

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Γεωπονικών Επιστημών
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**<<Φυτοπαθολογική και μοριακή μελέτη της αναπαραγωγής
ασκομυκήτων σε υπολείμματα της καλλιέργειας του σίτου>>**

ΤΣΑΓΚΛΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

(Α.Μ.:02385)

Επιβλέπων Καθηγητής

Βαγγέλας Ιωάννης

Αναπληρωτής Καθηγητής Φυτοπαθολογίας

Βόλος , 2025

**<<Φυτοπαθολογική και μοριακή μελέτη της αναπαραγωγής
ασκομυκήτων σε υπολείμματα της καλλιέργειας του σίτου.>>**

**<<Phytopathological and molecular study of ascomycetes reproduction
in wheat crop residues.>>**

Τριμελή Επιτροπή:

Ιωάννη Βαγγέλα, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυτοπαθολογίας

Παναγιώτη Μαδέση, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Χρήστο Καβαλάρη, Μέλος Ε.ΔΙ.Π., Γεωργικής Μηχανολογίας

Volos, 2025

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1. Η ΚΑΛΜΙΕΡΓΕΙΑ ΣΙΤΟΥ.....	10
1.1.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	10
1.1.2. ΤΟ ΣΚΛΗΡΟ ΣΙΤΑΡΙ	11
1.1.3. ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ	12
1.1.4. ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ	14
1.2. Ο ΜΥΚΗΤΑΣ <i>ZYMOSEPTORIA TRICITI</i>	14
1.2.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	14
1.2.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ	15
1.2.3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ/ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ	19
1.3. Ο ΜΥΚΗΤΑΣ <i>PYRENOPHORA TRICITI-REPENTIS</i>	22
1.3.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	22
1.3.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ	24
1.3.3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ/ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ	25
1.4. ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΑΡΞΗΣ ΚΑΡΠΟΦΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ <i>ZYMOSEPTORIA TRITICI</i> ΚΑΙ <i>PYRENOPHORA TRITICI- REPENTIS</i>	29
2. ΥΛΙΚΑ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	41
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	Error! Bookmark not defined.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 : MasterMix που χρησιμοποιήθηκε για την διαδικασία της PCR..	39
Πίνακας 2: Περιγραφική στατιστική για τον αριθμό καρποφοριών (Περιθήκια) ανά εκατοστό(cm) του καλαμιού σκληρού σίτου. Για κάθε τμήμα(1cm) παρουσιάζονται τα εξής: ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση, το σφάλμα του μέσου, καθώς και οι ελάχιστες και μέγιστες τιμές.	45
Πίνακας 3: Περιγραφική στατιστική για τον αριθμό Περιθηκίων ανά τμήμα του καλαμιού (segments 1-14cm).....	46
Πίνακας 4: Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον αριθμό Περιθηκίων κατά μήκος του καλαμιού..	47

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα για τον αριθμό Περιθηκίων ανά τμήμα(cm) (segment) του καλαμιού. Οι τιμές αντιστοιχούν σε σημεία παρατήρησης κατά μήκος του καλαμιού, από τη από την βάση του λαιμού προς τα πάνω	48
--	----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Οι μεγαλύτερες χώρες-παραγωγοί σκληρού σίτου παγκοσμίως από το 2016 έως το 2024 (Statista, 2024).....	12
Εικόνα 2: Μεγαλύτεροι καταναλωτές σίτου 2023/24 (Shahbandeh, 2024)	13
Εικόνα 3: Συμπτώματα της Σεπτορίωσης οφειλόμενη στο παθογόνο (<i>Zymoseptoria tritici blotch (STB)</i> ή <i>Z. tritici</i> στο σιτάρι, Παρατηρούμε την αγενή αναπαραγωγή του μυκητα(προκαλεί τις δευτερογενείς μολύνσεις) : πυκνίδια που έχουν σχηματιστεί μέσα στις νεκρωτικές κηλίδες των φύλλων του σίτου . (Τζάμος, 2007).....	15
Εικόνα 4: Μορφές ανάπτυξης του <i>Z. Tritici</i> : (A) Πυκνιδιοσπόρια, (B) Μυκηλιακές υφές του <i>Z. tritici</i> , (C) Μικροπυκνίδια (Steinberg, 2015).....	16
Εικόνα 5: Πυκνίδιο στο <i>Z. tritici</i> (Steinberg, 2015).....	17
Εικόνα 6: Βιολογικός κύκλος <i>Z. tritici</i> (Ponomarenko et al., 2011).....	17
Εικόνα 7: προσβολή σίτου από <i>Pyrenophora tritici-repentis (Ptr)</i> (Roman Ramos et al., 2023).....	23
Εικόνα 8: Η εμφάνιση σεταίων μετά από την προσβολή με το μύκητα <i>P. tritici-repentis</i> (Βαγγέλας,εργαστήριο φυτοπαθολογίαςΠ.Θ).....	24
Εικόνα 9: Βιολογικός κύκλος του μύκητα <i>pyrenophora tritici-repentis</i> (Abdullah, 2017).....	25
Εικόνα 10: Χάρτες που επικαλύπτουν την παγκόσμια παραγωγή σιταριού και τη συχνότητα εμφάνισης του <i>P. tritici-repentis</i> . (Ciufetti et al., 2014)	27
Εικόνα 11: Καλάμια σκληρού σιταριού από τα οποία πάρθηκε δείγμα για την παρατήρηση των περιθηκίων.(Βαγγέλας,εργαστήριο φυτοπαθολογίας Π.Θ).....	36
Εικόνα 12: Οπτικό μικροσκοπιο και εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία παρατήρησης των καλαμιών σίτου. Διακρίνεται στερεοσκοπικό μικροσκόπιο, καυστήρας αερίου για αποστείρωση εργαλείων, δίσκος με θρεπτικό υπόστρωμα και εργαλεία όπως νυστέρι, λαβίδες και βελόνες παρασκευής.....	Er
ror! Bookmark not defined.	

Εικόνα 13: κηλίδες (*tan spots*) στα φύλλα των προσβεβλημένων φυτών *Ptr.*

..... **Error! Bookmark not defined.**

Εικόνα 14: Δείγματα καλαμιού σκληρού σίτου (*Triticum durum*) με εμφανείς ζώνες νέκρωσης και αλλοιώσεων, πιθανώς λόγω προσβολής από μύκητες του γένους *Zymoseptoria* ή *Pyrenophora*. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από προσβεβλημένα φυτά και χρησιμοποιήθηκαν για μικροσκοπική καταμέτρηση καρποφοριών κατά μήκος του στελέχους. Η τοποθέτηση χάρακα χρησιμοποιήθηκε για την ομοιόμορφη διαίρεση των δειγμάτων σε 10 ισαπέχοντα (ανά cm) τμήματα (segments).....37

Εικόνα 15: Καλάμι σιταριού μετρημένο σε εκατοστά για τον ακριβή καθορισμό των τμημάτων (segments) προς μικροσκοπική παρατήρηση. Κάθε καλάμι χωρίστηκε σε 10 ίσα μέρη από τη βάση (λαιμός) ως την κορυφή, με στόχο την αξιολόγηση της χωρικής κατανομής των καρποφοριών.37

Εικόνα 16: Αφαίρεση καρποφοριών (περιθηκίων) με την χρήση νυχτερινού προκειμένου να γίνει ανάπτυξη και παρατήρηση του παθογόνου σε τριβλίο..**Error! Bookmark not defined.**

Εικόνα 17: Στιγμιότυπο από τοποθέτηση δείγματος σε τρυβλίο *Petri*. Το νυστέρι χρησιμοποιείται για να μεταφερθεί μικρό τεμάχιο από το καλάμι στον θρεπτικό παράγοντα, στο πλαίσιο προκαταρκτικής εργαστηριακής παρατήρησης ή καλλιέργειας.....**Er**

ror! Bookmark not defined.

Εικόνα 18: Περιθήκια πάνω στο καλάμι του σιταριού όπως παρατηρήθηκαν με την χρήση στερεοσκοπίου, με σκοπό την αναγνώριση-διάκριση του παθογόνου μύκητα (Βαγγέλας, εργαστήριο φυτοπαθολογίας Π.Θ.....41

Εικόνα 19: Παρατήρηση δείγματος καλαμιού σκληρού σίτου με χρήση ψηφιακού μικροσκοπίου USB, συνδεδεμένου με υπολογιστή. Η εικόνα του δείγματος προβάλλεται σε πραγματικό χρόνο στην οθόνη και καταγράφεται για σκοπούς καταμέτρησης των καρποφοριών κατά μήκος του στελέχους.....41

Εικόνα 20: Μικροσκοπική εικόνα από οπτικό φακό, όπου διακρίνεται καρποφορία μύκητα(περιθήκιο) πάνω σε καλάμι σκληρού σίτου. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε μέσω στερεοσκοπίου, με στόχο την καταμέτρηση του αριθμού των περιθηκίων κατά μήκος του καλαμιού.41

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην μακροσκοπική , μικροσκοπική καταγραφή και την μοριακή ανάλυση καρποφοριών και συγκεκριμένα της εγγενούς αναπαραγωγής (περιθήκια) των 2 παθογόνων (*Zymoseptoria tritici* και *Pyrenophora tritici-repentis*) ώστε να διαπιστωθεί ποιο από τα 2 ή και τα 2 παθογόνα έχουν προσβάλει το καλάμι του σκληρού σίτου (*Triticum durum*) που εξετάσαμε. Η έρευνα βασίστηκε στη καταγραφή των καρποφοριών σε δεκατέσσερα προκαθορισμένα τμήματα του καλαμιού, προκειμένου να εντοπιστεί ποιο από τα 2 παθογόνα έχει προσβάλει το σιτηρό.

