέντρωση μολύσματος επηρέασε την αποτελεσματικότητα του Serifel®, πραγματοποιήθηκαν άλλες δύο δοκιμές όπου χρησιμοποιήθηκαν, εκτός από την συγκέντρωση μολύσματος 10^6 κονίδια/mL, μικρότερες συγκεντρώσεις που προσομοιάζουν καλύτερα στις φυσικές συνθήκες (10^4 και 5×10^4 κονίδια/mL). Στην πρώτη δοκιμή εφαρμόστηκε το Serifel® μαζί με το TriaAlfa Essence®, σε καρπούς ελιάς ποικιλίας Κορωνέικη. Εκεί φάνηκε ότι το Serifel® μαζί με το TriaAlfa Essence® είναι ικανά να παρεμποδίσουν την εξέλιξη της ασθένειας, στη μικρότερη συγκέντρωση μολύσματος (Διάγραμμα 36, Εικόνα 47), όπως επίσης κατάφεραν να μειώσουν και την κονιδιογένεση του μύκητα, στη μικρότερη συγκέντρωση μολύσματος (Διάγραμμα 37). Στη δεύτερη δοκιμή με την χρήση μικρότερων συγκεντρώσεων μολύσματος, χρησιμοποιήθηκε μόνο το Serifel®, σε καρπούς ελιάς ποικιλίας Καλαμών. Εκεί φάνηκε ότι ο χειρισμός με τον βιολογικό παράγοντα μείωσε την εξέλιξη έντασης της ασθένειας, που προκαλεί ο μύκητας *C. acutatum*- Στέλεχος αναφοράς, σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές και συγκεντρώσεις του παθογόνου (Διάγραμμα 38, Εικόνα 48). Επίσης, κατά την μέτρηση της κονιδιογένεσης φάνηκε ότι η εφαρμογή του Serifel® μείωσε στατιστικά σημαντικά την παραγωγή κονιδίων στην συγκέντρωση μολύσματος 5×10^4 κονίδια/mL (Διάγραμμα 39).

Από τα παραπάνω πειράματα θα συμπεραίναμε ότι σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις μολύσματος, που προσομοιάζουν τις φυσικές συνθήκες μόλυνσης, τα ποσοστά ασθένειας είναι χαμηλότερα παρουσία Serifel®, με στατιστικά σημαντική διαφορά στις 6 μέρες μετά

την μόλυνση. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω πειραματισμός και επιπλέον αξιολόγηση της δράσης του βιολογικού σκευάσματος Serifel®.

Συμπερασματικά, θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω η δυνατότητα αξιοποίησης του σκευάσματος Renvyona και του βιολογικού σκευάσματος Serifel® στην καλλιέργεια της ελιάς με τις απαραίτητες συμπληρωματικές μελέτες για επέκταση της έγκρισης. Ωστόσο, είναι σημαντικός ο ακριβής καθορισμός EC50 και παράγοντα ανθεκτικότητας των χημικών σκευασμάτων στα υπό μελέτη στελέχη, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα που θα συμβάλλουν στην διαχείριση της ασθένειας. Τέλος, απαιτείται περαιτέρω πειραματισμός και επιπλέον αξιολόγηση της δράσης του βιολογικού σκευάσματος Serifel®.

BIBLIOGRAFIA

- Achbani, E.A., Benbouazza, A. and Douira, A., 2013. First report of olive anthracnose, caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, in Morocco. *Atlas J. Biol.* 2, 171–174.
- Acosta D.R., 1932. Investigaciones fitopatológicas. Min. Industrias, Dir. Agronomía, Publicación Mensual 4, 1–18.
- Agosteo, G.E., Magnano di San Lio, G., Frisullo, S. and Cacciola, S.O., 2002. Characterisation of the causal agent of olive anthracnose in southern Italy. *Acta Hort.* 586, 713–716.
- Agosteo G.E., Macrì C., Taccone P., 2005. Susceptibility of olive cv Itrana to anthracnose. *Journal of Plant Pathology* 87: 287.
- Agosteo G.E., Scolaro L., Previtiera G., 2007. Non-conventional chemical control of olive anthracnose. Integrated protection of olive crops. *IOBC-WPRS Bull.* 30, 245-248.
