



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Φυτιατρική και Περιβάλλον»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«Διάγνωση και Ταυτοποίηση με νέες Εργαστηριακές Τεχνικές Φυτοπαθογόνων
μυκήτων σε Μηλοειδή»

Βόλος 2023

Ράπτης Νικόλαος

**«Διάγνωση και Ταυτοποίηση με νέες Εργαστηριακές Τεχνικές
Φυτοπαθογόνων μυκήτων σε Μηλοειδή»**

Ράπτης Νικόλαος

Ιωάννης Βαγγέλας (Επιβλέπων Καθηγητής)

Επίκουρος Καθηγητής, Φυτοπαθολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χρήστος Αθανασίου (Μέλος)

Καθηγητής, Εντομολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παναγιώτης Μαδέσης (Μέλος)

Επίκουρος Καθηγητής, Μοριακής Βιολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Copyright © ΡΑΠΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, 2023.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

Πρόλογος & Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική βασίστηκε σε προγενέστερη αδημοσίευτη έρευνα του καθηγητή μου Ιωάννη Βαγγέλα. Θέλω να τον ευχαριστήσω μέσα από τα βάθη της καρδιάς μου για την αμέριστη βοήθειά του, στην απόφαση του θέματος της διπλωματικής, για την ατέρμονη υπομονή σε όλες τις κουραστικές απορίες μου και την κατανόηση που έδειξε ως προς το χρονοδιάγραμμά μου. Επιπρόσθετα θέλω να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας Παναγιώτη Μαδέση για την φιλοξενία στον χώρο εργασίας του, τις γνώσεις του και την κατανόηση και υπομονή που έδειξε σε όλες τις απορίες μου, πάνω στις μοριακές αναλύσεις. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα Γεωργία Τσίντζου για την απαραίτητη βοήθεια της πάνω στις εργαστηριακές αναλύσεις. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω όλους του συμμαθητές μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα, καθώς το μορφωτικό τους επίπεδο, οι στοχευμένες απορίες τους και ο ζήλος που δείχνανε με έκανε καλύτερο φοιτητή, επιστήμονα και άνθρωπο. Τέλος θέλω να ευχαριστήσω την κοπέλα μου για την απίστευτη υπομονή της στις πολλές ώρες διαβάσματος και αφοσίωσης στο αντικείμενό μου.

Η διπλωματική εργασία είναι αφιερωμένη σε όλους τους φοιτητές που ταυτόχρονα με τις σπουδές τους δούλευαν για να 'βγάλουν τα προς το ζην'...

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση μυκήτων που ευθύνονται για ασθένειες που προκαλούν συμπτώματα ελκών, ξήρανσης κλάδων, βραχιόνων και αποπληξίας σε φυτά μηλιάς. Η δειγματοληψία έγινε σε αγροτεμάχιο στην ευρύτερη περιοχή της Αγιάς Λάρισας, σε δένδρα μηλιάς που παρουσίαζαν την παραπάνω συμπτωματολογία. Ως δείγματα λήφθηκαν πριονίδια ξύλου από συγκεκριμένα σημεία πάνω στους βλαστούς, στον κορμό και στο λαιμό δένδρων. Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση Universal Fungi Primers και στη συνέχεια η αλληλούχιση ταυτίστηκε με κομμάτια γονιδιώματος από βάση γονιδιακών δεδομένων. Επιπρόσθετα, τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο NGS (Next Generation Sequencing) με σκοπό τη μελέτη της βιοποικιλότητας μυκήτων ανά δείγμα. Τέλος, έγιναν καλλιέργειες μυκήτων σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA και μελέτη των υφών στο μικροσκόπιο. Τα κυριότερα γένη μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ήταν τα γένη: *Diplodia*, *Eutypa*, *Phaeoacremonium*, *Didymosphaeria*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Vishniacozyma* και *Genolevuria*.

Summary

The aim of this study was the isolation and identification of fungi, that are responsible for diseases that cause canker, stem canker and dieback symptoms in apple trees. The sampling was done in a plot of land in the wider area of Agia Larissa, in apple trees that presented the above symptoms. Wood sawdust was taken as samples from specific points on the shoots, trunk and neck of trees. Samples were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) using Universal Fungi Primers and subsequently sequenced with genome fragments from a gene database. In addition, the samples were analyzed by the NGS (Next Generation Sequencing) method in order to study the biodiversity per sample. Finally, fungal cultures were made in PDA nutrient medium and the hyphae were studied under the microscope. The main fungal genera detected were: *Diplodia*, *Eutypa*, *Phaeoacremonium*, *Didymosphaeria*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Vishniacozyma* and *Genolevuria*.

Εγώ, ο Ράπτης Νικόλαος, είμαι ο συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.

Ράπτης Νικόλαος

Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από τον κο Ράπτη Νικόλαο.

Ιωάννης Βαγγέλας
Επίκουρος Καθηγητής

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1 ^ο Εισαγωγή	1
1.1 Ασθένειες ξύλου, σημαντικότητά τους στη χώρα μας και παγκοσμίως	2
1.2. Συμπτωματολογία σε μηλοειδή	3
1.3 Σπουδαιότερα παθογόνα που τις προκαλούν	5
1.4 Σύγκριση συμπτωμάτων και σημείων σε σχέση με το φυτικό μέρος που προσβάλλουν και δημιουργούν συμπτώματα	13
1.5 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας	14
Κεφάλαιο 2 ^ο Υλικά και Μέθοδοι	15
2.1 Συλλογή δειγμάτων	16
2.2 Απομόνωση μυκήτων σε θρεπτικά υποστρώματα.	19
2.2 Απομόνωση DNA και PCR.....	23
2.3 Μικροσκοπικό παρασκεύασμα	28
2.4 Διαδικασία NGS	28
2.5 Ανάλυση Δεδομένων	29
Κεφάλαιο 3 ^ο Αποτελέσματα.....	30
3.1 Καλλιέργειες μυκήτων στα θρεπτικά υποστρώματα	31
3.2 NGS	36
3.3 Ταυτοποίηση μυκήτων με PCR	56
Κεφάλαιο 4 ^ο Συζήτηση.....	62
Βιβλιογραφία.....	67

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Αγροτεμάχιο από το οποίο έγινε η δειγματοληψία.....	17
Εικόνα 2. Μέγεθος της προσβολής.....	17
Εικόνα 3. Συμπτώματα.....	18
Εικόνα 4. Τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA.....	21
Εικόνα 5. Δημιουργία καθαρών καλλιεργειών.....	22
Εικόνα 6. Διαδικασία απομόνωσης γενετικού υλικού.....	24
Εικόνα 7. Απομόνωση DNA.....	26
Εικόνα 8. Φωτογραφία από την πλάκα παρατήρησης του διαλύματος DNA μετά την μέθοδο PCR.....	28
Εικόνα 9. Απομόνωση P2B1.....	31
Εικόνα 10. Απομόνωση P1A.....	32
Εικόνα 11. Απομόνωση P3A.....	32
Εικόνα 12. Απομόνωση P3B2.....	33
Εικόνα 13. Εικόνες από μικροσκόπιο της απομόνωσης P3B2.....	33
Εικόνα 14. Απομόνωση A1A2.....	34
Εικόνα 15. Απομόνωση A2B.....	35
Εικόνα 16. Απομόνωση A3A.....	35
Εικόνα 17. Εικόνες από μικροσκόπιο της απομόνωσης A3A.....	36
Εικόνα 18. Απομόνωση B1B.....	36

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Διαγραμματική απεικόνιση της δειγματοληψίας.....	19
Πίνακας 2. Διαγραμματική απεικόνιση των απομονώσεων στα τριβλία.....	21
Πίνακας 3. Καθαρές καλλιέργειες.....	22
Πίνακας 4. Διαγραμματική απεικόνιση δειγμάτων και διαγνωστικών μεθόδων που ακολουθήθηκαν.....	24
Πίνακας 5. Συγκέντρωση διαλύματος DNA και υπολογισμοί αραίωσης.....	26
Πίνακας 6. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 1.....	57
Πίνακας 7. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 2.....	57
Πίνακας 8. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 3.....	58
Πίνακας 9. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 4.....	58
Πίνακας 10. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 5.....	59
Πίνακας 11. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 6.....	60
Πίνακας 12. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 7.....	60
Πίνακας 13. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 8.....	61

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Κατανομή δενδροκομικών καλλιεργειών στην Ελλάδα με βάση την έκταση τους σε στρέμματα.....	4
Διάγραμμα 2. Ομάδες μυκήτων.....	37
Διάγραμμα 3. Κλάσεις μυκήτων.....	40
Διάγραμμα 4. Τάξεις μυκήτων.....	41
Διάγραμμα 5. Οικογένειες μυκήτων.....	42
Διάγραμμα 6. Γένη μυκήτων.....	43
Διάγραμμα 7. Οικογένεια Aureobasidiaceae.	45
Διάγραμμα 8. Οικογένεια Botryosphaeriaceae.....	45
Διάγραμμα 9. Οικογένεια Cladosporiaceae.....	46
Διάγραμμα 10. Οικογένεια Cystobasidiaceae.....	46
Διάγραμμα 11. Σύνολο μη ταυτοποιημένων	47
Διάγραμμα 12. Οικογένεια Pleosporaceae.....	47
Διάγραμμα 13. Οικογένεια Symmetrosporaceae.....	48
Διάγραμμα 14 Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα A1.....	49
Διάγραμμα 15. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα A2.....	50
Διάγραμμα 16. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα A3.....	50
Διάγραμμα 17. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα B1.....	51
Διάγραμμα 18. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα B2.....	52
Διάγραμμα 18. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα B3.....	52
Διάγραμμα 20. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα M1.....	53
Διάγραμμα 21. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα M2.....	54
Διάγραμμα 22. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα P1.....	54
Διάγραμμα 23. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα P2.....	55
Διάγραμμα 24. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα P3.....	55

Κεφάλαιο 1^ο Εισαγωγή

1.1 Ασθένειες ξύλου, σημαντικότητά τους στη χώρα μας και παγκοσμίως

Οι φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί αποτελούν έναν από τους κυριότερους παράγοντες υποβάθμισης της παραγωγής και των καλλιεργειών στη χώρα μας και παγκοσμίως. Πολλοί από αυτούς προσβάλλουν ξυλοποιημένα φυτικά μέρη στο υπέργειο τμήμα των φυτών, όπως κλαδίσκοι, βραχίονες και κορμοί δέντρων. Άλλοι προσβάλλουν το υπόγειο τμήμα όπως τις ρίζες πολυετών και μονοετών φυτών.

Οι Smith et al. (1994) παρατήρησαν για πρώτη φορά την παθογένεια του μύκητα *Botryosphaeria dothide* σε φυτά του γένους *Eucalyptus* στη Νότια Αφρική. Τα συμπτώματα της ασθένειας ήταν φανερά στα ξυλώδη φυτικά μέρη, των οποίων τα φυτά υποβλήθηκαν σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως έντονη και παρατεταμένη ξηρασία ή δυνατοί θερμοί άνεμοι. Η πρώτη αναφορά του ίδιου μύκητα στην Κίνα, σε καλλιέργεια πεκάν έγινε το 2011, με αρκετά παρόμοια συμπτωματολογία (Zhang and Xu, 2011). Στην Τουρκία το 2014, έγινε πρώτη φορά αναφορά σε συμπτωματολογία ασθένειας ξύλου που οφείλεται σε πάνω από ένα είδος της οικογένειας Botryosphaeriaceae. Οι επιστήμονες αφού περιέγραψαν τα συμπτώματα, απομόνωσαν τέσσερα διαφορετικά είδη μυκήτων από φυτά αμπέλου με κοινή συμπτωματολογία (Akgul et al., 2014). Μία ακόμη αναφορά παρόμοιας συμπτωματολογίας αναφέρθηκε σε φυτά αμπέλου στη Χιλή. Για πρώτη φορά, διαπιστώθηκε προσβολή από το μύκητα *Botryosphaeria obtusa* σε καλλιέργεια αμπέλου, ύστερα από απομόνωση του παθογόνου (Auger et al., 2004). Στην ίδια χώρα, απομονώθηκε ο μύκητας *Neofusicoccum australe* για πρώτη φορά, από συμπτωματολογικά φυτικά μέρη, καλλιέργειας αμπέλου (Besoain et al., 2013). Επίσης οι Wunderlich et al. (2012) διαπίστωσαν για πρώτη φορά προσβολή του μύκητα *Botryosphaeria dothidea* σε φυτά καλλιέργειας κελυφοτών φυσιτικών στην Αυστραλία. Οι ερευνητές απομόνωσαν και μελέτησαν τον μύκητα από δέντρα ηλικίας είκοσι έως εικοσιπέντε ετών.

Στη χώρα μας το πρόβλημα της παθογένειας αυτής είναι εξίσου σοβαρό και προβληματίζει εδώ και χρόνια τους παραγωγούς και την επιστημονική κοινότητα. Σε φυτά αβοκάντο ηλικίας έξι ετών παρατηρήθηκαν παρόμοια συμπτώματα. Ο μύκητας που απομονώθηκε από τα προσβεβλημένα φυτικά μέρη ήταν ο *Diaporthe foeniculina*, του οποίου η ταυτοποίηση στο συγκεκριμένο φυτικό είδος έγινε πρώτη φορά στη χώρα μας στην Κρήτη (Mathioudakis et al., 2020). Ο Rumbos (1988) ταυτοποίησε τον μύκητα *Diaporthe eres* σε συμπτωματικά φυτά ελιάς στη χώρα μας και δοκίμασε τη δράση κάποιων μυκητοκτόνων για την αντιμετώπιση του. Το ίδιο παθογόνο, κάποια χρόνια αργότερα, ανιχνεύθηκε σε φυτά ροδακινιάς, όπου προκάλεσε ασθένεια με παρόμοια συμπτωματολογία (Thomidis and Michailides, 2009).

Σύμφωνα με τα παραπάνω , τα παθογόνα που προσβάλλουν ξυλώδη φυτικά μέρη είναι πολλά. Οι ασθένειές τους, προκαλούν σημαντικά προβλήματα σε καλλιέργειες στην Ελλάδα αλλά και παγκοσμίως. Διαδίδονται γρήγορα και έχουν πλήθος ξενιστών, όπως αναφέρθηκε και πρωτύτερα. Οι ξενιστές πολλές φορές δεν είναι μόνο καλλιεργούμενα είδη αλλά και δασικά (Tsopelas and Angelopoulos, 2004).

Η καλλιέργεια της μηλιάς αποτελεί μία από τις κύριες καλλιέργειες στις οποίες έχουν αναφερθεί παθογόνα με τα παραπάνω συμπτώματα. Η ανίχνευση των παθογόνων και η αντιμετώπιση αυτών των ασθενειών είναι πολύ σημαντική καθώς στη χώρα μας τα μήλα και η παραγωγή τους αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι των διατροφικών συνηθειών. Σύμφωνα με την Ελληνική Στατιστική Υπηρεσία (ΕΛ. ΣΤΑΤ.) το 2019 η καλλιέργεια της μηλιάς αριθμούσε 94 χιλιάδες στρέμματα και βρίσκονταν στην έβδομη θέση των δενδροκομικών καλλιεργειών, εφόσον εξαιρέσουμε την ελαιοκαλλιέργεια που καταλαμβάνει με διαφορά την πρώτη θέση με 7,9 εκατομμύρια στρέμματα (Διάγραμμα 1).

1.2. Συμπτωματολογία σε μηλοειδή

Αναλύοντας την παθογένεια των ασθενειών ξυλώματος στα μηλοειδή συναντάμε δύο κύρια συμπτώματα, το έλκος (canker) και σε πιο εκτεταμένη μορφή της ασθένειας την ξήρανση, αφυδάτωση του δένδρου λόγω βλάβης στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες του φυτού ή αποπληξία (dieback). Η συμπτωματολογία αυτή μπορεί να χωριστεί σε βαθμιαία κλιμακωτά στάδια ξεκινώντας από μαρασμό, καχεξία του δέντρου, στη συνέχεια πτώση των φύλλων και νέκρωση ολόκληρων κλάδων και τέλος την ξήρανση ολόκληρου του δέντρου (Lowman, n.d.).

Στα νεαρά κλαδιά η συμπτωματολογία ξεκινά με μεταχρωματισμό εξωτερικά του φλοιού από όχρα έως σκούρο καφέ, ξεφλούδισμα και εύκολη αποκόλληση του φλοιού καθώς και μεταχρωματισμός του δακτυλίου του καμβίου (Delgado-Cerrone et al., 2016). Σε άλλες μελέτες, παρατηρήθηκαν μικρά έλκη και σε ποιο προχωρημένο

Διάγραμμα 1. Κατανομή δενδροκομικών καλλιεργειών στην Ελλάδα με βάση την έκτασή τους σε στρέμματα. Εξαιρέθηκε η καλλιέργεια της ελιάς η οποία καταλαμβάνει την πρώτη θέση με 7,9 εκ. στρέμματα (Ελληνική Στατιστική Υπηρεσία , 2019).



στάδιο, ύστερα από εγκάρσια τομή του βλαστού, μεταχρωματισμός του φλοιού, του δεσμικού καμβίου και του ξηλώματος και τέλος νέκρωση αυτών (Sessa et al., 2016).

Σε μεγαλύτερους κλάδους και στους βραχίονες των δέντρων παρατηρήθηκαν εκτεταμένα έλκη, επουλωτικά έλκη, βυθισμένα σημεία εξωτερικά στον φλοιό, εύκολη αποκόλληση του φλοιού, μεταχρωματισμός του φλοιώματος, του δεσμικού καμβίου και σε προχωρημένο στάδιο νέκρωση του βλαστού (Delgado-Cerrone et al., 2016; Sessa et al., 2016).

Στον κορμό, τα έλκη είναι κι εκεί εκτεταμένα, εύκολη αποκόλληση του φλοιού, μεταχρωματισμός του καμβίου, του φλοιώματος και του ξυλώματος (Borovinova et al., 2012).

Συμπερασματικά συμπτώματα όπως τα έλκη (canker) και η αποπληξία (dieback) είναι δύσκολο να διαχειριστούν, διότι είναι πολλά παθογόνα που τα προκαλούν και κρίνεται αναγκαία η εργαστηριακή ανίχνευση και απομόνωση αυτών. Έρευνα έδειξε πως η συμπτωματολογία αυτή μπορεί να μην σχετίζεται με το υπόγειο μέρος του φυτού, κατά συνέπεια, απέκλεισε κάποιο παθογόνο εδάφους (Havenga et al., 2019). Αντίθετα, άλλες έρευνες έχουν αποδώσει την συμπτωματολογία της αποπληξίας (dieback) σε εδαφογενείς μύκητες του γένους *Verticillium* (Karajeh and Owais, 2012). Επιπρόσθετα, εύκολη αποκόλληση του φλοιού κορμού δέντρου και καφέ μεταχρωματισμό του έχει αποδειχθεί, σε έρευνα σε καλλιέργεια μηλιάς, πως οφείλεται σε μύκητες του γένους *Phytophthora* (Rashid

and Naffaa, 2017). Ακόμα, ερευνητές έχουν ανιχνεύσει και βακτήρια του γένους *Pseudomonas* σε δένδρα μηλιάς και παρατήρησαν στη συμπτωματολογία μικρά έλκη και ακόμα και μεταχρωματισμό και νεκρωτικούς ιστούς σε διαμήκη τομές βλαστών (Araujo et al., 2020).

1.3 Σπουδαιότερα παθογόνα που τις προκαλούν

1.3.1. Γένη της τάξης *Botryosphaeriales*

Το γένος *Botryosphaeria* συναντάται πολλές φορές σε ασθένειες με αυτή τη συμπτωματολογία (Κεφάλαιο 1.2). Χαρακτηριστικό των μυκήτων αυτών, είναι η εγγενής καρποφορία τους που σχηματίζεται ανάμεσα σε στρώματα. Εκεί παρατηρούνται τα ψευδοθήκια, όπου μέσα σε αυτά βρίσκονται οι ασκοί με τα ασκοσπόρια (Τζάμος, 2007). Στην εγγενή τους, λοιπόν, μορφή κατατάσσονται στους ασκομύκητες (mycobank.org). Η αναφορά του γένους γίνεται εδώ και πολλά χρόνια ξεκινώντας από τη δεκαετία του εβδομήντα (Truszkowska, 1963), συνεχίζοντας και σε μεταγενέστερα χρόνια (Funk, 1985; Rayachhetry et al., 1996; SMITH et al., 1994). Η ασθένεια που προκαλεί είναι δύσκολη στην αντιμετώπιση, καθώς το παθογόνο διαχειμάζει μέσα στους μηλεώνες, ακόμα και μετά από εφαρμογές με μυκητοκτόνα μέσα στον χειμώνα. Οι μορφές αυτές αποτελούν το αρχικό μόλυσμα για την επόμενη καλλιεργητική περίοδο, που σημαίνει πως η διαχείριση του είναι αρκετά δύσκολη και πολλές χειμερινές εφαρμογές θα πρέπει να επαναξιολογηθούν ως προς τη χρησιμότητά τους (Gelain et al., 2022). Οι Delgado-Cerrone et al. (2016) απομόνωσαν από προσβεβλημένα δέντρα μηλιάς αρκετά είδη του γένους *Botryosphaeria* και ένα από αυτά ήταν το *Botryosphaeria dothidea*.

Φυσικά καθώς η τεχνολογία αναπτύσσεται, νέες σύγχρονες τεχνικές ανίχνευσης αλλάζουν συνεχώς το πεδίο της ταξινόμησης. Αυτό εξηγεί το γεγονός πως έχουν ενταχθεί καινούρια γένη μυκήτων στο προσκήνιο, που ανήκουν στην οικογένεια Botryosphaeriaceae, και προκαλούν αυτή την παθογένεια (canker, dieback κλπ) (Darge and Woldemariam, 2021). Ένας τέτοιος μύκητας είναι ο *Diplodia seriata* που ανιχνεύθηκε σε μηλεώνες στη Χιλή, ύστερα από απομόνωση από συμπτωματικά δέντρα (Díaz et al., 2019). Επιπρόσθετα, το ίδιο παθογόνο έχει αναφερθεί πως προκαλεί ζημιά και στους καρπούς προκαλώντας μαύρες κηλίδες που εξελίσσονται σε κυκλική, βυθισμένη, καστανή σήψη (Harteveld et al., 2020). Οι Crespo et al. (2018) παρατήρησαν σε προσβεβλημένα μήλα ανοιχτόχρωμες έως σκούρες καφέ κηλίδες, διαμέτρου τριών έως τεσσάρων εκατοστών με καθορισμένα όρια. Στη συνέχεια της ασθένειας, ο καρπός μαλάκωσε και υπέστη ολοκληρωτική σήψη. Σε μια άλλη έρευνα, σε δέντρα μηλιάς παρατηρήθηκαν έλκη στους κλάδους, καθώς και σχηματισμένες καρποφορίες του μύκητα *Diplodia bulgarica*. Σε τεστ παθογένειας, τα φυτά που προσβλήθηκαν από το

παθογόνο που απομονώθηκε, εμφάνισαν μεταχρωματισμό του φλοιού, του καμβιακού δακτυλίου και του ξυλώματος, έλκη και ακανόνιστες κηλίδες καφέ χρώματος στον εξωτερικό φλοιό που με την πάροδο του χρόνου εξελίχθηκαν προς την κορυφή και προς τη βάση του φυτού (Hanifeh et al., 2017).

Μύκητες του γένους *Dothiorella* ανιχνεύθηκαν σε συμπτωματικά φυτά μηλιάς. Τα συμπτώματα ήταν παρόμοια με την ασθένεια που προκαλούν οι μύκητες του γένους *Botryosphaeria* και *Diplodia*. Αποδεικνύεται, πως συνυπάρχουν στα δείγματα των περισσότερων πειραματικών δειγμάτων σε έρευνες ανά τον κόσμο (Lódolo et al., 2022).

Ένα ακόμα γένος της οικογένειας που έχει αναφερθεί πρόσφατα είναι το γένος *Lasiodiplodia*. Έλκη στους κλάδους, και μεγαλύτερα επουλωτικά στους βραχίονες, μεταχρωματισμός, καφέτιασμα του φλοιού και ακόμα και του ξύλου, νέκρωση και τελικά αποπληξία, παρατηρήθηκαν σε συμπτωματολογικά δέντρα μηλιάς. Το παθογόνο που ανιχνεύθηκε ήταν μύκητας του γένους *Lasiodiplodia* (Martins et al., 2018; Xue et al., 2019).

Το γένος *Neofusicoccum* , αποτελεί ένα ακόμα γένος μύκητα της οικογένειας Botryosphaeriaceae, που προκαλεί παρόμοια συμπτωματολογία. Ο μύκητας ανιχνεύθηκε σε απομόνωση από προσβεβλημένα δένδρα μηλιάς στη νότια Ιταλία. Η συμπτωματολογία αποτελούνταν από έλκη στον κορμό και στους βραχίονες, μεταχρωματισμός του καμβίου και του φλοιού, σε προχωρημένο στάδιο της ασθένειας κιτρίνισμα φύλλων και αποπληξία (Mang et al., 2022). Ομοίως στην Αμερική ο μύκητας ανιχνεύθηκε από απομόνωσεις προσβεβλημένων δένδρων μηλιάς. Έλκη στον κορμό και στους βραχίονες, καθώς και κηλίδες στα φύλλα παρουσιάστηκαν στα συμπτωματολογικά δένδρα (Rooney-Latham and Soriano, 2016).

Οι μύκητες της οικογένειας Botryosphaeriaceae στην εγγενή τους μορφή σχηματίζουν ασκούς και ασκοσπόρια μέσα σε κοιλότητες ενός στρώματος που ονομάζεται ασκόστρωμα. Οι ασκοί βρίσκονται στα ψευδοθήκια, μυκηλιακούς σχηματισμούς στα έλκη του ξύλου προηγούμενων ετών και εσωκλείουν έως και οχτώ ασκοσπόρια (Tennakoon et al., 2016). Αυτός αποτελεί έναν από τους τρόπους διαχείμασης του παθογόνου (Marsberg et al., 2017). Τα ασκοσπόρια μπορεί να έχουν ένα με δύο σέπτα ή και καθόλου, ανάλογα με το είδος του παθογόνου (Phillips et al., 2013). Την άνοιξη με την αύξηση της θερμοκρασίας και της υγρασίας, με τον άνεμο και τη βροχή, τα ασκοσπόρια απελευθερώνονται και προσβάλλουν νέα φυτικά μέρη. Οι προσβολές συνήθως γίνονται από τομές κλαδέματος ή από σημεία όπου έχουν τραυματιστεί τα φυτά και η φυσική άμυνα της επιδερμίδας έχει καταστραφεί (Slippers and Wingfield, 2007). Στην αγενή μορφή το παθογόνο σχηματίζει πυκνίδια, και

πυκνιδιοσπόρια, τα οποία διασπείρονται και προσβάλλουν φυτικά μέρη (Kim et al., 2001). Όπως και στην εγγενή αναπαραγωγή, έτσι και εδώ οι καρποφορίες σχηματίζονται μέσα σε στρώματα, πανομοιότυπα με εκείνα των ασκωστρωμάτων. Τα κονίδια αυτής της οικογένειας παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία, ανάλογα με το είδος του παθογόνου (Phillips et al., 2008). Σε γενικές γραμμές, η μορφολογία των κονιδίων χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: η πρώτη περιλαμβάνει κονίδια με λεπτά τοιχώματα και μακρόστενα, σαν αυτά του γένους *Fusicoccum* (Smith et al., 2001), ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει κονίδια πιο πλατιά και κοντά, συνήθως σκούρα και με πιο παχιά τοιχώματα, σαν αυτά του γένους *Diplodia* (Amponsah et al., 2011).

Δύο από τους κύριους παράγοντες για την εξάπλωση της ασθένειας είναι η θερμοκρασία και η χρονική διάρκεια διαβροχής των φυτικών μερών. Έρευνα έδειξε πως η κατάλληλη θερμοκρασία για την παραγωγή ψευδοθηκίων και καρποφοριών του παθογόνου, είναι είκοσι με είκοσι πέντε βαθμούς κελσίου. Επίσης η περίοδος διαβροχής των φυτικών μερών, στα οποία βρίσκονται τα έλκη, ήταν μεγαλύτερο από τρεις ημέρες (Muñoz-Adalia and Colinas, 2021; Xue et al., 2021). Το υδατικό στρες και γενικότερα τα πιο καταπονημένα φυτά είναι πιο ευάλωτα στην προσβολή του μύκητα (Bellée et al., 2017; Gonthier and Nicolotti, 2013). Οι πληγές που δημιουργούνται από το κλάδεμα των δένδρων φαίνεται να είναι το πιο σοβαρό μέσω μετάδοσης του παθογόνου, γι' αυτό και κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή ενός σκευάσματος, αμέσως μετά το κλάδεμα που θα προστατεύσει το φυτό από την μόλυνση (Holland et al., 2021).

1.3.2 Γένη της τάξης Diaporthales

Η οικογένεια Valsaceae ανήκει στην τάξη Diaporthales των ασκομυκήτων. Συμπεριλαμβάνει πολλά γένη μυκήτων που προκαλούν canker-dieback συμπτώματα σε πολλές δενδρώδεις καλλιέργειες ανά τον κόσμο. Τα σημαντικότερα γένη είναι: *Leucostoma*, *Valsa*, *Valsella*, *Valseutypella* (Rossman et al., 2007). Τα παθογόνα αυτά συνδέονται στην αγνή τους μορφή με είδη μυκήτων του γένους *Cytospora*. Ο Τζάμος (2007) αναφέρει πως το γένος *Cytospora* προκαλεί έλκη σε βραχίονες δένδρων και πως η τέλεια μορφή του ανήκει στην ομάδα των ασκομυκήτων και πιο συγκεκριμένα στο γένος *Leucostoma*. Ωστόσο τα περιθήκια και τα ασκοσπόρια (*Leucostoma*) δεν σχηματίζονται συχνά. Με την πάροδο των χρόνων και τη σύγχρονη ταξινόμηση έχει εδραιωθεί το όνομα *Cytospora* ως τον πιο κοινό παρονομαστή της συμπτωματολογίας της ασθένειας (Agris 2017).

Σε πείραμα που έγινε στην Κίνα, οι επιστήμονες απομόνωσαν από συμπτωματολογικά δένδρα μηλιάς στελέχη μυκήτων του είδους *Cytospora schulzer* και *Cytospora mali*. Στους μεγάλους κορμούς και στους βραχίονες των δένδρων εμφανίστηκαν έλκη που ξεκίνησαν από νέκρωση του φλοιού (Ma et al., 2020). Στην ίδια χώρα, ερευνητές απομόνωσαν τον μύκητα από δένδρα μηλιάς με μεγάλα έλκη στον κορμό, ξεφλούδισμα του φλοιού, μεταχρωματισμός του καμβίου, καθώς επίσης παρατήρησαν πυκνίδια στον νεκρό φλοιό, μικρά σαν σπυριά (Wang et al., 2014). Συμπερασματικά, στην εξέλιξη της συμπτωματολογίας παρατηρήθηκαν αρχικά, μεταχρωματισμοί στον εξωτερικό φλοιό, στην πορεία βυθισμένα σκούρα σημεία που εξελίχθηκαν τελικά σε έλκη. Στην πορεία ξήρανση κλάδων, βραχιόνων και τελικά ολόκληρου του δέντρου (dieback). Μετά από δεκαπέντε μέρες από την μόλυνση, το μυκήλιο έχει αναπτυχθεί σε όλο τον εξωτερικό φλοιό, στο κάμβιο και στα αγγεία του ξύλου, σχηματίζοντας τέλος καρποφορίες κονιδίων στα έλκη (Ke et al., 2013).

Ένα ακόμα γένος της τάξης Diaporthales που έχει δημιουργήσει πολλά προβλήματα σε δενδρώδεις καλλιέργειες είναι το *Diaporthe* και στην αγενή του κυρίως μορφή το *Phomopsis*. Επιστήμονες απομόνωσαν το παθογόνο από προσβεβλημένα νεοφυτεμένα δένδρα μηλιάς. Στη συμπτωματολογία παρατηρήθηκαν σκούροι μεταχρωματισμοί εξωτερικά του φλοιού, μεταχρωματισμός στο κάμβιο και στο ξύλωμα των νεαρών φυτών. Η αναγνώριση έγινε από καλλιέργεια στο εργαστήριο όπου παρατηρήθηκαν τα χαρακτηριστικά, δύο τύπων κονίδια του μύκητα. Το είδος του παθογόνου ήταν το *Diaporthe eres* (Ali et al., 2020). Σε παρόμοια έρευνα, απομονώθηκαν στελέχη του μύκητα *Phomopsis* spp, από προσβεβλημένα δένδρα μηλιάς με την ίδια συμπτωματολογία (Abreo et al., 2012). Ένα ακόμα ενδιαφέρον πείραμα, έδειξε πως ο μύκητας μπορεί να συμβιώνει με το φυτό χωρίς να έχουν προκληθεί συμπτώματα της ασθένειας. Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές απομόνωσαν μύκητες του γένους *Diaporthe* (*Phomopsis*) από συμπτωματικά αλλά και από υγιή, δηλαδή χωρίς συμπτώματα, δέντρα (Król et al., 2017).

Οι μύκητες που αναφέρθηκαν παραπάνω, της τάξης Diaporthales διαχειμάζουν, κατά κύριο λόγο, ως μυκήλιο και υπό μορφή πυκνιδίων στα έλκη. Τα πυκνιδιοσπόρια εξέρχονται από τα πυκνίδια και όταν επικρατεί βροχερός καιρός, διασπείρονται και μολύνουν υγιή φυτά (Agrios 2017). Μεταφορά μολύσματος γίνεται και με τον άνθρωπο αλλά και με τα ξυλοφάγα έντομα (Masood et al., 2011). Οι προσβολές γίνονται κυρίως το φθινόπωρο και την άνοιξη, όπου έχουμε αυξημένη βροχόπτωση και υγρασία. Τα μικρότερα κλαδιά μολύνονται από πληγές, ή από ουλές που δημιουργούν τα φύλλα με την πτώση τους. Τα μεγαλύτερα κλαδιά μολύνονται από πληγές και τομές κλαδέματος. Ωστόσο μία πειραματική έρευνα έδειξε πως η δραστηριότητα του παθογόνου υφίσταται και το χειμώνα αλλά σε πολύ μικρότερους ρυθμούς,

καθώς τα νεκρωτικά σημεία μεγαλώνουν αργά, μέσω της ενζυμικής δράσης του παθογόνου (Mihaescu et al., 2021).