Τα αποτελέσματα ανέδειξαν την ύπαρξη του παθογόνου *pyrenophora tritici-repentis*. Η ανάλυση διακύμανσης επιβεβαίωσε τη στατιστική σημαντικότητα του παραπάνω αποτελέσματος,.

Η εργασία αναδεικνύει τη σημασία της καταγραφής των καρποφοριών και μοριακής ανάλυσης αυτών στα φυτοπαθογόνα, καθώς και την αναγκαιότητα εφαρμογής στοχευμένων γεωργικών παρεμβάσεων. Παρά τους περιορισμούς που αφορούν την ταυτόχρονη μελέτη δύο παθογόνων και την απουσία περιβαλλοντικών μεταβλητών, τα αποτελέσματα προσφέρουν αξιόλογη βάση για περαιτέρω έρευνα. Ιδιαίτερη σημασία αποδίδεται στη δυνατότητα χρήσης της χαρτογράφησης των καρποφοριών ως διαγνωστικού εργαλείου πρώιμης ανίχνευσης μόλυνσης και βελτιστοποίησης των φυτοπροστατευτικών πρακτικών.

ABSTRACT

This study focused on the macroscopic and microscopic recording, as well as the molecular analysis, of fruiting bodies specifically the endogenous reproductive structures (perithecia) of two pathogens (*Zymoseptoria tritici* and *Pyrenophora tritici-repentis*) in order to determine which of the two, or possibly both, had infected the stem of durum wheat (*Triticum durum*) under examination. The research was based on the documentation of fruiting bodies across fourteen predefined segments of the stem, aiming to identify the presence and distribution of the pathogens.

The results revealed the presence of the pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. Analysis of variance confirmed the statistical significance of this finding.

This study highlights the importance of documenting fruiting bodies and conducting molecular analysis in phytopathology, as well as the need for targeted agricultural interventions. Despite limitations, such as the simultaneous study of two pathogens and the absence of environmental variables, the findings provide a valuable foundation for further research. Particular emphasis is placed on the potential use of fruiting body mapping as a diagnostic tool for early infection detection and the optimization of crop protection practices.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΙΤΟΥ

1.1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Το σιτάρι αναφέρεται σε οποιοδήποτε δημητριακό του γένους *Triticum* της οικογένειας (*Poaceae*). Το σιτάρι είναι μια από τις παλαιότερες και πιο σημαντικές καλλιέργειες δημητριακών. Από τις χιλιάδες γνωστές ποικιλίες, η πιο σημαντική είναι το μαλακό σιτάρι (*Triticum aestivum*), που χρησιμοποιείται για την παρασκευή ψωμιού, ενώ το σκληρό σιτάρι (*T. durum*), που χρησιμοποιείται σε ζυμαρικά όπως τα μακαρόνια. Επιπλέον, μέρος του σίτου χρησιμοποιείται επίσης βιομηχανικά για την παραγωγή αμύλου, πάστας, βύνης, γλυκόζης, γλουτένης, αλκοόλης και άλλων προϊόντων (Britannica, 2024).

Η καλλιέργεια του σιταριού έχει μακρά ιστορία. Το σιτάρι ήταν μια από τις πρώτες καλλιέργειες του ανθρώπου και αποτελεί βασικό διατροφικό συστατικό των πολιτισμών της Ευρώπης, της Δυτικής Ασίας και της Βόρειας Αφρικής εδώ και περίπου 8.000 χρόνια. Σήμερα, το σιτάρι καλλιεργείται σε περισσότερες εκτάσεις στρεμμάτων από οποιαδήποτε άλλη καλλιέργεια και παραμένει η σημαντικότερη πηγή τροφής της ανθρωπότητας. (Curtis et al., 2002).

Αν και καλλιεργείται με μεγάλη επιτυχία μεταξύ 30° έως 55° γεωγραφικού πλάτους τόσο στο βόρειο όσο και στο νότιο ημισφαίριο. Η πιο παραγωγική ζώνη είναι μεταξύ 35° και 45° Βόρειου Γεωγραφικού πλάτους (π.χ. Βόρεια Μεσόγειος, Ουκρανία, Κεντρικές ΗΠΑ, Βόρεια Κίνα). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης κατά το Βλαστικό Στάδιο (σπορά - φύτευση): είναι 20°C - 25°C, με τις ελάχιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης να είναι 4°C έως 5°C ενώ θερμοκρασίες άνω των 30°C κατά την άνθηση και γέμισμα του κόκκου μειώνουν σημαντικά την απόδοση. (Curtis et al., 2002).

Το σιτάρι προσαρμόζεται σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών υγρασίας από τις ξηρές έως τις παράκτιες περιοχές. Περίπου τα τρία τέταρτα των περιοχών καλλιέργειας σίτου δέχονται μέση ετήσια βροχόπτωση από 375 έως 875 mm, Η βέλτιστη παραγωγή απαιτεί επαρκή πηγή υγρασίας κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Ωστόσο, η υπερβολική βροχόπτωση μπορεί να οδηγήσει σε απώλειες απόδοσης λόγω ανάπτυξης παθογόνων όπως (*Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*) και σάπισμα σπόρων (ασφυξία λόγω αναερόβιου περιβάλλοντος). Οι συγκομιδές γίνονται μεταξύ Απριλίου και Σεπτεμβρίου στο βόρειο ημισφαίριο και μεταξύ Οκτωβρίου και Ιανουαρίου στο νότιο ημισφαίριο (Curtis et al., 2002).

1.1.2. ΤΟ ΣΚΛΗΡΟ ΣΙΤΑΡΙ

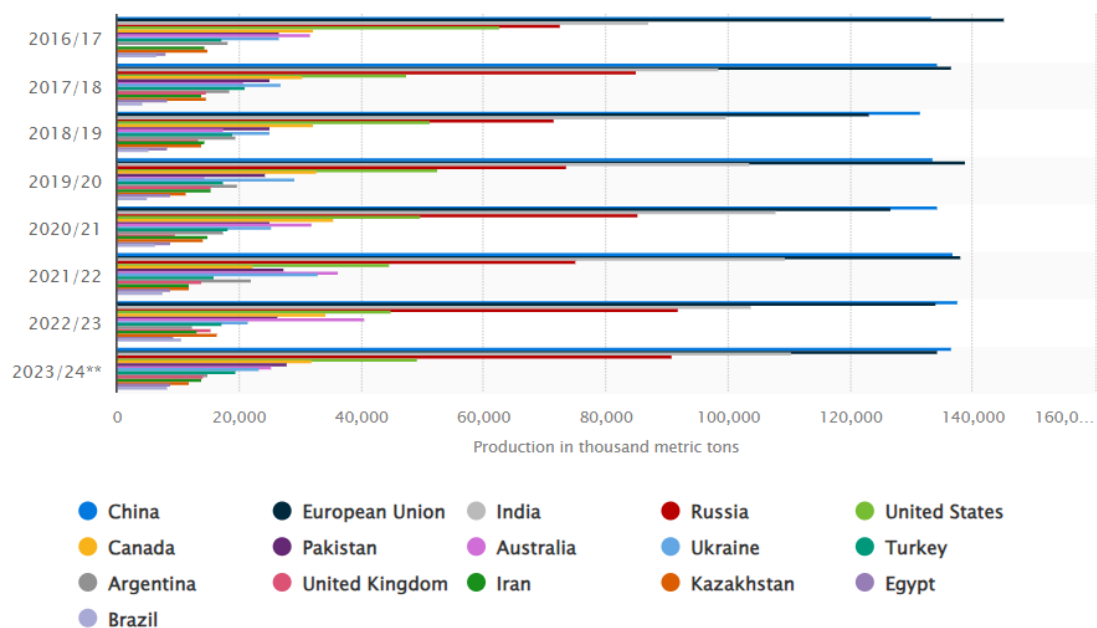
Το μεγαλύτερο μέρος του σκληρού σίτου που χρησιμοποιείται στην παραγωγή τροφίμων χρησιμοποιείται για την παραγωγή προϊόντων ζυμαρικών. Το σκληρό σιτάρι είναι ποικιλία σιταριού με τετραπλοειδές γονιδίωμα AABB και 28 χρωμοσώματα. Το σκληρό σιτάρι αντιπροσωπεύει περίπου το 5% της παγκόσμιας συγκομιδής σιταριού. Καλλιεργείται καλύτερα σε περιοχές με ήπιο έως θερμό κλίμα και με εποχιακή βροχόπτωση (κυρίως φθινόπωρο – άνοιξη) και σε εδάφη με καλή αποστράγγιση. Ως εκ τούτου, η κύρια προέλευση είναι η Μέση Ανατολή, η Βόρεια Αμερική, η Νότια Ευρώπη και η Βόρεια Αφρική. (Wieser et al., 2020).