- Agosteo, G.E., Sanzani, S.M., Macrì, C., Cacciola, S.A., Li Destri Nicosia, M.G. and Schena, L., 2015. Olive leachates affect germination of *Colletotrichum godetiae* conidia and the development of appressoria. *Phytopathol. Mediterr.* 54, 35–44.
- Almeida, J.V., 1899. La gaffa des olives en Portugal. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 15, 90–94.
- Antelmi I., Sion V., Nigro F., 2019. First report of *Colletotrichum nymphaeae* on olive in Italy. *Plant Dis.* 103 (4), 765.
- Von Arx, J.A., 1970. A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. *Bibl. Mycol.* 24, 1–203.
- Azevedo A.R., 1976. A Defesa Sanitaria da Oliveira em Portugal. Instituto Nacional de Investigação Agrária, Oeiras, Portugal.
- Azevedo-Nogueira F., Martins-Lopes P., Gomes S., 2020. Current understanding of *Olea europaea* L. – *Colletotrichum acutatum* interactions in the context of identification and quantification methods – A review. *Crop Protection*. Elsevier.
- Ballio A., Botalico A., Buonocore V., Carilli A., Di Vittorio V., Graniti A., 1969. Production and insolation of aspergillomarasmine B (lycomarasmine acid) from cultures of *Colletotrichum gloeosporioides* (*Gloeosporium olivarum*). *Phytopatologia Mediterranea* 8: 187-196.
- Barker, I., Pitt, D., 1988. Detection of the leaf curl pathogen of anemones in corms by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Plant Pathol.* 37 (3), 417–422.
- Baroncelli, R., Talhinhos, P., Pensec, F., Sukno, S.A., Le Floch, G. and Thon, M., 2017. The *Colletotrichum acutatum* species complex as a model system to study evolution and host specialization in plant pathogens. *Front. Microbiol.* 8, 2001.
- Bartlett D.W., Clough J.M., Godwin J.R., Hall A.A., Hamer M., Parr-Dobrzanski B., 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58, 649-662.
- Biraghi, A. 1934. Variazioni in due ceppi di *Gloeosporium olivarum* Alm. di provenienze diverse. *Bollettino della Regia Stazione di Patologia Vegetale di Roma.* 14: 223-253.
- Bompeix, G., Julio, E.V.R. and Phillips, D.H., 1988. *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding et V. Schrenk. In: *European Handbook of Plant Diseases* (Smith, I. M., Dunez, J., Lelliot, R.A., Phillips, D.H. and Archer, S.A., eds), pp. 325–327. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

- Brancher, N., Perez, B.A., Matias, C., Otero, L., Oriolani, E., Aybar, V.E. and Roca, M., 2008. Olive (*Olea europaea* L.) pathologies and pests in Catamarca province, Argentina. *Acta Hort.* 94.
- Bukhari, K.A.I.M., Nithya, K., Valluvaparidasan, V., Paranidharan, V., Velazhahan, R., 2012. Detection of *Colletotrichum falcatum* causing red rot of sugarcane by enzyme-linked immunosorbent assay. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 45 (7), 823–830.
- Cacciola S.O., Agosteo G.E., Pane A., Magnano di San Lio G., 1996. Osservazioni sull'epidemiologia dell'antracnosi dell'olivo in Calabria. *Informatore Fitopatologico* 46 (6): 27-32.
- Cacciola S.O., Faedda R., Sinatra F. et al., 2012. Olive anthracnose. *Journal of Plant Pathology* 94, 29–44.
- Cannon P. F., Damm U., Johnston P. R., Weir B. S., 2012. *Colletotrichum*- current status and future directions. *Stud. Mycol.* 73 (1), 181-213.
- Cerkauskas R. F., Sinclair J, B., 1980. Use of paraquat to aid detection of fungi in soybean tissues. *Phytopathology* 70 (11), 1036- 1038.
- Chandra, A., Keizerweerd, A.T., Que, Y., Grisham, M.P., 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane. *Mol. Biol. Rep.* 42 (8), 1309–1316
- Chattaoui, M., Raya, M.C., Bouri, M., Moral, J., Perez-Rodriguez, M., Trapero, A., Msallem, M. and Rhouma, A., 2016. Characterization of a *Colletotrichum* population causing anthracnose disease on olive in northern Tunisia. *J. Appl. Microbiol.* 120, 1368–1381.
- Ciccarone, A., 1950. Considerazioni biologiche e sistematiche sull'agente della “lebbra” delle olive, recentemente osservata nel Leccese. *Boll. Regia Staz. Patol. Veg. Roma, Ser. III.* 5, 143–165.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woundenberg, J.H.C. and Crous, P.W., 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Stud. Mycol.* 73, 27–113.