1.3.3 Γένη της τάξης Hypocreales

Στην τάξη Hypocreales κατατάσσονται μύκητες του γένους *Neonectria* (συν. *Nectria galligena*; αγενής μορφή *Cylindrocarpon heteronema*). Ερευνητές ανίχνευσαν τον μύκητα σε προσβεβλημένα φυτά μηλιάς σε φυτώρια, που παρουσίαζαν συμπτωματολογία με έλκη. Παράλληλα προσπάθησαν να αναπτύξουν μία μέθοδο ανίχνευσης του παθογόνου, όταν αυτό ακόμα βρίσκεται στη λανθάνουσα φάση και δεν έχουν εμφανιστεί τα συμπτώματα της ασθένειας στα φυτά (Wenneker et al., 2017). Σε παρόμοια έρευνα οι επιστήμονες απομόνωσαν τον μύκητα από φυτά που δεν παρουσίαζαν ακόμα συμπτώματα, κάνοντας αποδεκτό το γεγονός πως το παθογόνο μπορεί να εισέλθει από πληγές, τομές κλαδέματος και από ανοίγματα που δημιουργούνται κατά την πτώση των φύλλων, και να παραμείνει σε απόσταση δέκα με δεκαπέντε χιλιοστών, από το σημείο εισόδου χωρίς ακόμα να ξεκινήσει η παθογένεια της ασθένειας (Ghasemkhani et al., 2016; Olivieri et al., 2021). Σε ένα πολύ ενδιαφέρον πείραμα στη Νέα Ζηλανδία, επιστήμονες προσπάθησαν να συσχετίσουν την αζωτούχο λίπανση της καλλιέργειας μηλιάς, με την άμυνα των φυτών ενάντια στους μύκητες του γένους *Nectria*. Διαπίστωσαν ότι η εφαρμογή νιτρικού καλίου στο έδαφος, είχε το θετικότερο αποτέλεσμα στην άμυνα των φυτών, παράλληλα όμως μεγάλες ποσότητες αζώτου στη θρέψη των δένδρων έδειξε να ευνοεί την εκδήλωση της ασθένειας. Οι επιστήμονες στην εργασία τόνισαν πως η δράση του καλίου και του αζώτου στην άμυνα των δένδρων, έναντι αυτών των παθογόνων πρέπει να μελετηθεί εκτενέστερα (Vorster et al., 2021).

Ένα ακόμα γένος που συνδέεται στην εγγενή του φάση με το γένος *Nectria* και παράλληλα με την τάξη Hypocreales είναι το *Fusarium*. Ο Τζάμος (2007) αναφέρει πως κάποια είδη του γένους *Nectria* συνδέονται στην αγενή τους φάση με το γένος *Fusarium*. Επίσης ο Παναγόπουλος (2007) αναφέρει πως στην ατελή φάση του γένους *Nectria* συναντάται το παθογόνο *Cylindrocarpon heteronema*, συν. *Fusarium heteronemum*. Ο Agrios (2017) αναφέρει πως ο μύκητας του γένους *Nectria* που προκαλεί συμπτώματα όπως έλκη στα μηλοειδή, σχηματίζει μονοκύτταρα μικροκονίδια ή κυλινδρικά μακροκοκκονίδια του γένους *Cylindrocarpon*. Ερευνητές απομόνωσαν κονίδια του γένους *Fusarium* από φυτά με παρόμοια συμπτωματολογία που προκαλούν μύκητες του γένους *Nectria*. Πιο συγκεκριμένα, παρατήρησαν σημεία μεταχρωματισμού του εξωτερικού φλοιού σαν μικρές καστανόχρωμες κηλίδες, σε νεαρά δένδρα ενός και δύο ετών, και σημείωσαν πως αυτά ξεκινούν από παλιές τομές, από σημεία πληγών, από οφθαλμούς ή από τις περιοχές που βρίσκονταν ο μίσχος του

φύλλου, δηλαδή από το “κενό” που δημιουργείται κατά την πτώση των φύλλων (Marek et al., 2013).

Ως αναφορά τον κύκλο ζωής των παθογόνων, το γένος *Nectria* σχηματίζει δικύτταρα ασκοσπόρια σε ασκούς που βρίσκονται σε περιθήκια με έντονα χρώματα (Agtios, 2017). Πιο πρόσφατες έρευνες αναφέρουν και άλλες μορφές ασκοσπορίων, σε νέα είδη του γένους (Araujo et al., 2022; Zeng and Zhuang, 2015). Ο μύκητας διαχειμάζει ως μυκήλιο σε παλιά έλκη ή με τα περιθήκια στον νεκρό φλοιό. Την άνοιξη με συνθήκες ευνοϊκές για το παθογόνο, τα κονίδια που έχουν σχηματιστεί διασπείρονται και μολύνουν υγιή φυτικά μέρη (Xu et al., 1998). Τα περιθήκια εμφανίζονται στα έλκη τέλος του φθινοπώρου και του καλοκαιριού με κύριους παράγοντες ωρίμανσης και διασποράς των ασκοσπορίων να είναι η θερμοκρασία, η διαβροχή των φυτικών μερών και η κατάσταση του ξενιστή (Latorre et al., 2002). Σε μεγαλύτερης ηλικίας κλάδων, τα έλκη είναι μεγάλα και επουλωτικά, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σχέδιο ομόκεντρων κύκλων γύρω από το αρχικό έλκος. Το σύμπτωμα αυτό φαίνεται να είναι χαρακτηριστικό για τη διάγνωση της ασθένειας, αλλά το πρόβλημα υπάρχει σε νεαρούς κλάδους ή και νεαρά φυτά, όπου εκεί η εξάπλωση της ασθένειας είναι πιο γρήγορη και τα σημεία αυτά καταρρέουν χωρίς να δημιουργηθεί επουλωτικός ιστός (Θανασουλόπουλος, 1996).

1.3.4 Γένη της τάξης Xylariales

Το γένος *Eutypa* ανήκει στην τάξη Xylariales και απασχολεί εδώ και πολλά χρόνια την επιστημονική κοινότητα παγκοσμίως, καθώς το παθογόνο εμφανίζεται σε μια πληθώρα ξενιστών με κύριο το αμπέλι (Catal et al., 2007; Grinbergs et al., 2021; Luna et al., 2022). Στην καλλιέργεια της μηλιάς, επιστήμονες απομόνωσαν το παθογόνο από συμπτωματικά δένδρα δύο ετών, μαζί με άλλα παθογόνα που είναι υπεύθυνα για (canker and dieback) το σύνδρομο της αποπληξίας και των ελκών (Nourian et al., 2021). Στις Η.Π.Α. το παθογόνο ανιχνεύθηκε αρκετά νωρίτερα σε γιγαρτόκαρπα και συγκεκριμένα σε καλλιέργεια αχλαδιάς (Trouillas and Gubler, 2010). Επίσης, ερευνητές απομόνωσαν το παθογόνο από δένδρα μηλιάς και αχλαδιάς στη Νότια Αφρική (Cloete et al., 2011). Στην Ελλάδα ο κύκλος της ασθένειας είναι γνωστός κυρίως από τις καλλιέργειες των πυρηνόκαρπων, της ελιάς και του αμπελιού. Η συμπτωματολογία περιέχει έλκη, συμπτώματα αποπληξίας όπως καχεκτικά φυτά, κιτρίνισμα φύλλων και τελικά ξήρανση κλάδων. Το χαρακτηριστικό σύμπτωμα παρατηρείται σε εγκάρσια τομή ενός προσβεβλημένου βλαστού, όπου υπάρχει μεταχρωματισμός του ξύλου, που αρχίζει από μια τομή κλαδέματος ή μια μεγάλη πληγή (Παναγόπουλος, 2007). Η τέλεια μορφή του μύκητα σχηματίζει περιθήκια βυθισμένα στο ξύλο, ασκούς και ασκοσπόρια τα οποία αποτελούν το μόλυσμα. Τα ασκοσπόρια ωριμάζουν

τέλη του χειμώνα με αρχές άνοιξης, καθώς οι ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξής τους είναι η μεγάλη ποσότητα βροχής και ο άνεμος. Η είσοδος του παθογόνου στα φυτά γίνεται κατά κύριο λόγο, από τις τομές κλαδέματος, καθώς ο μύκητας αποικεί κατευθείαν στο ξήλωμα. Τα έλκη παρουσιάζονται πολύ αργότερα, αφού η προσβολή ξεκινά από μέσα προς τα έξω, πηγαίνοντας από το ξήλωμα προς τον εξωτερικό φλοιό (Θανασουλόπουλος, 1996).

Ένα ακόμα γένος της τάξης Xylariales είναι το *Rosellinia*. Ο μύκητας προσβάλλει κυρίως ρίζες δέντρων όπου και έχουν παρατηρηθεί μαύρα σφαιρικά περιθήκια στο φλοιό νεκρών ριζών (Τζάμος, 2007). Κύριο σημείο που έχει παρατηρηθεί είναι ο σχηματισμός λευκής μυκηλιακής πλάκας ανάμεσα στον φλοιό και το ξύλωμα ριζών. Διαχειμάζει κυρίως με τη μορφή των ριζόμορφων και από υπολείμματα νεκρών ριζών στο έδαφος, προσβάλλει υγιείς φυτικών ιστούς. Η συμπτωματολογία εστιάζεται στο υπέργειο μέρος των φυτών, όπου παρατηρούνται καχεξία, χλώρωση και ξήρανση φυτών. Το κύριο σύμπτωμα είναι το σύνδρομο της αποπληξίας (dieback) και η παθογένεια μοιάζει αρκετά με αυτή που προκαλούν μύκητες του γένους *Armillaria* (Παναγόπουλος, 2007). Στο Ισραήλ ερευνητές προσπάθησαν να εξηγήσουν πως ο μύκητας προσβάλλει τα φυτά και πως μεταφέρεται το μόλυσμα σε καλλιέργεια μηλιάς και διαπίστωσαν πως το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής γίνεται από γειτνιαζουσες νεκρές ρίζες μέσα στο έδαφος (Dafny-Yelin et al., 2018). Στην ίδια χώρα, πολλά χρόνια νωρίτερα, οι επιστήμονες δοκίμαζαν τρόπους αντιμετώπισης του μύκητα με βάση την ηλιοαπολύμανση, δίνοντας σοβαρά αποτελέσματα μείωσης του μολύσματος στο έδαφος (Freeman et al., 1990). Ακόμα, και άλλοι ερευνητές προσπάθησαν να εξετάσουν πιο φιλικούς προς το περιβάλλον τρόπους αντιμετώπισης, μελετώντας ανταγωνιστικούς μύκητες του γένους *Trichoderma* (Golafrouz et al., 2020).

1.3.5 Γένη της τάξης Agaricales (*Armillaria mellea*)

Στην τάξη Agaricales, συγκαταλέγεται το γένος *Armillaria*, το οποίο προκαλεί μια από τις σοβαρότερες ασθένειες σε δενδρώδη καλλιέργειες και δασικά οικοσυστήματα. Η ασθένεια ανήκει στις σηψιρριζίες που έχουν ως αποτέλεσμα την τελική αποπληξία του φυτού. Είναι εδαφογενές παθογόνο, ανήκει στην ομάδα των Βασιδιομυκήτων. Το μόλυσμα παραμένει στο έδαφος σε υπολείμματα κυρίως νεκρών φυτικών ιστών με τη μορφή ριζόμορφων. Στη συνέχεια προσβάλλει τις υγιείς γειτνιαζουσες ρίζες. Στα συμπτώματα της ασθένειας έχει παρατηρηθεί η σταδιακή αποπληξία μεγάλων σε ηλικία δέντρων ξεκινώντας από καχεκτική ανάπτυξη, κιτρίνισμα φύλλων, ξήρανση κλάδων, βραχιόνων και με την πάροδο του χρόνου, ξήρανση ολόκληρων δέντρων. Σε νεαρά δέντρα η εξέλιξη της παθογένειας είναι πολύ πιο γρήγορη (Θανασουλόπουλος, 1996; Παναγόπουλος, 2007). Στη χώρα μας το 1999, απομονώθηκαν στελέχη του μύκητα από δασικά κυρίως φυτικά είδη (Tsopelas, 1999). Λίγα

χρόνια νωρίτερα, απομονώθηκε ο μύκητας από καλλιέργεια αμυγδαλιάς, φυτεμένη σε έδαφος όπου τα προηγούμενα χρόνια υπήρχαν δασικά φυτικά είδη. Παρατηρήθηκε μυκηλιακή πλάκα ανάμεσα στο φλοιό και στο ξήλωμα στη βάση των προσβεβλημένων δένδρων και ριζόμορφα του μύκητα στη ριζόσφαιρα (Tsopelas and Tjamos, 1997). Στη χώρα μας, επιστήμονες δοκίμασαν την αντιμετώπιση του μύκητα με τη δραστική cyproconazole σε καλλιέργεια μηλιάς, ακτινιδιάς και καρυδιάς, βλέποντας ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Thomidis and Exadaktylou, 2012). Ερευνητές δοκίμασαν τρόπους μείωσης του μολύσματος με τη χρήση των μυκητοκτόνων fosetyl-Al και fenpropidin. Επίσης, δοκίμασαν ανταγωνιστικά στελέχη μυκήτων όπως αυτά τους γένους *Trichoderma* σε πειράματα αγρού σε καλλιέργεια μηλιάς. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά (Raziq and Fox, 2006).

1.3.6 Παθογόνα τους γένους *Phytophthora*

Το γένος *Phytophthora* ανήκει στην ομάδα των Ωομηκύτων και πιο συγκεκριμένα στην τάξη Peronosporales (Τζάμος, 2007). Η ασθένεια συγκαταλέγεται στις σήψεις λαιμού, και τα πρώτα συμπτώματα εκφράζονται ως μεταχρωματισμένη περιοχή στον λαιμό, ενώ το κάμβιο κάτω από την περιοχή αυτή του φλοιού μεταχρωματίζεται και γίνεται καστανό (Παναγόπουλος, 2007). Στα μηλοειδή εμφανίζεται εξίδρωση στη βάση του λαιμού, και κατά τους θερινούς μήνες η εκδήλωση της ασθένειας εξελίσσεται σε αποπληξία. Τα φύλλα σε προσβεβλημένα φυτά μηλιάς ωριμάζουν πρόωρα και παίρνουν χρώμα κόκκινο προς μπρούτζινο (Θανασουλόπουλος, 1996). Στα συμπτώματα συγκαταλέγονται η αποπληξία (dieback), αλλά και τα έλκη (canker), κυρίως στην περιοχή του λαιμού του δέντρου (Παναγόπουλος, 2007). Ο μύκητας διαχειμάζει στο έδαφος σε σαπροφυτική μορφή, ή σε αντίξοες συνθήκες υπό τη μορφή των ωοσπορίων. Η μόλυνση γίνεται με τη μορφή ζωοσπορίων, και ο κύριος παράγοντας μετάδοσης του μολύσματος είναι το νερό, η υπερβολική εδαφική υγρασία. Έπειτα της προσβολής το παθογόνο αναπτύσσεται στους ιστούς του φλοιού, στο παρέγχυμα και στο κάμβιο (Θανασουλόπουλος, 1996). Στη χώρα μας, ερευνητές απομόνωσαν στελέχη του παθογόνου από καλλιέργεια μηλιάς και αχλαδιάς, και διαπίστωσαν πως για τα συγκεκριμένα υποκείμενα, από τα οποία έγινε η δειγματοληψία, επικράτησαν τα είδη *P. cactorum* και *P. Citricola* (Thomidis et al., 2002). Επιπρόσθετα, έχουν γίνει προσπάθειες σχεδιασμού μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης της ασθένειας από ερευνητές που διαπίστωσαν πως οι κύριοι παράγοντες μετάδοσης του μολύσματος είναι η διάρκεια των υγρών περιόδων και η θερμοκρασία (Harris and Xu, 2003). Ως αναφορά την καταπολέμηση, θετικά αποτελέσματα έχει αποδειχθεί ότι δίνει η δραστική phosphonate, σε πείραμα αγρού σε καλλιέργεια μηλιάς (Nyoni et al., 2021).

1.3.7 Παθογόνα του γένους *Verticillium*

Το γένος *Verticillium* ανήκει στην ομάδα των αδηλωμυκήτων. Πρόκειται για εδαφογενή είδη μυκήτων, οι οποίοι προσβάλλουν τις ρίζες των δένδρων (Θανασουλόπουλος, 1996). Οι ασθένειες που προκαλούνται από τα παθογόνα ανήκουν στις αδρομυκώσεις, καθώς οι μύκητες αναπτύσσονται στους ιστούς του ξηλώματος, των αγγείων των φυτών. Στα συμπτώματα συγκαταλέγονται η καχεκτική ανάπτυξη, η μαρανση των φύλλων και των κλάδων, η ημιπληγία και σε πολλές περιπτώσεις η καθολική ξήρανση των δέντρων (dieback). Ο μεταχρωματισμός του ξηλώματος είναι σε κάποιες περιπτώσεις ξενιστών χαρακτηριστικός και συνεπάγεται με την παρουσία του παθογόνου στα αγγεία των φυτών που μεταφέρουν το υδατικό διάλυμα στο υπέργειο μέρος (Παναγόπουλος, 2007). Επιστήμονες απομόνωσαν μαζί και με άλλα γένη μυκήτων, ένα μικρό ποσοστό του γένους *Verticillium*, σε καλλιέργεια μηλιάς με συμπτώματα μεταχρωματισμού φυτικών ιστών στο λαιμό δένδρων (Rashid and Naffaa, 2017). Πρόσφατες έρευνες σε χωράφια χρόνιων καλλιεργειών μηλιάς, έδειξαν μετά από δειγματοληψίες στο έδαφος της ριζόσφαιρας, υψηλούς πληθυσμούς μυκήτων του γένους *Verticillium*. Αντίθετα οι πληθυσμοί των ωφέλιμων μικροοργανισμών στο έδαφος ήταν πολύ εξασθενημένοι, πράγμα που πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη σε νέες έρευνες στο μέλλον (Jiang et al., 2017).

1.4 Σύγκριση συμπτωμάτων και σημείων σε σχέση με το φυτικό μέρος που προσβάλλουν και δημιουργούν συμπτώματα

Μύκητες του γένους *Botryosphaeria* εισέρχονται πολλές φορές από πληγές των δέντρων και πιο συγκεκριμένα από ανοίγματα της επιδερμίδας. Οι υφές του παθογόνου παρατηρήθηκαν ύστερα από ένα μήνα από την προσβολή στο κολένχυμα του φλοιού, σε μεσοκυττάριους χώρους (Han et al., 2016). Το παθογόνο φαίνεται να διεισδύει μέσα στα κύτταρα, ύστερα από την απελευθέρωση τοξινών που καταστρέφουν το κυτταρικό τοίχωμα, των κυττάρων του ξενιστή (Dong et al., 2021; Salvatore et al., 2021). Καθώς η διαδικασία της μόλυνσης των γειτονικών κυττάρων συνεχίζεται, δημιουργείται μία στρώση από νεκρά κύτταρα γύρω από της υφές του παθογόνου. Το στρώμα αυτό λειτουργεί ως άμυνα του φυτού, καθώς ξεχωρίζει το παθογόνο και το "απομακρύνει" από τα υγιή κύτταρά του. Τρεις μήνες από την προσβολή, ένα στρώμα αποτελούμενο από έξι έως δέκα σειρές νεκρών κυττάρων έχει δημιουργηθεί για τον σκοπό αυτό (Han et al., 2016).

Ερευνητές διαπίστωσαν πως ο μύκητας *N. Parvum* είναι πιο επιθετικός για την καλλιέργεια της μηλιάς σε σχέση με άλλα είδη που προκαλούν παρόμοια συμπτωματολογία, όπως: *Diaporthe eres*, *Trametes versicolor*, *Pestalotiopsis funerea*, *Phomopsis* spp και *Diaporthe foeniculina* (Mang et al., 2022).

Έρευνα σε καλλιέργεια μηλιάς έδειξε πως μύκητες του γένους *Cytospora* προσβάλουν τον φλοιό, το κάμβιο, το φλοίωμα και μέσα σε δέκα μέρες από την είσοδο του παθογόνου στους ιστούς, υφές του μύκητα έχουν αναπτυχθεί και στα αγγεία του ξύλου (Ke et al., 2013). Παθογόνα του γένους *Diaporthe* (*Phomopsis*) απομονώθηκαν από συμπτωματολογικά δένδρα μηλιάς στη Σκωτία. Σε τεστ παθογένειας που έγιναν στη συνέχεια, παρατηρήθηκε σε εγκάρσια τομή του βλαστού, μεταχρωματισμός του φλοιού, του καμβίου και του ξηλώματος (Ali et al., 2020).

Στελέχη του γένους *Nectria*, έχουν παρατηρηθεί να προσβάλουν αρχικά το φλοιό και να πολλαπλασιάζονται έντονα στους ιστούς του, και στη συνέχεια να προσβάλουν και τους ιστούς του ξηλώματος (Crowdy, 1949).

1.5 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανίχνευση, απομόνωση και ταυτοποίηση φυτοπαθογόνων μυκήτων, των οποίων οι ασθένειες που προκαλούν συμπτωματολογία ελκών, ξήρανσης κλαδίσκων και βραχιόνων, αποπληξίας, σε δέντρα μηλιάς.

Κεφάλαιο 2^ο Υλικά και Μέθοδοι

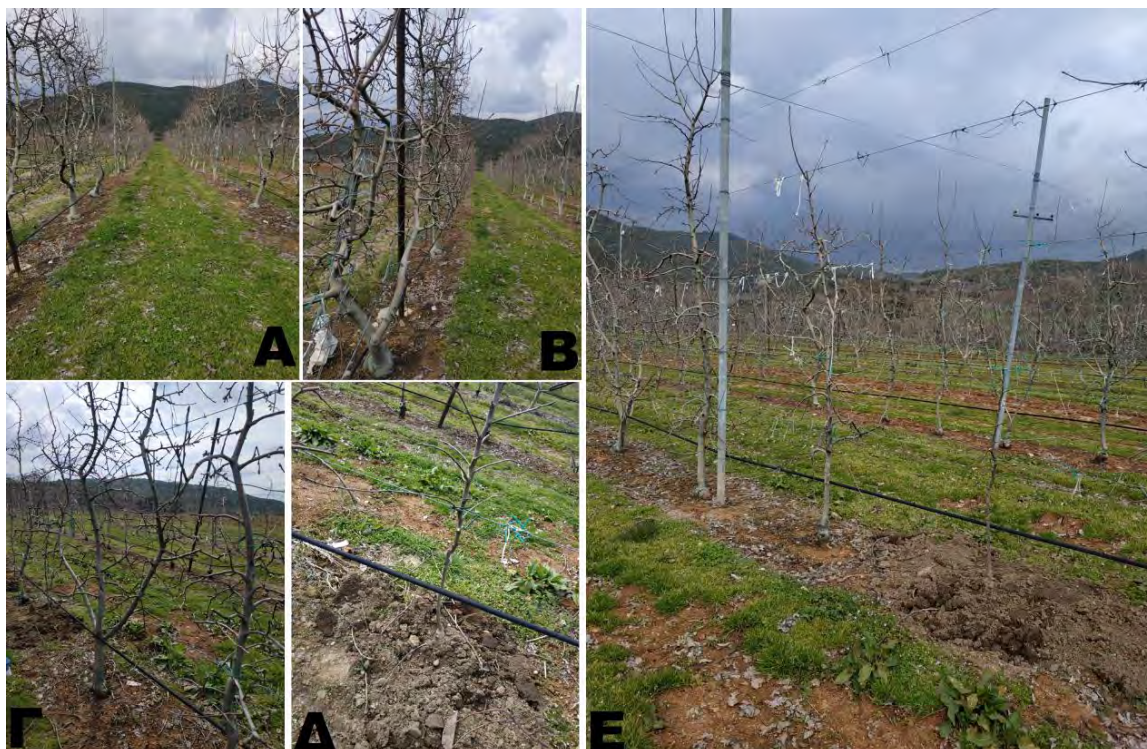
2.1 Συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε αγροτεμάχιο στην ευρύτερη περιοχή της Αγιάς Λάρισας. Στη συνέχεια, η διεξαγωγή των εργαστηριακών απομονώσεων έγινε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας και στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στον Βόλο.

2.1.1 Περιγραφή αγροτεμαχίου και συμπτωματολογίας δένδρων

Η λήψη δειγμάτων έγινε στις 17 Απριλίου του 2022 σε αγροτεμάχιο καλλιέργειας μηλιάς που βρίσκονταν στην ευρύτερη περιοχή της Αγιάς Λάρισας. Τα δέντρα στο χωράφι ήταν στην πλειοψηφία τους ηλικίας από επτά έως δέκα ετών, ενώ υπήρχαν και μικρότερης ηλικίας δένδρα, εξαιτίας νέκρωσης των γηραιότερων λόγω ασθενειών και μεταφύτευσης νέων (Εικόνα 1). Τα φυτά ήταν ποικιλίας Jonagold, σε υποκείμενο M9, διαμορφωμένα σε γραμμική παλμέτα και αποστάσεις φύτευσης 1,5 μέτρα πάνω στη γραμμή και 4 μέτρα μεταξύ των γραμμών. Οι εποικονιαστές ήταν δένδρα ποικιλίας G. Delicious και Gr. Smith.

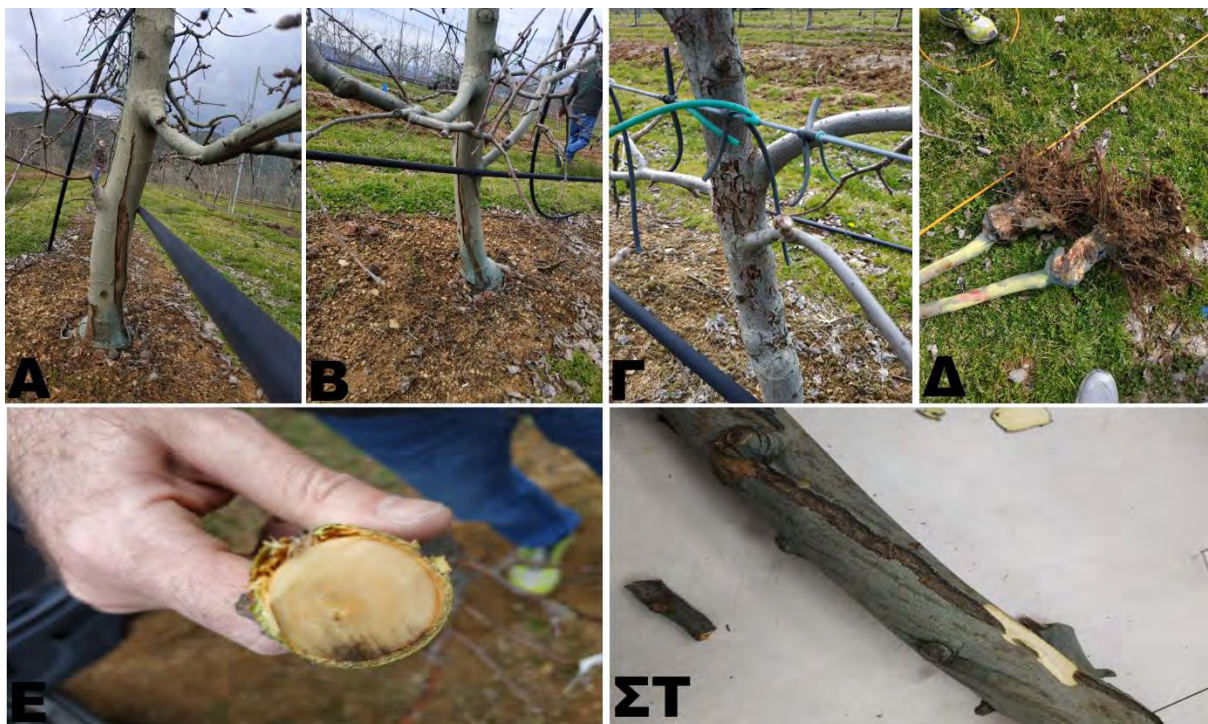
Σύμφωνα με τα λεγόμενα του παραγωγού, περίπου τριάντα τις εκατό των δένδρων κάθε χρόνο εκριζώνονταν και επαναφυτεύονταν άλλα στη θέση τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εικόνα των δένδρων, καθώς και ο σωρός με τα εκριζωμένα δένδρα στο τέλος του χωραφιού (Εικόνα 2). Κατά την εξέταση των φυτεμένων δένδρων παρατηρήθηκε ένα μοτίβο συμπτωμάτων. Κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν πριόνι ή λάμα χειρός, με σκοπό τον τεμαχισμό φυτών και πατόφιαρο για το ξελάκωμά τους. Η λάμα, μετά από κάθε κοπή ψεκάζονταν με διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης. Με αυτόν τον τρόπο, παρατηρήθηκε σε μικρούς κλαδίσκους, πορτοκαλί και σκούρος μεταχρωματισμός του καμβίου, μεταξύ του φλοιώματος και του ξυλώδους παρεγχύματος. Επιπρόσθετα, ήταν φανερά σημάδια αφυδάτωσης των καρποφόρων οργάνων (οφθαλμών) και νέκρωσης αυτών. Σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρήθηκαν νεκροί ολόκληροι οι κλαδίσκοι. Σε κάποιους κλάδους διαμέτρου τριών έως πέντε εκατοστών παρατηρήθηκε ξεφλούδισμα του εξωτερικού φλοιού, καθώς και ελαφρύς μεταχρωματισμός. Στους, μεγαλύτερης διαμέτρου, βραχίονες και στον κορμό του κεντρικού άξονα υπήρχαν σχισίματα του φλοιού στα οποία κατά την μεταχείρισή τους παρουσίασαν εύκολη αποκόλλησή του εξωτερικού φλοιού. Ακόμα παρατηρήθηκαν εκτεταμένη έλκη που στις άκρες τους παρουσίαζαν σημάδια επούλωσης. Στα σημεία των ελκών, αφαιρέθηκε ο φλοιός και παρατηρήθηκε καστανός μεταχρωματισμός στους ιστούς. Στην περιοχή της ρίζας δεν παρουσιάστηκε κάποιο εμφανές σύμπτωμα, έτσι ώστε να περιγραφεί στην προκειμένη περίπτωση (Εικόνα 3).



Εικόνα 1. Αγροτεμάχιο από το οποίο έγινε η δειγματοληψία. Α και Β δένδρα πιο μεγάλης ηλικίας σε διαμόρφωση παλμέτας. Γ δένδρα μικρότερης ηλικίας και Δ επαναφύτευση νέου δένδρου εξαιτίας εκρίζωσης του προσβεβλημένου παλαιού. Ε εδώ φαίνεται ξεκάθαρα η συχνή εκρίζωση και επαναφύτευση νέων δένδρων πάνω στην ίδια γραμμή, με αποτέλεσμα την ανομοιόμορφη κατανομή ηλικίας φυτών. Δεξιά παρατηρείται ένα νεοφυτεμένο, αριστερά του, ένα ηλικίας 2-3 ετών και πιο αριστερά ένα μεγαλύτερο.



Εικόνα 2. Μέγεθος της προσβολής. Στην εικόνα φαίνεται ο μεγάλος αριθμός εκριζωμένων δένδρων, εξαιτίας της μη παραγωγικής τους κατάστασης.



Εικόνα 3. Συμπτώματα. Α και Β σχισίματα του φλοιού στον κεντρικό άξονα-κορμό των δένδρων. Γ ξεφλούδισμα του φλοιού στον κεντρικό άξονα, σε ύψος περίπου ενός μέτρου από το έδαφος. Δ το ριζικό σύστημα κάποιων φυτών που ξελακώθηκαν για να εξεταστούν. Ε καστανός μεταχρωματισμός του καμβίου. ΣΤ εκτεταμένο έλκος σε μεγάλης διαμέτρου κλάδο.

2.1.2 Δείγματα φυτικού ιστού στο εργαστήριο

Ολόκληρα φυτά και τμήματα αυτών μεταφέρθηκαν για περαιτέρω εξέταση στο εργαστήριο. Από αυτά επιλέχθηκαν δύο δένδρα ηλικίας δύο έως τριών ετών με εμφανή συμπτώματα και ένα που δεν παρουσίαζε συμπτώματα και χαρακτηρίστηκε ως μάρτυρας-υγιές φυτό. Τα φυτά με συμπτώματα ονομάστηκαν Α και Β αντίστοιχα και το φυτό χωρίς συμπτώματα, ονομάστηκε Μ. Ως αναφορά τη συμπτωματολογία, το φυτό Α παρουσίαζε νέκρωση οφθαλμών και μικρών κλαδίσκων, μικρά έλκη στον κεντρικό άξονα και μεταχρωματισμό του καμβίου, ύστερα από εγκάρσια τομή (Εικόνα 3). Το φυτό Β είχε ένα διευρυμένο έλκος στον κεντρικό άξονα, κάτω από το οποίο υπήρχε καφέ μεταχρωματισμός. Ύστερα από εκτενέστερη παρατήρηση το έλκος χαρακτηρίστηκε ως επουλωτικό (Εικόνα 3).