Οι σπόροι του σκληρού σίτου διαφέρουν σημαντικά από εκείνους άλλων τύπων σιταριού για δύο χαρακτηριστικά: την υφή του ενδοσπερμίου (πολύ σκληρό) και το κίτρινο-κεχριμπαρένιο χρώμα του. Η υφή του ενδοσπέρμιου μαλακού σίτου (μαλακό έως μέτριο) βασίζεται σε γενετικά ελεγχόμενους χημικούς δεσμούς μεταξύ αμύλου και των *puroindolines* α και β. Αυτοί οι δεσμοί ρυθμίζουν την ευαισθησία του ενδοσπερμίου. Οι ποικιλίες μαλακού σιταριού έχουν δύο τύπους *puroindolines*, ενώ οι ποικιλίες σκληρού σιταριού έχουν μόνο έναν. Το σκληρό σιτάρι στερείται των *puroindolines* α και β, με αποτέλεσμα ο κόκκος να είναι σκληρός. Αυτό κάνει το σκληρό σιτάρι πιο κατάλληλο ως συστατικό στην παρασκευή ζυμαρικών. Επιπλέον, το ενδοσπέρμιο σκληρού σίτου είναι πλούσιο σε κίτρινες χρωστικές ουσίες όπως καροτενοειδή (*β-καροτίνη* και

λουτεΐνη) και η περιεκτικότητά του κυμαίνεται μεταξύ 4-8 mg/kg. Ο βαθμός του χρωματισμού αποτελεί ένδειξη ποιότητας του σκληρού σίτου και σημαντικό κριτήριο για την αποδοχή των προϊόντων σκληρού σίτου από τους καταναλωτές. (Wieser et al., 2020).

1.1.3. ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ

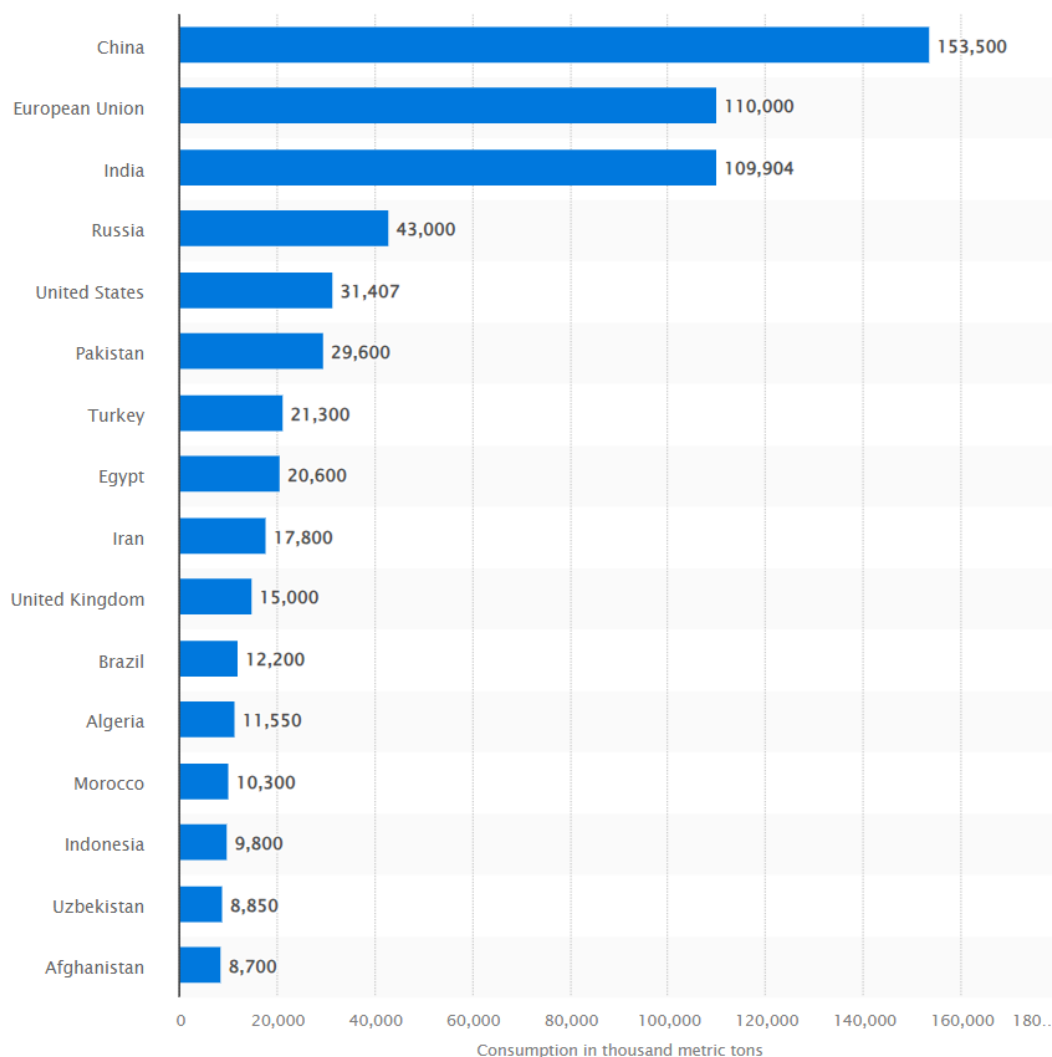
Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω, το σιτάρι αποτελεί μια από τις πιο βασικές καλλιέργειες παγκοσμίως, Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα (Εικόνα1), οι μεγαλύτεροι παραγωγοί είναι η Ευρωπαϊκή Ένωση, η Κίνα, η Ινδία, η Ρωσία και οι ΗΠΑ. Το 2023 η ΕΕ παρήγαγε πάνω από 134 εκατομμύρια τόνους σιτάρι, το οποίο αντιστοιχεί στο 1/5 της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής (Shahbandeh, 2024).



Εικόνα 1: Οι μεγαλύτερες χώρες-παραγωγοί σιταριού παγκοσμίως από το 2016 έως το 2024 (Statista, 2024)

Όπως φαίνεται από το παρακάτω διάγραμμα(Εικόνα2) οι μεγαλύτεροι καταναλωτές σίτου είναι η Κίνα με 153.500.000 τόνους το 2023/24, Είναι επίσης σημαντικό να ειπωθεί ότι η κατανάλωση των προϊόντων σίτου αυξάνεται

παγκοσμίως, σημειώνοντας αύξηση της τάξης του 8% από το 2018/19 και έπειτα (Shahbandeh, 2024).



Εικόνα 2: Μεγαλύτεροι καταναλωτές σίτου 2023/24 (Shahbandeh, 2024)

Όπως μπορεί να διαφανεί από τα παραπάνω, το σκληρό σιτάρι είναι πολύ σημαντική καλλιέργεια για τη διατροφή του ανθρώπου. Αυτό δείχνει και τη σημασία που έχει η διαχείριση οποιωνδήποτε προβλημάτων ενδέχεται να προκύψουν κατά την παραγωγή όπως φυτοπαθογόνα (πχ *pyrenophora tritici-repentis* και *septoria tritici*) που απειλούν το σιτάρι.

1.1.4. ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ

Ένα βασικό ζήτημα που επηρεάζει την παραγωγή σκληρού σίτου είναι η εμφάνιση φυτοπαθογόνων που προκαλούν ασθένειες (*Σεπτορίωση* , *tan spot* του σιταριού) του σίτου με αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης και της ποιότητας των σπόρων. Η εμφάνιση κίτρινων, καφέ ή μαύρων κηλιδώσεων οφειλόμενη σε παθογόνα φυλλώματος (*Σκωριάσεις*) ανάλογα με το παθογόνο, έχει σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις και είναι διαδεδομένες στις περισσότερες περιοχές καλλιέργειας σιταριού σε όλο τον κόσμο, ενώ έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές ζημιές και απώλειες στην απόδοση και την ποιότητα της καλλιέργειας. Η αρνητική επίδραση στα φυτά σιταριού οφείλεται κυρίως στη μείωση της φωτοσυνθετικής επιφάνειας που έχει ως συνέπεια την μειωμένη παραγωγή σακχάρων (φωτοσυνθετικά προϊόντα) συνεπώς λιγότερη ενέργεια διαθέσιμη για ανάπτυξη του φυτού. (Ganeva et al., 2024)

Μια ακόμα σημαντική ασθένεια που προσβάλλει το σιτάρι είναι η καστανή κηλίδωση (*tan spot*) που οφείλεται στο παθογόνο *pyrenophora tritici-repentis*. Προκαλεί ακανόνιστες ή ωοειδείς καστανές–φαιές κηλίδες στα φύλλα που περιβάλλονται από κιτρινωπό φωτοστέφανο(άλω) (*chlorotic halo*). (del Pozo et al., 2023).

Στις παρακάτω ενότητες θα αναλυθούν οι μύκητες *Zymoseptoria tritici* και *Pyrenophora tritici-repentis*

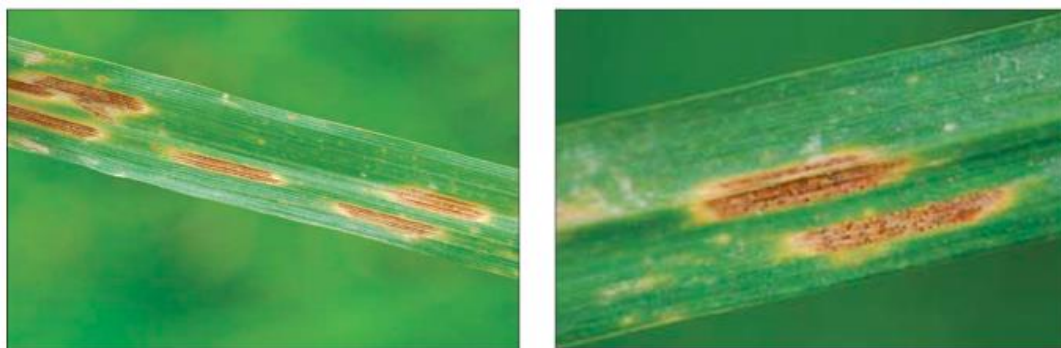
1.2. Ο ΜΥΚΗΤΑΣ *ZYMOSEPTORIA TRICITI*

1.2.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το Παθογόνο *Septoria tritici blotch* (*STB*) που σήμερα ταξινομείται ως *Zymoseptoria tritici*, είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της σεπτορίωσης του φύλλου του σιταριού . Αποτελεί μία από τις σοβαρότερες ασθένειες σιταριού (*Triticum sp.*) παγκοσμίως, ιδιαίτερα σε περιοχές με εύκρατο και υγρό κλίμα.