- Denoyes- Rotham B., Guerin G., Delye C., Smith B., Minz D., Maymon M., Freeman S., 2003. Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* species from strawberry. *Phytopathology* 93 (2), 219-228.
- Duarte, H.S.S., Cabral, P.G.C., Pereira, O.L., Zambolim, L., Goncalves, E.D., Vieira Neto, J., Zambolim, E.M. and Sergeeva, V. (2010) First report of anthracnose and fruit mummification of olive fruit (*Olea europaea*) caused by *Colletotrichum acutatum* in Brazil. *Plant Pathol.* 59, 1170.
- Embaby, E.-S., 2014. Anthracnose disease (*Colletotrichum* sp.) affecting olive fruit quality and its control in Egypt. *J. Agric. Technol.* 10, 1289–1306.
- Erukhimovitch V., Tsrur Lahkim L., Hazanovsky M., Talyshinsky M., Souprun Y., Huleihel M., 2007. Early and rapid detection of potato's fungal infection by Fourier transform infrared microscopy. *Appl. Spectrosc.* 61 (10), 1052-1056.
- Faisal, P.M., Nagendran, K., Ranjitham, P., Ponnuswamy Kalaiselvi, R.S., Gandhi, K., Thiruvengadam, R., Prabakar, K., 2011. Specific detection of *Colletotrichum musae* inciting anthracnose disease in Banana. *Libyan Agric. Res. Cen. J. Intl.* 2 (6), 279–286.

- Foster H., Adaskaveg J.E., 1999. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. *Phytopathology* 89 (11), 1056- 1065.
- Gomes S., Prieto P., Martin- Lopes P., Carvalho T., Martin A., Guedes- Pinto H., 2009. Development of *Colletotrichum acutatum* on tolerant and susceptible *Olea europaea* L. cultivars: a microscopic analysis. *Mycopathologia* 168 (4), 203- 211.
- Gomes S, Prieto P., Carvalho T., Guedes- Pinto, H., Martin- Lopes P., 2012c. Olive- *Colletotrichum acutatum*: an example of fruit- fungal interaction. *Plant Breed.*, IntechOpen 247- 264.
- Gouvinhas I., Machado N., Girones- Vilaplana A., Gomes S., Carvalho T., Dominguez- Perles R., Barros A.I.R.N.A., 2016. Sorting out the value of spectroscopic tools to assess the *Colletotrichum acutatum* impact in olive cultivars with different susceptibilities. *J. Chemon.* 30 (9), 548-558.
- Gouvinhas I., Martin- Lopes P., Carvalho T., Barros A., Gomes S., 2019. Impact of *Colletotrichum acutatum* pathogen on olive phenylpropanoid metabolism. *Agriculture* 9 (8), 173.
- Gorter, G.J.M.A. (1956) Anthracnose fungi of olives. *Nature*, 178, 1129–1130.
- Graniti A., Frisullo S., Pennisi A.M., Magnano di San Lio G., 1993. Infections of *Glomerella cingulata* on olive in Italy. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 23: 457-465.
- Hemmi, T. and Kurata, S., 1935. Contributions to the knowledge of anthracnose of plants II, on *Gloeosporium olivarum* Alm. causing the olive anthracnose. *J. Soc. Trop. Agric. Taiwan*, 6, 573–583.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66 (4), 411–453.
- Hyun Ji S., Chandra Paul N., Xin Deng J., Sook Kim Y., Yun Bong-Sik and Hun Yu S., 2013. Biocontrol Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against Fungal Plant Diseases, *Mycobiology*, 41:4, 234-242, DOI: 10.5941/MYCO.2013.41.4.234.
- Iliadi, M.K., Tjamos, E., Antoniou, P. and Tsitsigiannis, D.I., 2018. First report of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose on olives in Greece. *Plant Dis*, 102, 820.
- Jamil Shafi, Hui Tian & Mingshan Ji, 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31:3, 446-459, DOI: 10.1080/13102818.2017.1286950.
- Jayawardena, R.S., Hyde, K.D., Damm, U., Cai, L., Liu, M., Li, X.H., Zhang, W., Zhao, W.S., Yan, J.Y., 2016. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. *Mycosphere* 7 (8), 1192–1260.