Σκοπός του πειράματος σε αυτή τη φάση, ήταν η απομόνωση πιθανών φυτοπαθογόνων μυκήτων από τα ξυλοποιημένα φυτικά μέρη. Η δυσκολία του εγχειρήματος έγκειται στο γεγονός, πως έπρεπε να ληφθεί φυτικός ιστός από την φλοιό, το φλοιώμα, το κάμβιο και από τους ιστούς των αγγείων του ξύλου, αφού δεν ήταν γνωστό σε ποιον από αυτούς τους ιστούς αποικούν οι πιθανοί φυτοπαθογόνοι μύκητες. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά: δράπανο, τρυπάνια (ένα για κάθε δέντρο), φλόγιστρο, πλαστικά σωληνάρια τύπου Falcon. Στα φυτά ανοίχτηκαν τρύπες με το δράπανο και τα ρινίσματα του ξύλου μεταφέρθηκαν στα πλαστικά σωληνάρια. Μετά από κάθε άνοιγμα το τρυπάνι

αποστειρωνόταν με τη χρήση του φλόγιστρου. Το βάθος του κάθε ανοίγματος, είχε ως στόχο να παρθούν ρινίσματα από όλους τους φυτικούς ιστούς, μέχρι και το ξύλωμα. Πιο συγκεκριμένα στο φυτό Α πάρθηκαν τρία δείγματα από το υπέργειο μέρος, από τρία διαφορετικά σημεία: το 1, το 2 και το 3. Αυτά ονομάστηκαν Α1, Α2 και Α3. Με τα ρινίσματα γέμισαν δύο Falcon για το κάθε σημείο λήψης δείγματος. Συμπερασματικά, προέκυψαν: δύο πλαστικά σωληνάρια Α1, δύο πλαστικά σωληνάρια Α2 και δύο πλαστικά σωληνάρια Α3. Στο φυτό Β πάρθηκαν έξι δείγματα, τρία από το υπέργειο μέρος που ονομάστηκαν Β1, Β2 και Β3 αντίστοιχα και τρία από τον λαιμό του δέντρου, τα οποία ονομάστηκαν Ρ1, Ρ2 και Ρ3 αντίστοιχα. Όπως στην περίπτωση του φυτού Α, έτσι και στο φυτό Β, γέμισαν δύο Falcon για κάθε δείγμα. Συμπερασματικά προέκυψαν: δύο πλαστικά σωληνάρια Β1, δύο πλαστικά σωληνάρια Β2, δύο πλαστικά σωληνάρια Β3, δύο πλαστικά σωληνάρια Ρ1, δύο πλαστικά σωληνάρια Ρ2 και δύο πλαστικά σωληνάρια Ρ3. Τέλος, πάρθηκαν δύο δείγματα από το υπέργειο μέρος του υγιούς φυτού και ονομάστηκαν Μ1 και Μ2 αντίστοιχα. Στο τέλος προέκυψαν: ένα πλαστικό σωληνάριο Μ1 και ένα πλαστικό σωληνάριο Μ2 (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Διαγραμματική απεικόνιση της δειγματοληψίας.

Φυτό	Α	Β	Μ
Σημεία δειγματοληψίας	Α1, Α2, Α3	Β1, Β2, Β3 Ρ1, Ρ2, Ρ3	Μ1, Μ2
Αριθμός Falcon/ δείγμα	2	2	1

2.2 Απομόνωση μυκήτων σε θρεπτικά υποστρώματα.

Το συγκεκριμένο κεφάλαιο είχε ως σκοπό την απομόνωση μυκήτων από τον φυτικό ιστό (πριονίδια ξύλου) σε θρεπτικό υπόστρωμα, κατάλληλο για την ανάπτυξη μυκήτων.

2.2.1 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος PDA

Για την απομόνωση των μυκήτων από τα πριονίδια του ξύλου, παρασκευάστηκε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar). Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

- Σκαφίδια ζύγισης

- Σπάτουλες
- Μπουκάλι Duran 500 mL
- Αυτόκαυστο
- Ηλεκτρονικός ζυγός με ακρίβεια δύο δεκαδικών
- Απεσταγμένο νερό
- PDA (NEOGENE® Culture Media, Potato Dextrose Agar)

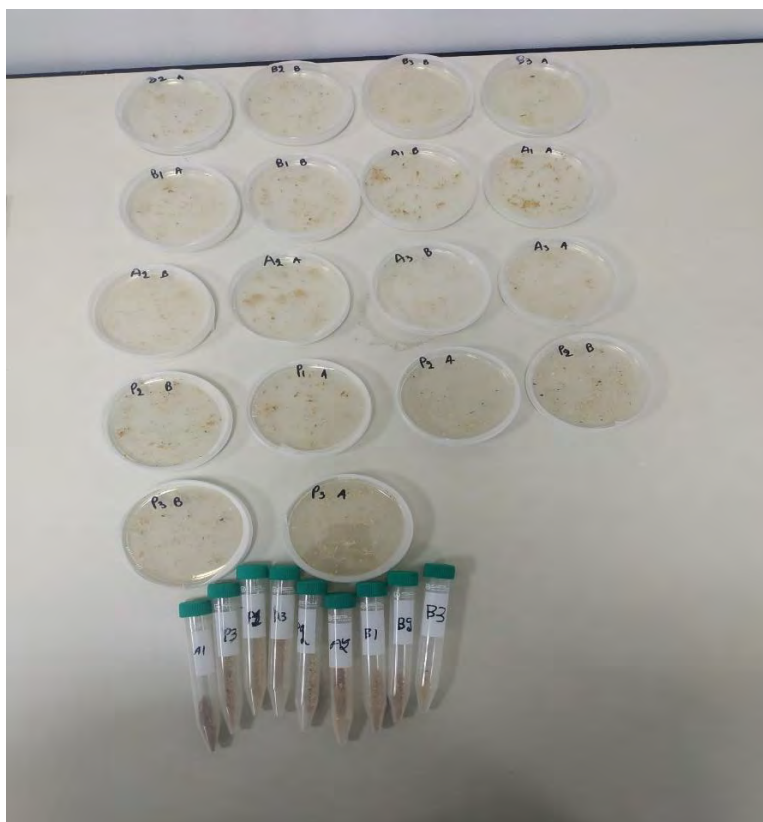
Αρχικά, στο μπουκάλι Duran προστέθηκαν 400 mL απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια προστέθηκαν σε αυτό 20 g PDA και στη συνέχεια προστέθηκε πάλι νερό, μέχρι τη χαραγή των 500 mL. Αφού αναδεύτηκε, το μπουκάλι τοποθετήθηκε σε αυτόκαυστο για είκοσι λεπτά, στους 121 °C.

Μετά την έξοδο του διαλύματος από το αυτόκαυστο, τοποθετήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής για περίπου είκοσι λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε τριβλία.

2.2.2 Μεταφορά φυτικού ιστού στο θρεπτικό υπόστρωμα και δημιουργία καθαρών καλλιεργειών

Για την μεταφορά του φυτικού ιστού στα τριβλία, χρησιμοποιήθηκαν ένα πλαστικό σωληνάριο τύπου Falcon από κάθε δείγμα, εκτός από τα δείγματα του μάρτυρα (Κεφάλαιο 2.1.2). Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν δύο τριβλία τα οποία χαρακτηρίστηκαν Α και Β αντίστοιχα. Επομένως για κάθε δείγμα δημιουργήθηκαν δύο επαναλήψεις (Πίνακας 2). Ο φυτικός ιστός, πριν μεταφερθεί στα τριβλία με το θρεπτικό υπόστρωμα, απολυμάνθηκε σε διάλυμα χλωρίνης. Πιο συγκεκριμένα, τα ρινίσματα ξύλου μεταφέρθηκαν από το κάθε σωληνάριο σε τούλι, στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε τριβλίο με διάλυμα 1% υποχλωριόδους νατρίου για δύο λεπτά. Έπειτα ξεπλύθηκαν σε τρία διαδοχικά τριβλία με αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό για ένα λεπτό στο καθένα. Τέλος μεταφέρθηκαν στα τριβλία, τα καπάκια των οποίων σημαδεύτηκαν με μαρκαδόρο για το αντίστοιχο δείγμα που αντιπροσώπευαν (Εικόνα 4). Τα τριβλία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25 °C.

Κάθε τέσσερις ημέρες τα τριβλία ελέγχονταν στον επωαστικό θάλαμο για την ανάπτυξη του μύκητα. Καθώς αναπτύχθηκαν παραπάνω του ενός μικροοργανισμού σε κάθε τριβλίο, κρίθηκε απαραίτητο η δημιουργία καθαρών καλλιεργειών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εκ νέου τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA, όπως έχει περιγραφθεί και παραπάνω.



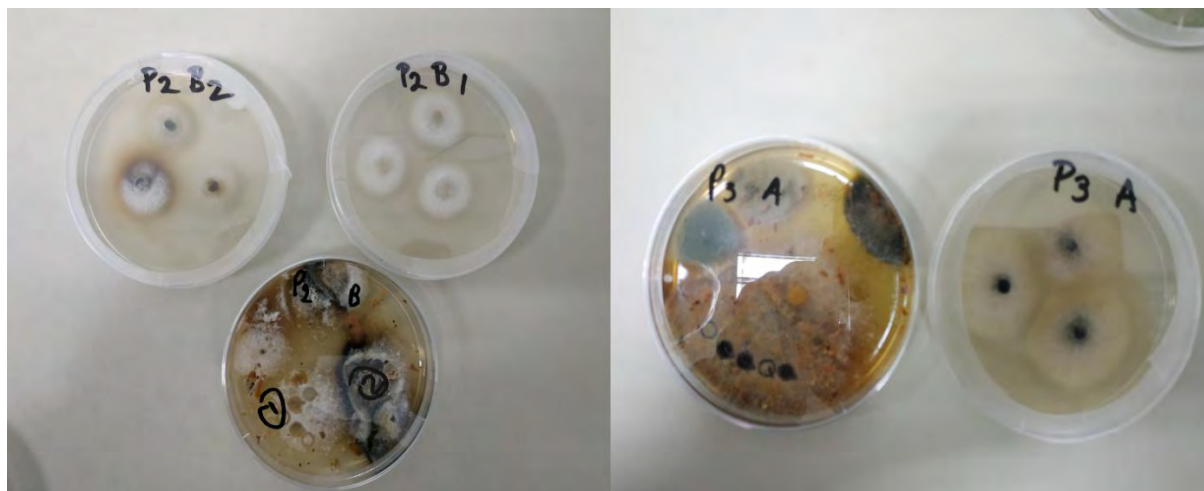
Εικόνα 4. Τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA και ο φυτικός ιστός από κάθε δείγμα σε δύο επαναλήψεις.

Η απομόνωση έγινε με μεταφορά μυκηλιακού δίσκου στο νέο τριβλίο με το θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Για την διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν φαιλοτρυπητής και λυχνία για την αποστείρωσή του. Στη συνέχεια τα τριβλία μεταφέρθηκαν σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 25 °C και ελέγχονταν ανά τέσσερις μέρες. Ο αριθμός των καθαρών καλλιεργειών και των μυκηλιακών δισκών που μεταφέρθηκαν δεν ήταν συγκεκριμένος, αλλά εξαρτήθηκε από τον αριθμό των διαφορετικών αποικιών που σχηματίστηκαν σε καθένα από τα αρχικά τριβλία Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα φαίνεται στην Εικόνα 5. Συγκεκριμένα από την επανάληψη P2B μεταφέρθηκαν μυκηλιακοί δίσκοι από δύο διαφορετικές αποικίες που χαρακτηρίστηκαν P2B1 και P2B2 αντίστοιχα. Συμπερασματικά δημιουργήθηκαν είκοσι τριβλία με καθαρές καλλιέργειες και δυστυχώς το P1B μολύνθηκε από άκαρι, δεν μελετήθηκε και καταστράφηκε (Πίνακας 4).

Πίνακας 2. Διαγραμματική απεικόνιση των απομονώσεων στα τριβλία.

Φυτό	Δείγμα	Επαναλήψεις/Τριβλία
A	A1	A1A
		A1B
	A2	A2A
		A2B
	A3	A3A
		A3B
B	B1	B1A
		B1B
	B2	B2A
		B2B
	B3	B3A
		B3B

	P1	P1A
		P1B
	P2	P2A
		P2B
	P3	P3A
		P3B



Εικόνα 5. Δημιουργία καθαρών καλλιεργείων. Στην επανάληψη P2B κρίθηκε απαραίτητο να μεταφερθούν μυκηλιακοί δίσκοι από δύο διαφορετικά σημεία του υποστρώματος, τα οποία χαρακτηρίστηκαν 1 και 2. Αντίθετα στην επανάληψη P3A κρίθηκε απαραίτητο να μεταφερθούν μυκηλιακοί δίσκοι από μία αποικία, με αποτέλεσμα η νέα επανάληψη να χαρακτηριστεί P3A.

Πίνακας 3. Διαγραμματική απεικόνιση των καθαρών καλλιεργείων και του αριθμού των τελικών καθαρών καλλιεργείων.

Δείγμα	Επαναλήψεις/Τριβλία	Καθαρές καλλιέργειες
A1	A1A	A1A1 A1A2
	A1B	A1B
A2	A2A	A2A
	A2B	A2B
A3	A3A	A3A
	A3B	A3B
B1	B1A	B1A
	B1B	B1B
B2	B2A	B2A
	B2B	B2B
B3	B3A	B3A
	B3B	B3B
P1	P1A	P1A

	P1B	-
P2	P2A	P2A
	P2B	P2B1 P2B2
P3	P3A	P3A
	P3B	P3B1 P3B2

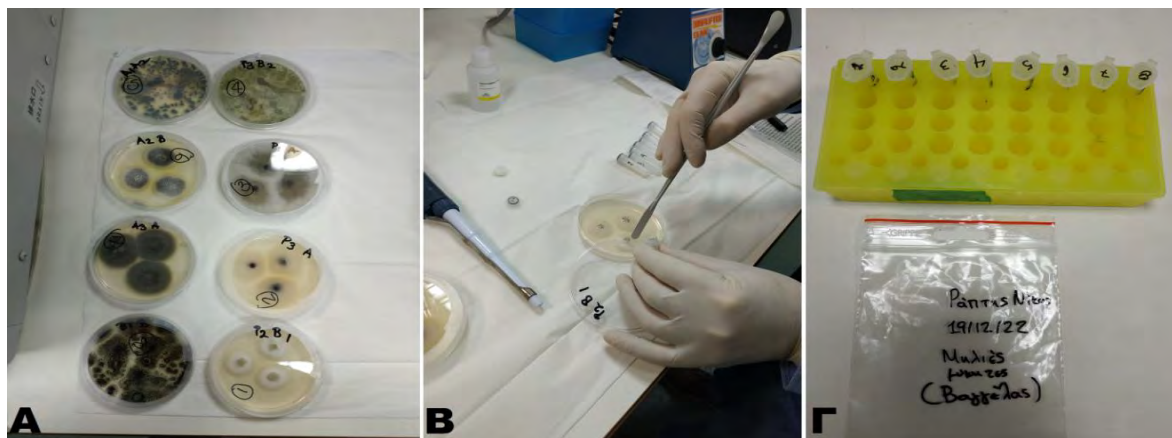
2.2 Απομόνωση DNA και PCR

Τα τριβλία P2B1, P3A, P1A, P3B2, A1A2, A2B, A3A, B1B επιλέχθηκαν για να γίνει ταυτοποίηση των μυκήτων με τη μέθοδο PCR. Σε πρώτη φάση έπρεπε να γίνει η απομόνωση του γενετικού υλικού των μυκήτων. Η διαδικασία έγινε με τη χρήση του Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit της εταιρίας ZYMO RESEARCH και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο χρήσης του, αφού πρώτα προσαρμόστηκε για τα δείγματα μυκηλίων. Για τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν:

- Πιπέτες ακριβείας
- Φυγόκεντρος
- Ομογενοποιητής
- Διάλυμα 95% αιθανόλης
- Σωληνάκια συλλογής
- Σωληνάκια τύπου Eppendorf 1.5 mL
- Υλικά και Buffers του Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit
- Αποστειρωμένες σπάτουλες

Αρχικά οι επαναλήψεις των μεταχειρίσεων μετονομάστηκαν τυχαία με αριθμούς από το ένα έως το 8, έτσι ώστε να γίνει πιο εύχρηστη όλη η διαδικασία (Πίνακας 4). Στη συνέχεια το μυκήλιο από κάθε αποικία μεταφέρθηκε με τη σπάτουλα σε ZR Bashing Bead Lysis Tube. Έπειτα, προστέθηκε σε κάθε tube 750 µL Bashing Bead Buffer και τα οχτώ σωληνάκια συλλογής (collection tubes) μεταφέρθηκαν στον ομογενοποιητή για δέκα λεπτά. Αμέσως μετά φυγοκεντρήθηκαν στα 10000 x g για ένα λεπτό και 400 µL από το κάθε tube μεταφέρθηκαν σε οχτώ ZymoSpin III-F Filter τα οποία είχαν μεταφερθεί σε οχτώ νέα σωληνάκια συλλογής, αντίστοιχα. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 8000 x g για ένα λεπτό, κρατήθηκαν τα σωληνάκια συλλογής με το διήθημα και πετάχτηκαν οι στύλες. Έπειτα προστέθηκαν 800 µL Genomic Lysis Buffer και 400 µL διαλύματος αιθανόλης σε κάθε σωληνάκι συλλογής και αναδεύτηκαν. Συνολικά σε κάθε σωληνάκι συλλογής είχαμε διάλυμα όγκου 1600 µL. Αμέσως μετά, 800 µL από το κάθε διάλυμα προστέθηκαν σε Zymo-Spin

PCR κι αυτό σε νέο σωληνάκι συλλογής και φυγοκεντρήθηκαν στα 10000 x g για ένα λεπτό. Έπειτα, κρατώντας τις οχτώ στύλες (Zymo-Spin PCR), επαναλήφθηκε η διαδικασία για τα υπόλοιπα 800μL του αρχικού διαλύματος. Οι στύλες κρατήθηκαν, αφού τοποθετήθηκαν σε νέα σωληνάκια συλλογής, προστέθηκαν σε αυτές 200μL DNA Pre-Wash Buffer και φυγοκεντρήθηκαν στα 10000 x g για ένα λεπτό. Έστερα, προστέθηκαν 500μL gDNA Wash Buffer και φυγοκεντρήθηκαν στα 10000 x g για ένα λεπτό.



Εικόνα 6. Διαδικασία απομόνωσης γενετικού υλικού. Α τα οχτώ τριβλία που επιλέχθηκαν για τη διαδικασία. Β μεταφορά των υφών στα ZR Bashing Bead Lysis Tubes. Γ οι οχτώ μεταχειρίσεις με το γενετικό υλικό στο τέλος της διαδικασίας.

Οι στύλες (Zymo-Spin PCR) κρατήθηκαν, και μεταφέρθηκαν σε οχτώ σωληνάκια τύπου Eppendorf 1.5 mL. Προστέθηκαν 50μL DNA Elution Buffer και φυγοκεντρήθηκαν στα 10000 x g για 30 δευτερόλεπτα. Η συγκεκριμένη διαδικασία επαναλήφθηκε αμέσως μετά. Στο τέλος, προέκυψαν οχτώ οχτώ σωληνάκια τύπου Eppendorf 1.5 mL με το απομονωμένο DNA. Έπειτα, οχτώ Zymo-Spin III-HRC τοποθετήθηκαν σε καθαρά σωληνάκια συλλογής και προστέθηκαν 600μL PrepSolution στο καθένα. Φυγοκεντρήθηκαν στα 8000 x g για τρία λεπτά, κρατήθηκαν οι στύλες και πετάχτηκαν τα σωληνάκια συλλογής (προετοιμασία στήλης). Τέλος το διάλυμα του απομονωμένου DNA, από τα προηγούμενα βήματα, προστέθηκε στις οχτώ Zymo-Spin III-HRC στήλες, σε καθαρά σωληνάκια τύπου Eppendorf 1.5 mL και φυγοκεντρήθηκε στα 12000 x g για 4 λεπτά.

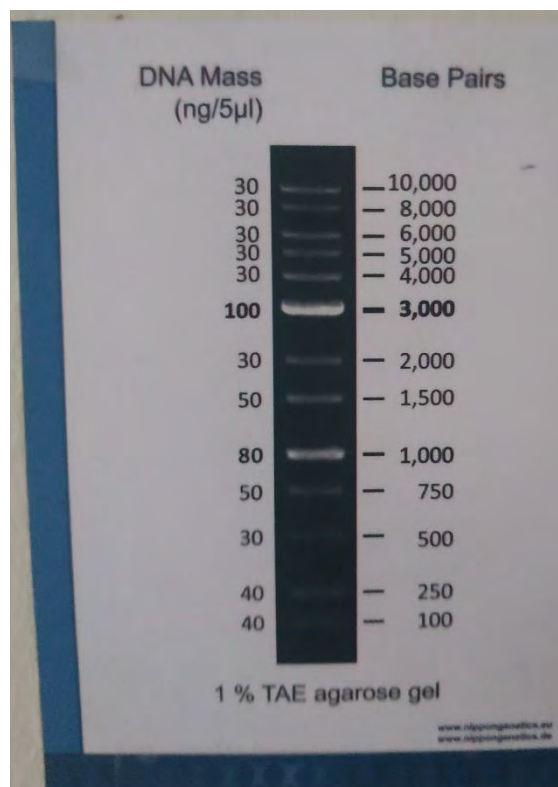
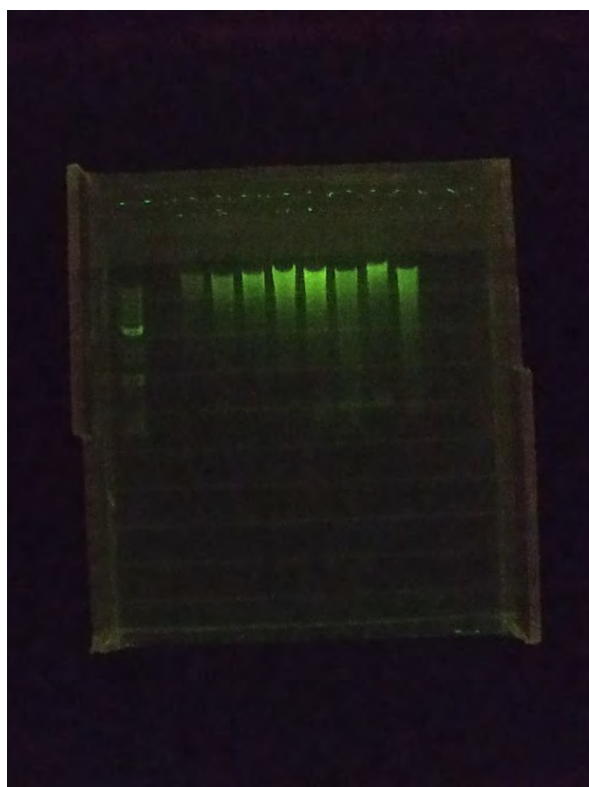
Πίνακας 4. Διαγραμματική απεικόνιση δειγμάτων και διαγνωστικών μεθόδων που ακολουθήθηκαν.

Δείγμα	Αριθμός	PCR	Παρασκεύασμα/Μικροσκόπιο
P2B1	1	✓	✓
P3A	2	✓	✓
P1A	3	✓	✓
P3B2	4	✓	✓
A1A2	5	✓	✓
A2B	6	✓	✓
A3A	7	✓	✓
B1B	8	✓	✓

Για να γίνει επαλήθευση της διαδικασίας, δηλαδή για να εξακριβώσουμε ότι όντως απομονώθηκε DNA από τα δείγματα, ακολουθήθηκε διαδικασία οριζόντιας ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε πλάκα πυκτής αγαρόζης. Για τη συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν:

- Κωνική Φιάλη 100mL
- Πλαστικό καλούπι (mold) για να σχηματιστούν τα βοηθία'
- Σιφώνιο μέτρησης όγκου
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Ηλεκτρονική ζυγαριά ακριβείας
- TAE (ρυθμιστικό διάλυμα)
- Αγαρόζη 0,2g
- Χρωστική (Midori Green direct)
- Ladder (δείκτη μοριακού βάρους DNA 1kb)

Αρχικά, ζυγίστηκαν 0,2g αγαρόζης και μεταφέρθηκαν στην κωνική φιάλη, μαζί με 20mL TAE. Η κωνική με το μείγμα τοποθετήθηκε για περίπου ένα λεπτό στον φούρνο μικροκυμάτων και αναδεύτηκε μέχρι να ομογενοποιηθεί. Έπειτα έγινε απόχυση του διαλύματος στο πλαστικό καλούπι και αφέθηκε για περίπου 30 λεπτά μέχρι να στερεοποιηθεί. Στη συνέχεια, το καλούπι τοποθετήθηκε στην συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, η οποία είχε πριν γεμίσει με TAE. Στο πρώτο βοηθίο μεταφέρθηκαν 3μL από το διάλυμα του Ladder και 1μL χρωστικής. Το δεύτερο βοηθίο αφέθηκε κενό και από το τρίτο και στα επόμενα οχτώ προστέθηκαν 5μL από το διάλυμα με το απομονωμένο DNA του κάθε δείγματος (1-8) και 1μL από το διάλυμα της χρωστικής. Η συσκευή ρυθμίστηκε σε σταθερή τάση στα 100V για περίπου 25 λεπτά. Τέλος η πλάκα πυκτής αγαρόζης παρατηρήθηκε σε τράπεζα φωτισμού (FAS-NANO) και αφού κρίθηκε επιτυχής η απομόνωση του DNA, συνεχίστηκε η διαδικασία αναγώρισης και ταυτοποίησης μυκήτων με τη μέθοδο PCR (Polymerase Chain Reaction).



Εικόνα 7. Απομόνωση DNA. Αριστερά παρατηρούμε την εικόνα ύστερα από την ηλεκτροφόρηση της πλάκας πηκτής αγαρόζης και δεξιά την απεικόνιση του Ladder που χρησιμοποιήσαμε.

Συνεχίζοντας, κρίθηκε απαραίτητο η μέτρηση της συγκέντρωσης DNA του κάθε διαλύματος (1-8) με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (Eppendorf BioPhotometer). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν σωληνάρια τύπου eppendorf (κυψελίδες), αφού επισημάνθηκαν με τον κωδικό του δείγματος από το 1 έως το 8. Σε κάθε eppendorf προστέθηκαν 495μL dd H₂O και 5 μL από το διάλυμα του DNA και αναδεύτηκαν για 2-3 δευτερόλεπτα, με τη χρήση vortex. Έπειτα, τοποθετήθηκε κυψελίδα με dd H₂O στο φασματοφωτόμετρο και η ένδειξη μηδενίστηκε. Οι ενδείξεις A₂₆₀ και A₂₆₀/A₂₈₀ καταγράφηκαν για το κάθε δείγμα (Πίνακας 6). Η συγκέντρωση υπολογίστηκε από τον τύπο: $C(\text{ng}/\mu\text{L}) = A_{260} \times 50 \times 100$, όπου 100 είναι ο συντελεστής αραίωσης που είχε το διάλυμα που μετρήθηκε, δηλαδή στην προκειμένη περίπτωση 5μL σε 500μL διαλύματος. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ με σκοπό να επιτύχουμε συγκέντρωση 20ng/μL σε κάθε δείγμα και να υπολογίσουμε την ποσότητα νερού που θα προσθέσουμε για την αραίωση. Αναλυτικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων και οι υπολογισμοί φαίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 5. Συγκέντρωση διαλύματος DNA και υπολογισμοί αραίωσης.

Δείγμα	A ₂₆₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	C (ng/μL)	V ₁ (μL)	V _{H2O} (μL)
1	0,026	1,12	130	10	55
2	0,118	1,18	590	10	285
3	0,043	1,23	215	10	97,5
4	0,091	1,31	455	10	217,5
5	0,018	2,53	90	10	35
6	0,048	1,56	240	10	110
7	0,024	1,47	120	10	50
8	0,035	1,34	175	10	77,5

Για τη διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής Universal Fungi Primers:

- 1270 CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA Fungi ITS1-F
- 1273 TCCTCCGCTTATTGATATGC Fungi ITS4

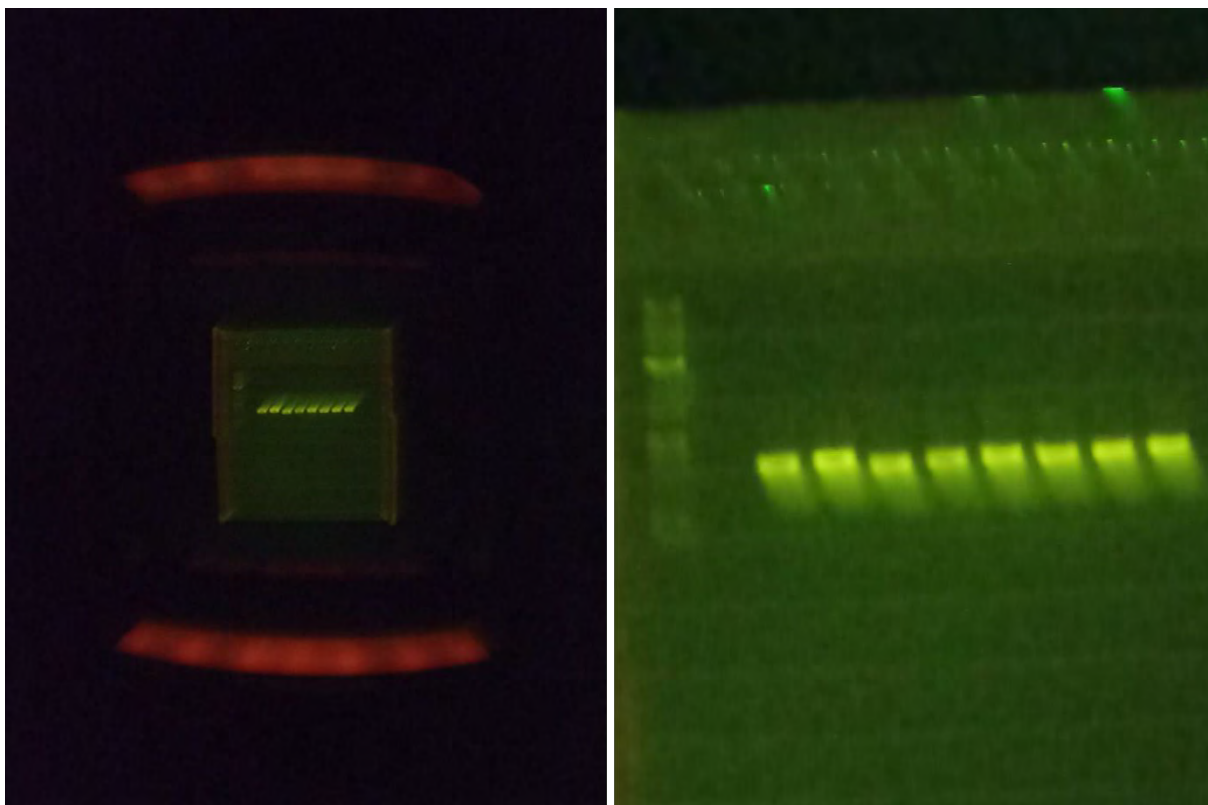
Επίσης δημιουργήθηκε ένα διάλυμα (Master Mix) για το αντιδραστήριο το οποίο αποτελούνταν από:

- 9 μ L dNTP's
- 13,5 μ L $MgCl_2$
- 45 μ L Buffer
- 18 μ L Primer F70
- 18 μ L Primer R73
- 319,5 injection H_2O

Για το κάθε δείγμα προστέθηκαν 48 μ L Master Mix και 2 μ L από το διάλυμα DNA (20ng/ μ L) σε μικροσωληνίσκους PCR (tubes PCR) και μεταφέρθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή (Genetics NIPPON. Genetics EUROPE/FastGene Ultra Cycler Gradient). Ως αναφορά τους κύκλους της εναλλαγής θερμοκρασίας, ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

- 95° C για 5 λεπτά
- 95° C για 30 δευτερόλεπτα, αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας DNA
- 51° C για 20 δευτερόλεπτα, υβριδισμός εκκινητών
- 72° C για 50 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση θυγατρικών αλυσίδων
- Τα τρία προηγούμενα βήματα, περατώθηκαν στα πλαίσια 35 κύκλων
- 72° C για 2 λεπτά

Με την περάτωση της διαδικασίας για την εξακρίβωση της επιτυχίας της αντίδρασης ακολουθήθηκε διαδικασία οριζόντιας ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε πλάκα πυκτής αгарόζης. Η παρασκευή της πλάκας έχει αναλυθεί προηγουμένους, με τη μόνη διαφορά ότι στο πρώτο βοθρίο προστέθηκαν 3 μ L διαλύματος Ladder και 0,5 μ L διαλύματος χρωστικής, το δεύτερο αφέθηκε κενό και από το τρίτο και στα επόμενα οχτώ προστέθηκαν 5 μ L διαλύματος DNA από την διαδικασία PCR και 0,5 μ L διαλύματος χρωστικής. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμίστηκε σε σταθερή τάση 100V για περίπου 30 λεπτά. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε σε τράπεζα φωτισμού (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Φωτογραφία από την πλάκα παρατήρησης του διαλύματος DNA μετά την μέθοδο PCR.

Αφού κρίθηκε επιτυχής η διαδικασία PCR, τα διαλύματα του DNA στάλθηκαν στη Λάρισα στο εργαστήριο της εταιρίας CeMIA (Cellular and Molecular Immunological Applications) για αλληλούχιση (Sanger Sequencing) των προϊόντων της PCR και ταυτοποίηση των μυκήτων.

2.3 Μικροσκοπικό παρασκεύασμα

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 5, οι απομονώσεις P2B1, P3A, P1A, P3B2, A1A2, A2B, A3A, B1B εξετάστηκαν και στο μικροσκόπιο , αφού έγινε μικροσκοπικό παρασκεύασμα. Για την διαδικασία χρησιμοποιήθηκε σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο Nikon Labophot-2 EFD3.

2.4 Διαδικασία NGS

Η μέθοδος της NGS (Next Generation Sequencing) , αν μπορεί να μεταφραστεί στα ελληνικά θα την ορίζαμε ως μέθοδος νέας γενιάς αλληλούχισης, αναφέρεται στη μαζική, ταυτόχρονη και παράλληλη αλληλούχιση μορίων νουκλεικών οξέων (DNA, RNA) για τον προσδιορισμό της σειράς των νουκλεοτιδίων σε αυτά. Η ταχεία ανάπτυξη της μεθόδου , σε σχέση με τις τεχνολογίες και τις αναλύσεις , έχει συμβάλει στην ραγδαία ανάπτυξη της ιατρικής και βιολογικής διάγνωσης. Η μέθοδος δίνει το πλεονέκτημα στους ερευνητές να αναλύσουν ολόκληρα γονιδιώματα, εξώματα, μεταγραφήματα, επιγονιδιώματα και πολλά

άλλα. Στις μέρες μας, η έννοια της πολυομικής καθιερώθηκε για να αναφέρεται στην ολοκλήρωση και τη συνδυασμένη ανάλυση μιας ποικιλίας γονιδιωματικών, μεταγραφικών, πρωτεομικών και μεταβολικών συνόλων δεδομένων. Αυτός ο τύπος συνδυασμένης ανάλυσης παρέχει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα περίπλοκων βιολογικών διεργασιών και φαινοτύπων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την ανίχνευση και ταυτοποίηση φυτοπαθογόνων μυκήτων σε φυτικούς ιστούς, καθώς και την μελέτη της βιοποικιλότητας του μικροβιακού φορτίου στους φυτικούς ιστούς, είτε αυτό αποτελείται από φυτοπαθογόνους μύκητες, είτε από μύκητες που συμβιώνουν στον οργανισμό του φυτού. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2, ένα πλαστικό Falcon που περιείχε φυτικό ιστό (πριονίδια ξύλου), από το κάθε δείγμα: A1, A2, A3, B1, B2, B3, P1, P2, P3, M1, M2 στάλθηκαν στο Ε.Κ.Ε.Τ.Α. (Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης) και με την πλατφόρμα Illumina NovaSeq™ Next Sequencing (Novogene®) έγινε η περάτωση της διαδικασίας.