Αναπαράγεται τόσο αγενώς, μέσω πυκνιδίων που παράγουν πυκνιδιοσπόρια, όσο και εγγενώς, μέσω περιθηκίων που παράγουν ασκοσπόρια.

Πρώιμα συμπτώματα του παθογόνου εμφανίζονται ως μικρές, χλωρωτικές κηλιδώσεις στα χαμηλά φύλλα. Σταδιακά εξελίσσονται σε μεγάλες, επιμήκεις ή ακανόνιστες νεκρωτικές κηλιδώσεις με μαύρα στίγματα (πυκνίδια) στο κέντρο. Τα πυκνίδια (καρποφορίες) είναι ορατά με γυμνό μάτι ή μικροσκοπικό φακό. Η έντονη προσβολή οδηγεί σε πρόωρη φυλλόπτωση και μείωση της φωτοσυνθετικής επιφάνειας, με αποτέλεσμα σημαντικές απώλειες στην παραγωγή και στην ποιότητα του καρπού.



Εικόνα 3: Παρατηρούμε την αγενή αναπαραγωγή του μύκητα : πυκνίδια που έχουν σχηματιστεί μέσα στις νεκρωτικές κηλίδες των φύλλων του σίτου , και σχηματίζουν πυκνιδιοσπόρια δικύτταρα, υαλώδη, κυλινδρικά με αποστρογγυλεμένα άκρα (Τζάμος, 2007)

1.2.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

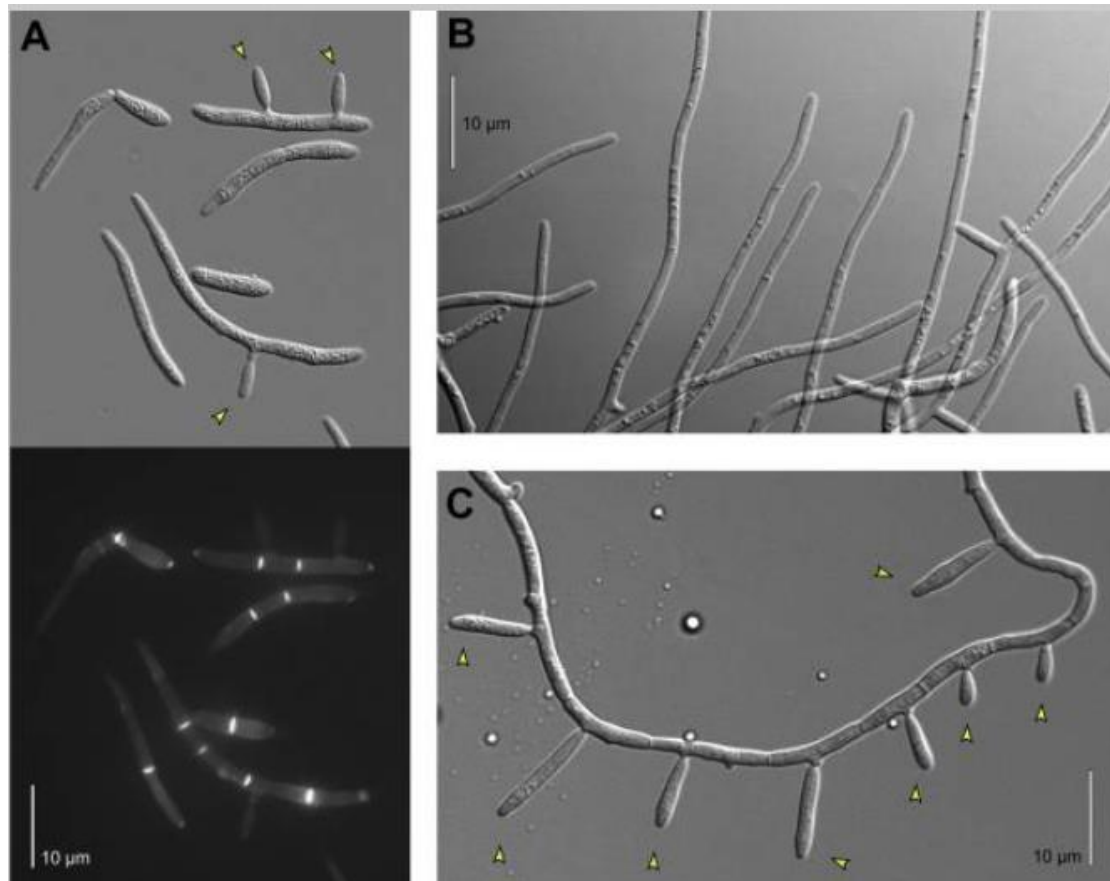
Η μόλυνση ξεκινά όταν ασκοσπόρια ή πυκνιδιοσπόρια προσγειωθούν σε υγρή επιφάνεια φύλλου. Τα σπόρια βλαστάνουν και διεισδύουν μέσω στομάτων, όχι με απευθείας διάτρηση της επιδερμίδας. Ακολουθεί ασυμπτωματική λανθάνουσα φάση (latent period) που μπορεί να διαρκέσει 7–14 ημέρες, κατά την οποία ο μύκητας αναπτύσσεται ενδοφυτικά στον μεσοκυττάριο χώρο. Τελικά, ο μύκητας προκαλεί νέκρωση των κυττάρων και εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά συμπτώματα στις νεκρωμένες περιοχές .

Αγενής αναπαραγωγή: Πραγματοποιείται μέσω πυκνιδίων, τα οποία αναπτύσσονται πάνω στις νεκρωμένες περιοχές των φύλλων. Τα πυκνίδια παράγουν πυκνιδιοσπόρια (*conidia*), τα οποία είναι υδρόφιλα και μεταφέρονται

κυρίως με την βοήθεια της βροχής . Αυτά είναι υπεύθυνα για τις δευτερογενείς μολύνσεις μέσα στην καλλιεργητική περίοδο.

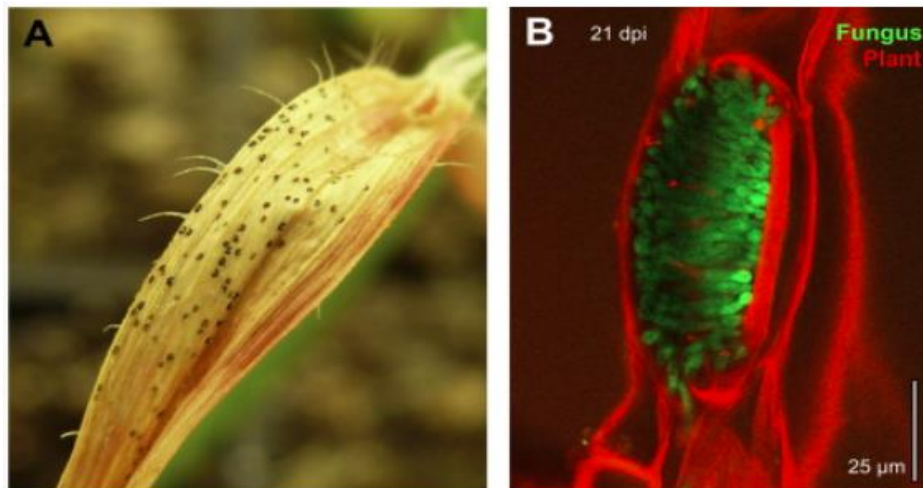
Εγγενής αναπαραγωγή:

Πραγματοποιείται με το σχηματισμό περιθηκίων (καρποφορίες) σε νεκρά υπολείμματα φυτών. Τα περιθήκια περιέχουν ασκούς με ασκοσπόρια, τα οποία απελευθερώνονται αερομεταφερόμενα και προκαλούν πρωτογενείς μολύνσεις στην αρχή της επόμενης καλλιεργητικής περιόδου.



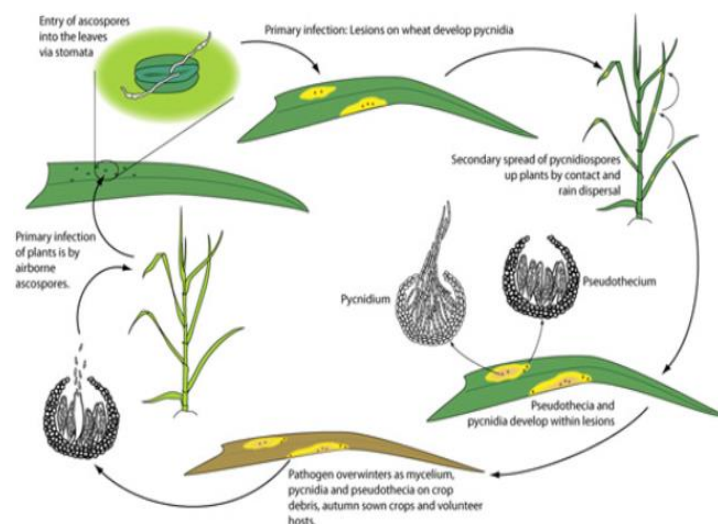
Εικόνα 4: Μορφές ανάπτυξης του *Z. Triciti*: (Α) Πυκνιδιοσπόρια, (Β) Μυκηλιακές υφές του *Z. tritici* ,
(C) Μικροπυκνίδια (Steinberg, 2015)

Στην Εικόνα 5 παρουσιάζονται τα πυκνίδια του μύκητα. Παρατηρούμε την αγενή αναπαραγωγή του μύκητα : πυκνίδια που έχουν σχηματιστεί μέσα στις νεκρωτικές κηλίδες των φύλλων του σίτου , και σχηματίζουν πυκνιδιοσπόρια δικύτταρα,υαλώδη, κυλινδρικά με αποστρογγυλεμένα άκρα (Steinberg, 2015).