- Kang, K., Lee, K., Ishihara, A., Park, S., Kim, Y.S., Back, K., 2010. Induced synthesis of caffeoylserotonin in pepper fruits upon infection by the anthracnose fungus, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Sci. Hort.* 124 (2), 290–293.
- Kim, Y.K., Kawano, T., Li, D., Kolattukudy, P.E., 2000. A mitogen-activated protein kinase kinase required for induction of cytokinesis and appressorium formation by host signals in the conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Cell* 12 (8), 1331–1343.
- Kolainis S., Koletti A., Lykogianni M., Karamanou D., Gkizi D., Tjamos S.E., Antonios Paraskeuopoulos A., Aliferis K.A., 2020. An integrated approach to improve plant protection against olive anthracnose caused by the *Colletotrichum acutatum* species complex. *PLOS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233916>.

- Komarek M., Cadkova E., Chrastny V., Bordas F., Bollinger J.C., 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environ. Int.* 36, 138-151.
- Landum, M.C., Felix, M.R., Alho, J., Garcia, R., Cabrita, M.J., Rei, F. and Varanda, C., 2016. Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. *Microbiol. Res.* 183, 10.
- Lardner R., Johnston P. R., Plummer K. M., Pearson M. N., 1999. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum lato sensu*. *Mycol. Res.* 103 (3), 275-285.
- Lee, J.H., Jeong, S.W., Cho, Y.A., Park, S., Kim, Y.H., Bae, D.W., Chung, J.I., Kwak, Y.S., Jeong, M.J., Park, S.C., Shim, J.H., Jin, J.S., Shin, S.C., 2013. Determination of the variations in levels of phenolic compounds in soybean (*Glycine max* Merr.) sprouts infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *J. Sci. Food Agric.* 93 (12), 3081–3086.
- Leoni C., Bruzzone J., Villamil J.J., Martinez C., Montelongo M. J., Bentancur O., Conde-Innamorato P., 2018. Percentage of anthracnose (*Colletotrichum acutatum s.s.*) acceptable in olives for the production of extra virgin olive oil. *Crop Protection* 108, 47-53.
- Malathi, P., Viswanathan, R., Padmanaban, P., Mohanraj, D., Kumar, V.G., Salin, K., 2008. Differential accumulation of 3-deoxy anthocyanidin phytoalexins in sugarcane varieties varying in red rot resistance in response to *Colletotrichum falcatum* infection. *Sugar Tech* 10 (2), 154–157.
- Malavolta C., Perdakis D., 2012. Guidelines for Integrated Production of olives: IOBC Technical Guideline III: 2012, 2nd edition.
- Margarita, L., Porta-Puglia, A. and Quacquarelli, A., 1986. *Colletotrichum acutatum*, nuovo patogeno dell'olivo in Cina e confronto con l'agente della "lebbra" dell'olivo. *Ann. Ist. Sperim. Patol. Veg.* 11, 125–133.
- Markakis E.A., Roidakis E. N., Kalantzakis G. S., Chatzaki A., Soultatos S. K., Stavrakaki M., Tavlaki G. I., Koubouris G.C., Bagkis N. and Goumas D. E., 2021. Characterization of Fungi Associated with Olive Fruit Rot and Olive Oil Degradation in Crete, Southern Greece. *Plant Disease*, 105: 3623-3635.
- Martelli G.P., 1959. La lebbra delle olive. Presenza e diffusione in Calabria. *Italia Agricola* 96: 905-914.
- Martelli G.P., 1961. Acervuli di *Gloeosporium olivarum* Alm. su foglie di olivo. *Phytopathologia Mediterranea* 1: 125-128.
- Martin, M.P. and Garcia-Figueres, F., 1999. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 733–741.
- Materatski P., Varanda C., Carvalho T., Bento Dias A., Campos M.-D., Gomes L. Nobre T., Rei F. and Félix Maria do Rosario, 2019. Effect of Long-Term Fungicide Applications on Virulence and Diversity of *Colletotrichum* spp. Associated to Olive Anthracnose. *Plants*, 8, 311, doi:10.3390/plants8090311.
- Mincione A., Valenzise M., Runcio A., Poiana M., Agosteo G.E., Taccone P.L., 2004. Ricerche sugli oli di oliva vergini calabresi. Influenza delle fitopatie sulle caratteristiche qualitative degli oli. Nota I - Effetti diretti degli attacchi di Antracnosi. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 81: 9- 17.