2.5 Ανάλυση Δεδομένων

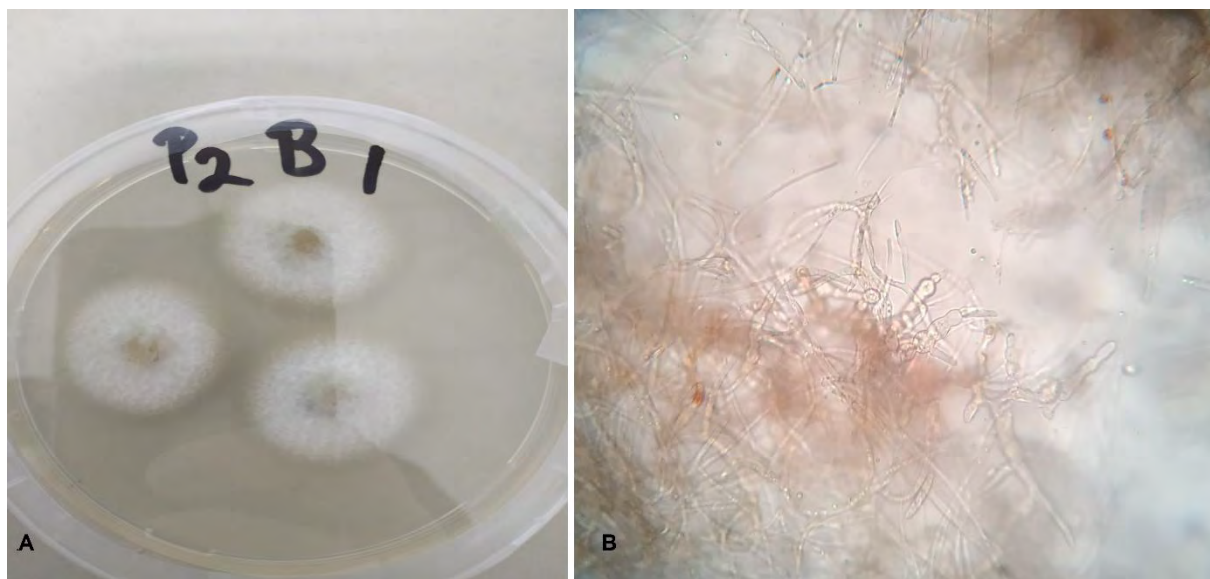
Η ανάλυση των δεδομένων και η δημιουργία των διαγραμμάτων και πινάκων που ακολουθούν στο Κεφάλαιο 3, έγιναν με τη χρήση του λογισμικού Office 365, Microsoft Excel.

Κεφάλαιο 3^ο Αποτελέσματα

3.1 Καλλιέργειες μυκήτων στα θρεπτικά υποστρώματα

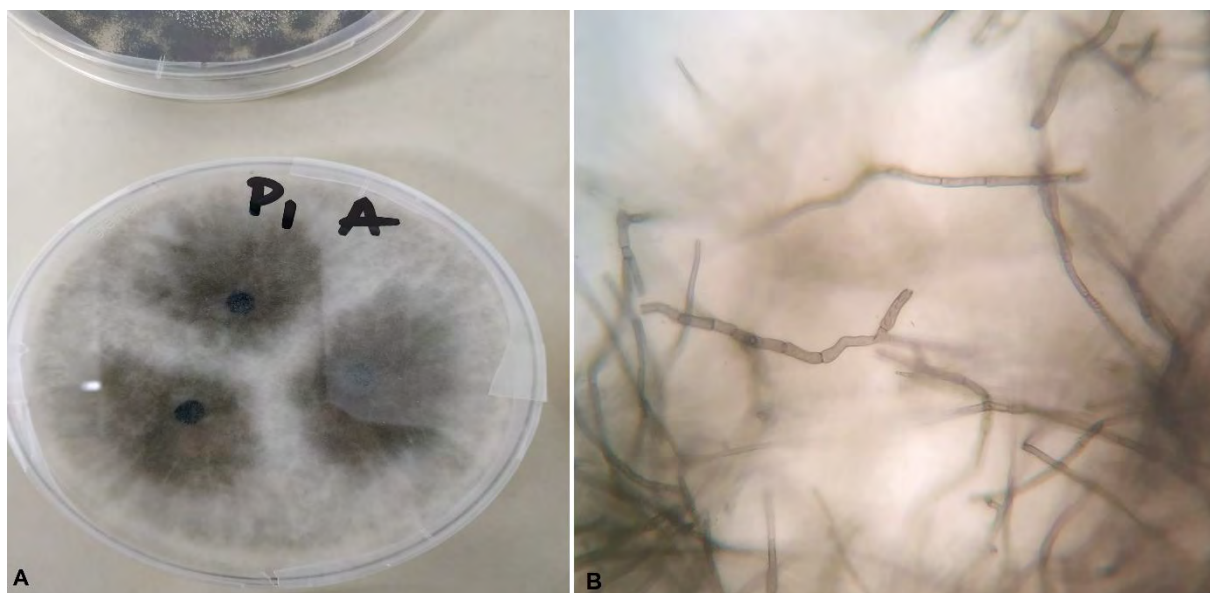
Οι απομονώσεις P2B1, P3A, P1A, P3B2, A1A2, A2B, A3A, B1B (Πίνακας 5) επιλέχθηκαν για περαιτέρω εξέταση σε οπτικό μικροσκόπιο. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν παρασκευάσματα, και εξετάστηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο. Ωστόσο η ταυτοποίηση των μυκήτων έγινε με τη διαγνωστική μέθοδο της PCR και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 3.3. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής δεν έγινε μέτρηση των καρποφοριών των μυκήτων με σκοπό την ταυτοποίηση τους με τη συγκεκριμένη μέθοδο, αλλά περατώθηκε διαδικασία παρατήρησης και εκτίμησης της εικόνας με βάση τις βιβλιογραφικές πηγές.

Ξεκινώντας από την απομόνωση P2B1, εκτιμήθηκε ως η ταυτοποίηση του φυτοπαθογόνου γένους *Phytophthora*. Οι υφές δεν παρουσίαζαν σέπτα, και παρατηρήθηκαν σφαιρικές διογκώσεις υφών, παρατεταμένες σε αλυσίδες (Ghaderi and Habibi, 2021). Επιπρόσθετα, στο τριβλίο παρουσιάστηκε ανάπτυξη μυκηλίου, λευκού χρώματος (Bertier et al., 2013).



Εικόνα 9. Απομόνωση P2B1. Α. Εικόνα από την καλλιέργεια του μύκητα σε τριβλίο με PDA. Β. Φωτογραφία από το μικροσκόπιο.

Η απομόνωση P1A εξετάστηκε και αυτή (Εικόνα 10). Το παθογόνο εκτιμήθηκε ότι ανήκει στο γένος *Lasiodiplodia*. Παρατηρήθηκαν υφές με σέπτα και διακλάδωση υφών (de Silva et al., 2019). Επιπρόσθετα στο τριβλίο, παρατηρήθηκε σκουρόχρωμο, γκριζωπό μυκήλιο (Honger, 2018).



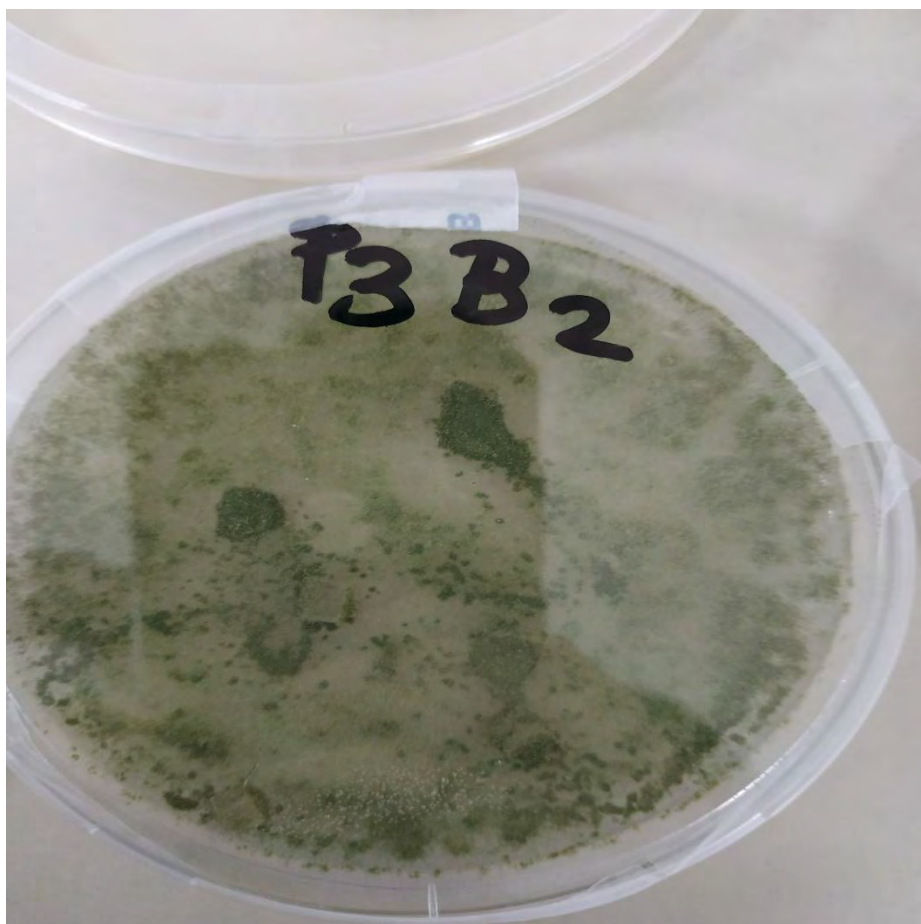
Εικόνα 10. Απομόνωση P1A. Α. Εικόνα από την καλλιέργεια του μύκητα σε τριβλίο με PDA. Β. Φωτογραφία από το μικροσκόπιο.

Η απομόνωση P3A εκτιμήθηκε ως μύκητας του γένους *Fusarium* (Εικόνα 11). Παρατηρήθηκε λευκό μυκήλιο (Maryani et al., 2019).

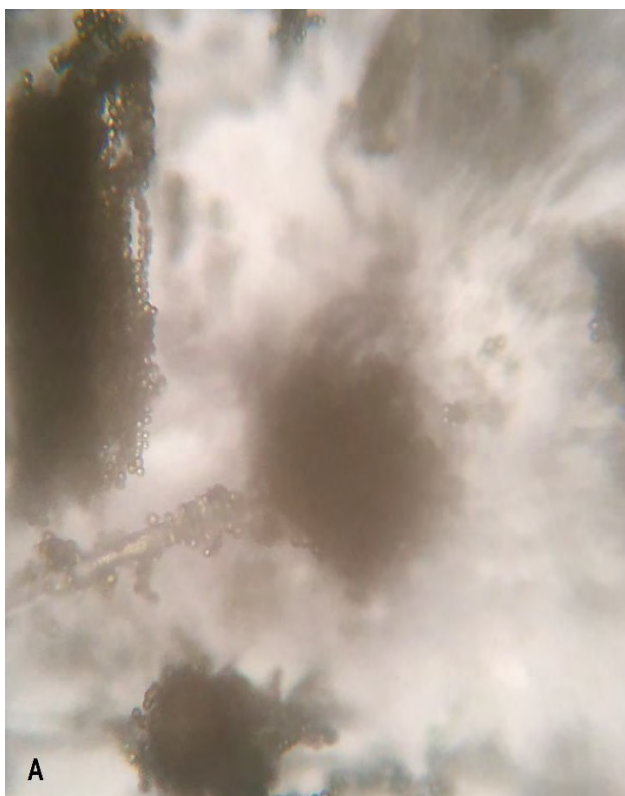


Εικόνα 11. Απομόνωση P3A.

Η απομόνωση P3B2 εξετάστηκε και αυτή (Εικόνα 12 και 13). Ο μύκητας εκτιμήθηκε ότι ανήκει στο γένος *Penicillium*. Παρατηρήθηκαν αλυσίδες στρογγυλών κονιδίων χαρακτηριστικών του συγκεκριμένου γένους (Saif et al., 2020). Επιπρόσθετα στο τριβλίο, παρατηρήθηκε πράσινο μυκήλιο (Visagie et al., 2016).

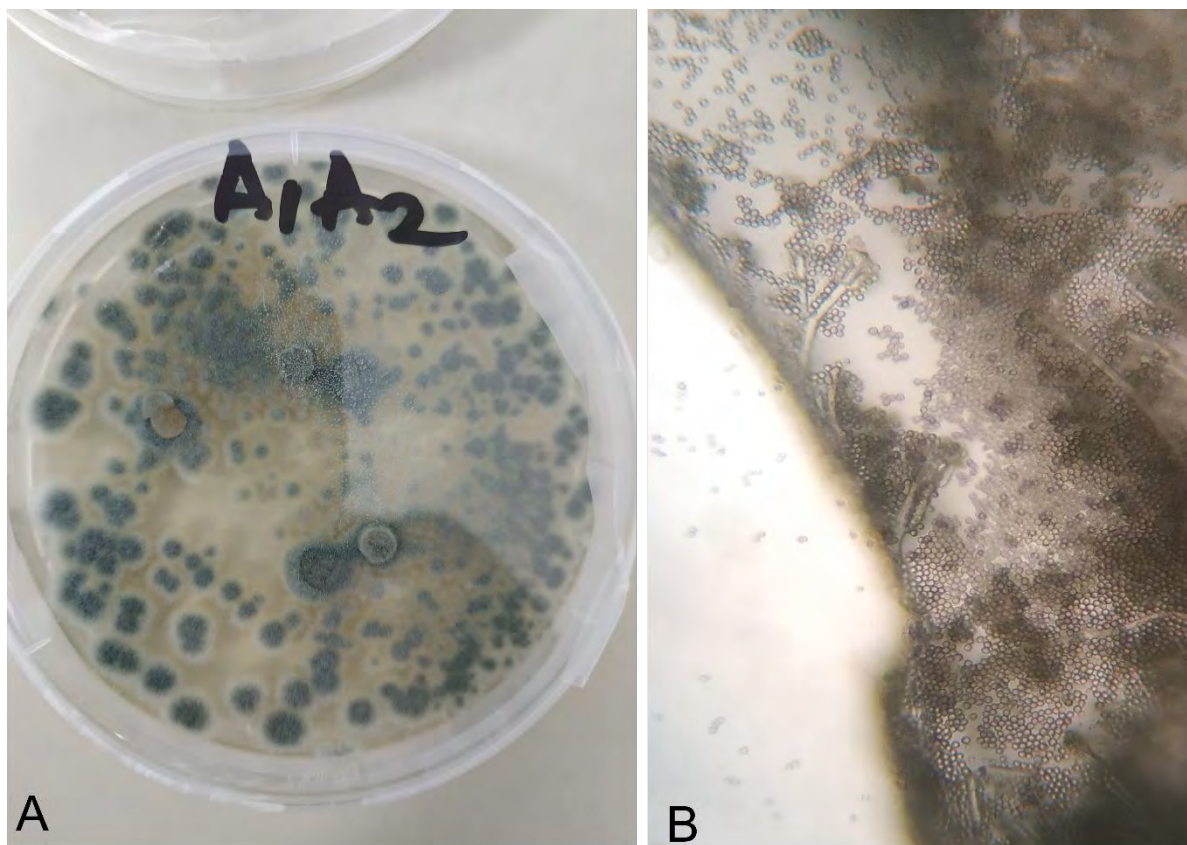


Εικόνα 12. Απομόνωση P3B2.



Εικόνα 13. Εικόνες από μικροσκόπιο της απομόνωσης P3B2. Α. Παρητηρείται ο κονιδιοφόρος του μύκητα και στην εικόνα Β οι αλυσίδες των στρογγυλών κονιδίων.

Παρομοίως εξετάστηκε και η απομόνωση A1A2. Ο μύκητας εκτιμήθηκε και σε αυτή την περίπτωση ότι ανήκει στο γένος *Penicillium*. Στο τριβλίο παρατηρήθηκε μυκήλιο πράσινου χρώματος, και στο μικροσκοπικό παρασκεύασμα, τα χαρακτηριστικά στρογγυλά κονίδια (Εικόνα 14).

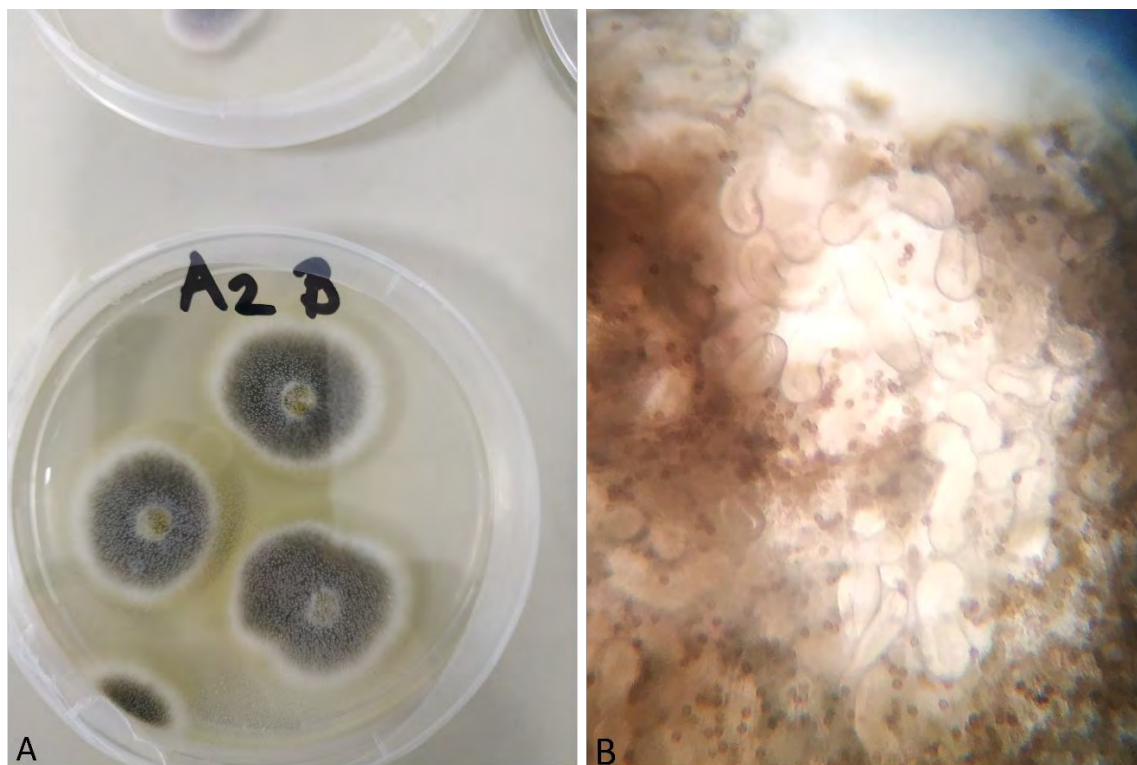


Εικόνα 14. Απομόνωση A1A2. Α. Εικόνα από την καλλιέργεια του μύκητα σε τριβλίο με PDA. Β. Φωτογραφία από το μικροσκόπιο.

Η απομόνωση A2B εξετάστηκε και αυτή (Εικόνα 15). Οι εικόνες της αποικίας στο τριβλίο και η εικόνα από το μικροσκοπικό παρασκεύασμα, δεν έδωσαν τη δυνατότητα να δοθεί κάποια εκτίμηση για την ταυτοποίηση του μύκητα. Ο μύκητας πιθανολογείται ότι ανήκει στην ομάδα των ασκομυκήτων καθώς παρατηρήθηκαν μυκηλιακοί σχηματισμοί ασκοστρωμάτων (Εικόνα 15).

Η απομόνωση A3A εξετάστηκε και αυτή. Ο μύκητας εκτιμήθηκε ότι ανήκει στο γένος *Alternaria*. Παρατηρήθηκαν σκουρόχρωμα, προς την απόχρωση του καφέ, κονίδια με εγκάρσια χωρίσματα (Εικόνα 16 και 17). Επιπρόσθετα στο τριβλίο, παρατηρήθηκε σκούρο πράσινο μυκήλιο (Zlatkovic et al., 2016).

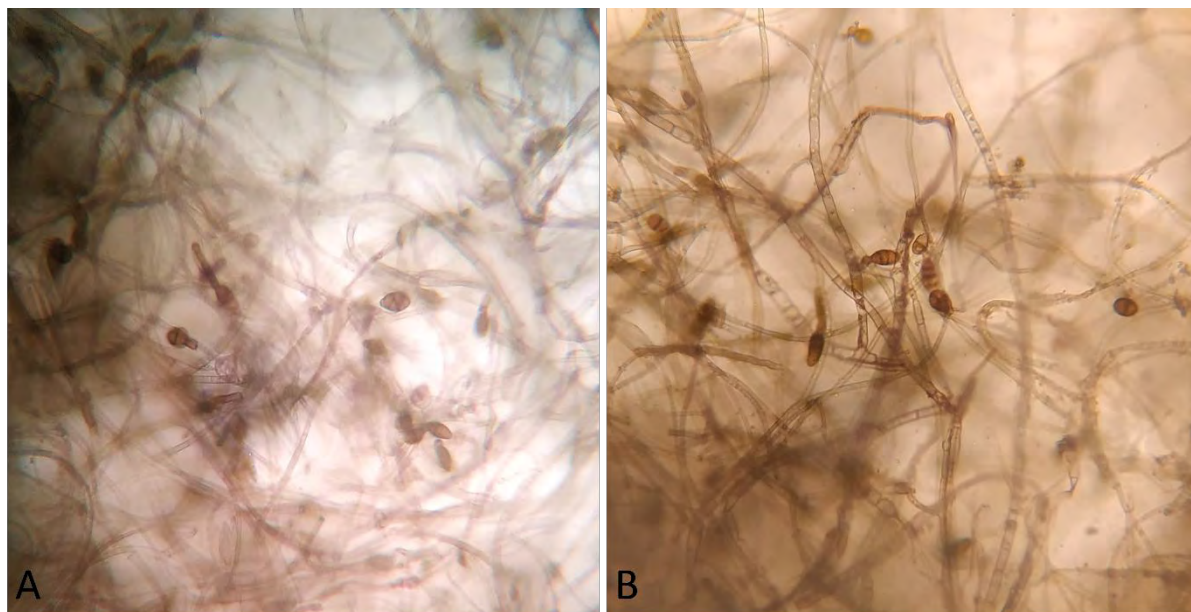
Η απομόνωση B1B εξετάστηκε και αυτή (Εικόνα 18). Οι εικόνες της αποικίας στο τριβλίο και η εικόνα από το μικροσκοπικό παρασκεύασμα, δεν έδωσαν τη δυνατότητα να δοθεί κάποια εκτίμηση για την ταυτοποίηση του μύκητα.



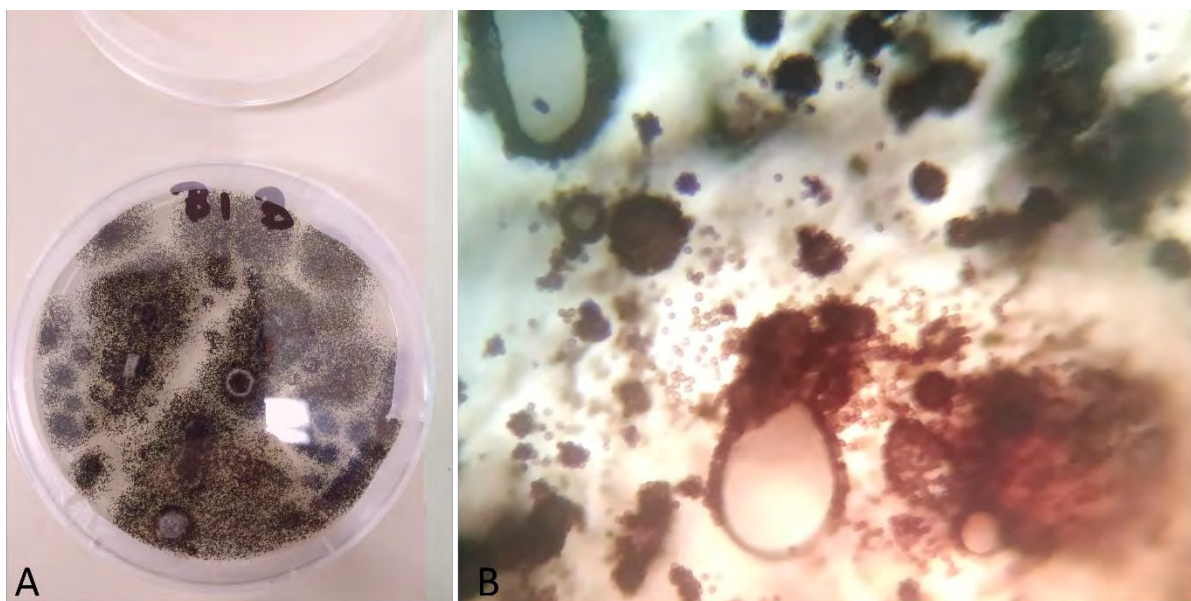
Εικόνα 15. Απομόνωση A2B. Α. Εικόνα από την καλλιέργεια του μύκητα σε τριβλίο με PDA. Β. Φωτογραφία από το μικροσκόπιο.



Εικόνα 16. Απομόνωση A3A.



Εικόνα 17. Εικόνες από μικροσκόπιο της απομόνωσης A3A. Α και Β. Φωτογραφίες από μικροσκόπιο, παρατηρούνται κονίδια με εγκάρσια χωρίσματα.



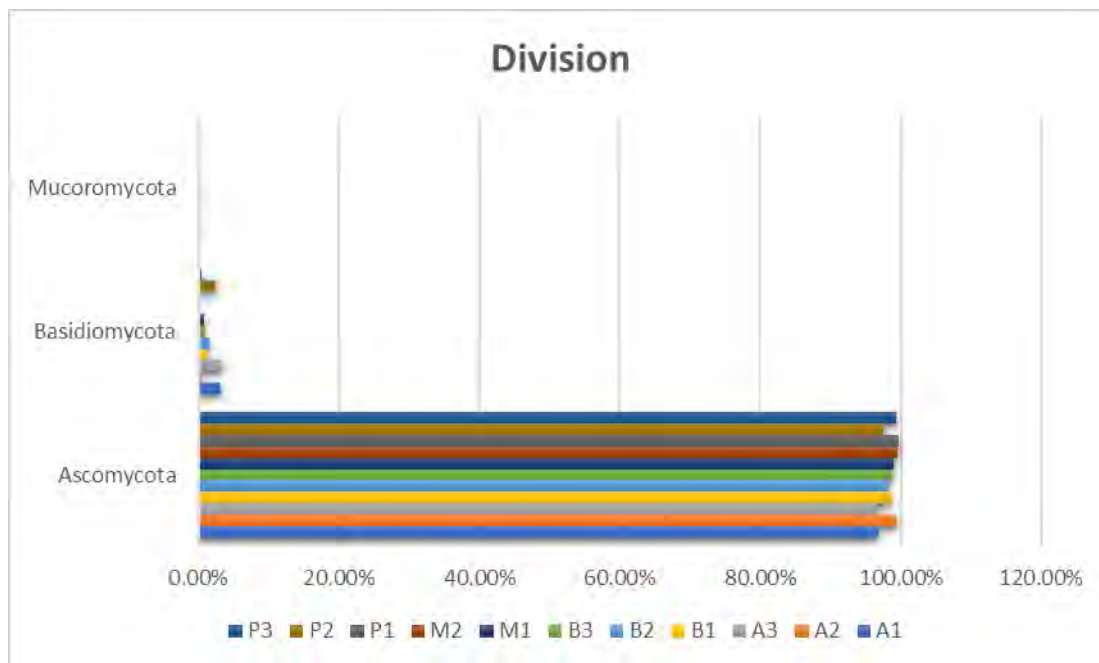
Εικόνα 18. Απομόνωση B1B. Α. Εικόνα από την καλλιέργεια του μύκητα σε τριβλίο με PDA. Β. Φωτογραφία από το μικροσκόπιο.

3.2 NGS

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν ως προς την ομάδα μυκήτων (Ασκομύκητες, Βασιδιομύκητες κλπ.), ως προς την κλάση, την τάξη, την οικογένεια και το γένος. Πιο αναλυτικά, ως προς την ομάδα μυκήτων στο δείγμα A1 το 96.81% των μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ανήκαν στην ομάδα των Ασκομυκήτων και το 3.11% στην ομάδα των Βασιδιομυκήτων. Στο δείγμα A2 το 99.30% άνηκε στην ομάδα των Ασκομυκήτων, το 0.45% στην ομάδα των Βασιδιομυκήτων και το υπόλοιπο 0.06% στην ομάδα των Ζυγομυκήτων ή

Mucoromycota. Στο δείγμα A3 το 96.56% άνηκε στην ομάδα των Ασκομυκήτων και το υπόλοιπο 3.36% στους Βασιδιομύκητες. Στο δείγμα B1 το 98.70% άνηκε στους Ασκομύκητες και το υπόλοιπο 1.25% στους Βασιδιομύκητες. Στο δείγμα B2 το 98.27% άνηκε στους Ασκο-

Διάγραμμα 2. Ομάδες μυκήτων. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού της ομάδας μυκήτων, ανά δείγμα.