Εικόνα 5: Πυκνίδια στο *Z. tritici* (Steinberg, 2015)

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται ο Βιολογικός κύκλος του μύκητα *Z.tritici* στο σιτάρι (Ponomarenko et al., 2011).



Εικόνα 6: Βιολογικός Κύκλος *Zymoseptoria tritici* (Ponomarenko et al., 2011)

Ο μύκητας *Zymoseptoria tritici* (παλαιότερα γνωστός ως *Septoria tritici*) είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της σεπτορίωσης του σιταριού (*Septoria tritici blotch* – *STB*), μία από τις σημαντικότερες ασθένειες του σκληρού σίτου (*Triticum durum*). (Ponomarenko et al., 2011).

Ο Βιολογικός κύκλος είναι μικτός και περιλαμβάνει τόσο αγενή όσο και εγγενή φάση αναπαραγωγής.

1) ΑΓΕΝΗΣ ΦΑΣΗ :

- I. Δομή καρποφορίας: Πυκνίδιο
- II. Σπόρια: Πυκνιδιοσπόρια (κονίδια)

Τα πυκνιδιοσπόρια (κονίδια) μεταδίδονται κυρίως με τη βροχή από κατώτερα σε ανώτερα φύλλα και αυτή η φάση είναι υπεύθυνη για την ταχεία επιδημιολογική εξάπλωση της ασθένειας κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου.

2) ΕΓΓΕΝΗΣ ΦΑΣΗ: Τελειόμορφη (*Mycosphaerella graminicola*)

- I. Δομή καρποφορίας: Περιθήκιο
- II. Σπόρια: Ασκοσπόρια

Τα περιθήκια σχηματίζονται στα υπολείμματα του σιταριού (άχυρα, καλάμια, φύλλα) κατά την περίοδο παραμονής στο έδαφος (μετασυλλεκτικά). Τα περιθήκια παράγουν ασκούς με ασκοσπόρια, τα ασκοσπόρια με την βοήθεια του αέρα και της βροχής μολύνουν τα πρώτα φύλλα το φθινόπωρο ή την άνοιξη και είναι η κύρια πηγή αρχικής μόλυνσης (πρωτογενής μόλυνση). (Ponomarenko et al., 2011).

Παράγοντες που ευνοούν τη μόλυνση:

- I. Υψηλή υγρασία και θερμοκρασίες 15–20°C.
- II. Συνεχόμενες βροχές (για διασπορά κονιδίων).
- III. Πυκνή σπορά και η έλλειψη αμειψισποράς ευνοούν τη διατήρηση και εξάπλωση του παθογόνου.

1.2.3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ/ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ

Ο μύκητας *Zymoseptoria tritici* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της ασθένειας γνωστής ως Σεπτορίωση ή *Septoria tritici blotch* (STB). Πρόκειται για μία από τις σημαντικότερες ασθένειες του μαλακού σίτου, αλλά στις νότιες Μεσογειακές περιοχές, όπως η Ελλάδα, έχει σημαντικότερη επίδραση στο σκληρό σιτάρι όπου και μας αφορά. Το παθογόνο ανήκει στους ασκομύκητες και προκαλεί πολυκυκλική ασθένεια, με ικανότητα ταχείας εξάπλωσης σε ευνοϊκές συνθήκες.

Η ασθένεια ξεκινά από προσβεβλημένα φυτικά υπολείμματα που παραμένουν στο χωράφι μετά τη συγκομιδή. Ο μύκητας παράγει ασκοσπόρια σε ψευδοθήκια (περιθήκια) που σχηματίζονται σε αυτά τα υπολείμματα. Τα ασκοσπόρια απελευθερώνονται με τη βροχή και μεταφέρονται με τον άνεμο, μολύνοντας τα νεαρά φύλλα. Κατά την περίοδο ανάπτυξης του φυτού, το παθογόνο δημιουργεί κονίδια (πυκνίδια) στις προσβεβλημένες επιφάνειες, τα οποία διασπείρονται τοπικά μέσω σταγονιδίων νερού, κυρίως από βροχή ή άρδευση με καταιονισμό. Η θερμοκρασία που ευνοεί την ανάπτυξη του μύκητα κυμαίνεται μεταξύ 10–20°C, ενώ απαιτείται υψηλή σχετική υγρασία (>85%) ή νερό στην επιφάνεια του φύλλου για τουλάχιστον 48–72 ώρες, προκειμένου να ολοκληρωθεί η μόλυνση. Η ασθένεια ακολουθεί χαρακτηριστικό λανθάνον στάδιο διάρκειας περίπου 7–14 ημερών, κατά το οποίο δεν παρατηρούνται ορατά συμπτώματα, γεγονός που δυσκολεύει την έγκαιρη διάγνωση. (Fones, H., & Gurr, S. 2015)

Ο μύκητας *Septoria tritici* αποτελεί σημαντική απειλή για την παραγωγή σκληρού σιταριού, ιδιαίτερα σε περιοχές με ήπιο και υγρό χειμώνα, όπως είναι η Μεσόγειος. Τα συμπτώματα εκδηλώνονται κυρίως στα φύλλα ως επιμήκεις κηλιδώσεις, όπου στο κέντρο τους εμφανίζονται τα μαύρα πυκνίδια του μύκητα. Οι κηλιδώσεις μπορεί να συγχωνευτούν, προκαλώντας πρόωρη φυλλόπτωση και μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας του φυτού.

Η μείωση φυλλικής επιφάνειας πριν την πλήρη ωρίμανση οδηγεί σε μείωση του βάρους των κόκκων και του αριθμού τους ανά στάχυ. Σε σοβαρές προσβολές, η απώλεια παραγωγής μπορεί να φτάσει το 30–50%, ενώ παράλληλα υποβαθμίζεται και η ποιότητα του παραγόμενου σιταριού, γεγονός κρίσιμο για τη βιομηχανία ζυμαρικών. Οι επιπτώσεις είναι ακόμη μεγαλύτερες όταν η ασθένεια εμφανίζεται νωρίς και παρατείνεται σε όλη την καλλιεργητική περίοδο (πολυκυκλική ασθένεια).

Η οικονομική σημασία της ασθένειας εντείνεται λόγω της ανάγκης για πολλαπλούς ψεκασμούς με μυκητοκτόνα και της αδυναμίας πλήρους καταστολής του παθογόνου. Επιπλέον, το *Z. tritici* είναι γνωστό για τη γενετική του ποικιλομορφία και την ικανότητά του να αναπτύσσει ανθεκτικότητα σε δραστικές ουσίες (συνέπεια της εγγενούς αναπαραγωγής του) γεγονός που καθιστά τη διαχείρισή του ιδιαίτερα περίπλοκη.

Όσον αφορά στη διαχείριση της νόσου, η συνεχιζόμενη έρευνα που στοχεύει στον έλεγχο της νόσου του *STB* περιλαμβάνει μια πολύπλευρη προσέγγιση για την κατανόηση των γενετικών αλληλεπιδράσεων ξενιστή-παθογόνου, την ανάπτυξη ανθεκτικότητας και την ανάπτυξη νέων μιγμάτων μυκητοκτόνων. Οι ανθεκτικές ποικιλίες είναι ο καλύτερος έλεγχος για τον *Z. tritici*. Για παράδειγμα, Apache' (Γαλλία) – Ποικιλία με αντοχή μέσω του γονιδίου Stb6.

'Arina' (Ελβετία) – Έχει συνδυασμό Stb γονιδίων, αρκετά σταθερή αντοχή (Brown, J. K. M., & Chartrain, L. 2011).

Επεξήγηση Stb: Τα Stb (*Septoria tritici blotch resistance*) γονίδια που είναι υπεύθυνα για αντίσταση σε συγκεκριμένες φυλές του μύκητα.

Stb6 είναι το πιο κοινό, αλλά ο *Z. tritici* έχει εξελιχθεί και εμφανίζει ανθεκτικές φυλές

Ο συνδυασμός πολλών Stb γονιδίων (*pyramiding*) είναι η τρέχουσα στρατηγική στη βελτίωση ποικιλιών.

Ωστόσο, η αντίσταση στη φάση του φυλλώματος είναι συνήθως επαρκής για την πρόληψη σοβαρών απωλειών απόδοσης. Τα μυκητοκτόνα φυλλώματος και πιο συγκεκριμένα μυκητοκτόνα με βάση την ομάδα των τριαζολών και των στρομπιλουρινών(π.χ. *azoxystrobin*), είναι επίσης μια επιλογή για τον έλεγχο της νόσου. Το Bumper, το Headline, το Proline, το Propimax, το Quilt και το Quadris , είναι μερικά διασυστηματικά μυκητοκτόνα με βάση την τριαζόλη ,που παρέχουν καλή δράση έναντι αυτής της ασθένειας. Όταν εφαρμόζεται μυκητοκτόνο για φυλλώματα, είναι σημαντικό να προστατεύονται τα δύο τελευταία φύλλα. Αυτά τα φύλλα παρέχουν το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας που απαιτείται για την παραγωγή του κόκκου. Η προστασία αυτών των φύλλων επιτυγχάνεται καλύτερα με την εφαρμογή του μυκητοκτόνου μεταξύ της εμφάνισης του φύλλου σημαίας και της έναρξης της ανθοφορίας. (De Wolf, 2008).