- Moral J., Bouhmidi K., Trapero A., 2008. Influence of fruit maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 92: 1421-1426.
- Moral, J., de Oliveira, R., Trapero, A., 2009. Elucidation of the disease cycle of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 99 (5), 548–556.
- Moral J., Cherifi F., Muñoz-Diez C., Xaviér C.J., Trapero Casas A., 2009a. Infection of olive seeds by *Colletotrichum acutatum* and its effect on germination. *Phytopathology* 99: S88.
- Moral, J. and Trapero, A., 2012. Mummified fruit as a source of inoculum and disease dynamics of olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. *Phytopathology*, 102, 982–989.
- Moral, J., Xavier, C., Roca, L.F., Romero, J., Moreda, W. and Trapero, A., 2014. La Antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite. *Grasas y Aceites*, 65, e028.
- Moral, J., Xavier, C., Roca, L.F., Viruega, J.R., Roca, L.F., Caballero, J. and Trapero, A., 2017. Variability in susceptibility to anthracnose in the world collection of olive cultivars of Cordoba (Spain). *Front. Plant Sci.* **8**, 1892.
- Moral J., Agustí-Brisach C., Agalliub G., Rodrigues de Oliveira, Pérez-Rodríguez M., Roca L.F., Romero J., Trapero A., 2018. Preliminary selection and evaluation of fungicides and natural compounds to control olive anthracnose caused by *Colletotrichum* species. Elsevier. *Crop Protection* 114, 167–176.
- Mosca, S., Li Destri Nicosia, M.G., Cacciola, S.O. and Schena, L., 2014. Molecular analysis of *Colletotrichum* species in the carposphere and phyllosphere of olive. *PLoS One*, 9, e114031.
- Mugnai, L., Surico, G. and Ragazzi, A., 1993. *Glomerella cingulata* on olive in India: morphological and pathological notes. *Bull. OEPP*, 23, 449–455.
- Nagorny, P.I. and Eristavi, E.M., 1929. A brief survey of plant diseases in Abkhasia in 1928. *Pub. Agr. Exp. St. Abkhasia*. 38, 1–28.
- Nithya, K., Bukhari, K.A.I.M., Valluvaparidasan, V., Paranidharan, V., Velazhahan, R., 2012. Molecular detection of *Colletotrichum falcatum* causing red rot disease of sugarcane (*Saccharum officinarum*) using a SCAR marker. *Ann. Appl. Biol.* 160 (2), 168–173.
- Oliveira R., Moral J., Bouhmidi K., Trapero A., 2005. Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del olivo. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 3.
- Pangallo, S., Nicosia, M.G.L.D., Agosteo, G.E., Abdelfattah, A., Romeo, F.V., Cacciola, S.O., Rapisarda, P. and Schena, L., 2017. Evaluation of a pomegranate peel extract as an alternative means to control olive anthracnose. *Phytopathology*, 107, 1462–1467.
- Park S., Jeong W.Y., Lee J.H., Kim Y.-H., Jeong S.W., Kim G.-S., Bae D.W., Lim C.-S., Jin J.S., Lee S.J., Shin S.G., 2012. Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow pepper bell) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 130 (4), 981-985.
- Pennisi M., Agosteo G.E., Grasco S., 1993. Chemical control of the olive rot caused by *Glomerella cingulata*. *EPPO Bull.* 23, 467- 472.

- Peres N. A. R., Souza N. L., Peever T. L., Timmer L. W., 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Dis.* 88 (2), 125-130.
- Peres N. A., Timmer L. W., Adaskaveg J. E., Correll J. C., 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.* 89 (8), 784- 796.
- Perfect S. E., Hughes H.B., O'Connell R. J., Green J. R.,1999. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal- plant interactions. *Fungal Genet. Biol.* 27 (2-3), 186- 198.
- Petri, L. 1930. *Azione tossica dell'arseniato sodico sopra le spore del Gloeosporium olivarum*. *Alm. Bollettino della Regia Stazione di Patologia Vegetale di Roma.* 10: 359-361.
- Pontis, R.E. and Hansen, H.N., 1942. Olive anthracnose in the United States. *Phytopathology*, 32, 642–644.
- Preto, G., Martins, F., Pereira, J.A. and Baptista, P., 2017. Fungal community in olive fruits of cultivars with different susceptibilities to anthracnose and selection of isolates to be used as biocontrol agents. *Biol. Control.* 110, 1–9.