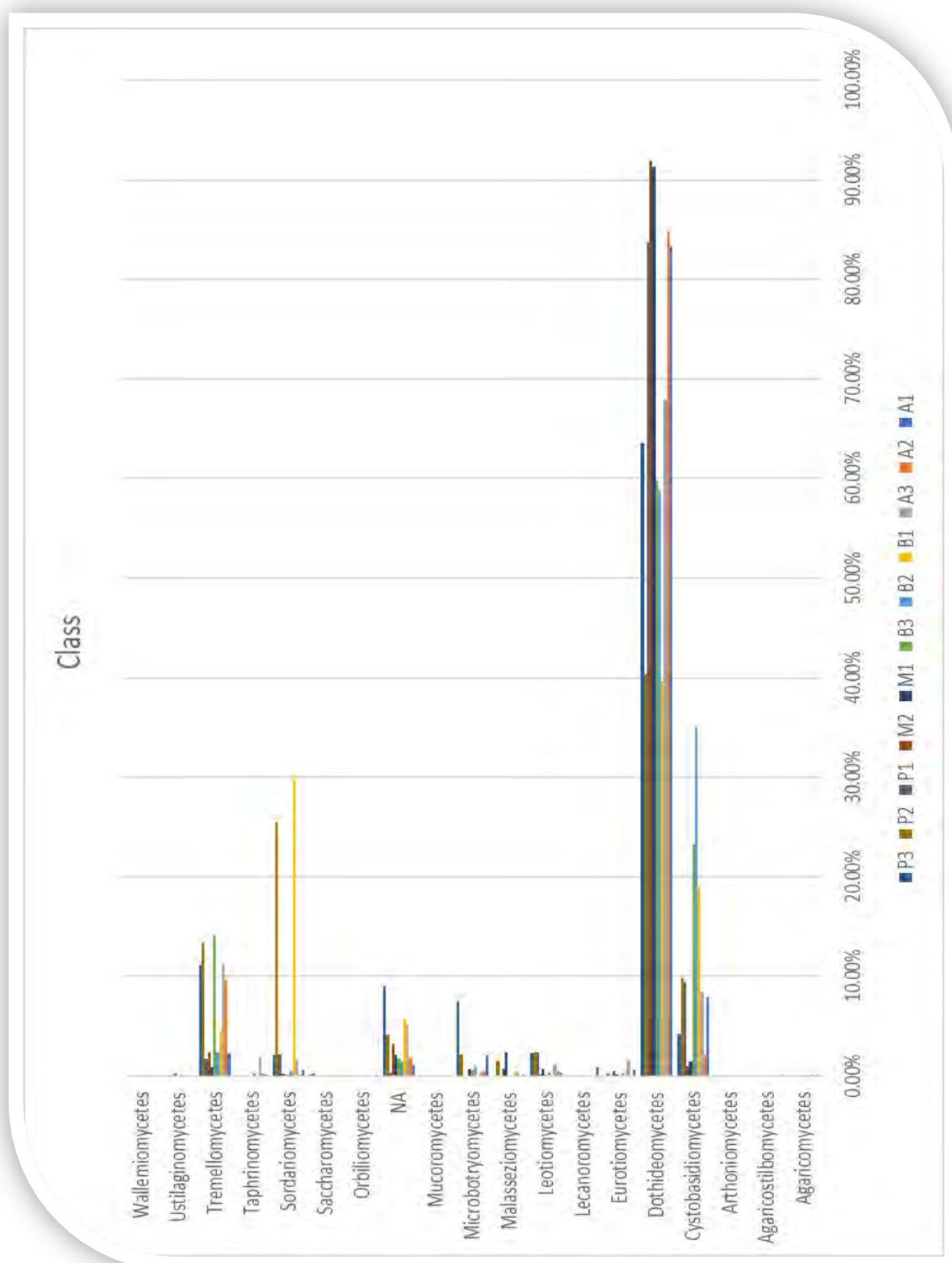


μύκητες και το υπόλοιπο 1.59% στους Βασιδιομύκητες. Στο δείγμα B3 το 98.87% άνηκε στην ομάδα των Ασκομυκήτων και το υπόλοιπο 1.02% στους Βασιδιομύκητες. Στο δείγμα P1 το 99.63% άνηκε στους Ασκομύκητες και το υπόλοιπο 0.23% στους Βασιδιομύκητες. Στο δείγμα P2 το ποσοστό 97.45% άνηκε στους Ασκομύκητες, ενώ το 2.39% στους Βασιδιομύκητες. Στο δείγμα P3 το 99.44% άνηκε στην ομάδα των Ασκομυκήτων και το 0.47% στην ομάδα των Βασιδιομυκήτων. Στο δείγμα M1 το ποσοστό 98.96% άνηκε στους Ασκομύκητες, ενώ το 0.90% στους Βασιδιομύκητες. Τέλος στο δείγμα M2, το 99.63% άνηκε στην ομάδα των Ασκομυκήτων και το υπόλοιπο 0.35% στην ομάδα των Βασιδιομυκήτων. Ως προς την κλάση, ανιχνεύθηκαν στο σύνολο 18 κλάσεις μυκήτων και κάποιες που δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν. Το σύνολο των μη ταυτοποιημένων είναι άγνωστο και είναι πιθανόν να ανήκουν στην ομάδα των ωομυκήτων, καθώς δεν υπήρχε η βάση δεδομένων αλληλούχισης κατά τη διαδικασία NGS. Γι αυτό το λόγο, η κατηγορία των μη ταυτοποιημένων χαρακτηρίστηκε ως NA. Πιο αναλυτικά, η κλάση Agaricomycetes ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.13%, 0.04%, 0.16% στα δείγματα A1, A2 και A3 αντίστοιχα, 0.01% στο δείγμα M1, 0.05%, 0.01% στα δείγματα P2 και P3. Η κλάση Agaricostilbomycetes ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.18% στο δείγμα A1. Η κλάση Arthoniomycetes ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.06%, 0.05% στα δείγματα A2 και A3 αντίστοιχα. Η κλάση Cystobasidiomycetes ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 7.96%, 2.13%, 8.46% στα δείγματα A1, A2 και A3 αντίστοιχα,

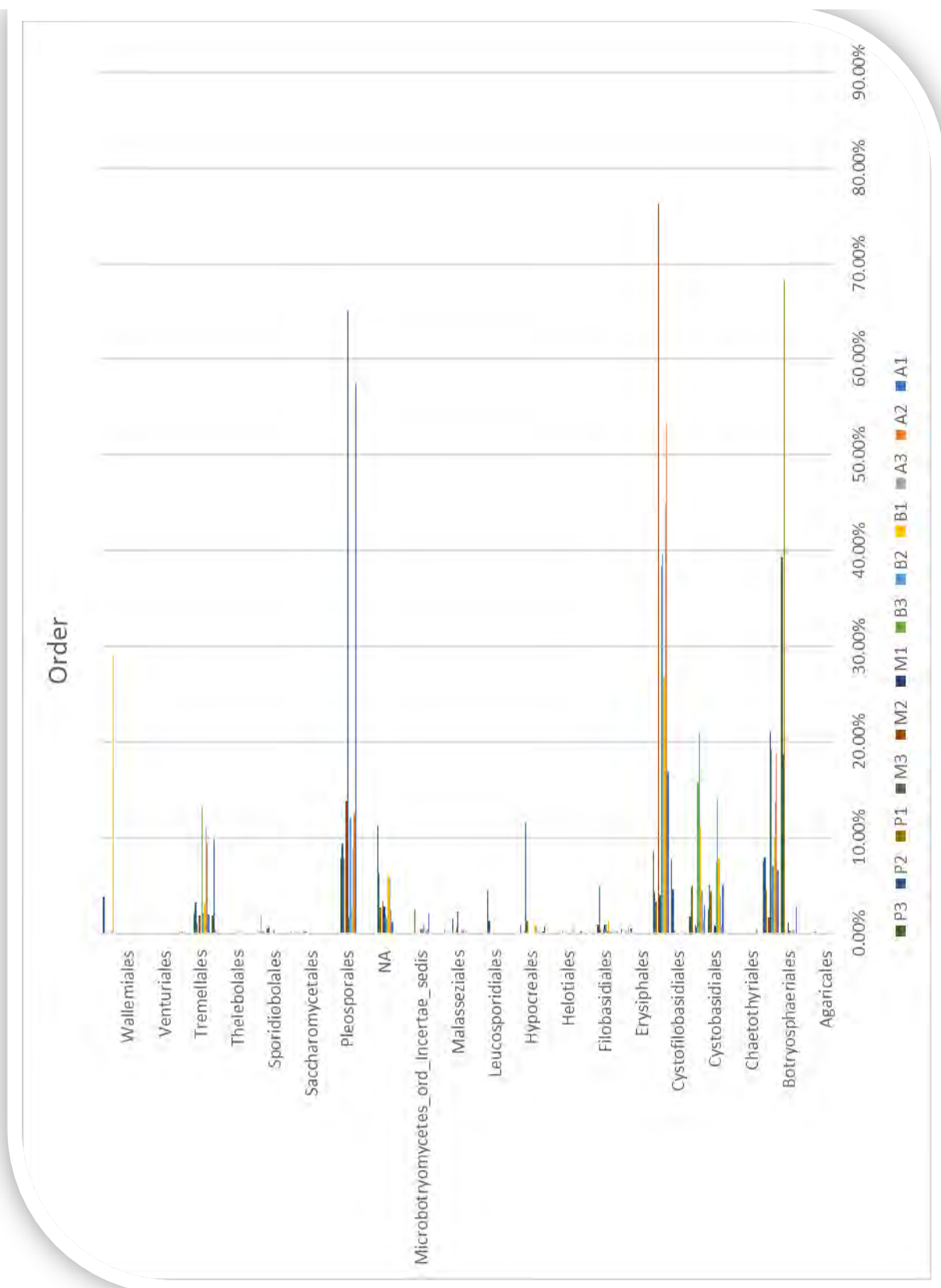
19.08%, 35.05%, 23.30% στα δείγματα B1, B2, και B3 αντίστοιχα, 1.48% , 0.97% στα δείγματα M1 και M2 αντίστοιχα, 9.44%, 9.87%, 4.21% στα δείγματα P1, P2 και P3 αντίστοιχα. Η κλάση *Dothideomycetes* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 83.33%, 84.84%, 67.99%, 39.72%, 58.81%, 59.73%, 91.26%, 91.91%, 83.68%, 40.34%, 63.54% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2 και P3 αντίστοιχα. Η κλάση *Eurotiomycetes* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.63% στο δείγμα A1, 1.51% στο δείγμα A2, 0.22% στο δείγμα B2, 0.14%, 0.49% στα δείγματα M1 και M2, 0.28% στο δείγμα P2. Η κλάση *Lecanoromycetes* ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα A1 σε ποσοστό 0.86%. Η κλάση *Leotiomycetes* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.30%, 0.49%, 1.16%, 0.16%, 0.32%, 0.17%, 0.73%, 0.19%, 2.42%, 2.36%, 2.28% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2, P3 αντίστοιχα. Η κλάση *Malasseziomycetes* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.20% , 0.09%, 0.45%, 0.47%, 0.00%, 0.06%, 2.35%, 0.68%, 0.00% , 1.53%, 0.00% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2 και P3 αντίστοιχα. Η κλάση *Microbotryomycetes* ανιχνεύθηκε σε ποσοστά 2.14% , 0.53%, 0.39%, 0.00%, 0.99%, 0.63%, 0.69%, 0.00%, 0.06%, 2.23%, 7.55% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2 και P3 αντίστοιχα. Η κλάση *Mucoromycetes* ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα B3 σε ποσοστό 0.03%. Το σύνολο των μη ταυτοποιημένων κλάσεων (NA) ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 1.10%, 1.83%, 5.05%, 5.76%, 1.43%, 1.70%, 2.07%, 3.20%, 0.34%, 4.16%, 9.03% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2 και P3 αντίστοιχα. Η κλάση *Orbiliomycetes* ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα A1 σε ποσοστό 0.12%. Η κλάση *Saccharomycetes* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.02%, 0.26%, 0.17% στα δείγματα P1, P2 και P3 αντίστοιχα. Η κλάση *Sordariomycetes* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.60%, 0.15%, 1.60%, 30.31%, 0.55%, 0.14%, 0.14%, 0.22%, 2.24%, 25.54%, 2.07% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2 και P3 αντίστοιχα. Η κλάση *Taphrinomycetes* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.19%, 0.22%, 1.93%, 0.02%, 0.23% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2 και σε ποσοστό 0.03% στο δείγμα P3. Η κλάση *Tremellomycetes* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 2.27%, 9.63%, 11.25%, 4.44%, 2.40%, 14.16%, 0.91%, 2.36%, 1.76%, 13.42%, 11.12% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2 και P3 αντίστοιχα. Η κλάση *Ustilaginomycetes* ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα M2 σε ποσοστό 0.23%. Τέλος, η κλάση *Wallemiomycetes* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.06% και 0.09% στα δείγματα B1 και B3 (Διάγραμμα 3). Ως προς την τάξη, ανιχνεύθηκαν στο σύνολο 39 τάξεις μυκήτων και κάποιες που δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν. Το σύνολο των μη ταυτοποιημένων είναι άγνωστο και είναι πιθανόν να ανήκουν στην ομάδα των ωομυκήτων , καθώς δεν υπήρχε η βάση δεδομένων αλληλούχισης κατά τη διαδικασία NGS. Γι αυτό το λόγο, η κατηγορία των μη τακτοποιημένων χαρακτηρίστηκε ως NA. Πιο συγκεκριμένα η τάξη *Agaricales* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.07% στο δείγμα A1, 0.04% στο δείγμα A2 και 0.16% στο δείγμα A3. Εννοείται

πως στα υπόλοιπα δείγματα ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0% , για αυτό και δεν αναφέρεται. Η τάξη Agaricostilbales ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.18% στο δείγμα A1. Η τάξη Botryosphaeriales ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 2.72% στο δείγμα A1, 0.15% στο δείγμα A2, 0.37% στο δείγμα A3, 0.16%, 0.26%, 0.31% στα δείγματα B1, B2 και B3 αντίστοιχα, 1.17% στο δείγμα M1 και 68.31%, 18.70%, 39.32% στα δείγματα P1, P2 και P3 αντίστοιχα. Η τάξη Capnoidiales ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 6.55%, 18.84%, 13.78% στα δείγματα A1, A2, και A3 αντίστοιχα, 10.03%, 7.09%, 19.30% στα δείγματα B1, B2 και B3 αντίστοιχα. Η τάξη Chaetothyriales μόνο στα δείγματα A1, A3 και P2 σε ποσοστό 0.08%, 0.54% και 0.06% αντίστοιχα. Η τάξη Corticiales ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα P1 σε ποσοστό 0.03%. Η τάξη Cystobasidiales ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 5.07%, 0.72%, 4.01%, 7.87%, 14.03%, 7.56%, 0.88%, 0.00%, 4.38%, 5.10%, 2.47% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2, P3 αντίστοιχα. Η τάξη Cystobasidiomycetes ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 2.88%, 1.41%, 4.45%, 11.21%, 21.02%, 15.74%, 0.60%, 0.97%, 5.05%, 4.77%, 1.74% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2, P3 αντίστοιχα. Η τάξη Cystofilobasidiales ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.12%, 0.00%, 0.00%, 0.00%, 0.16%, 0.11%, 0.00%, 0.00%, 0.25%, 4.59%, 7.69% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2, P3 αντίστοιχα. Η τάξη Dothideales ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 16.94%, 53.31%, 44.89%, 26.83%, 39.63%, 38.39%, 3.99%, 76.35%, 3.30%, 4.27%, 8.59% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2, P3 αντίστοιχα. Η τάξη Erysiphales ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα A1 σε ποσοστό 0.07%. Η τάξη Eurotiales ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.55%, 0.00%, 0.63%, 0.00%, 0.22%, 0.00%, 0.14%, 0.48%, 0.00%, 0.22%, 0.00% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2, P3 αντίστοιχα. Η τάξη Filobasidiales ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.21%, 0.18%, 0.16%, 1.33%, 0.16%, 0.92%, 0.91%, 0.47%, 0.46%, 4.89%, 0.99% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2, P3 αντίστοιχα. Η τάξη Glomerellales ανιχνεύθηκε μόνο στα δείγματα A3 και P2 σε ποσοστό 0.20% και στα δύο δείγματα. Η τάξη Helotiales ανιχνεύθηκε στα δείγματα A1, A3, P1, P2, P3 σε ποσοστό 0.14%, 0.65%, 0.07%, 0.23%, 0.02%, αντίστοιχα. Η τάξη Holtermanniales ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.01%, 0.73%, 0.21% στα δείγματα P1, P2 και P3 αντίστοιχα. Η τάξη Hypocreales ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.14%, 0.00%, 0.82%, 0.99%, 0.07%, 0.14%, 0.14%, 0.00%, 1.38%, 11.59%, 0.18% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2, P3 αντίστοιχα. Η τάξη Lecanorales ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα A1 σε ποσοστό 0.86%. Η τάξη Leucosporidiales ανιχνεύθηκε στα δείγματα A3, B2, P1, P2 και P3 σε ποσοστό 0.11%, 0.05%, 0.02%, 1.31% και 4.46% αντίστοιχα. Η τάξη Lichenostigmatales ανιχνεύθηκε μόνο στα δείγματα A2 και A3 σε ποσοστά 0.06% και 0.05% αντίστοιχα.

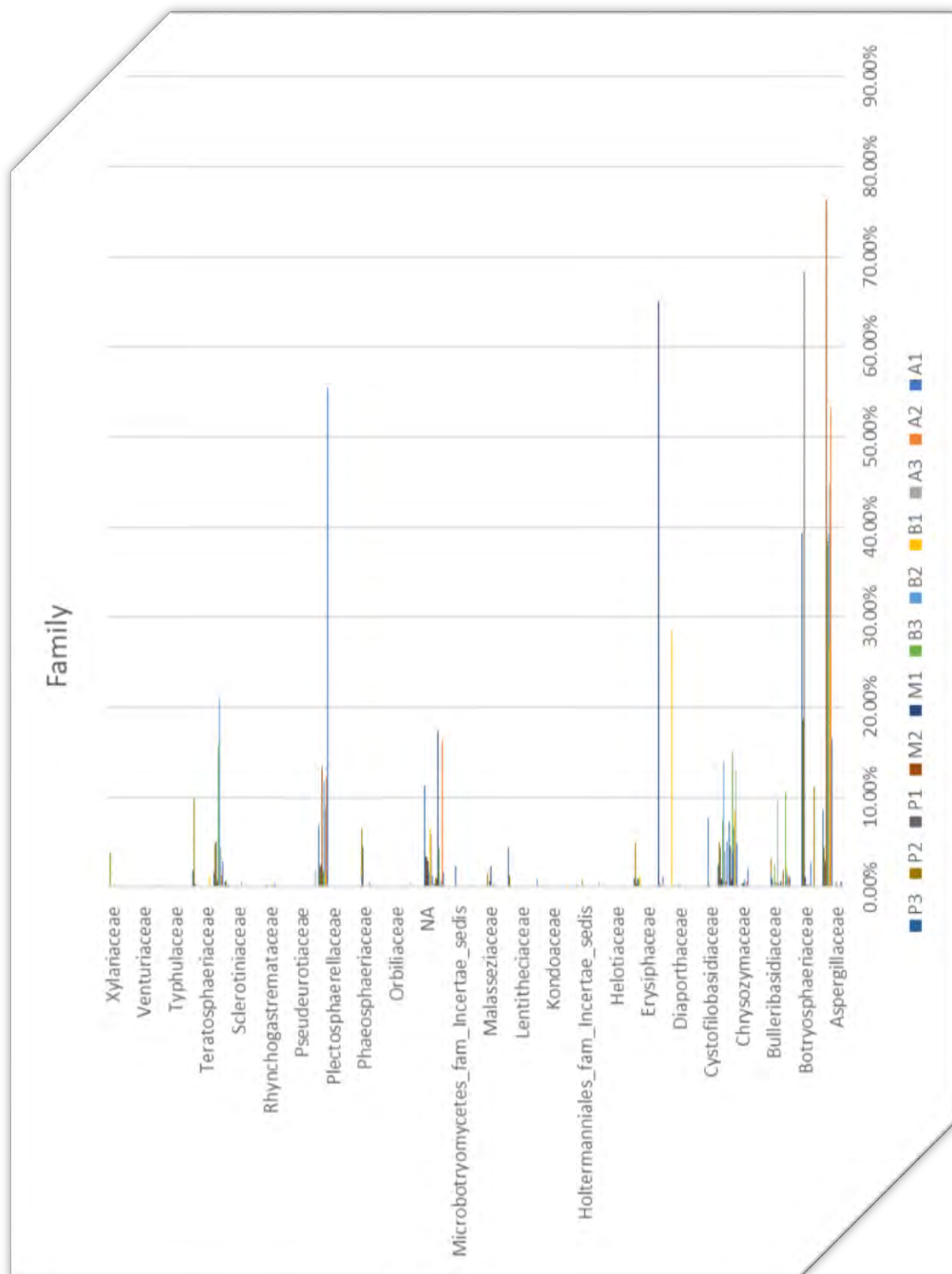
Διάγραμμα 3. Κλάσεις μυκήτων. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού της κλάσης μυκήτων, ανά δείγμα.

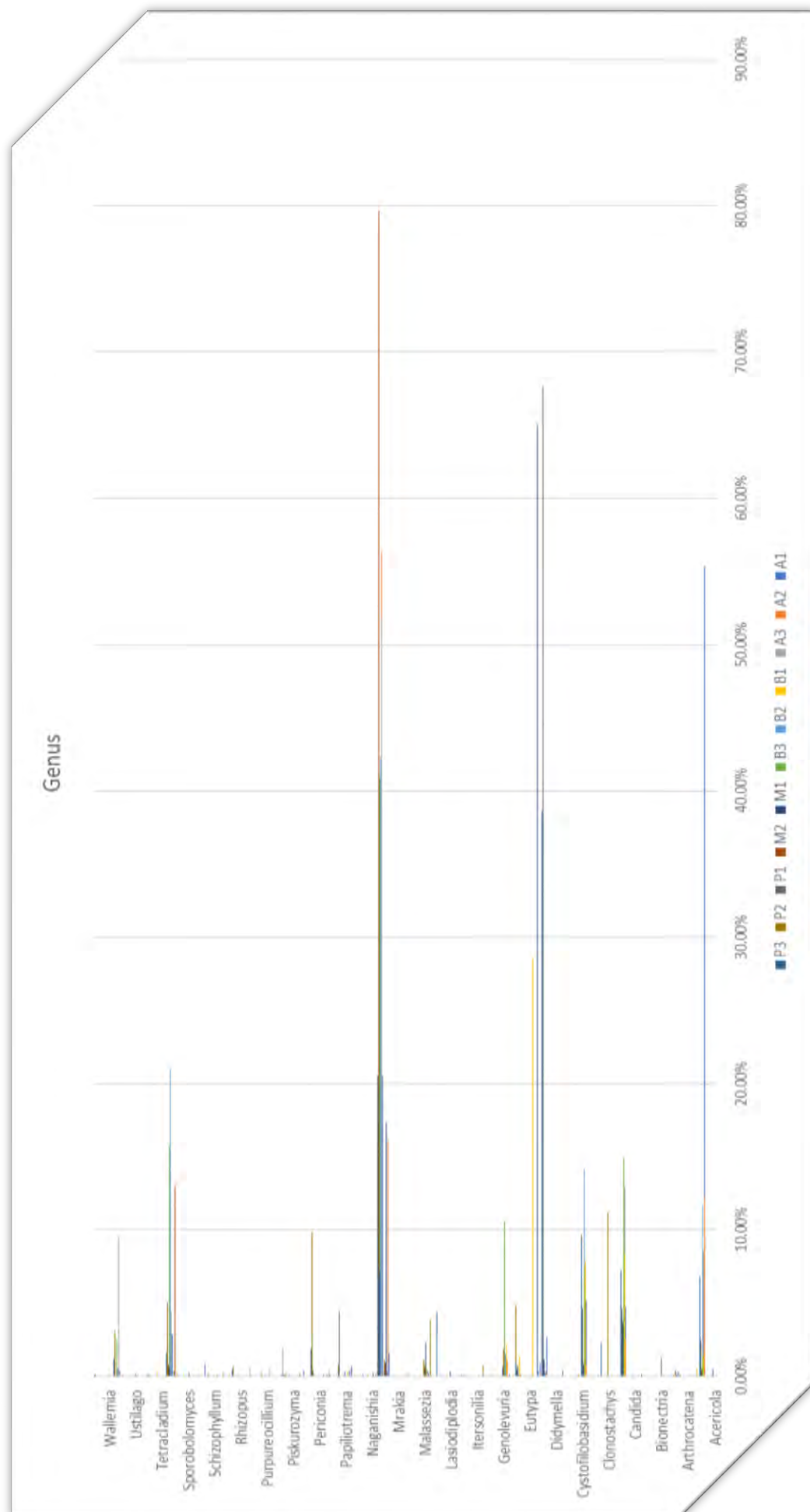


Διάγραμμα 4. Τάξεις μυκήτων. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού της τάξης μυκήτων, ανά δείγμα.



Διάγραμμα 5. Οικογένειες μυκήτων. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού της οικογένειας μυκήτων, ανά δείγμα.

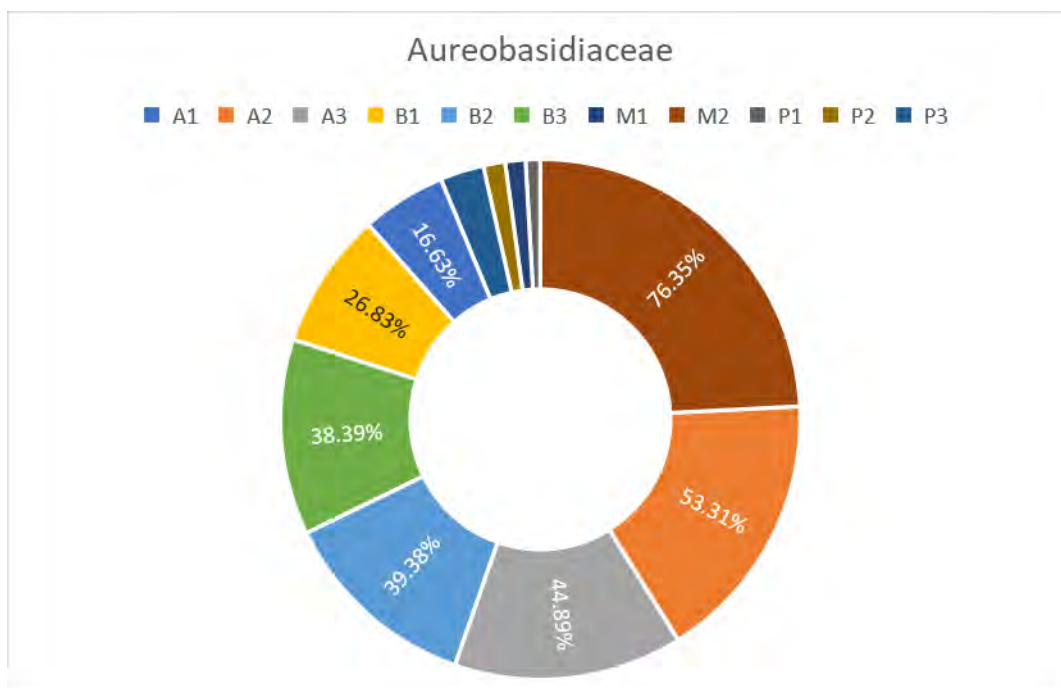




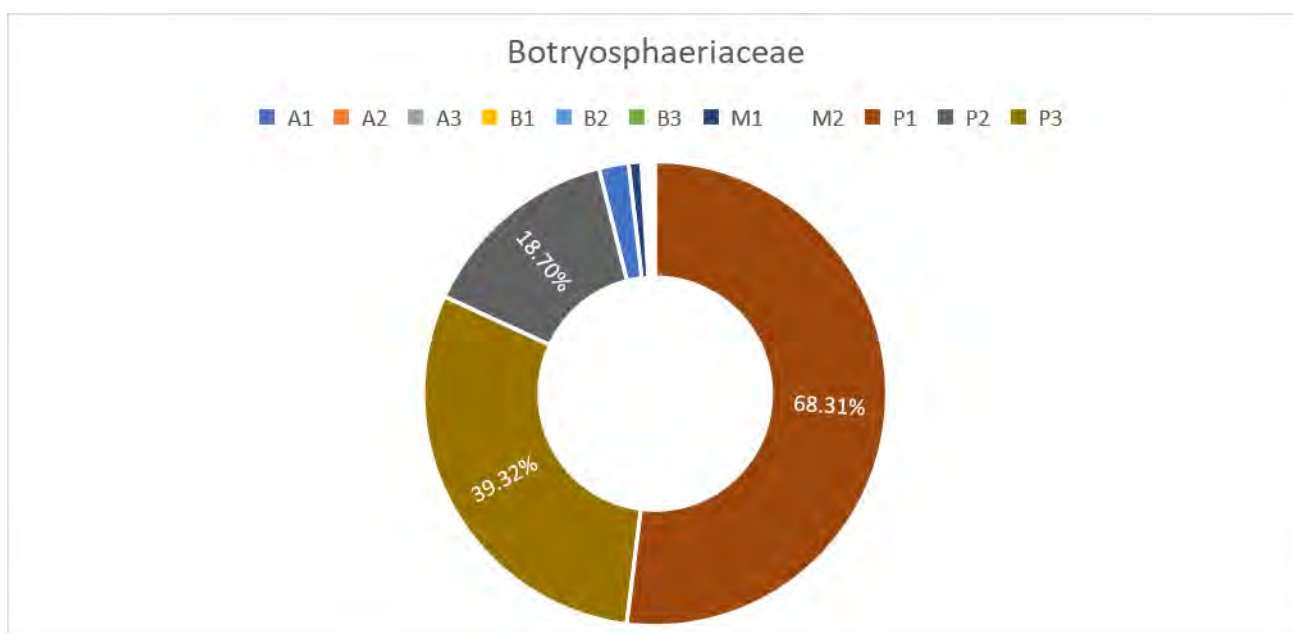
Η τάξη *Malasseziales* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.20%, 0.09%, 0.45%, 0.47%, 0.00%, 0.06%, 2.35%, 0.68%, 0.00%, 1.53%, 0.00% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2, P3 αντίστοιχα. Η τάξη *Microascales* ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα A3 σε ποσοστό 0.50%. Η τάξη *Microbotryomycetes* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 2.14%, 0.53%, 0.28%, 0.00%, 0.94%, 0.58%, 0.42%, 0.00%, 0.00%, 0.09%, 2.52% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2, P3 αντίστοιχα. Η τάξη ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα B3 σε ποσοστό 0.03%. Το σύνολο των μη ταυτοποιημένων τάξεων NA ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 1.24%, 2.47%, 5.90%, 5.91%, 1.58%, 1.86%, 2.80%, 3.38%, 2.71%, 6.39%, 11.29% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2, P3 αντίστοιχα. Η τάξη *Orbiliales* ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα A1 με ποσοστό 0.12%. Η τάξη *Pleosporales* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 57.44%, 12.53%, 8.86%, 2.69%, 12.08%, 1.73%, 65.02%, 13.89%, 7.85%, 9.38%, 7.99% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2, P3 αντίστοιχα. Η τάξη *Polyporales* ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα A1 σε ποσοστό 0.06%. Η τάξη *Saccharomycetales* ανιχνεύθηκε μόνο στα δείγματα P1, P2, και P3 σε ποσοστό 0.02%, 0.26%, 0.17% αντίστοιχα. Η τάξη *Sporidiobolales* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.06%, 0.27%, 0.00%, 0.04%, 0.75%, 0.56% στα δείγματα B3, M1, M2, P1, P2 και P3 αντίστοιχα. Η τάξη *Taphrinales* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0.19%, 0.22%, 1.93%, 0.02%, 0.23%, 0.00%, 0.00%, 0.00%, 0.00%, 0.00%, 0.03% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2, P3 αντίστοιχα. Η τάξη *Thelebolales* ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα B2 σε ποσοστό 0.18%. Η τάξη *Togniniales* ανιχνεύθηκε στα δείγματα B1, P1, P2 και P3 σε ποσοστό 0.12%, 0.45%, 9.86%, 1.88% αντίστοιχα. Η τάξη *Tremellales* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 1.95%, 9.45%, 11.09%, 3.11%, 2.08%, 13.12%, 0.00%, 1.89%, 1.04%, 3.21%, 2.23% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2, P3 αντίστοιχα. Η τάξη *Ustilaginales* ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα M1 σε ποσοστό 0.23%. Η τάξη *Venturiales* ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα A3 σε ποσοστό 0.09%. Η τάξη *Verrucariales* ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα M2 σε ποσοστό 0.01%. Η τάξη *Wallemiales* ανιχνεύθηκε στα δείγματα B1 και B3 σε ποσοστό 0.06% και 0.09%. Τέλος η τάξη *Xylariales* ανιχνεύθηκε στα δείγματα B1, B2 και P2 σε ποσοστό 29.00%, 0.23% και 3.89% αντίστοιχα.

Ως προς την Οικογένεια, ανιχνεύθηκαν στο σύνολο 69 οικογένειες μυκήτων και το σύνολο των μη ταυτοποιημένων που χαρακτηρίστηκε ως NA. Πιο αναλυτικά οι οικογένειες που ανιχνεύθηκαν ήταν οι εξής: *Aspergillaceae*, *Aureobasidiaceae*, *Bionectriaceae*, *Botryosphaeriaceae*, *Buckleyzymaceae*, *Bulleraceae*, *Bulleribasidiaceae*, *Capnoidiales*, *Chaetomiaceae*, *Chrysozymaceae*, *Cladosporiaceae*, *Cystobasidiaceae*, *Cystofilobasidiaceae*, *Debaryomycetaceae*, *Dermateaceae*, *Diaporthaceae*, *Diatrypaceae*, *Didymellaceae*, *Erysiphaceae*, *Filobasidiaceae*, *Graphiaceae*, *Helotiaceae*, *Helotiales*, *Herpotrichiellaceae*,

Διάγραμμα 7. Οικογένεια Aureobasidiaceae. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού αντίχενυσης της οικογένειας Aureobasidiaceae σε κάθε δείγμα.



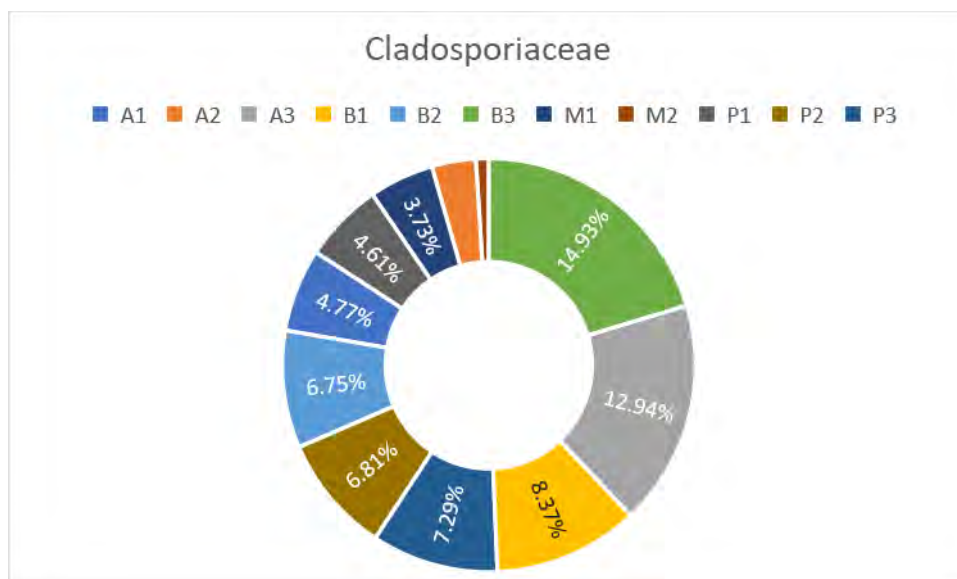
Διάγραμμα 8. Οικογένεια Botryosphaeriaceae. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού αντίχενυσης της οικογένειας Botryosphaeriaceae σε κάθε δείγμα.



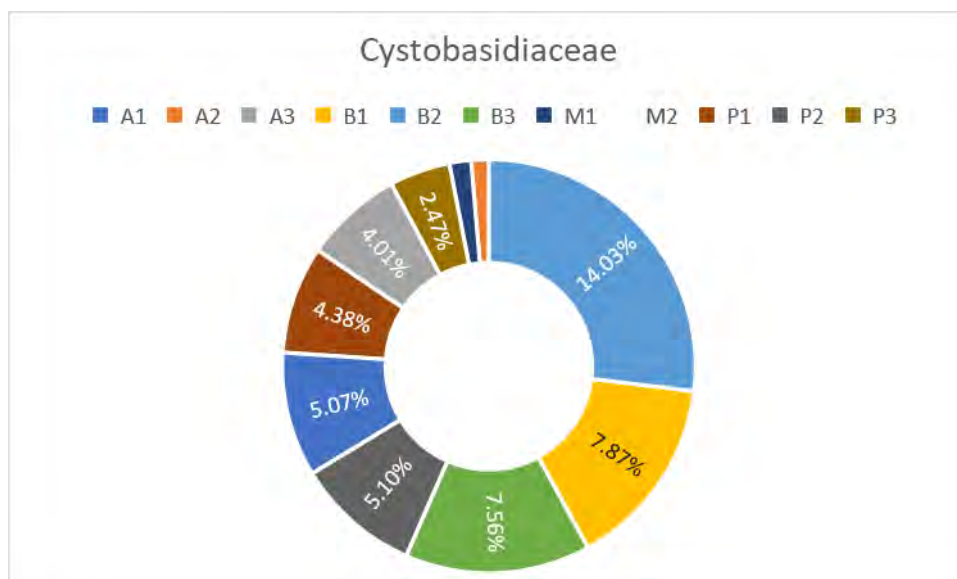
Holtermanniales, Hypocreaceae, Hypocreales, Kondoaceae, Lasiosphaeriaceae, Lecanoraceae, Lentitheciaceae, Leucosporidiaceae, Lophiostomataceae, Malasseziaceae, Metschnikowiaceae, Microascaceae, Microbotryomycetes, Mrakiaceae, Mycosphaerellaceae, Nectriaceae, Ophiocordycipitaceae, Orbiliaceae, Periconiaceae, Phaeococcomycetaceae, Phaeosphaeriaceae, Phanerochaetaceae, Piskurozymaceae, Plectosphaerellaceae, Pleosporaceae, Protomycetaceae, Pseudeurotiaceae, Punctulariaceae, Rhizopodaceae,

Rhynchogastremataceae, Saccharomycetales, Schizophyllaceae, Sclerotiniaceae, Sporidiobolaceae, Symmetrosporaceae, Teratosphaeriaceae, Togniniaceae, Tricholomataceae, Typhulaceae, Ustilaginaceae, Valsaceae, Venturiaceae, Verrucariaceae, Wallemiaceae και Xylariaceae (Διάγραμμα 5).