Επιπλέον, οι έλεγχοι των καλλιεργειών, συμπεριλαμβανομένης της αμειψισποράς ή της καταστροφής των υπολειμμάτων από προηγούμενες καλλιέργειες σιταριού, μπορεί να έχουν θετική επίδραση στη σοβαρότητα της νόσου. Τέλος τα επενδυτικά σπόρων μπορούν να προστατεύσουν από τις πρώιμες μολύνσεις του φθινοπώρου (τον χειμώνα οι χαμηλές θερμοκρασίες προκαλούν αναστολή της δημιουργίας σπορίων). Έτσι υπάρχει μείωση του τοπικού μολύσματος, που αργότερα θα μεταφέρει την ασθένεια στα νέα φύλλα υπό ευνοϊκές συνθήκες. (Καθηγητής Ι. Βαγγέλας , Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας.)

1.3. Ο ΜΥΚΗΤΑΣ *PYRENOPHORA TRITICI-REPENTIS*

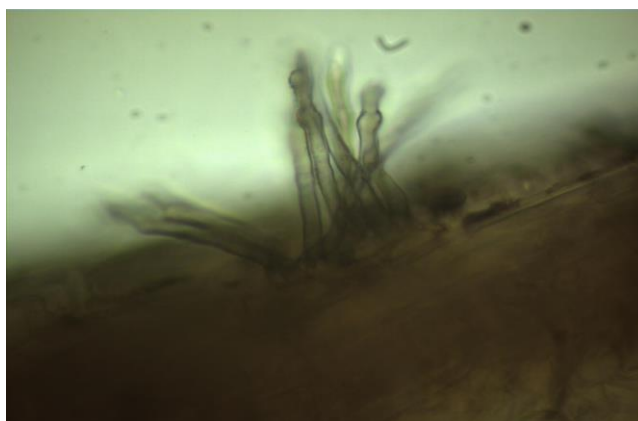
1.3.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η ασθένεια γνωστή ως *tan spot* (ή κίτρινη κηλίδωση, καστανή κηλίδωση), οφείλεται στον παθογόνο μύκητα *Pyrenophora tritici-repentis* (συντομογραφία *Ptr.*).(ατελής μορφή το *Dreschlera tritici-repentis*). Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται στα φύλλα, ως ελλειπτικές-φακοειδείς κηλίδες καστανού χρώματος περιβαλλόμενες από έντονη, κίτρινη ζώνη (άλω) (Tissaoui et al., 2022). Πρωτοαναφέρθηκε στην Ιαπωνία στη δεκαετία του 1920 (Moreno & Perello, 2010). Με την παρουσία υγρού καιρού, στο κέντρο της κηλίδας εμφανίζεται ένα σκούρο στίγμα (εξ ου και το όνομα «*tan spot*»). Οι κηλίδες αυτές σταδιακά συνενώνονται κι εξελίσσονται σε νεκρώσεις του ελάσματος. Θεωρείται σχετικά δύσκολο να διακριθούν τα συμπτώματα της πυρηνοφόρας από αυτά που προκαλούνται από τον μύκητα *Septoria tritici*. Η ασφαλής διάγνωση γίνεται με μικροσκοπική εξέταση των καρποφοριών του μύκητα που εμφανίζονται στο κέντρο των κηλίδων. Οι καρποφορίες που σχηματίζονται στις κηλίδες, καθ' όλη την διάρκεια της βλαστικής περιόδου, είναι κονιδιοφόροι που παράγουν πολυκύτταρα σπόρια (κονίδια). Τα κονίδια μεταφέρονται από τον αέρα και τις σταγόνες της βροχής και δημιουργούν νέες μολύνσεις σε άλλα φύλλα. Τα κονίδια, σε μεγάλες αποστάσεις, μεταδίδοντας την ασθένεια παρασυρόμενα από τον αέρα μπορεί να μεταφερθούν άλλες περιοχές. Μολύνσεις προκαλούνται στα στελέχη ακόμη και στα σταχύδια, παράγοντας κόκκους με κοκκινωπό χρωματισμό. Στα στελέχη που παραμένουν μετά τον αλωνισμό, ο μύκητας ζει σαπροφυτικά σχηματίζοντας τις καρποφορίες περιθήκια, στα οποία παράγονται εγγενή σπόρια (ασκοσπόρια). Τα ασκοσπόρια, αλλά και κονίδια που παράγονται από μυκήλιο που αναπτύσσεται στα υπολείμματα της καλλιέργειας, δημιουργούν τις αρχικές μολύνσεις κατά την επόμενη καλλιεργητική περίοδο. (Καθηγητής Ι. Βαγγέλας. Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας). Όταν στην αρχή της άνοιξης επικρατούν συνθήκες υψηλής υγρασίας, είναι δυνατόν να εκδηλωθεί σοβαρή επιδημία της ασθένειας. Ο βροχερός και υγρός καιρός αποτελούν ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης του παθογόνου.

Οι αλληλεπιδράσεις *Ptr*-παθοφυσιολογίας σίτου ακολουθούν γενικά αντίστροφα μοντέλα διαγονιδιακών και ειδικών για τη φυλή μοντέλων. Αυτή η μεταβλητότητα της παθογένειας συσχετίστηκε με 8 στελέχη του *Ptr*. Ένα μόνο στέλεχος είναι ικανό να παράγει τρεις τοξίνες εκλεκτικές για τον ξενιστή (*host selective toxins (HSTs)*), τις *PtrToxA*, *PtrToxB* και *PtrToxC*, οι οποίες θεωρούνται παθογόνες. Οι τοξίνες μπορούν να παραχθούν από στελέχη των φυλών 2, 3 και 5 μεμονωμένα, όπως *Ptr ToxA*, *Ptr ToxC* ή *Ptr ToxB*, ή σε συνδυασμό δύο τοξινών, όπως *Ptr ToxA+Ptr ToxC*, *Ptr ToxB+Ptr ToxC* και *Ptr ToxA+Ptr ToxB*, από καθένα από τα στελέχη 1, 6 και 7, αντίστοιχα. Επιπλέον, το στέλεχος 8(*ptr*) μπορεί να παράγει και τις τρεις τοξίνες ταυτόχρονα. Ωστόσο, το στέλεχος 4 δεν παράγει γνωστές τοξίνες και άρα, δεν είναι παθογόνο. Η ειδική τοξίνη *Ptr ToxA* προκαλεί νεκρωτικά συμπτώματα σε ευαίσθητους γονότυπους σίτου και επηρεάζει τη σοβαρότητα της νόσου της ασθένειας (*tan spot*) ανάλογα με τη γενετική ανθεκτικότητα του ξενιστή. Η απόκριση ευαισθησίας του σίτου στην τοξίνη *Ptr ToxA* προκαλείται από το γονίδιο *Tsn1*. Το γονίδιο *Tsn1* αλληλεπιδρά με το γονίδιο τελεστή *Tox A* στο παθογόνο και είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της συγκεκριμένης τοξίνης *Ptr ToxA*. (Tissaoui et al., 2022).



Εικόνα 7: Προσβολή σίτου από *Pyrenophora tritici-repentis* (*Ptr*) (Roman Ramos et al., 2023)

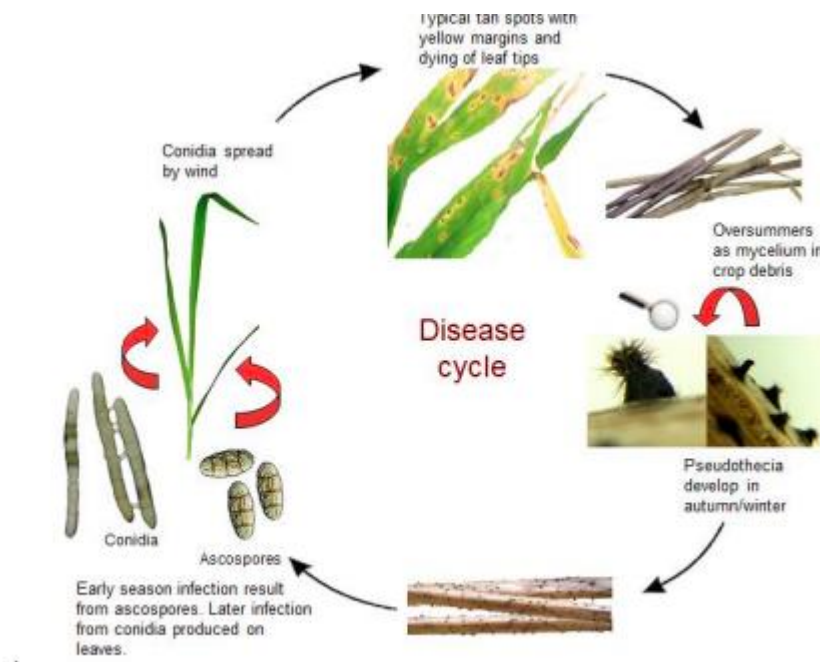


Εικόνα 8: Η εμφάνιση σεταίων μετά από την προσβολή με το μύκητα *P. tritici-repentis* (Χαρακτηριστικό σημείο ώστε να καταλάβουμε ότι πρόκειται για τον μύκητα *pyrenophora tritici-repentis*) (Καθηγητής Ι. Βαγγέλας, εργαστήριο φυτοπαθολογίας Π.Θ)

1.3.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Ο *Pyrenophora tritici-repentis* παράγει εγγενώς ασκούς με ασκοσπόρια και αγενώς κονιδιοφόρους με κονιδιοσπόρια, αντίστοιχα. Προκειμένου να επιβιώσει, ο μύκητας εγκαθίσταται σε μολυσμένα υπολείμματα σιταριού που βρίσκονται στην επιφάνεια του εδάφους και παράγει μονόχωρα μαύρα υπερυψωμένα καρποφόρα σώματα (ψευδοθηκία) διαμέτρου περίπου 0,2-0,35 mm (Εικόνα 8). Τα ψευδοθηκία περιέχει ασκούς όπου κάθε ασκός περιέχει 8 ασκοσπόρια. Οι ασκοί περιέχουν ασκοσπόρια με 2 έως 5 εγκάρσια διαφράγματα (*septa*) . Το κεντρικό κύτταρο ενός ασκοσπορίου έχει ένα διαμήκη διαχωρισμό με 4-5 κύτταρα. Τα κονίδια του *Pyrenophora tritici-repentis* είναι πολκύτταρα, επιμήκη, σκουρόχρωμα, με 3–10 εγκάρσια διαφράγματα και παχύ τοίχωμα.(Abdullah et al., 2017).