- Priest F.G., Goodfellow M., Shute L.A. and Berkeley R.C.W., 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. *norn. rev. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, p. 69-71.
- Prota U., 1995. Le malattie dell'olivo. *Informatore Fitopatologico* 45(12): 16-26.
- Raj, M., Jeeva, M., Hegde, V., Vidyadharan, P., Archana, P., Senthil alias Sankar, M., Nath, S.V., 2012. Polymerase chain reaction assay for rapid, sensitive detection, and identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing greater yam anthracnose. *Mol. Biotechnol.* 52 (3), 277–284.
- Raja H. A., Miller A.N., Pearce C. J., Oberlies N. H., 2017. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J. Nat. Prod.* 80, 756-770.
- Roca, L.F., Moral, J., Viruega, J.R., Avila, A., Oliveira, R. and Trapero, A., 2007. Copper fungicides in the control of olive diseases. *Olea*, 26, 48–50.
- Romero J., Agusti-Brisach C., Santa Barbara A.E., Cherifi F., Oliveira R., Roca L.F., Moral J., Trapero A., 2018. Detection of latent infections caused by *Colletotrichum* sp. in olive fruit. *J. Appl. Microbiol.* 124 (1), 209- 219.
- Rhouma, A., Triki, M.A. and Msallem, M., 2010. First report of olive anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Tunisia. *Phytopathol. Mediterr.* 49, 95–98.
- Sakaguchi, A., Tsuji, G., Kubo, Y., 2010. A yeast STE11 homologue CoMEKK1 is essential for pathogenesis-related morphogenesis in *Colletotrichum orbiculare*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23 (12), 1563–1572.
- Salman A., Tsrer L., Pomerantz A., Moreh R., Mordechai S., Huleihel M., 2010. FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes. *Spectroscopy* 24 (3-4), 261- 267.
- Salman A., Shufan E., Tsrer L., Moreh R., Mordechai S., Huleihel M., 2014. Classification of *Colletotrichum coccodes* isolates into vegetative compatibility groups using infrared attenuated total reflectance spectroscopy and multivariate analysis. *Methods* 68 (2), 325-330.
- Sanei, S.J. and Razavi, S.E., 2011. Differentiation of olive *Colletotrichum gloeosporioides* populations on the basis of vegetative compatibility and pathogenicity. *Afr. J. Agric. Res.* 6, 2099–2107.

- Sanei, S.J. and Razavi, S.E., 2012. Survey of olive fungal disease in north of Iran. *Annu. Rev. Res. Biol.* 2, 27–36.
- Saponaro A., 1953. Presenza di *Gloeosporium olivarum* Alm. sugli organi vegetativi dell'olivo nel leccese e nel brindisino. *Annali della Sperimentazione Agraria* 7: 609- 619.
- Sarejanni, J.A., 1939. Catalogue commente des champignons rencontres sur les plantes cultivees en Grece. *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki.* 3, 60.
- Schena, L., Mosca, S., Cacciola, S.O., Faedda, R., Sanzani, S.M., Agosteo, G.E., Sergeeva, V. and Magnano di San Lio, G., 2014. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. *Plant Pathol.* 63, 437–336.
- Schena L., Abdelfattah A., Mosca S., Li Destri Nicosia M.G., Agosteo G.E., Cacciola S.O., 2017. Quantitative detection of *Colletotrichum godetiae* and *C. acutatum sensu stricto* in the phyllosphere and carposphere of olive during four phenological phases. *Eur. J. Plant Pathol.* 149:337–347.
- Sergeeva V., Spooner-Hart R., Nair N.G., 2008a. Evidence of early flower infection in olives (*Olea europaea*) by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing anthracnose disease. *Australasian Plant Pathology* 3: 81-82.
- Sergeeva V., Spooner-Hart R., Nair N.G., 2008b. First report of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing leaf spots of olives (*Olea europaea*) in Australia. *Australasian Plant Pathology* 3: 143-144.
- Sergeeva, V. and Spooner-Hart, R., 2010. Anthracnose and Queensland fruit fly in olives. *Olive Press.* 16, 23–24.
- Sergeeva, V., 2011. Anthracnose in olives: symptoms, disease cycle and management. In: 4th International Conference for Olive Tree and Olive Products – OLIVE BIOTEQ (Chartzoulakis, Kostas S. ed), pp. 269–274. Chania, Greece: NAGREF Institute for Olive Tree and Subtropical Plants of Chania.