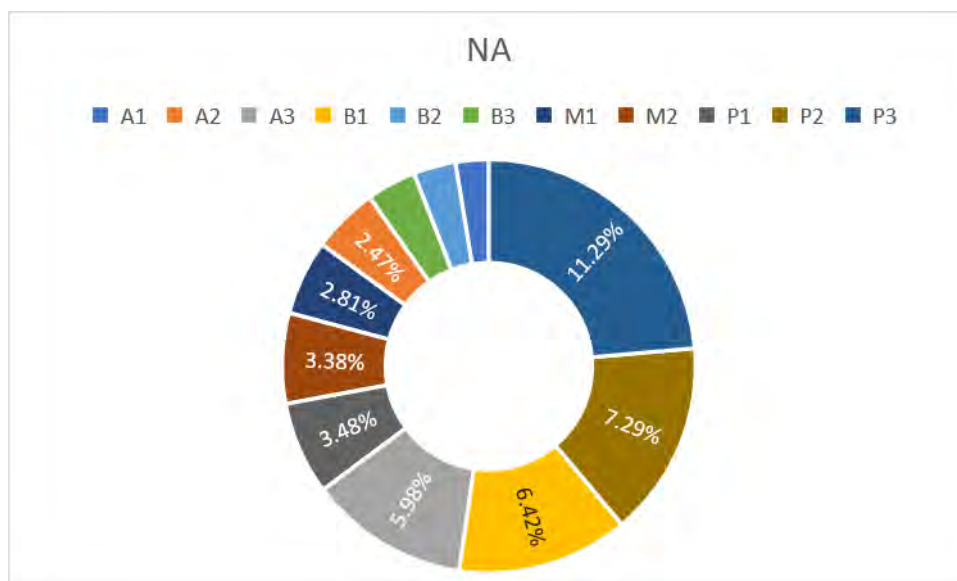
Διάγραμμα 9. Οικογένεια Cladosporiaceae. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού ανίχνευσης της οικογένειας Cladosporiaceae σε κάθε δείγμα.



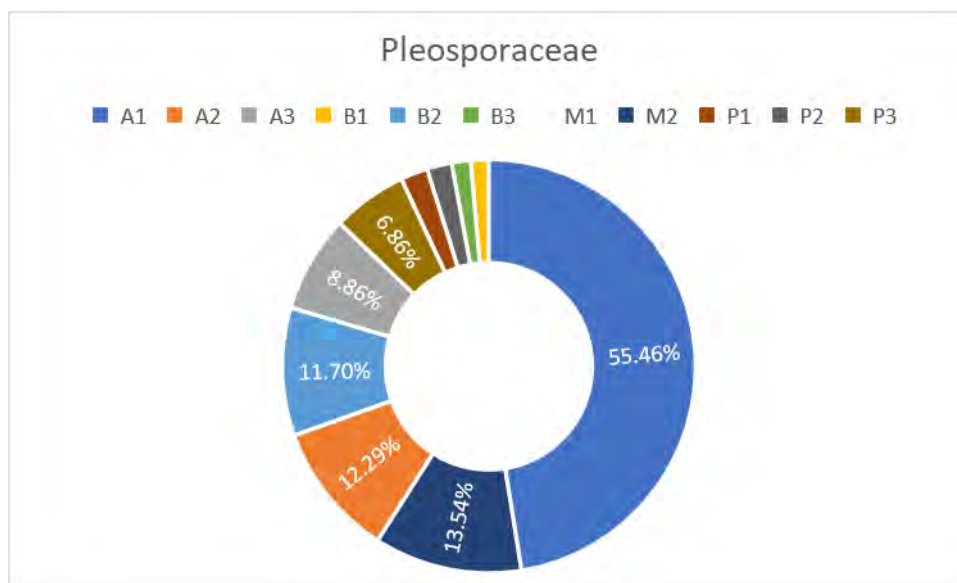
Διάγραμμα 10. Οικογένεια Cystobasidiaceae. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού ανίχνευσης της οικογένειας Cystobasidiaceae σε κάθε δείγμα.



Διάγραμμα 11. Σύνολο μη ταυτοποιημένων οικογενειών NA. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού ανίχνευσης των μη ταυτοποιημένων οικογενειών NA σε κάθε δείγμα.

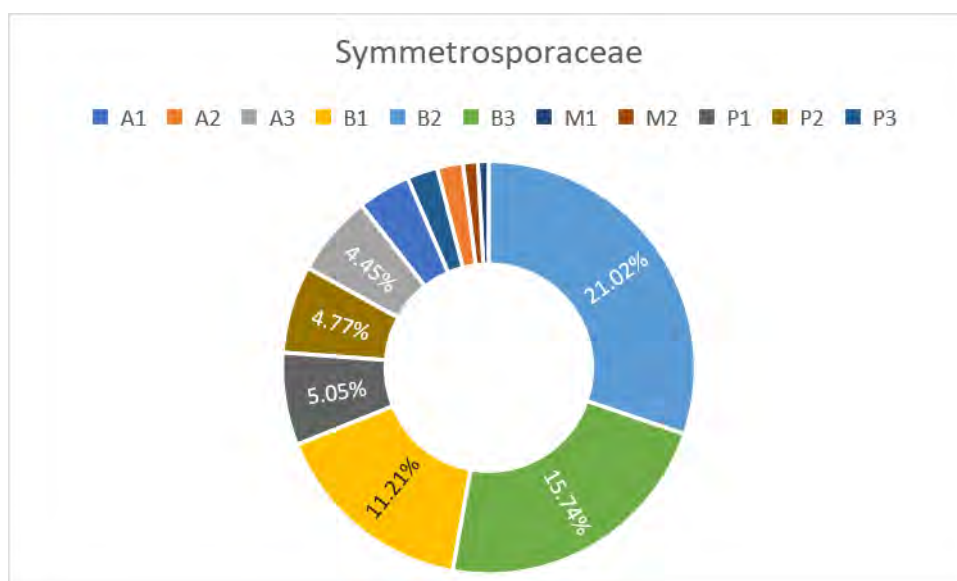


Διάγραμμα 12. Οικογένεια Pleosporaceae. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού ανίχνευσης της οικογένειας Pleosporaceae σε κάθε δείγμα.



Μία από τις κυριότερες οικογένειες ως προς τα ποσοστά ανίχνευσης ήταν η Aureobasidiaceae. Ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 16.63%, 53.31%, 44.89%, 26.83%, 39.38%, 38.39%, 3.99%, 76.35%, 2.89%, 4.27%, 8.59% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2 και P3 αντίστοιχα (Διάγραμμα 7). Η οικογένεια Botryosphaeriaceae ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 2.72%, 0.15%, 0.37%, 0.16%, 0.26%, 0.31%, 1.17%, 0.00%, 68.31%, 18.70%, 39.32% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2 και P3 αντίστοιχα (Διάγραμμα 8). Η οικογένεια Cladosporiaceae ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 4.77%, 2.54%, 12.94%, 8.37%, 6.75%, 14.93%, 3.73%, 0.74%, 4.61%, 6.81%, 7.29% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2 και P3 αντίστοιχα (Διάγραμμα 9). Η οικογένεια

Διάγραμμα 13. Οικογένεια Symmetrosporaceae. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού ανίχνευσης της οικογένειας Symmetrosporaceae σε κάθε δείγμα

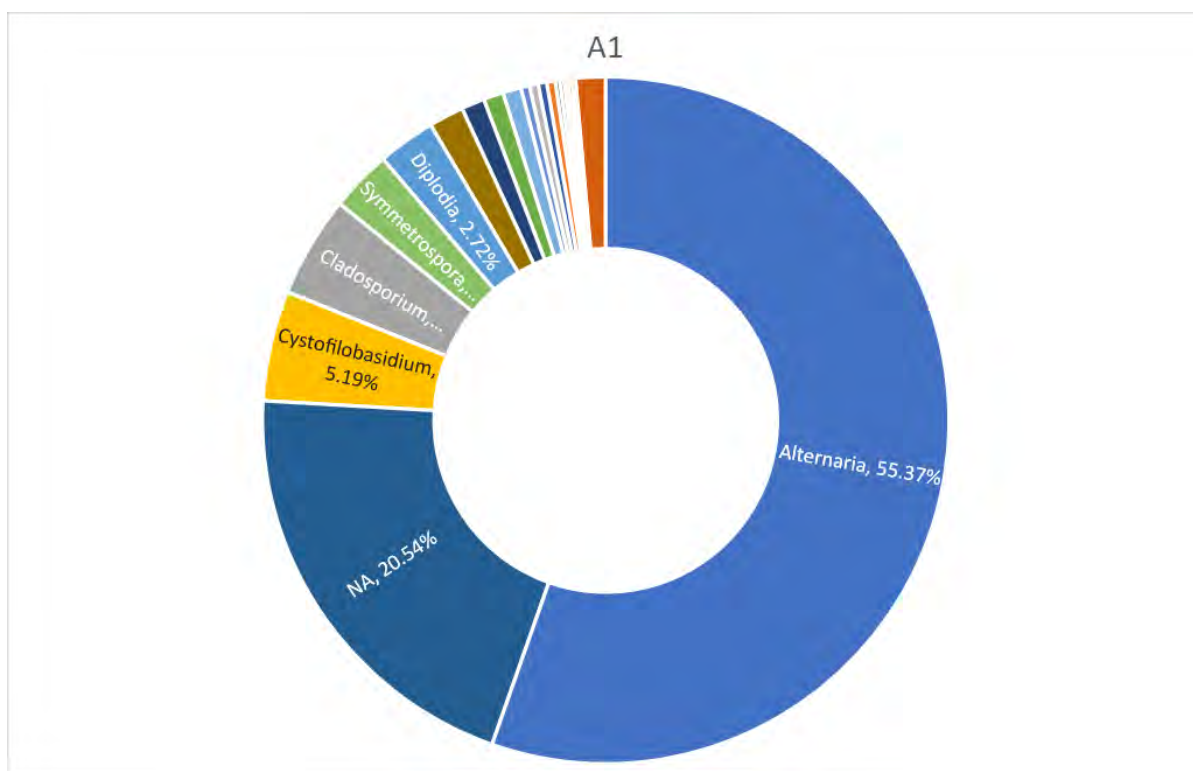


Cystobasidiaceae ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 5.07%, 0.72%, 4.01%, 7.87%, 14.03%, 7.56%, 0.88%, 0.00%, 4.38%, 5.10%, 2.47% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2 και P3 αντίστοιχα (Διάγραμμα 10). Το σύνολο των μη ταυτοποιημένων οικογενειών που χαρακτηρίστηκε ως NA ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 1.24%, 2.47%, 5.98%, 6.42%, 1.58%, 1.86%, 2.81%, 3.38%, 3.48%, 7.29%, 11.29% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2 και P3 αντίστοιχα (Διάγραμμα 11). Η οικογένεια Pleosporaceae ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 55.46%, 12.29%, 8.86%, 1.65%, 11.70%, 1.73%, 0.00%, 13.54%, 2.48%, 2.29%, 6.86% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2 και P3 αντίστοιχα (Διάγραμμα 12). Τέλος η οικογένεια Symmetrosporaceae ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 2.88%, 1.41%, 4.45%, 11.21%, 21.02%, 15.74%, 0.60%, 0.81%, 5.05%, 4.77%, 1.67% στα δείγματα A1, A2, A3, B1, B2, B3, M1, M2, P1, P2 και P3 αντίστοιχα (Διάγραμμα 13).

Ως προς τα γένη των μυκήτων ανιχνεύθηκαν συνολικά 94 γένη και μια ομάδα μη ταυτοποιημένων γενών που χαρακτηρίστηκε ως NA. Συγκεκριμένα ανιχνεύθηκαν τα γένη: *Acericola*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Apenidiella*, *Arthrocatena*, *Articulospora*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bionectria*, *Bjerkandera*, *Blumeria*, *Buckleyzyma*, *Candida*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Clitocybe*, *Clonostachys*, *Curvibasidium*, *Curvularia*, *Cylindrosyndonium*, *Cystofilobasidium*, *Daldinia*, *Dendrocorticium*, *Diaporthe*, *Didymella*, *Dioszegia*, *Diplodia*, *Epicoccum*, *Eutypa*, *Exophiala*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Genoleuria*, *Geosmithia*, *Graphium*, *Holtermanniella*, *Itersoniella*, *Kabatiella*, *Keissleriella*, *Kondoa*, *Lasioidiplodia*, *Leptospora*, *Leucosporidium*, *Lopadostoma*, *Malassezia*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Microascus*, *Mrakia*, *Mycoarthris*, *Mycosphaerella*, *Naganishia*, *Neoascochyta*, *Neodidymelliopsis*, *Occultifur*, *Papiliotrema*, *Paraphoma*, *Parastagonospora*, *Penicillium*,

Periconia, *Phaeoacremonium*, *Phaeococcomyces*, *Phaeosphaeria*, *Piskurozyma*, *Plectosphaerella*, *Protomyces*, *Pseudofabrea*, *Purpureocillium*, *Pyrenophora*, *Ramularia*, *Rhinocladiella*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Rosellinia*, *Sarocladium*, *Schizophyllum*, *Schizothecium*, *Scoliciosporum*, *Sigarispora*, *Sporobolomyces*, *Stagonosporopsis*, *Stemphylium*, *Symmetrospora*, *Tetracladium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Typhula*, *Ustilago*, *Verrucaria*, *Verrucocladosporium*, *Vishniacozyma*, *Wallemia*, *Wickerhamomyces* και *Yamadazyma* (Διάγραμμα 6). Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν ανά δείγμα και ποσοστό ανίχνευσης του κάθε γένους.

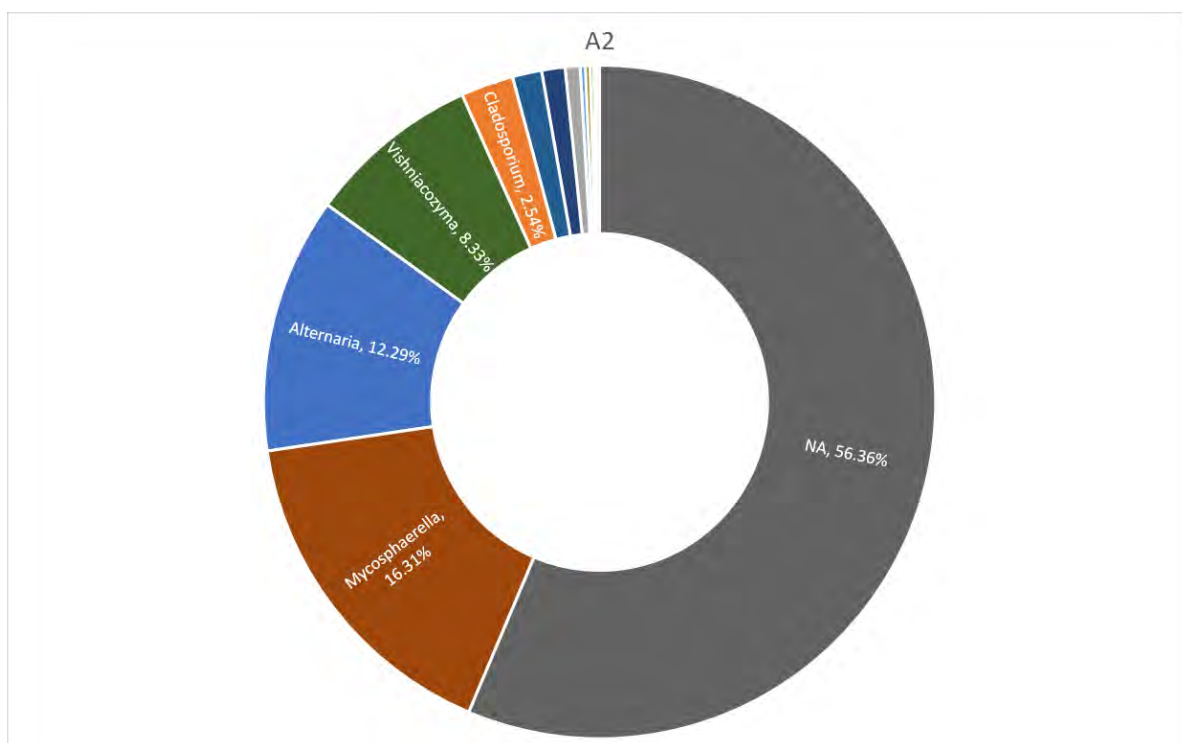
Διάγραμμα 14. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα A1.



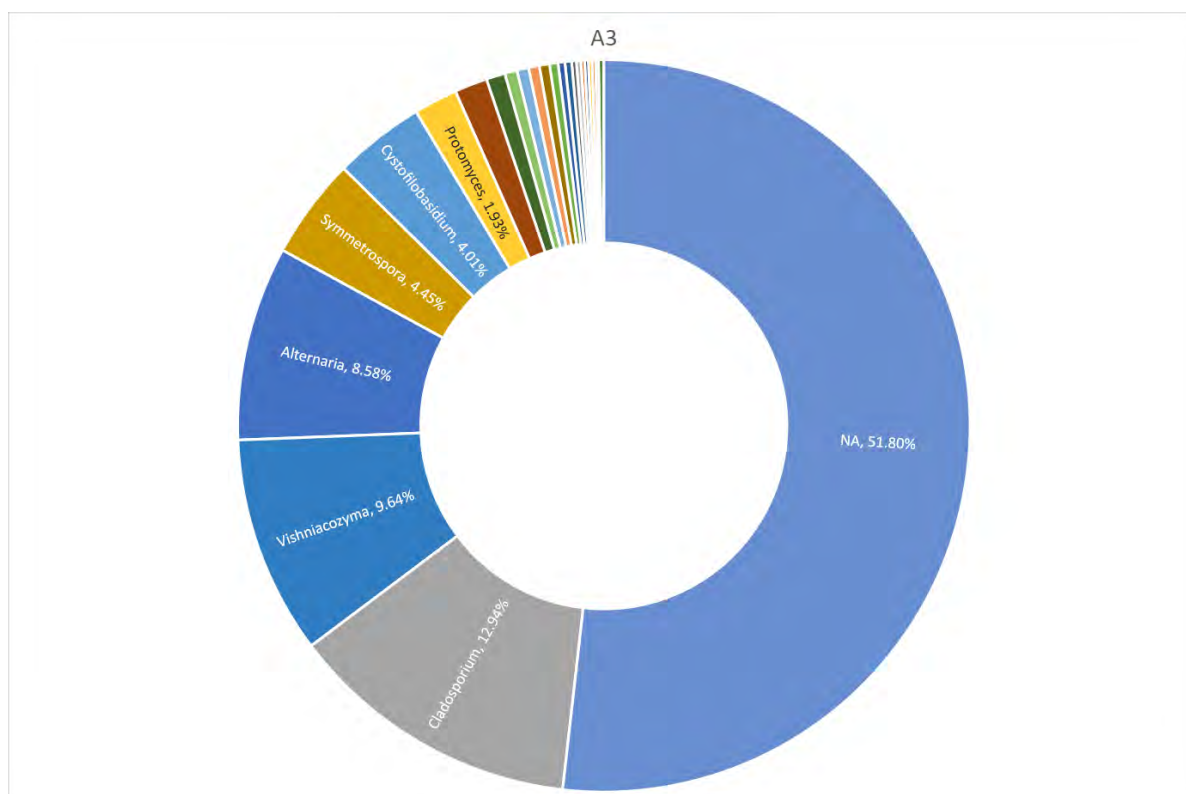
Συγκεκριμένα στο δείγμα A1 τα κυριότερα γένη μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ήταν το γένος *Alternaria* σε ποσοστό 55.37%, η ομάδα μη ταυτοποιημένων γενών NA ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 20.54%, το γένος *Cystofilobasidium* σε ποσοστό 5.19%, το γένος *Cladosporium* σε ποσοστό 4.77%, το γένος *Symmetrospora* σε ποσοστό 2.88%, *Diplodia* σε ποσοστό 2.72% (Διάγραμμα 14).

Στο δείγμα A2 τα κυριότερα γένη μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ήταν σε μεγαλύτερο ποσοστό η ομάδα μη ταυτοποιημένων γενών NA με ποσοστό 56.36%, το γένος *Mycosphaerella* με ποσοστό 16.31%, το γένος *Alternaria* με ποσοστό 12.29%, το γένος *Vishniacozyma* με ποσοστό 8.33%, το γένος *Cladosporium* με ποσοστό 2.54% και το γένος *Symmetrospora* με ποσοστό 1.41% (Διάγραμμα 15).

Διάγραμμα 15. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα A2.

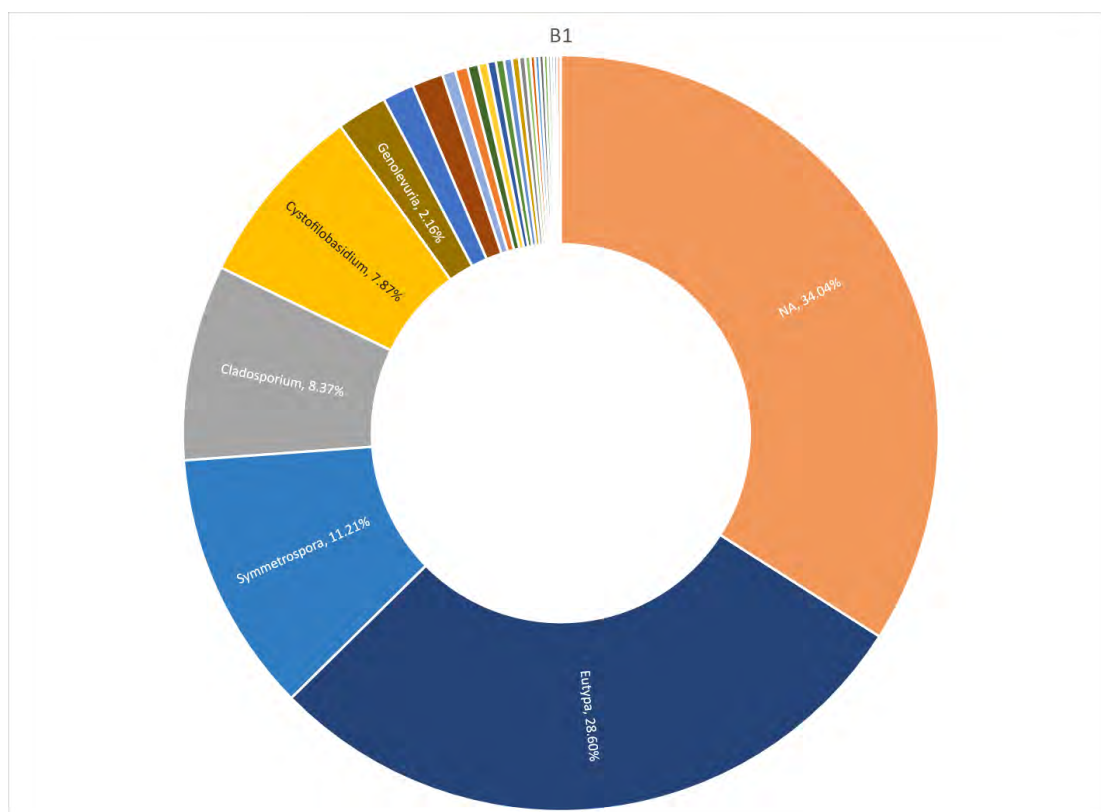


Διάγραμμα 16. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα A3



Στο δείγμα A3 τα κυριότερα γένη μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ήταν, σε μεγαλύτερο ποσοστό η ομάδα των μη ταυτοποιημένων μυκήτων NA, με ποσοστό 51.80%, το γένος *Cladosporium* με ποσοστό 12.94%, το γένος *Vishniacozyma* με ποσοστό 9.64%, το γένος *Alternaria* με ποσοστό 8.58%, το γένος *Symmetrospora* με ποσοστό 4.45% και το γένος *Cystofilobasidium* με ποσοστό 4.01% (Διάγραμμα 16).

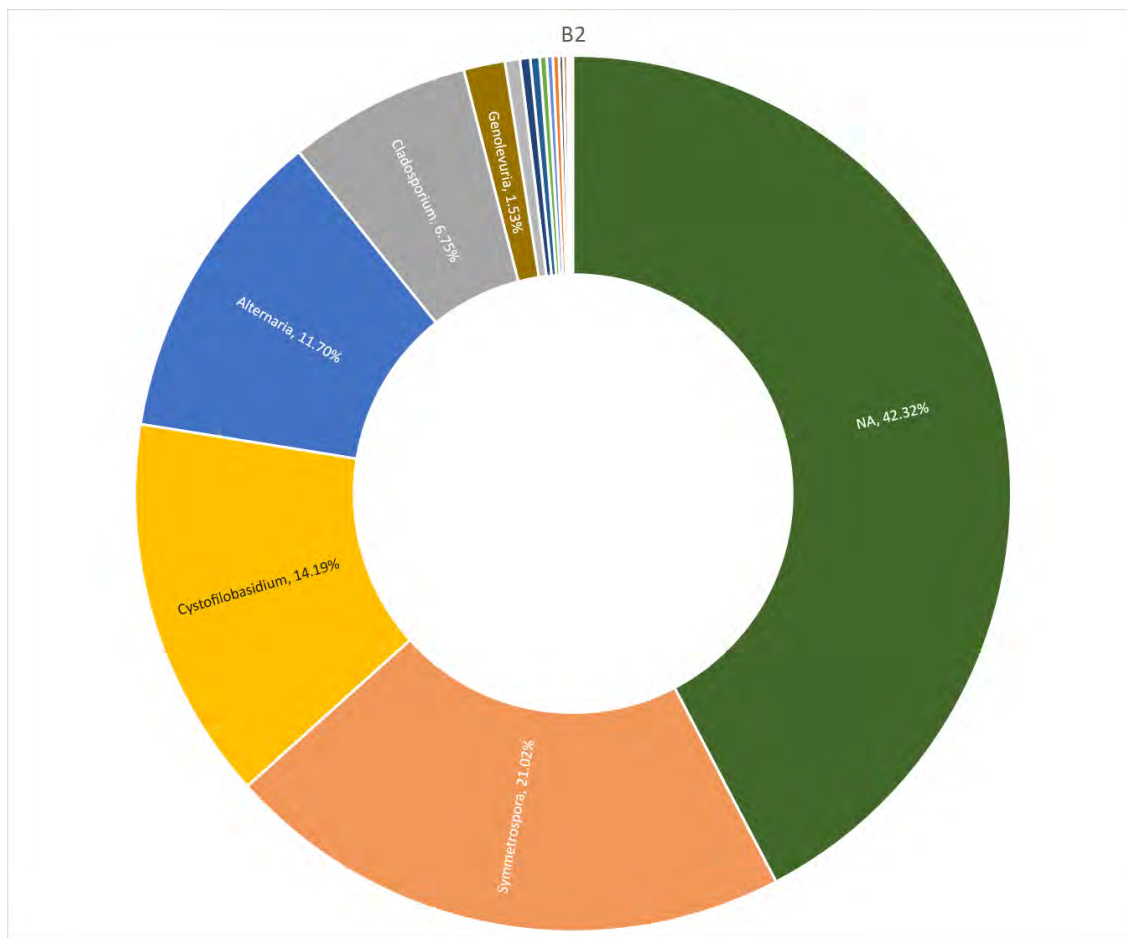
Διάγραμμα 17. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα B1



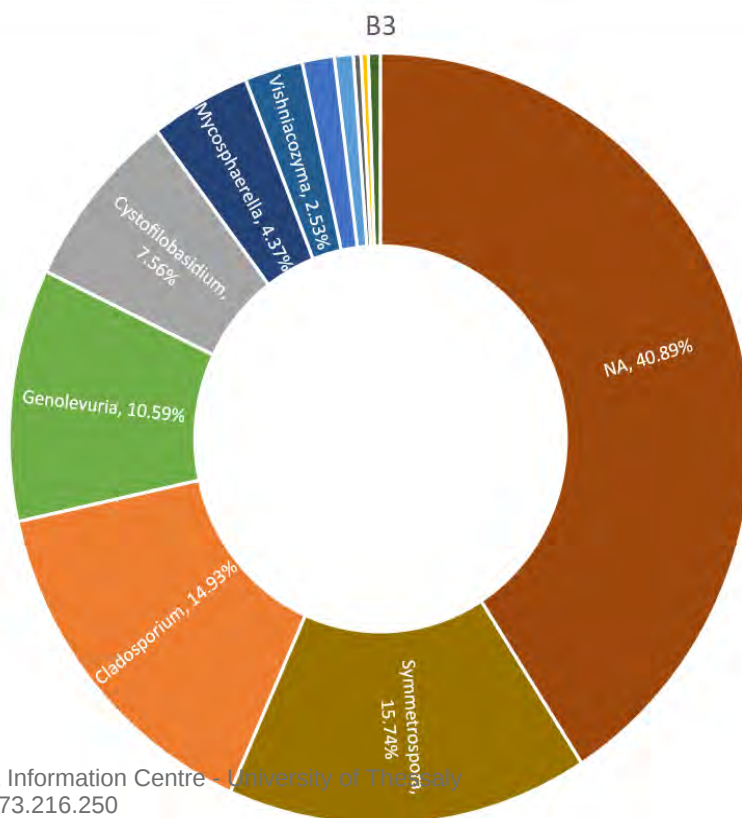
Στο δείγμα B1 τα κυριότερα γένη μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ήταν, σε μεγαλύτερο ποσοστό η ομάδα των μη ταυτοποιημένων μυκήτων NA, με ποσοστό 34.04%, το γένος *Eutypa* με ποσοστό 28.60%, το γένος *Symmetrospora* με ποσοστό 11.21%, το γένος *Cladosporium* με ποσοστό 8.37%, το γένος *Cystofilobasidium* με ποσοστό 7.87% και το γένος *Genolevuria* με ποσοστό 2.16% (Διάγραμμα 17.).

Στο δείγμα B2 τα κυριότερα γένη μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ήταν, σε μεγαλύτερο ποσοστό η ομάδα των μη ταυτοποιημένων μυκήτων NA, με ποσοστό 42.32%, το γένος *Symmetrospora* με ποσοστό 21.02%, το γένος *Cystofilobasidium* με ποσοστό 14.19%, το γένος *Alternaria* με ποσοστό 11.70%, το γένος *Cladosporium* με ποσοστό 6.75% και το γένος *Genolevuria* με ποσοστό 1.53% (Διάγραμμα 18).

Διάγραμμα 18. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα B2

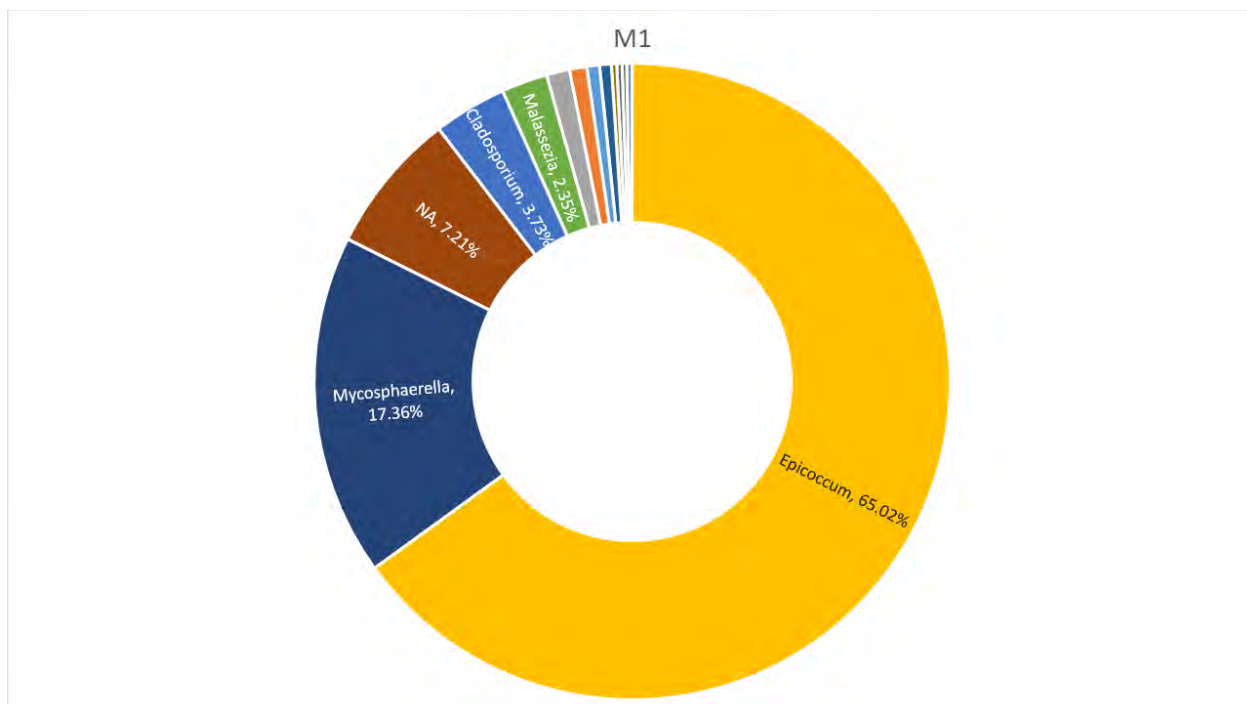


Διάγραμμα 19. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα B3



Στο δείγμα B3 τα κυριότερα γένη μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ήταν, σε μεγαλύτερο ποσοστό η ομάδα των μη ταυτοποιημένων μυκήτων NA, με ποσοστό 40.89%, το γένος *Symmetrospora* με ποσοστό 15.74%, το γένος *Cladosporium* με ποσοστό 14.93%, το γένος *Genolevuria* με ποσοστό 10.59%, το γένος *Cystofilobasidium* με ποσοστό 7.56% και το γένος *Mycosphaerella* με ποσοστό 4.37% (Διάγραμμα 19).