Στην Εικόνα 9 εμφανίζεται ο Βιολογικός κύκλος του παθογόνου *Ptr*.



Εικόνα 9: Βιολογικός κύκλος του μύκητα *Pyrenophora tritici-repentis* (Abdullah, 2017).

1.3.3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ/ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ

Η επιδημιολογία του *Ptr* σχετίζεται με την παρουσία μολύσματος στο φυτικό υπόλειμμα, όπου ο μύκητας επιβιώνει σε μορφή ψευδοθηκίων.

Το *Ptr* εμφανίζεται σε θερμές και εύκρατες περιοχές καλλιέργειας σίτου. Η ασθένεια αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, αλλά έχει αρκετά υψηλό βέλτιστο (20-28 °C) και ευνοείται από μεγάλες περιόδους (18 ώρες ή περισσότερο) με δροσιά και βροχή. (Καθηγητής Ι. Βαγγέλας Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας).

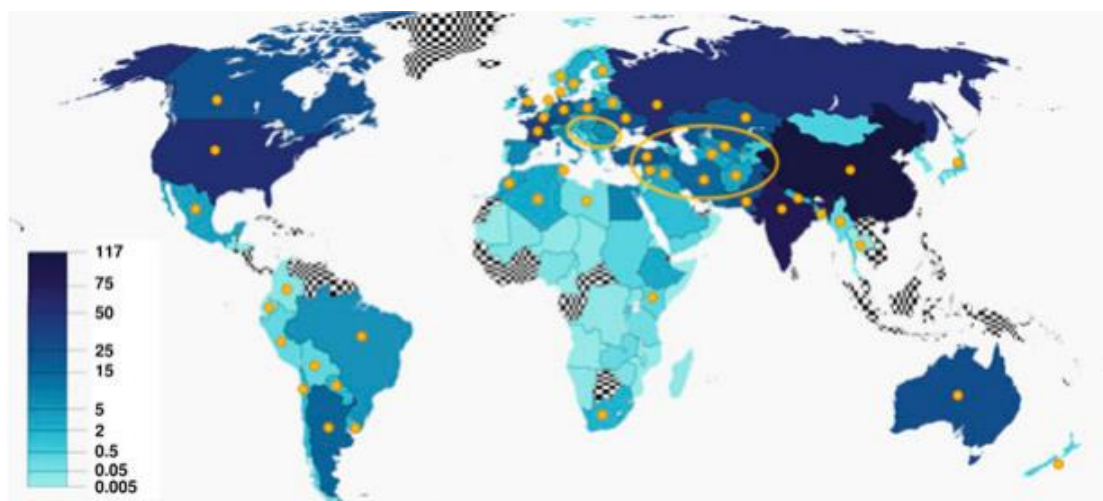
Ακόμα, Η κλιματική αλλαγή επηρεάζει ουσιαστικά την επιδημιολογία του *Pyrenophora tritici-repentis*, τροποποιώντας τα κρίσιμα περιβαλλοντικά στοιχεία που ρυθμίζουν τη μόλυνση, την ανάπτυξη και τη διασπορά του μύκητα. Η άνοδος της μέσης θερμοκρασίας: επιμηκύνει την περίοδο ευνοϊκών συνθηκών, ειδικά σε περιοχές όπου προηγουμένως οι θερμοκρασίες ήταν οριακές. Επιταχύνει τους κύκλους μόλυνσης, αφού ο χρόνος επώασης και παραγωγής κονιδίων μειώνεται.

Επεκτείνει τη γεωγραφική εξάπλωση του παθογόνου προς βορειότερες περιοχές ή μεγαλύτερα υψόμετρα (Tissaoui et al., 2022).

Επιπλέον αλλαγές στις βροχοπτώσεις και την υγρασία , έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη συχνότητα βροχοπτώσεων και πρωινής υγρασίας/δροσιάς διευκολύνοντας τη μόλυνση, καθώς όπως είδαμε πιο πάνω ο μύκητας ευνοείται από μεγάλες περιόδους (18 ώρες ή περισσότερο) με δροσιά και βροχή. (Καθηγητής Ι. Βαγγέλας Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας).

Φαίνεται να υφίσταται μια ανεξήγητη, μέχρι στιγμής, συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας του *Ptr* να εκκρίνει διάφορους συνδυασμούς τοξινών και της γεωγραφικής προέλευσής του. Στη Βόρεια Αμερική και την Αυστραλία, τα προϊόντα απομόνωσης *Ptr* είναι κυρίως παραγωγοί *ToxA* και *ToxC*, με τους παραγωγούς *ToxB* να είναι εξαιρετικά σπάνιοι ή απόντες, ενώ , σε περιοχές που περιλαμβάνουν το κέντρο προέλευσης του σιταριού, όπως πχ. η Βόρεια Αφρική, βρίσκονται όλες οι φυλές, ακόμη και σε περιοχές που δεν έχουν ερευνηθεί επαρκώς, με τους παραγωγούς *ToxB* να κυριαρχούν στη Βόρεια Αφρική. Αυτή η διακύμανση στην παρουσία/απουσία τοξινών υποδηλώνει μια αποκλίνουσα εξέλιξη του *Ptr* και των τοξινών του παγκοσμίως (Gourlie et al., 2022).

Στον παρακάτω χάρτη εμφανίζεται η επίπτωση του *Ptr* στη παγκόσμια παραγωγή σιταριού για το 2011.



Εικόνα 10: Χάρτες που επικαλύπτουν την παγκόσμια παραγωγή σιταριού και τη συχνότητα εμφάνισης του *P. tritici-repentis* (Ciufetti et al., 2014)

Επεξήγηση, εικόνα 10: Χάρτες που επικαλύπτουν την παγκόσμια παραγωγή σιταριού και τη συχνότητα εμφάνισης του *P. tritici-repentis*. Παγκόσμιες αποδόσεις σιταριού από μεμονωμένες χώρες για το 2011 (οι χώρες που παράγουν σιτάρι είναι σκιασμένες, η πιο σκούρα σκίαση αντιπροσωπεύει μεγαλύτερη ετήσια παραγωγή σιταριού, οι <<καρό>> περιοχές αντιπροσωπεύουν χώρες με αμελητέα ή μηδενική παραγωγή σιταριού), με τα έθνη (κουκκίδες) και τις περιοχές (περικυκλωμένες περιοχές) του κόσμου που ανέφεραν την ασθένεια της κηλίδας του σιταριού (*Tan spot*).

Οι βλαβερές συνέπειες των μολυσμένων με μύκητες σπόρων, μπορούν επίσης να επηρεάσουν την παραγωγικότητα των φυτών και την τελική απόδοση εάν οι μολυσμένοι σπόροι χρησιμοποιούνται ως πηγή σποράς. Ορισμένες από τις αρνητικές επιπτώσεις που έχουν παρατηρηθεί περιλαμβάνουν βραδύτερη εμφάνιση των νεαρών φυτών, μειωμένη συνολική βλάστηση και ζωηρότητα των φυταρίων και μειωμένο αριθμό αδερφών (*tillers*) και κεφαλών. Σπόροι που είναι μολυσμένοι με *P. tr* από προηγούμενες χρονιές εμφανίζουν έως και 20% μειωμένο αριθμό κεφαλών, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης των σπόρων ανά χωράφι κατά 17%. (Theen See et al., 2020).

Σε σχέση με τη διαχείριση του παθογόνου , αυτή πραγματοποιείται μέσω της καλλιέργειας ανθεκτικών στελεχών και γενετικού ελέγχου, αλλά και με μυκητοκτόνα. Τις τελευταίες δεκαετίες, οι ανησυχίες σχετικά με τη διαχείριση του *Ptr* έχουν οδηγήσει σε αυξημένες προσπάθειες για τη βελτίωση της αναπαραγωγής ανθεκτικότητας μέσω της προόδου στη γενετική και τη γονιδιωματική του σίτου. Η χρήση γενετικού ελέγχου είναι μια οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση. Σε αυτό το πλαίσιο, διεξάγεται έρευνα για την εισαγωγή γονιδίων ανθεκτικότητας στο *Ptr* και την καλλιέργεια ανθεκτικών βελτιωμένων ποικιλιών (Roman Ramos et al., 2023).