- Sergeeva, V., 2014. The role of epidemiology data in developing integrated management of anthracnose in olives - a review. In: VII International Symposium on Olive Growing, 1057, pp. 163–168.
- Shivas, R.G. and Tan, Y.P., 2009. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum* in Australia, introducing *C. fioriniae* comb. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. *Fungal Divers*, 39, 111–122.
- Sreenivasaprasad, S. and Talhinhos, P. (2005) Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Mol. Plant Pathol.* 6, 361–378.
- Talhinhos, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J. and Oliveira, H., 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal the association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2987–2998.
- Talhinhos, P., Neves-Martins, J., Oliveira, H. and Sreenivasaprasad, S., 2009. The distinctive population structure of *Colletotrichum* species associated with olive anthracnose in the Algarve region of Portugal reflects a host–pathogen diversity hot spot. *FEMS Microbiol. Lett.* 296, 31–38.
- Talhinhos, P., Mota-Capitao, C., Martins, S., Ramos, A.P., Neves-Martins, J., Guerra-Guimaraes, L., Varzea, V., Silva, M.C., Sreenivasaprasad, S. and Oliveira, H., 2011. Epidemiology, histopathology

- and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. *Plant Pathol.* 60, 483–495.
- Talhinhas, P., Goncalves, E., Sreenivasaprasad, S. and Oliveira, H., 2015. Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. *Eur. J. Plant Pathol.* 142, 73–83.
- Talhinhas P., Loureiro A. and Oliveira H., 2018. Olive anthracnose: a yield- and oil quality- degrading disease caused by several species of *Colletotrichum* that differ in virulence, host preference and geographical distribution. *Molecular Plant Pathology* 19(8), 1797- 1807.
- Tao, G., Hyde, K.D., Cai, L., 2013. Species-specific real-time PCR detection of *Colletotrichum kahawae*. *J. Appl. Microbiol.* 114 (3), 828–835.
- Trapero A., Lopez-Doncel L.M., Viruega Puente J.R., 1998. Los “Repilos” del olivo: etiología, epidemiología y estrategias de control. *Phytoma España* 168: 154- 158.
- Trapero Casas A., 2003. La Antracnosis o Aceituna jabonosa en el cultivo del olivo. *Vida Rural* 168: 46-50.
- Trapero A., Blanco-López M.A., 2008. Enfermedades, In: Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L. (eds). *El cultivo de Olivo*, pp. 557-614, Junta de Andalucía/MundiPrensa, Madrid, Spain.
- Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J., 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Rev.* 1 (1), 13–25.
- Vucinic Z., Latinovic J., Metzidakis I.T. and Voyiatzis, D.G. (1999) *Colletotrichum gloeosporioides*, a new olive (*Olea europaea* L.) parasite in Yugoslavia. *Acta Hort.* 474, 577–579.
- Weir, B., Johnston, P.R. and Damm, U. (2012) The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* 73, 115–180.
- Wharton P. S. and Dieguez- Uribeondo J., 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. In: *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, vol. 61, 1, vols. 3- 22, ISSN 1988-3196.
- Whitelaw-Weckert, M., Curtin, S.J., Huang, R., Steel, C.C., Blanchard, C.L. and Roffey, P.E. (2007) Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. *Plant Pathol.* 56, 448–463.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Fujii, Y., Shirata, A., 2000. *Colletotrichum dematium* produces phytotoxins in anthracnose lesions of mulberry leaves. *Phytopathology* 90 (3), 285–291.
- Zachos, D. G. and Makris, S. A. 1963. Recherches sur le *Gloeosporium olivarum* en Grèce. II. Symptomatologie de la maladie. *Annals of the Institute of Phytopathology Benaki.* 5: 128-130.
- Zhang, X., Harrington, T.C., Batzer, J.C., Kubota, R., Peres, N.A., Gleason, M.L., 2016.
- Detection of *Colletotrichum acutatum sensu lato* on strawberry by loop-mediated isothermal amplification. *Plant Dis.* 100 (9), 1804–1812.
- Zivkovic S., Stojanovic S., Ivanovic Z., Trkulja N., Dolovac N., Aleksic G. and Balaz J., 2010. Morphological and Molecular Identification of *Colletotrichum acutatum* from Tomato Fruit. *Pestic. Phytomed.* (Belgrade), 25(3), 231-239.