Διάγραμμα 20. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα M1

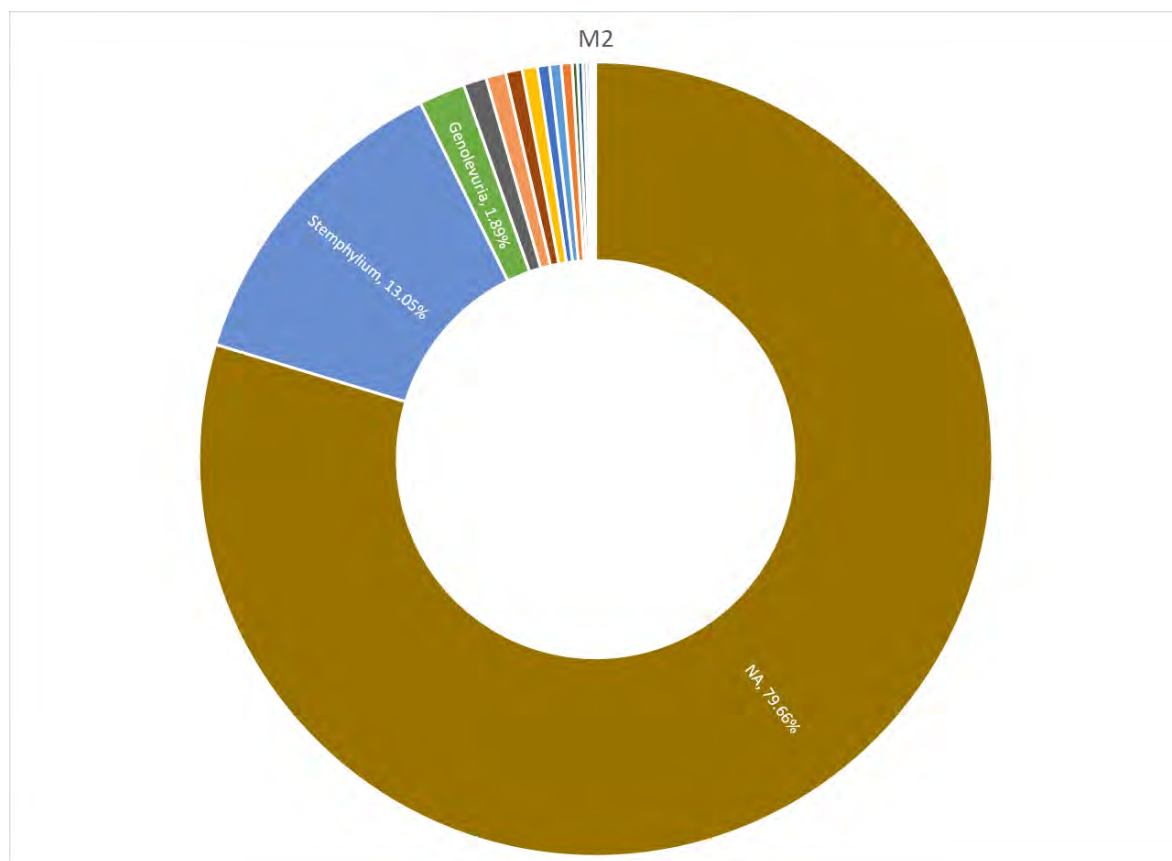


Στο δείγμα M1 τα κυριότερα γένη μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ήταν, σε μεγαλύτερο ποσοστό το γένος *Epicoccum* με ποσοστό 65.02%, το γένος *Mycosphaerella* με ποσοστό 17.36%, η ομάδα μη ταυτοποιημένων γενών NA με ποσοστό 7.21%, το γένος *Cladosporium* με ποσοστό 3.73% και το γένος *Malassezia* με ποσοστό 2.35% (Διάγραμμα 20.)

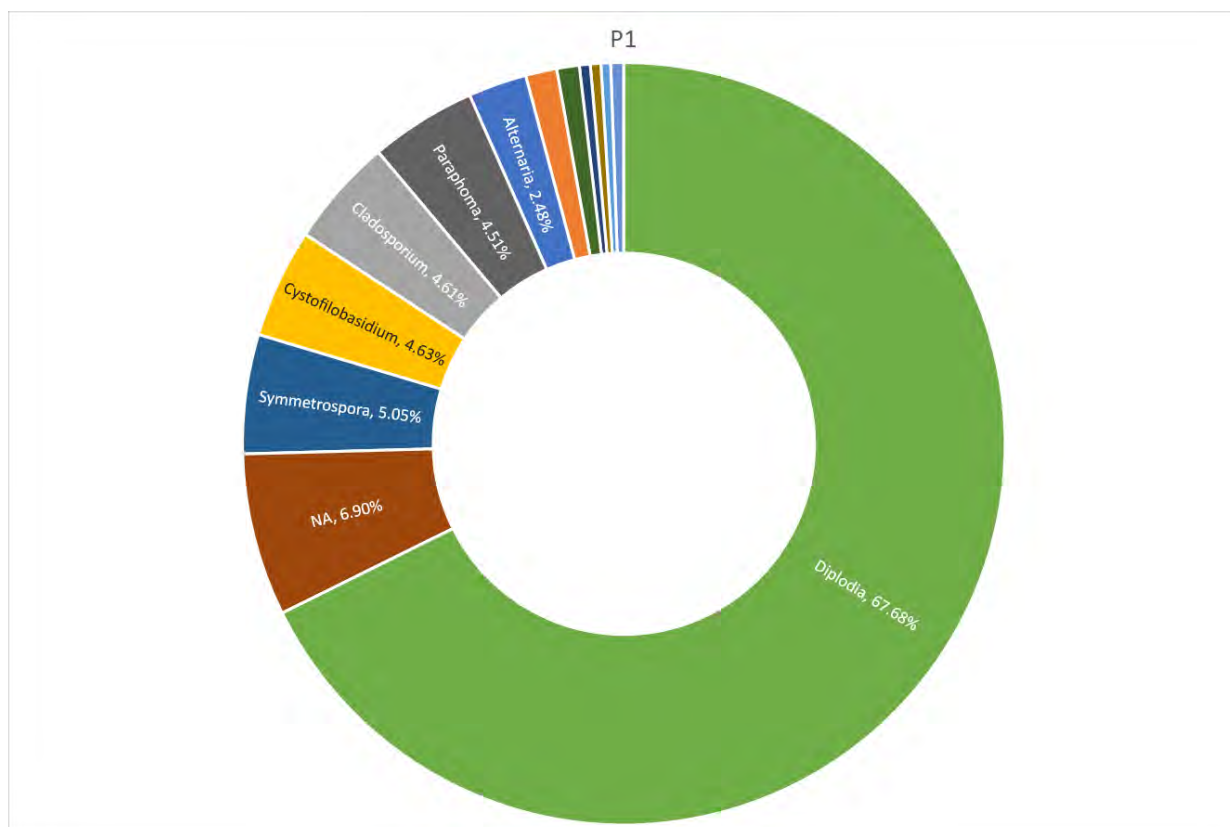
Στο δείγμα M2 τα κυριότερα γένη μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ήταν, το μεγαλύτερο ποσοστό παρουσιάστηκε στην ομάδα μη ταυτοποιημένων γενών NA με ποσοστό 79.66%, το γένος *Stemphylium* με ποσοστό 13.05% και το γένος *Genolevuria* με ποσοστό 1.89% (Διάγραμμα 21).

Στο δείγμα P1 τα κυριότερα γένη μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ήταν, σε μεγαλύτερο ποσοστό το γένος *Diplodia* με ποσοστό 67.68%, η ομάδα μη ταυτοποιημένων γενών NA με ποσοστό 6.90%, το γένος *Symmetrospora* με ποσοστό 5.05%, το γένος *Cystofilobasidium* με ποσοστό 4.63%, το γένος *Cladosporium* με ποσοστό 4.61%, το γένος *Paraphoma* με ποσοστό 4.51% και το γένος *Alternaria* με ποσοστό 2.48% (Διάγραμμα 22).

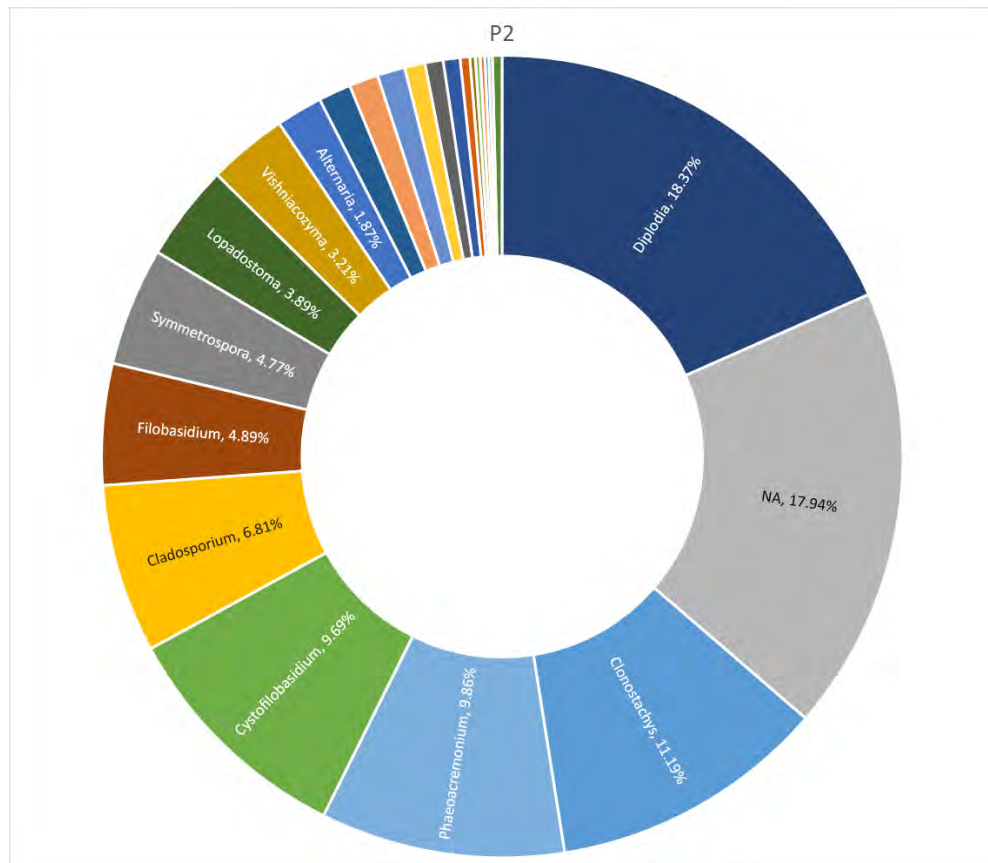
Διάγραμμα 21. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα M2



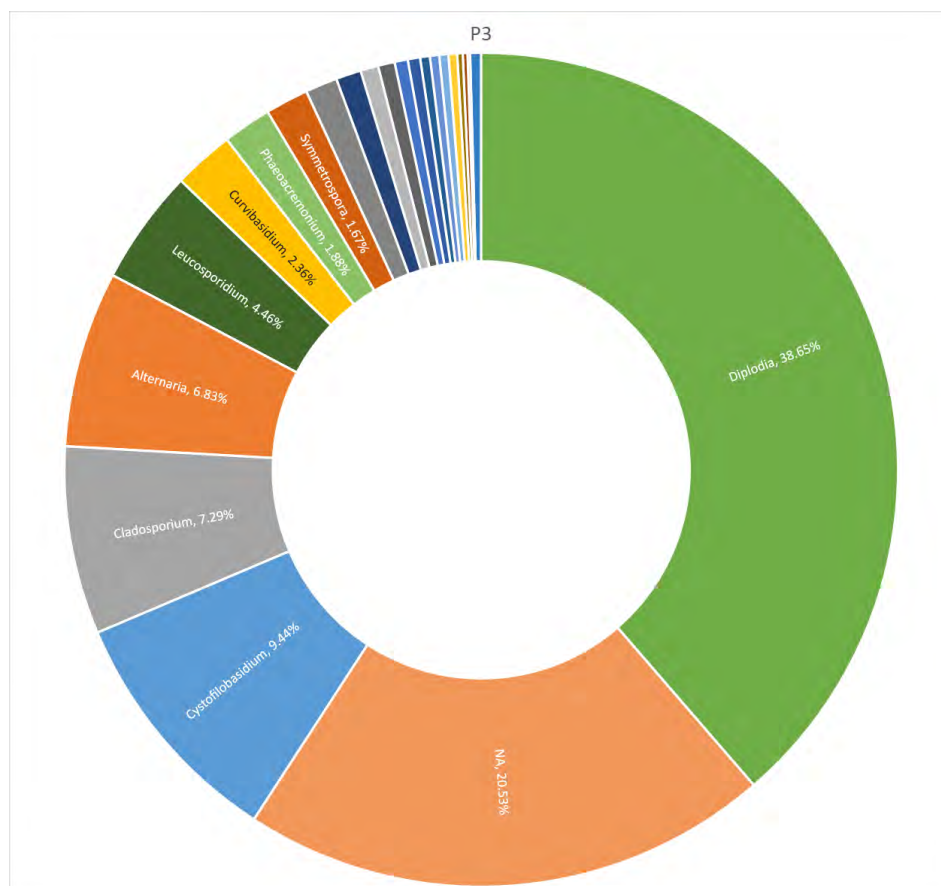
Διάγραμμα 22. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα P1



Διάγραμμα 23. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα P2



Διάγραμμα 24. Ανίχνευση γενών μυκήτων στο δείγμα P3



Στο δείγμα P2 τα κυριότερα γένη μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ήταν, σε μεγαλύτερο ποσοστό το γένος *Diplodia* με ποσοστό 18.37%, η ομάδα των μη ταυτοποιημένων γενών NA με ποσοστό 17.94%, το γένος *Clonostachys* με ποσοστό 11.19%, το γένος *Phaeoacremonium* με ποσοστό 9.86%, το γένος *Cystofilobasidium* με ποσοστό 9.69%, το γένος *Cladosporium* με ποσοστό 6.81%, το γένος *Filobasidium* με ποσοστό 4.89%, το γένος *Symmetrospora* με ποσοστό 4.77%, το γένος *Lopadostoma* με ποσοστό 3.89% και το γένος *Vishniacozyma* με ποσοστό 3.21% (Διάγραμμα 23).

Στο δείγμα P3 τα κυριότερα γένη μυκήτων που ανιχνεύθηκαν ήταν, σε μεγαλύτερο ποσοστό το γένος *Diplodia* με ποσοστό 38.65%, η ομάδα μη ταυτοποιημένων μυκήτων NA με ποσοστό 20.53%, το γένος *Cystofilobasidium* με ποσοστό 9.44%, το γένος *Cladosporium* με ποσοστό 7.29%, το γένος *Alternaria* με ποσοστό 6.83%, το γένος *Leucosporidium* με ποσοστό 4.46% και το γένος *Curvibasidium* με ποσοστό 2.36% (Διάγραμμα 24).

3.3 Ταυτοποίηση μυκήτων με PCR

Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR συγκρίθηκαν με βάση δεδομένων για ταυτοποίηση των μυκήτων. Πιο συγκεκριμένα το δείγμα με τον αριθμό 1 (Πίνακας 4) είχε την εξής αλληλουχία νουκλεοτιδίων:

```
GATCATTATCTATTCCATGAGGTGCGGTGCGGCCCTCGGCGGGAGCAACAGCTA
CCGTCGGGGCGGTAGAGGTAACACTTTCACGCGCCGCATGTCTGAATCCTTTTTTTA
CGAGCACCTTTCGTTCTCCTTCGGCGGGGCAACCTGCCGTTGGAACCTATCAAAA
CCTTTTTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCTGATACAAACAATCGTTACAACCTTTC
AACAATGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
GTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC
CCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCT
GCTTGGTGTGTTGGGCGTCTGTCCCGCCTCTGCGCGCGGACTCGCCCCAAATTCATTG
GCAGCGGTCCTTGCCTCCTCTCGCGCAGCACATTGCGCTTCTCGAGGTGCGCGGC
CCGCGTCCACGAAGCAACATTACCGTCTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCC
GCTGAACTTAAGCATATC
```

Η αλληλουχία έδωσε τάνυση με κομμάτι γονιδιόματος των μυκήτων *Paraconiothyrium brasiliense* με ποσοστό τάνυσης 100.00%, *Didymosphaeria rubi-ulmifolii* με ποσοστό τάνυσης 100.00%, *Microdiplodia* sp με ποσοστό τάνυσης 99.82% (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 1.

Δείγμα 1	Max score	E- value	Per. Ident	Accession number
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	1055	0,0	100.00%	KR909140.1
<i>Didymosphaeria rubi- ulmifolii</i>	1051	0,0	100.00%	MK646046.1
<i>Microdiploia</i> sp. TBPJ-A	1048	0,0	99.82%	KF0108.41

Το δείγμα 2 είχε την εξής αλληλουχία:

ATAAGTCTCGTTGGTGACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATACAACTCATCA
ACCCTGTGAACATACCTAAAACGTTGCTTCGGCGGGAACAGACGGCCCTGTAACA
ACGGGCCCGCCCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTTTATAATGTTTTTCTGAGT
AAACAAGCAAATAAATTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTT
CGAGCGTCATTACAACCCTCAGGCCCCCGGGCCTGGCGTTGGGGATCGGCAGAA
GCCCCCTGTGGGCACACGCCGTCCCTCAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCAGCTT
CCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAGAGCGGCGCGGCCATGCCGTAA
AACACCCAACCTTCTGAATGTTGACCTCGAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT
AAGCATATCAWARTCGGRRGGAA

Η αλληλούχιση έδειξε ταύτιση με κομμάτι γονιδιόματος των μυκήτων *Fusarium solani* και *Fusarium oxysporum* με ποσοστό ταύτισης 100,00% (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 2.

Δείγμα 2	Max score	E- value	Per. Ident	Accession number
<i>Fusarium solani</i>	977	0,0	100,00%	MT560338.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	977	0,0	100,00%	MN651101.1

Το δείγμα 3 είχε την εξής αλληλουχία:

CCGTACGTGACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTTTTTCGGGCTTCGGCTCGACTCT
CCCACCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTTCGGCCGCCAAAGGACC

TTCAAACCTCCAGTCAGTAAACGCAGACGTCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAA
 CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
 ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT
 GCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAA
 GCTCTGCTTGGAATTGGGCACCGTCTCTCACTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGG
 CGGTGGCTGTTTCAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTG
 GCGTCGCCCCGCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAG
 GTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAARGCGGGRRRRAA

Η αλληλουχία έδειξε ταύτιση με κομμάτι του γονιδιώματος των μυκήτων *Lasiodiplodia citricola* και *Lasiodiplodia theobromae* σε ποσοστό 100,00% (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 3.

Δείγμα 3	Max score	E- value	Per. Ident	Accession number
<i>Lasiodiplodia citricola</i>	928	0,0	100,00%	MN634040.1
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	928	0,0	100,00%	MN364705.1

Το δείγμα 4 είχε την εξής αλληλουχία:

TCGCACGTGACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAA
 CCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGC
 CGCCGGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGT
 CTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAA
 TGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTG
 TGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTG
 GTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCCATCAAGCACGGCTT
 GTGTGTTGGGTTCGTTCCTCCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCG
 GCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCCGCTCTGTAGGCCCG
 GCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGT
 AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAARGGGGGRRRRGAA

Η αλληλουχία έδειξε ταύτιση με κομμάτι γονιδιώματος των μυκήτων *Aspergillus flavus* και *Aspergillus oryzae* σε ποσοστό 100,00% (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 4.

Δείγμα 4	Max score	E- value	Per. Ident	Accession number
<i>Aspergillus flavus</i>	1026	0,0	100,00%	OQ248215.1
<i>Aspergillus oryzae</i>	1026	0,0	100,00%	OP103938.1

Το δείγμα 5 είχε την εξής αλληλουχία:

TCTTAGCTTTTCGTAGTGACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGG
TCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAC
TGGCCGCCGGGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGA
ACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAA
CAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA
ATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCC
TGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCT
TGTGTGTTGGGCCCCGTCCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGC
GGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCC
GGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAARSCSGGAGGAA

Η αλληλουχία έδειξε ταύτιση με κομμάτι γονιδιώματος των μυκήτων *Penicillium olsonii*, *Trichoderma lixii* και *Penicillium chrysogenum* σε ποσοστό 100,00% (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 5.

Δείγμα 5	Max score	E- value	Per. Ident	Accession number
<i>Penicillium olsonii</i>	1009	0,0	100,00%	MT635310.1
<i>Trichoderma lixii</i>	1009	0,0	100,00%	ON116617.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1009	0,0	100,00%	MK762610.1

Το δείγμα 6 είχε την εξής αλληλουχία:

TATAGGTTTTTCGTAGTGACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCAGGTCTGCCC
CCGGGCAGGCCTAACCTCCCACCCGTGAATACCTGACCAACGTTGCTTCGGCGGT
GCGCCCCCCCCCGGGGGTAGCCGCCGGAGACCACACCGAACCTCCTGTCTTTAGT
GTTGTCTGAGCTTGATAGCAAACCTATTAACACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTT
CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGG
CATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGT
CGTCCCCCCCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCT
CGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCGATTAGGGCCGGCCGGGCGCCAGCCGG
CGTCTCCAACCTTCTATTTTACCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCT
GAACTTAAGCATATCATAGCCSRRAGGAAA

Η αλληλουχία παρουσίασε ταύτιση με κομμάτι γονιδιώματος των μυκήτων *Aspergillus calidoustus* και *Eurotiomycetes* sp. σε ποσοστό 100,00% και 99.81% αντίστοιχα (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 6.

Δείγμα 6	Max score	E- value	Per. Ident	Accession number
<i>Aspergillus calidoustus</i>	989	0,0	100,00%	MK503137.1
<i>Eurotiomycetes</i> sp. genotype 44	981	0,0	99.81%	JQ758668.1

Το δείγμα 7 είχε την εξής αλληλουχία:

TTATAAGTCTCGTAGTGACCTGCGGAGGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGC
 TGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGCGTAC
 TTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCACCCTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAA
 TTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCT
 TGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC
 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCA
 AAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGC
 GTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTAC
 TGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCA
 TTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCT
 AAGCATATCATARSCGGGAGGAAA

Η αλληλουχία παρουσίασε ταύτιση με κομμάτι του γονιδιώματος των μυκήτων *Alternaria alternata* και *Alternaria angustiovoidea* σε ποσοστό 100,00% (Πίνακας 12).

Πίνακας 12. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 7.

Δείγμα 7	Max score	E- value	Per. Ident	Accession number
<i>Alternaria alternata</i>	985	0,0	100,00%	OQ248210.1
<i>Alternaria angustiovoidea</i>	985	0,0	100,00%	OQ216878.1

Το δείγμα 8 είχε την εξής αλληλουχία:

CATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCT
 GTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGGCGCCTCTGCCCCC
 GGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTC
 TGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCG
 GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCA
 GTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCAT
 GCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTC

CCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCT
 CGAGCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG
 TTTTCCAACCATTTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC
 TTAAGCATAT

Η αλληλουχία παρουσίασε ταύτιση με κομμάτι γονιδιώματος των μυκήτων *Aspergillus niger* *Fusarium* sp. σε ποσοστό 100,00% (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Αποτελέσματα ταυτοποίησης μυκήτων στο δείγμα 8.

Δείγμα 8	Max score	E- value	Per. Ident	Accession number
<i>Aspergillus niger</i>	1035	0,0	100,00%	MT620753.1
<i>Fusarium</i> sp.	1035	0,0	100,00%	MT771322

Κεφάλαιο 4^ο Συζήτηση

Το γένος *Alternaria* ανιχνεύθηκε σε μεγάλα ποσοστά στα δείγματα Α και Β, κυρίως όμως στα δείγματα Α1, Α2 και Α3. Στο δείγμα Α1 έφτασε το ποσοστό 55.37%, γεγονός που επισημαίνει την προσοχή μας. Ο μύκητας προκαλεί ασθένεια στη χώρα μας γνωστή ως μαύρη κηλίδωση της μηλιάς και της απιδιάς. Προσβάλλονται κυρίως τα φύλλα, καρπούς και νεαρούς κλαδίσκους. Στα φύλλα δημιουργούνται μικρές κηλίδες καστανού σκούρου χρώματος που στην συνέχεια εξαπλώνονται και λαμβάνουν μεγαλύτερο μέρος του ελάσματος (Παναγόπουλος, 2007). Ερευνητές, προσπάθησαν να εξηγήσουν ποια παθογόνα μπορούν και διαχειμάζουν το χειμώνα σε καλλιέργεια μηλιάς, εμφανίζοντας υψηλό ρίσκο μόλυνσης την άνοιξη και ένα από αυτά ήταν το γένος *Alternaria* (Gelain et al., 2022). Επιστήμονες ύστερα από πειράματα, απέδειξαν πως η πιο ευνοϊκή περίοδος για αύξηση του μολύσματος πάνω στα φυτά είναι η περίοδος κοντά στην έκπτυξη των οφθαλμών έως και την ανθοφορία, καθώς και το καλοκαίρι στην ανάπτυξη των φρούτων (Harteveld et al., 2014). Η πρώτη περίοδος ταιριάζει με την εποχή που έγινε η δειγματοληψία μας στον πειραματικό αγρό. Ωστόσο, κάποιοι άλλοι ερευνητές απέδειξαν πως η περίοδος μόλυνσης συμπίπτει με την περίοδο είκοσι ημερών μετά την άνθιση. Αποδεκτό είναι φυσικά το γεγονός, πως η εποχή αυτή εξαρτάται από τη θερμοκρασία και γενικότερα τις καιρικές συνθήκες που ευνοούν το παθογόνο και την εξάπλωση της ασθένειας (Harteveld et al., 2014). Σε πείραμα καλλιέργειας μηλιάς με παρόμοια συμπτωματολογία οι ερευνητές απομόνωσαν και ταυτοποίησαν μύκητες του γένους *Alternaria* καθώς και μύκητες των γενών *Epicoccum*, *Aureobasidium*, και *Penicillium* και τους χαρακτήρισαν ως σαπροφυτικούς (Havenga et al., 2019).

Το γένος *Cladosporium* ανιχνεύθηκε και αυτό σε μεγάλα ποσοστά, σε όλα τα δείγματα. Στα δείγματα της σειράς Α και Β σε μεγαλύτερα ποσοστά, ενώ στα δείγματα Μ1 και Μ2 σε πολύ μικρότερα. Ερευνητές απομόνωσαν από καλλιέργεια μηλιάς με παρόμοια συμπτωματολογία με τη δική μας μύκητες των γενών *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium* και *Fusarium* (Elena et al., 2022). Άλλοι ερευνητές αναφέρουν το γένος *Cladosporium* ως ανταγωνιστικό μύκητα του *Venturia inaequalis*, ξεκινώντας να το δοκιμάζουν στην αντιμετώπιση της ασθένειας του φουζικλαδίου (Köhl et al., 2015). Στην περιοχή δειγματοληψίας το μόλυσμα του μύκητα *Venturia inaequalis* υπάρχει και ίσως αυτό εξηγεί το γεγονός του υψηλού ποσοστού ανίχνευσης του γένους *Cladosporium* στα δείγματά μας.

Το γένος *Clonostachys* ανιχνεύθηκε στα δείγματα Ρ1, Ρ2 και Ρ3. Αποτελεί έναν ασκομύκητα που διαθέτει μυκοπαρασιτικές ιδιότητες (Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden et al., 2021). Ερευνητές έχουν δοκιμάσει το συγκεκριμένο μύκητα ως βιολογικό τρόπο αντιμετώπισης ασθενειών με συμπτώματα ελκών σε βραχίονες που

προκλήθηκαν από τον μύκητα *Neonectria ditissima*. Τα αποτελέσματα ήταν πολύ ενθαρρυντικά (Elena et al., 2022).

Το γένος *Cystofilobasidium* ανιχνεύθηκε σε μεγάλα ποσοστά σε όλες της σειρές δειγμάτων, εκτός από τα δείγματα M1 και M2. Ο μύκητας έχει αναφερθεί και στο παρελθόν για τη δράση του ενάντια σε μύκητες που προκαλούν μετασυλλεκτικές σήψεις καρπών (Chand-Goyal and Spotts, 1997). Ερευνητές έχουν δοκιμάσει την αποτελεσματικότητά του ενάντια σε φυτοπαθογόνους μύκητες σε καρπούς μηλιάς (Vero et al., 2011).

Το γένος *Diplodia* έχει αναφερθεί κατά καιρούς ότι προκαλεί συμπτώματα παρόμοια με αυτά που συναντήσαμε στο πείραμά μας (Phillips et al., 2012). Πρόσφατα, ερευνητές απομόνωσαν τον μύκητα από δέντρα μηλιάς δύο ετών, με συμπτωματολογία ελκών , νέκρωσης κλάδων και βραχιόνων (Nabi et al., 2020). Σε ακόμα μία έρευνα, από δέντρα μηλιάς ηλικίας επτά ετών απομονώθηκε το παθογόνο *Diplodia seriata* σε διευρυμένα έλκη πάνω στον κεντρικό άξονα των φυτών (Díaz et al., 2018). Στην παρούσα διπλωματική το γένος ανιχνεύθηκε σε μεγάλα ποσοστά στα δείγματα της σειράς B και P και κυρίως στα δείγματα P1, P2 και P3. Τα δείγματα των σειρών B και P, προέρχονταν από το ίδιο φυτό και συγκεκριμένα από το λαιμό του (σειρά P). Ίσως τα ευρήματα να εξηγούν στη συμπτωματολογία το διευρυμένο έλκος που είχε παρουσιαστεί στο φυτό (Εικόνα 3). Ωστόσο το γένος *Eutypa* ανιχνεύθηκε και αυτό σε μεγάλα ποσοστά στα δείγματα της σειράς B, δηλαδή στο ίδιο φυτό. Επιστήμονες απομόνωσαν από νεαρά δένδρα μηλιάς με παρόμοια συμπτωματολογία τα παθογόνα *Eutypa lata* και *Diplodia seriata*. Η δειγματοληψία έγινε σε φυτώριο, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει και την δική μας εκτεταμένη προσβολή (Havenga et al., 2019). Είναι πιθανόν το μόλυσμα να προήλθε από το φυτώριο. Σε παρόμοιο πείραμα απομονώθηκαν και πάλι αυτά τα δύο γένη μυκήτων, αυτή τη φορά σε μεγαλύτερης ηλικίας δένδρων μηλιάς (Nourian et al., 2021). Ίσως υπάρχει κάποιος συνεργισμός των δύο παθογόνων, προκαλώντας τη συγκεκριμένη συμπτωματολογία.

Σε λιγότερο υψηλά ποσοστά ανιχνεύθηκαν και τα γένη *Genolevuria* και *Filobasidium*. Το γένος *Genolevuria* ανιχνεύθηκε κυρίως στις σειρές A και B, ενώ το γένος *Filobasidium* ανιχνεύθηκε στο λαιμό του φυτού, στα δείγματα της σειράς P. Πρόσφατα ερευνητές ανίχνευσαν στελέχη του γένους *Genolevuria* σε αποσυντετημένο ιστό ξύλου, σε δασικά οικοσυστήματα (Behnke-Borowczyk et al., 2018). Επιπρόσθετα ερευνητές συσχέτισαν το συγκεκριμένο μύκητα με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Hymenoscyphus fraxineus* που προκαλεί ασθένεια με συμπτώματα αποπληξίας δασικών δένδρων (Griffiths et al., 2020). Το γένος *Filobasidium* ανιχνεύθηκε στο φυτικό είδος *Atriplex canescens* καθώς και στον κορμό δένδρων μηλιάς (Arrigoni et al., 2020; Ricks and Koide, 2019). Προφανώς πρόκειται για

συμβιωτικούς μύκητες. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει διαθέσιμη βιβλιογραφική πηγή που να τους χαρακτηρίζει ως φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς.

Το γένος *Mycosphaerella* ανιχνεύθηκε σε όλες τις σειρές δειγμάτων, κυρίως στη σειρά A και στη σειρά M. Ερευνητές στην Ιαπωνία έχουν συσχετίσει το γένος με ασθένεια που προκαλεί μαύρες κηλίδες στα φύλλα και στου καρπούς μηλιάς. Πιο συγκεκριμένα, έχουν συνδέσει τον ασκομύκητα με τα κονίδια του γένους *Cylindrosporium* (Arai et al., 2005).

Το σύνολο των μη ταυτοποιημένων γενών που χαρακτηρίστηκε ως NA, ανιχνεύθηκε σε μεγάλα ποσοστά σε όλες τις σειρές δειγμάτων. Υπάρχει η πιθανότητα να αποτελείται από γένη που ανήκουν στην ομάδα των ωομυκήτων. Επιπρόσθετα η οικογένεια *Aureobasidiaceae* ανιχνεύθηκε σε μεγάλα ποσοστά κυρίως στα δείγματα M1 και M2. Τα γένη αυτής της οικογένειας δεν ταυτοποιήθηκαν και συμπεριλήφθηκαν στην ομάδα των μη ταυτοποιημένων γενών NA. Ίσως ένα ποσοστό αυτών, στην ομάδα των γενών να ανήκει στην οικογένεια αυτή.

Το γένος *Phaeoacremonium* ανιχνεύθηκε σε ποσοστά 0.45%, 9.86%, 1.88% στα δείγματα P1, P2 και P3 αντίστοιχα. Αποτελεί ένα από τα κυριότερα παθογόνα που προκαλούν το σύνδρομο της ίσκας της αμπέλου (Παναγόπουλος, 2007). Ερευνητές ταυτοποίησαν το παθογόνο από δένδρα μηλιάς με συμπτώματα αποπληξίας και μεταχρωματισμού του ξυλώματος (Arzanlou et al., 2014). Επιπρόσθετα το γένος *Phaeoacremonium* απομονώθηκε μαζί με τα γένη *Diplodia* και *Eutypa* από δένδρα μηλιάς με συμπτωματολογία ελκών, ξήρανσης κλάδων και βραχιόνων στην Νότια Αφρική (Cloete et al., 2011).

Το γένος *Vishniacozyma* ανιχνεύθηκε σε όλες τις σειρές δειγμάτων και σε μεγαλύτερα ποσοστά στη σειρά δειγμάτων A. Πρόκειται για ενδοφυτικό μύκητα. Πρόσφατα ερευνητές ανίχνευσαν το γένος σε φυτά αμπέλου, χρησιμοποιώντας την μέθοδο NGS, για την μελέτη της λειτουργικής βιοποικιλότητας των μικροοργανισμών στο εσωτερικών φυτικών οργανισμών (Aleynova et al., 2022). Ακόμα, ερευνητές δοκίμασαν στελέχη του μύκητα για την αναστολή της δράσης του παθογόνου *Botrytis cinerea* σε φυτά ακτινιδιάς. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά (Nian et al., 2023).

Συμπερασματικά, τα δένδρα στο συγκεκριμένο πείραμα παρουσίασαν μια συγκεκριμένη συμπτωματολογία που περιλάμβανε έλκη, μεταχρωματισμό του καμβίου, ξήρανση κλάδων και βραχιόνων και τελικά μάρανση ολόκληρου του φυτού. Η προσβολή στον αγρό ήταν πολύ μεγάλη, σύμφωνα με τα λεγόμενα του παραγωγού ένα ποσοστό της τάξης 30% του συνόλου των δέντρων εκριζώνονταν, εξαιτίας της μη παραγωγικής του κατάστασης. Τα κύρια παθογόνα που προκαλούν παρόμοια συμπτωματολογία και ανιχνεύθηκαν και στην παρούσα διπλωματική είναι τα γένη *Diplodia*, *Eutypa*, *Phaeoacremonium* και *Fusarium* το συνδέεται

με ο γένος *Nectria*. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, βάση βιβλιογραφίας, πολλές φορές σε παρόμοιας συμπτωματολογίας δένδρα έχουν ανιχνευθεί αυτοί οι μύκητες. Κυρίως τα γένη *Diplodia* και *Eutypa* όπως και στο γένος *Fusarium* που ταυτοποιήθηκε και από τη μέθοδο PCR, παρουσιάζονται πολύ συχνά σε τέτοιου είδους ασθένειες. Το πιο πιθανό είναι να υπάρχει ένας συνεργισμός ανάμεσα τους στον οποίο ήρθε στο συγκεκριμένο πείραμα να προστεθεί και το γένος *Phaeoacremonium*. Η ασθένεια εξελίσσεται σταδιακά και παρουσιάζει μια διασυστηματικότητα, καθώς τα γένη *Diplodia* και *Phaeoacremonium* ανιχνεύθηκαν σε μεγαλύτερα ποσοστά στο λαιμό των δένδρων. Τα δένδρα φτάνουν σταδιακά σε ολική κατάρρευση και όταν είναι και σε μικρότερη ηλικία, αυτή γίνεται σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα. Αυτό εξηγεί το γεγονός του μεγάλου ποσοστού εκρίζωσης δένδρων πριν καν αυτά προλάβουν να εισέλθουν στην πλήρη παραγωγή. Επιπρόσθετα το γένος *Didymosphaeria rubi-ulmifolii* έχει συσχετιστεί με παρόμοια συμπτωματολογία σε δένδρα μηλιάς. (Yirgu et al., 2021). Τα γένη *Alternaria* και *Cladosporium* προσβάλλουν μεταγενέστερα του ασθενικούς ιστούς των φυτών και για αυτό ανιχνεύθηκαν σε μεγάλα ποσοστά. Η έρευνα μας πρέπει να αποτελέσει το ξεκίνημα μιας σειράς μεταγενέστερων πειραμάτων με σκοπό τον εντοπισμό της πηγής του μολύσματος. Επιπρόσθετα περεταίρω μελέτες πρέπει να γίνουν για να δοθεί ένας αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης της ασθένειας, καθώς το πρόβλημα στην ευρύτερη περιοχή της Αγίας Λάρισας τείνει συνεχώς να αυξάνεται.

Βιβλιογραφία

Θανασουλόπουλος, Κ. (1996). *ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΔΕΝΔΡΩΝ ΚΑΙ ΑΜΠΕΛΟΥ*, Μαθήματα Ειδικής Φυτοπαθολογίας. Εκδόσεις ΖΗΤΗ, Θεσσαλονίκη.

Παναγόπουλος, Χ.Γ. (2007). *Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου*. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα.

Τζάμος, Ε.Κ. (2007). *ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ*. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα.

AGRIOS, G.N. (2017). *ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ*. Εκδόσεις Utopia, Αθήνα.

Abreo, E., Martínez, S., Sessa, L., Bettucci, L., Lupo, S., 2012. Phomopsis cotoneastri as a pathogen associated with trunk cankers and death of young apple trees cv. Cripps Pink. Journal of Phytopathology 160, 434–436. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01914.x>

Akgul, D.S., Savas, N.G., Eskalen, A., 2014. First Report of Wood Canker Caused by Botryosphaeria dothidea, Diplodia seriata, Neofusicoccum parvum, and Lasiodiplodia theobromae on Grapevine in Turkey. Plant Disease 98, 568–568. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0726-PDN>

Aleynova, O.A., Nityagovsky, N.N., Suprun, A.R., Ananov, A.A., Dubrovina, A.S., Kiselev, K.V., 2022. The Diversity of Fungal Endophytes from Wild Grape Vitis amurens Rupr. Plants 11. <https://doi.org/10.3390/plants11212897>

Ali, S., Renderos, W., Bevis, E., Hebb, J., Abbasi, P.A., 2020. Diaporthe eres causes stem cankers and death of young apple rootstocks in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology 42, 218–227. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1653377>

Amponsah, N.T., Jones, E.E., Ridgway, H.J., Jaspers, M.V., 2011. Identification, potential inoculum sources and pathogenicity of botryosphaeriaceous species associated with grapevine dieback disease in New Zealand. European Journal of Plant Pathology 131, 467–482. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9823-1>

Arai, S., Fujita, T., Harada, Y., 2005. Role of Cyindrosporium-type conidia of Mycosphaerella pomi (Pass.) Lindau: cause of Brooks fruit spot of apple, as an infection source in apple orchards. J Gen Plant Pathol 71, 357–359. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0209-0>

Araujo, L., Cardoza, Y.F., Duarte, V., Moraes, M.G. de, 2020. Pseudomonas syringae causing bacterial canker on apple trees in Brazil. Bragantia 79, 592–598. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20200246>

- Araujo, L., Pinto, F.A.M.F., de Andrade, C.C.L., Duarte, V., 2022. Viability and release of *Neonectria ditissima* ascospores on apple fruit in Brazil. *Plant Pathology* 71, 654–667. <https://doi.org/10.1111/ppa.13508>
- Arrigoni, E., Albanese, D., Longa, C.M.O., Angeli, D., Donati, C., Ioriatti, C., Pertot, I., Perazzolli, M., 2020. Tissue age, orchard location and disease management influence the composition of fungal and bacterial communities present on the bark of apple trees. *Environ Microbiol* 22, 2080–2093. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14963>
- Arzanlou, M., Narmani, A., Khodaei, S., Moshari, S., 2014. Pome and stone fruit trees as possible reservoir hosts for *Phaeoacremonium* spp., the causal agents of grapevine esca disease, in Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47, 717–727. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.820387>
- Auger, J., Esterio, M., Ricke, G., Pérez, I., 2004. Black Dead Arm and Basal Canker of *Vitis vinifera* cv. Red Globe Caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. *Plant Disease* 88, 1286–1286. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.11.1286A>
- Behnke-Borowczyk, J., Kwasna, H., Kokot, K., Haluszczak, M., Lakomy, P., 2018. Abundance and diversity of fungi in oak wood. *Dendrobiology* 80. <https://doi.org/10.12657/denbio.080.014>
- Bellée, A., Comont, G., Nivault, A., Abou-Mansour, E., Coppin, C., Dufour, M.C., Corio-Costet, M.F., 2017. Life traits of four *Botryosphaeriaceae* species and molecular responses of different grapevine cultivars or hybrids. *Plant Pathology* 66, 763–776. <https://doi.org/10.1111/ppa.12623>
- Bertier, L., Brouwer, H., Cock, A., Cooke, D., Olsson, C., Höfte, M., 2013. The expansion of *Phytophthora* clade 8b: Three new species associated with winter grown vegetable crops. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 31, 63–76. <https://doi.org/10.3767/003158513X668554>
- Besoain, X., Torres, C., Díaz, G.A., Latorre, B.A., 2013. First Report of *Neofusicoccum australe* Associated with *Botryosphaeria* Canker of Grapevine in Chile. *Plant Disease* 97, 143–143. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0652-PDN>
- Borovinova, M., Petrova, V., Maneva, S., 2012. Effect of different growing systems of apple on trunk and branch diseases and pests. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 40, 159–162. <https://doi.org/10.15835/nbha4028165>

- Catal, M., Jordan, S.A., Butterworth, S.C., Schilder, A.M.C., 2007. Detection of *Eutypa lata* and *Eutypella vitis* in grapevine by nested multiplex polymerase chain reaction. *Phytopathology* 97, 737–747. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-6-0737>
- Chand-Goyal, T., Spotts, R.A., 1997. Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi-commercial and commercial conditions using three saprophytic yeasts. *Biological Control* 10, 199–206. <https://doi.org/10.1006/bcon.1997.0568>
- Cloete, M., Fourie, P.H., Damm, U., Crous, P.W., Mostert, L., 2011. Fungi associated with die-back symptoms of apple and pear trees, a possible inoculum source of grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 50, S176–S190.
- Crespo, M., Moral, J., Michailides, T.J., Trouillas, F.P., 2018. First report of black rot on apple fruit caused by *Diplodia seriata* in California. *Plant Disease* 102, 824. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1023-PDN>
- CROWDY, S.H., 1949. OBSERVATIONS ON APPLE CANKER III. THE ANATOMY OF THE STEM CANKER. *Annals of Applied Biology* 36, 483–495. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1949.tb06944.x>
- Dafny-Yelin, M., Mairesse, O., Moy, J., Dor, S., Malkinson, D., 2018. Genetic diversity and infection sources of *Rosellinia necatrix* in northern Israel. *Phytopathologia Mediterranea* 57, 37–47. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-22478
- Darge, W.A., Woldemariam, S.S., 2021. Botryosphaeria tree fungal pathogens and their diversity. *International Journal of Phytopathology* 10, 49–56. <https://doi.org/10.33687/phytopath.010.01.3447>
- de Silva, N.I., Phillips, A.J.L., Liu, J.-K., Lumyong, S., Hyde, K.D., 2019. Phylogeny and morphology of *Lasioidiplodia* species associated with *Magnolia* forest plants. *Sci Rep* 9, 14355. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50804-x>
- Delgado-Cerrone, L., Mondino-Hintz, P., Alaniz-Ferro, S., 2016. Botryosphaeriaceae species associated with stem canker, die-back and fruit rot on apple in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology* 146, 637–655. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0949-z>
- Desvani, S.D., Lestari, I.B., Wibowo, H.R., Supyani, Poromarto, S.H., Hadiwiyono, 2018. Morphological characteristics and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from some rice production areas in some districts of Central Java. Presented at the Proceedings of

the 17th International Conference on Ion Sources, Geneva, Switzerland, p. 020068.
<https://doi.org/10.1063/1.5054472>

Díaz, G., Mostert, L., Halleen, F., Lolas-Caneo, M., Gutierrez, M., Ferrada, E., Latorre, B., 2018. *Diplodia seriata* Associated with *Botryosphaeria* Canker and Dieback in Apple Trees in Chile. *Plant Disease* 103. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1785-PDN>

Dong, B.-Z., Zhu, X.-Q., Fan, J., Guo, L.-Y., 2021. The cutinase Bdo_10846 play an important role in the virulence of *botryosphaeria dothidea* and in inducing the wart symptom on apple plant. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 1–18.
<https://doi.org/10.3390/ijms22041910>

Dong, Bao-Zhu, Zhu, X.-Q., Fan, J., Guo, L.-Y., 2021. The Cutinase Bdo_10846 Play an Important Role in the Virulence of *Botryosphaeria dothidea* and in Inducing the Wart Symptom on Apple Plant. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 1910.
<https://doi.org/10.3390/ijms22041910>

Elena, G., Groenenboom-de Haas, B.H., Houwers, I., de Lange, E., Schnabel, S.K., Köhl, J., 2022. Systematic stepwise screening of new microbial antagonists for biological control of European canker. *Biological Control* 174, 105009.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105009>

Freeman, S., Szejnberg, A., Shabi, E., Katan, J., 1990. Long-term effect of soil solarization for the control of *Rosellinia necatrix* in apple. *Crop Protection* 9, 312–316.
[https://doi.org/10.1016/0261-2194\(90\)90110-S](https://doi.org/10.1016/0261-2194(90)90110-S)

Funk, A., 1985. *Botryosphaeria pseudotsugae*; association with a canker of douglas-fir and observations on its morphology. *Canadian Journal of Plant Pathology* 7, 355–358.
<https://doi.org/10.1080/07060668509501661>

Gelain, J., Hamada, N.A., De Mio, L.L.M., 2022. Survival of pathogens after dormancy in apple tree twigs indicates potential risk as source of inoculum. *Acta Scientiarum - Agronomy* 44. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v44i1.53816>

Gelain, J., Hamada, N.A., De Mio, L.L.M., 2022. Survival of pathogens after dormancy in apple tree twigs indicates potential risk as source of inoculum. *Acta Scientiarum - Agronomy* 44. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v44i1.53816>

- Ghaderi, F., Habibi, A., 2021. Morphological and molecular characterization of *Phytophthora* species associated with root and crown rot of pomegranate in Iran. *Plant Pathol* 70, 615–629. <https://doi.org/10.1111/ppa.13320>
- Ghasemkhani, M., Holefors, A., Marttila, S., Dalman, K., Zborowska, A., Rur, M., Rees-George, J., Nybom, H., Everett, K.R., Scheper, R.W.A., Garkava-Gustavsson, L., 2016. Real-time PCR for detection and quantification, and histological characterization of *Neovectria ditissima* in apple trees. *Trees - Structure and Function* 30, 1111–1125. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1350-9>
- Golafrouz, H., Safaie, N., Khelghatibana, F., 2020. The reaction of some apple rootstocks to biocontrol of white root rot *rosellinia necatrix* by *trichoderma harzianum* in greenhouse. *Journal of Crop Protection* 9, 577–589.
- Gonthier, P., Nicolotti, G., 2013. *Infectious Forest Diseases*. CABI.
- Griffiths, S.M., Galambao, M., Rowntree, J., Goodhead, I., Hall, J., O'Brien, D., Atkinson, N., Antwis, R.E., 2020. Complex associations between cross-kingdom microbial endophytes and host genotype in ash dieback disease dynamics. *Journal of Ecology* 108, 291–309. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13302>
- Grinbergs, D., Chilian, J., France, A., 2021. First Report of *Eutypa lata* Causing Cankers and Dieback in Sweet Cherry in Chile. *Plant Disease* 105. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-21-0240-PDN>
- Han, Q., Gao, X., Wang, J., Wang, H., Huang, L., 2016. Cytological and histological studies of the interaction between *Botryosphaeria dothidea* and apple twigs. *Scientia Horticulturae* 202, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.002>
- Hanifeh, S., Zafari, D., Soleimani, M.J., 2017. Reaction of some apple cultivars to *Diplodia bulgarica* in Iran. *Mycosphere* 8, 1253–1260. <https://doi.org/10.5943/MYCOSPHERE/8/2/9>
- Harris, D.C., Xu, X.-M., 2003. Conditions for infection of apple by *Phytophthora syringae*. *Journal of Phytopathology* 151, 190–194. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00704.x>
- Harteveld, D.O.C., Akinsanmi, O.A., Chandra, K., Drenth, A., 2014a. Timing of infection and development of alternaria diseases in the canopy of apple trees. *Plant Disease* 98, 401–408. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0676-RE>

- Hartevelde, D.O.C., Akinsanmi, O.A., Dullahide, S., Drenth, A., 2014b. Sources and seasonal dynamics of *Alternaria* inoculum associated with leaf blotch and fruit spot of apples. *Crop Protection* 59, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.01.011>
- Hartevelde, D.O.C., Pham, K.T.K., Wenneker, M., 2020. Confirmation of Black Rot on Different Apple Cultivars Caused by *Diplodia seriata* in the Netherlands. *Plant Disease* 104, 1540–1540. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2103-PDN>
- Havenga, M., Gatsi, G.M., Halleen, F., Spies, C.F.J., van der Merwe, R., Mostert, L., 2019. Canker and Wood Rot Pathogens Present in Young Apple Trees and Propagation Material in the Western Cape of South Africa. *Plant Disease* 103, 3129–3141. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0867-RE>
- Havenga, M., Gatsi, G.M., Halleen, F., Spies, C.F.J., van der Merwe, R., Mostert, L., 2019a. Canker and Wood Rot Pathogens Present in Young Apple Trees and Propagation Material in the Western Cape of South Africa. *Plant Disease* 103, 3129–3141. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0867-RE>
- Havenga, M., Gatsi, G.M., Halleen, F., Spies, C.F.J., van der Merwe, R., Mostert, L., 2019b. Canker and Wood Rot Pathogens Present in Young Apple Trees and Propagation Material in the Western Cape of South Africa. *Plant Disease* 103, 3129–3141. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0867-RE>
- Holland, L.A., Travadon, R., Lawrence, D.P., Nouri, M.T., Trouillas, F., 2021. Evaluation of Pruning Wound Protection Products for the Management of Almond Canker Diseases in California. *Plant Disease* 105, 3368–3375. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2371-RE>
- Honger, J., 2018. THE AETIOLOGY, INCIDENCE AND SEVERITY OF MANGO TREE DECLINE DISEASE IN GHANA. *Ghana Journal of Science* 58, 13–22.
- Jiang, J., Song, Z., Yang, X., Mao, Z., Nie, X., Guo, H., Peng, X., 2017. Microbial community analysis of apple rhizosphere around Bohai Gulf. *Scientific Reports* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08398-9>
- Karajeh, M.R., Owais, S.J., 2012. Reaction of selected apple cultivars to wilt pathogen: *Verticillium dahliae*. *Plant Protection Science* 48, 99–104. <https://doi.org/10.17221/61/2011-pps>

- Ke, X., Huang, L., Han, Q., Gao, X., Kang, Z., 2013. Histological and cytological investigations of the infection and colonization of apple bark by *Valsa mali* var. *mali*. *Australasian Plant Pathol.* 42, 85–93. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0158-y>
- Kim, K.W., Park, E.W., Kim, Y.H., Ahn, K.-K., Kim, P.G., Kim, K.S., 2001. Latency- and Defense-Related Ultrastructural Characteristics of Apple Fruit Tissues Infected with *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology®* 91, 165–172. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.2.165>
- Köhl, J., Scheer, C., Holb, I.J., Masny, S., Molhoek, W., 2015. Toward an Integrated Use of Biological Control by *Cladosporium cladosporioides* H39 in Apple Scab (*Venturia inaequalis*) Management. *Plant Disease* 99, 535–543. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-14-0836-RE>
- Król, E.D., Abramczyk, B.A., Zalewska, E.D., Zimowska, B., 2017. FUNGI INHABITING FRUIT TREE SHOOTS WITH SPECIAL REFERENCE TO THE DIAPORTHE (PHOMOPSIS) GENUS. *Acta sci. Pol. Hortorum Cultus* 16, 113–126. <https://doi.org/10.24326/asphc.2017.4.12>
- Latorre, B.A., Rioja, M.E., Lillo, C., Muñoz, M., 2002. The effect of temperature and wetness duration on infection and a warning system for European canker (*Nectria galligena*) of apple in Chile. *Crop Protection* 21, 285–291. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00099-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00099-0)
- Lódolo, X.V., Lutz, M.C., Mondino, P., Ousset, J., Sosa, M.C., 2022. First Report of *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila*, and *Dothiorella omnivora* Associated with Apple Cankers and Dieback in Rio Negro, Argentina. *Plant Disease* 106. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-1025-PDN>
- Lowman, M., n.d. THE DIEBACK CRISIS - TREE DECLINES THROUGHOUT THE WORLD 4.
- Luna, I.J., Doll, D., Ashworth, V.E.T.M., Trouillas, F.P., Rolshausen, P.E., 2022. Comparative Profiling of Wood Canker Pathogens from Spore Traps and Symptomatic Plant Samples within California Almond and Walnut Orchards. *Plant Disease* 106, 2182–2190. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-1057-RE>
- Ma, Q., Ju, M., Liu, Q., Zhang, L., Li, Z., Sun, P., 2020. Identification of the pathogenic fungi associated with apple valsa canker in Inner Mongolia, China. *Journal of Fruit Science* 37, 714–722. <https://doi.org/10.13925/j.cnki.gsxb.20190474>

- Mang, S.M., Marcone, C., Maxim, A., Camele, I., 2022. Investigations on Fungi Isolated from Apple Trees with Die-Back Symptoms from Basilicata Region (Southern Italy). *Plants* 11, 1374. <https://doi.org/10.3390/plants11101374>
- Marek, S.M., Yaghmour, M.A., Bostock, R.M., 2013. *Fusarium* spp., *cylindrocarpon* spp., and environmental stress in the etiology of a canker disease of cold-stored fruit and nut tree seedlings in California. *Plant Disease* 97, 259–270. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0355-RE>
- Marsberg, A., Kemler, M., Jami, F., Nagel, J.H., Postma-Smidt, A., Naidoo, S., Wingfield, M.J., Crous, P.W., Spatafora, J.W., Hesse, C.N., Robbertse, B., Slippers, B., 2017. *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Molecular Plant Pathology* 18, 477–488. <https://doi.org/10.1111/mpp.12495>
- Martins, M.V.V., Lima, J.S., Hawerth, F.J., Ootani, M.A., Araujo, F.S.A., Cardoso, J.E., Serrano, L.A.L., Viana, F.M.P., 2018. First report of *Lasiodiplodia brasiliense* causing disease in apple trees in Brazil. *Plant Disease* 102, 1027. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-17-1781-PDN>
- Maryani, N., Lombard, L., Poerba, Y.S., Subandiyah, S., Crous, P.W., Kema, G.H.J., 2019. Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in Mycology* 92, 155–194. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.003>
- Masood, A., Saeed, S., Da Silveira, S., Akem, C., Labar, N., Farooq, M., 2011. Quick decline of mango in Pakistan: Survey and pathogenicity of fungi isolated from mango tree and bark beetle. *Pakistan Journal of Botany* 43.
- Mathioudakis, M.M., Tziros, G.T., Kavroulakis, N., 2020. First Report of *Diaporthe foeniculina* Associated with Branch Canker of Avocado in Greece. *Plant Disease* 104, 3057. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-20-0900-PDN>
- Mihaescu, C., Dunea, D., Băşa, A.G., Frasin, L.N., 2021. Characteristics of *Phomopsis juglandina* (Sacc.) Hohn. Associated with Dieback of Walnut in the Climatic Conditions of Southern Romania. *Agronomy* 11, 46. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010046>
- Muñoz-Adalia, E.J., Colinas, C., 2021. Susceptibility of cork oak (*Quercus suber*) to canker disease caused by *Diplodia corticola*: when time is of the essence. *New Forests* 52, 863–873. <https://doi.org/10.1007/s11056-020-09829-8>

- Nabi, S.U., Sheikh, M.A., Raja, W.H., Mir, J.I., Chand Sharma, O., Singh, D.B., Yousuf, N., Shafi, M., Khan, K.A., Yadav, M.K., Kamil, D., 2020. Morphological and molecular characterization of *Diplodia* spp. associated with apple canker disease in India. *Crop Protection* 137, 105238. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105238>
- Nian, L., Xie, Y., Zhang, H., Wang, M., Yuan, B., Cheng, S., Cao, C., 2023. *Vishniacozyma victoricae*: An endophytic antagonist yeast of kiwifruit with biocontrol effect to *Botrytis cinerea*. *Food Chemistry* 411. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135442>
- Nourian, A., Salehi, M., Safaie, N., Khelghatibana, F., Abdollahzadeh, J., 2021. Fungal canker agents in apple production hubs of Iran. *Scientific Reports* 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02245-8>
- Nourian, A., Salehi, M., Safaie, N., Khelghatibana, F., Abdollahzadeh, J., 2021. Fungal canker agents in apple production hubs of Iran. *Scientific Reports* 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02245-8>
- Nyoni, M., Mazzola, M., Wessels, J.P.B., McLeod, A., 2021. Phosphonate treatment effects on *Phytophthora* root rot control, phosphite residues and *Phytophthora cactorum* inoculum in young apple orchards. *Plant Disease* 105. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0067-RE>
- Olivieri, L., Saville, R.J., Gange, A.C., Xu, X., 2021. Limited asymptomatic colonization of apple tree shoots by *Neonectria ditissima* following infection of leaf scars and pruning wounds. *Plant Pathology* 70, 1838–1849. <https://doi.org/10.1111/ppa.13419>
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., 2013. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology, Plant pathogenic and endophytic known from culture* 76, 51–167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Pennycook, S.R., Johnston, P.R., Ramaley, A., Akulov, A., Crous, P.W., 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the *Botryosphaeriaceae*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 21, 29–55. <https://doi.org/10.3767/003158508X340742>
- Phillips, A.J.L., Lopes, J., Abdollahzadeh, J., Bobev, S., Alves, A., 2012. Resolving the *Diplodia* complex on apple and other Rosaceae hosts. *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 29, 29. <https://doi.org/10.3767/003158512X658899>

- Rashid, A., Naffaa, W., 2017a. Fungal pathogens associated with crown and collar rot of apple trees in southern Syria. *Acta Agriculturae Slovenica* 109, 103–109. <https://doi.org/10.14720/aas.2017.109.1.10>
- Rashid, A., Naffaa, W., 2017b. Fungal pathogens associated with crown and collar rot of apple trees in southern Syria. *Acta Agriculturae Slovenica* 109, 103–109. <https://doi.org/10.14720/aas.2017.109.1.10>
- Rayachhetry, M.B., Blakeslee, G.M., Webb, R.S., Kimbrough, J.W., 1996. Characteristics of the *Fusicoccum* anamorph of *Botryosphaeria ribis*, a potential biological control agent for *Melaleuca quinquenervia* in South Florida. *Mycologia* 88, 239–248. <https://doi.org/10.2307/3760928>
- Raziq, F., Fox, R.T.V., 2006. The integrated control of *armillaria mellea* 2. field experiments. *Biological Agriculture and Horticulture* 23, 235–249. <https://doi.org/10.1080/01448765.2006.9755326>
- Ricks, K.D., Koide, R.T., 2019. The role of inoculum dispersal and plant species identity in the assembly of leaf endophytic fungal communities. *PLOS ONE* 14, e0219832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219832>
- Rooney-Latham, S., Soriano, M.C., 2016. First report of *neofusicoccum nonquaesitum* causing branch dieback of apple in California. *Plant Disease* 100, 1012. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0951-PDN>
- Rossmann, A.Y., Farr, D.F., Castlebury, L.A., 2007. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience* 48, 135–144. <https://doi.org/10.1007/s10267-007-0347-7>
- Rumbos, I.C., 1988. *Cytospora oleina* causing canker and dieback of olive in Greece. *Plant Pathology* 37, 441–444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1988.tb02098.x>
- Safari Motlagh, M.R., Jahangiri, B., Kulus, D., Tymoszyk, A., Kaviani, B., 2022. Endophytic Fungi as Potential Biocontrol Agents against *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, the Causal Agent of Rice Sheath Blight Disease. *Biology* 11, 1282. <https://doi.org/10.3390/biology11091282>
- Saif, F.A., Yaseen, S.A., Alameen, A.S., Mane, S.B., Undre, P.B., 2020. Identification of *Penicillium* Species of Fruits Using Morphology and Spectroscopic Methods. *J. Phys.: Conf. Ser.* 1644, 012019. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1644/1/012019>

- Salvatore, M.M., Alves, A., Andolfi, A., 2021. Secondary metabolites produced by *neofusicoccum* species associated with plants: A review. *Agriculture (Switzerland)* 11, 1–17. <https://doi.org/10.3390/agriculture11020149>
- Sessa, L., Abreo, E., Bettucci, L., Lupo, S., 2016. *Botryosphaeriaceae* species associated with wood diseases of stone and pome fruits trees: symptoms and virulence across different hosts in Uruguay. *Eur J Plant Pathol* 146, 519–530. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0936-4>
- Slippers, B., Wingfield, M.J., 2007. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews, Fungal Endophytes* 21, 90–106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Smith, D.R., Michailides, T.J., Stanosz, G.R., 2001. Differentiation of a *Fusicoccum* sp. causing panicle and shoot blight on California pistachio trees from *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 85, 1235–1240. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.12.1235>
- Smith, H., Kemp, G.H.J., Wingfield, M.J., 1994. Canker and die-back of *Eucalyptus* in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Pathology* 43, 1031–1034. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1994.tb01653.x>
- Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden, Funck Jensen, D., Dubey, M., Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden, Jensen, B., University of Copenhagen, Denmark, Karlsson, M., Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden, 2021. *Clonostachys rosea* to control plant diseases, in: Wageningen University & Research, The Netherlands, Köhl, J. (Eds.), *Burleigh Dodds Series in Agricultural Science*. Burleigh Dodds Science Publishing, pp. 429–472. <https://doi.org/10.19103/AS.2021.0093.14>
- Tennakoon, D.S., Phillips, A.J.L., Phookamsak, R., Ariyawansa, H.A., Bahkali, A.H., Hyde, K.D., 2016. Sexual morph of *Lasioidiplodia pseudotheobromae* (*Botryosphaeriaceae*, *Botryosphaeriales*, *Dothideomycetes*) from China. *Mycosphere* 7, 990–1000. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/1b/11>
- Thomidis, T., Exadaktylou, E., 2012. Effectiveness of cyproconazole to control *Armillaria* root rot of apple, walnut and kiwifruit. *Crop Protection* 36, 49–51. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.003>
- Thomidis, T., Michailides, T.J., 2009. Studies on *Diaporthe eres* as a New Pathogen of Peach Trees in Greece. *Plant Disease* 93, 1293–1297. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-12-1293>

- Thomidis, T., Tsipouridis, C., Cullum, J., 2002. Pathogenicity and relative virulence of 11 Greek *Phytophthora* species on apple and pear rootstocks. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 30, 261–264. <https://doi.org/10.1080/01140671.2002.9514222>
- Trouillas, F.P., Gubler, W.D., 2010. Host range, biological variation, and phylogenetic diversity of *Eutypa lata* in California. *Phytopathology* 100, 1048–1056. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-10-0040>
- Truszkowska, W., 1963. Preliminary observations on the beech mycoflora. *Monographiae Botanicae* 15, 413–421. <https://doi.org/10.5586/MB.1963.012>
- Tsopelas, P., 1999. Distribution and ecology of *Armillaria* species in Greece. *European Journal of Forest Pathology* 29, 103–116. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.1999.00139.x>
- Tsopelas, P., Angelopoulos, A., 2004. First report of canker stain disease of plane trees, caused by *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* in Greece. *Plant Pathology* 53, 531–531. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01021.x>
- Tsopelas, P., Tjamos, E.C., 1997. Occurrence and pathogenicity of *Armillaria tabescens* on almond in Greece 1. *EPPO Bulletin* 27, 455–461. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1997.tb00665.x>
- Vero, S., Garmendia, G., Garat, M.F., De Aurrecoechea, I., Wisniewski, M., 2011. *Cystofilobasidium infirmominiatum* as a biocontrol agent of postharvest diseases on apples and citrus. *Acta Horticulturae* 905, 169–180. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.905.18>
- Visagie, C.M., Seifert, K.A., Houbraken, J., Samson, R.A., Jacobs, K., 2016. A phylogenetic revision of *Penicillium* sect. *Exilicaulis*, including nine new species from fynbos in South Africa. *IMA Fungus* 7, 75–117. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2016.07.01.06>
- Vorster, L., Butler, R.C., Turner, L., Patrick, E., Campbell, R.E., Orchard, S., Walter, M., 2021. The effect of nitrogen source and quantity on disease expression of *Neonectria ditissima* in apple †. *New Zealand Plant Protection* 74, S20–S33. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2021.74.11748>
- Wang, X., Shi, C.-M., Gleason, M.L., Huang, L., 2020. Fungal species associated with apple *Valsa* canker in East Asia. *Phytopathology Research* 2. <https://doi.org/10.1186/s42483-020-00076-5>

- Wang, X., Zang, R., Yin, Z., Kang, Z., Huang, L., 2014. Delimiting cryptic pathogen species causing apple Valsa canker with multilocus data. *Ecology and Evolution* 4, 1369–1380. <https://doi.org/10.1002/ece3.1030>
- Wenneker, M., de Jong, P.F., Joosten, N.N., Goedhart, P.W., Thomma, B.P.H.J., 2017. Development of a method for detection of latent European fruit tree canker (*Neonectria ditissima*) infections in apple and pear nurseries. *Eur J Plant Pathol* 148, 631–635. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1115-3>
- Wunderlich, N., Costa, S.S., Tpoi, R.P., Ash, G.J., 2012. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing shoot blight and cankers of pistachio in Australia. *Australasian Plant Dis. Notes* 7, 47–49. <https://doi.org/10.1007/s13314-012-0045-y>
- Xu, X.-M., Butt, D.J., Ridout, M.S., 1998. The effects of inoculum dose, duration of wet period, temperature and wound age on infection by *Nectria galligena* of pruning wounds on apple. *European Journal of Plant Pathology* 104, 511–519. <https://doi.org/10.1023/A:1008689406350>
- Xue, D., Meng, L., Li, G., Li, B., Wang, C., 2019. First Report of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* Causing Canker and Shoot Dieback on Apple in China. *Plant Disease* 103. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0182-PDN>
- Xue, D.-S., Liu, J., Li, B.-H., Xu, X. -m., Liu, N., Lian, S., Dong, X.-L., Wang, C.-X., 2021. Effect of rainfall and temperature on perithecium production of *botryosphaeria dothidea* on cankered apple branches. *Phytopathology* 111, 982–989. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0262-R>
- Yirgu, A., Gezahgne, A., Alemu, T., Havenga, M., Mostert, L., 2021. First report of *Didymosphaeria rubi-ulmifolii* associated with canker and dieback of apple trees in southern Ethiopia. *Phytopathol. Mediterr.* 60, 229–236. <https://doi.org/10.36253/phyto-12400>
- Zeng, Z.-Q., Zhuang, W.-Y., 2015. A new species of *Nectria* (Nectriaceae, Hypocreales) with multiseptate ascospores. *Nova Hedwigia* 101, 327–334. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2015/0273
- Zhang, C.Q., Xu, B.C., 2011. First Report of Canker on Pecan (*Carya cathayensis*) Caused by *Botryosphaeria dothidea* in China. *Plant Disease* 95, 1319–1319. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0457>

Zlatkovic, M., Keca, N., Wingfield, M., Jami, F., Slippers, B., 2016. Botryosphaeriaceae associated with the die-back of ornamental trees in the Western Balkans. *Antonie van Leeuwenhoek* 109, 543–564. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0659-8>