Η αποτελεσματικότητα της επιλογής μπορεί να βελτιωθεί με τον εντοπισμό γονιδίων ευαισθησίας. Επί του παρόντος, περισσότερα από 100 QTL (*quantitative trait locus*) που σχετίζονται με την αντίσταση στο *Ptr* έχουν ανακαλυφθεί μέσω χαρτογράφησης σε εξαπλοειδείς και τετραπλοειδείς ποικιλίες σίτου (Roman Ramos et al., 2023).

Ο χημικός έλεγχος είναι μία από τις στρατηγικές που χρησιμοποιούνται για τη διαχείριση του *Ptr*. Η χρήση μυκητοκτόνων παρέχει οφέλη αλλά αυξάνεται το κόστος παραγωγής. Οι αποτελεσματικές ομάδες μυκητοκτόνων για τον έλεγχο της μαύρης κηλίδας περιλαμβάνουν τις τριαζόλες, τις στρομπιλουρίνες και τα καρβοξαμίδια.

Το *Ptr* θεωρείται ως μέσος κίνδυνος για την ανάπτυξη ανοχής στα μυκητοκτόνα, αλλά έχει αναφερθεί έλλειψη ευαισθησίας σε ορισμένα μυκητοκτόνα σε συγκεκριμένους πληθυσμούς *Ptr*. Στελέχη *Ptr* με μεταλλάξεις όπως *G137R* και *F129L* προσδίδουν μερική ανοχή και το *G143A* προσδίδει υψηλά επίπεδα αναισθησίας στα μυκητοκτόνα *Qol* (Roman Ramos et al., 2023).

{*Qol* (*quantitative trait locus*)- τόπος ποσοτικών χαρακτηριστικών}

Μελέτες από το εργαστήριο φυτοπαθολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας έδειξαν ότι: Οι σπόροι που έχουν υποστεί επεξεργασία με Systiva μπορούν να ελαχιστοποιήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης *P. tritici-repentis* και *Septoria tritici*.

Η επένδυση σπόρων με το μυκητοκτόνο Systiva (δ.ο *fluxapyroxad*) είναι ο πλέον κατάλληλος τρόπος πρόληψης της ασθένειας. Στην συνέχεια εάν έχει ήδη μολυνθεί η καλλιέργεια πρέπει να γίνει ψεκασμός στο φύλλο σημαία του φυτού (τελευταίο φύλλο του φυτού στην κορυφή του), με μίγματα κάποιας Στρομπιλουρίας με μια Τριαζόλη.

1.4. Μελέτη ύπαρξης καρποφοριών που οφείλονται στα παθογόνα *Zymoseptoria tritici* και *Pyrenophora tritici-repentis*

Η μελέτη επικεντρώθηκε στην ύπαρξη καρποφοριών εγγενούς αναπαραγωγής και συγκεκριμένα περιθηκίων τόσο του παθογόνου *Ptr* όσο και του *Stb*. Αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την κατανόηση των επιδημιολογικών τους χαρακτηριστικών, καθώς και για την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών διαχείρισης. Στην περίπτωση του *Zymoseptoria tritici* και του *Pyrenophora tritici-repentis*, η μορφολογία και ο αριθμός των καρποφοριών επηρεάζονται τόσο από τη φυσιολογία του φυτού ξενιστή όσο και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τις καλλιεργητικές πρακτικές.

Όσο αναφορά τα παθογόνα φυλλώματος έρευνες έχουν αναφερθεί εκτεταμένα στις καρποφορίες των συγκεκριμένων παθογόνων όπως θα δούμε στην συνέχεια.

Ο μύκητας *Zymoseptoria tritici* εμφανίζει έντονη χωρική ετερογένεια όσον αφορά την παραγωγή πυκνίδιων στην επιφάνεια του φύλλου ή του καλαμιού, η οποία έχει συσχετιστεί με το μικροπεριβάλλον των φυτικών ιστών

και την ύπαρξη τοπικών πληγών ή στομάτων. Η μελέτη των Ouaja et al. (2020) έδειξε ότι σε τοπικές ποικιλίες σκληρού σίτου της Τυνησίας, παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στον χωρικό εντοπισμό των καρποφοριών του μύκητα, οι οποίες σχετίστηκαν με την ποικιλία και την ηλικία του ιστού, υποδεικνύοντας πιθανή επιρροή γενετικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών του ξενιστή (Ouaja et al., 2020).

Οι διαφοροποιήσεις στη χωρική παρουσία καρποφοριών θα μπορούσαν, σύμφωνα με τους συγγραφείς, να οφείλονται εν μέρει σε γενετική ετερογένεια, ιδιαίτερα σε σχέση με την ικανότητα αποφυγής της άμυνας του φυτού ξενιστή (Sampaio et al., 2025).

Από την πλευρά του *Pyrenophora tritici-repentis*, η μελέτη των Cotuna et al. (2022) στην περιοχή της Ρουμανίας κατέδειξε σημαντικές διακυμάνσεις στον αριθμό και την εντόπιση των καρποφοριών σε διαφορετικά τμήματα του φυτού. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι το παθογόνο μπορεί να εντοπιστεί σε διάφορα σημεία του φύλλου, ενώ σε πιο προχωρημένα στάδια της μόλυνσης παρατηρείται συγκέντρωση των καρποφοριών σε συγκεκριμένες ζώνες. Αυτή η παρατήρηση ενισχύει την υπόθεση ότι η πρόοδος της νόσου ενδέχεται να προκαλεί συσσωμάτωση των καρποφοριών, είτε λόγω ευνοϊκότερων τοπικών συνθηκών είτε λόγω περιοχών με αυξημένη τροφοδότηση του παθογόνου από τον φυτικό ιστό (Cotuna et al., 2022).

Η μελέτη των Román Ramos et al. (2024) πρόσθεσε μια ακόμα διάσταση, διερευνώντας πώς η θρέψη του φυτού με άζωτο και πυρίτιο επηρεάζει τη φυσιολογία του σίτου και την άμυνά του απέναντι στο *P. tritici-repentis*. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αύξηση του πυριτίου βελτιώνει τη μηχανική αντοχή των κυτταρικών τοιχωμάτων, περιορίζοντας τη διείσδυση του μύκητα και, έμμεσα, επηρεάζοντας τη θέση και την έκταση των καρποφοριών στο φυτό. Η άνιση κατανομή του πυριτίου στους φυτικούς ιστούς φαίνεται πως οδηγεί και σε άνιση εμφάνιση των καρποφοριών, υποδεικνύοντας σαφή χωρική διαφοροποίηση η οποία δεν είναι τυχαία αλλά εξαρτώμενη από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες (Román Ramos et al., 2024).

Οι παλαιότερες μελέτες των Krupinsky (1992) και Rees & Platz (1983) επίσης προσέφεραν σημαντικά στοιχεία σχετικά με τη χωρική δυναμική των

καρποφοριών του *P. tritici-repentis*. Συγκεκριμένα, ο Krupinsky ανέδειξε τον ρόλο της ηλικίας του φυτού στην ευαλωτότητα σε μόλυνση, με τα πιο ώριμα τμήματα των φύλλων να παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση καρποφοριών, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί τόσο στη μειωμένη αποτελεσματικότητα της άμυνας όσο και στη σταθερότερη επιφάνεια για εγκατάσταση του παθογόνου. Από την άλλη, οι Rees και Platz παρατήρησαν διαφοροποίηση στην ένταση της νόσου κατά μήκος των ιστών του φυτού, με σημαντική επίδραση στα συστατικά της απόδοσης.

Επιπλέον, η μελέτη του Eyal (1999), αν και περισσότερο εστιασμένη σε πρακτικές διαχείρισης του *Septoria tritici*, παραθέτει παρατηρήσεις που αφορούν τη συγκέντρωση των καρποφοριών σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας. Οι συνθήκες αυτές δεν κατανέμονται ομοιόμορφα εντός του φυτού, και έτσι επηρεάζουν τη μικροτοποθέτηση των δομών αναπαραγωγής του μύκητα. Η τοπική συσσώρευση της υγρασίας στα κατώτερα φύλλα ή στα σημεία επαφής μεταξύ των φύλλων δημιουργεί ευνοϊκές μικροπεριβαλλοντικές εστίες για την ανάπτυξη πυκνίδων.

Αναφορικά με την βιβλιογραφία, αν επικρατεί το γένος *pyrenophora* ή *septoria* στη καλαμιά, βάση τούτου σας αναφέρουμε στην παρούσα μελέτη κάποια στοιχεία που μπορούν να βοηθήσουν προς αυτή τη κατεύθυνση.

Συνολικά, τα ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι η χωρική κατανομή των καρποφοριών των *Zymoseptoria tritici* και *Pyrenophora tritici-repentis* δεν είναι τυχαία ούτε ομοιογενής. Αντιθέτως, επηρεάζεται από συνδυασμό παραγόντων που περιλαμβάνουν:

- Την ηλικία και τη φυσιολογία του φυτικού ιστού.
- Τις γενετικές ιδιότητες του παθογόνου.
- Τις διαφορές στις θρεπτικές και περιβαλλοντικές συνθήκες.
- Την τοπική υγρασία και άλλες μικροκλιματικές μεταβολές.

Η ερμηνεία των χωρικών προτύπων κατανομής μπορεί να συμβάλει σε στοχευμένες παρεμβάσεις και να ενισχύσει τη στρατηγική διαχείρισης των ασθενειών σε επίπεδο αγρού.

2. ΥΛΙΚΑ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην μακροσκοπική , μικροσκοπική καταγραφή και την μοριακή ανάλυση καρποφοριών και συγκεκριμένα εγγενούς αναπαραγωγής (περιθήκια) των 2 παθογόνων (*Zymoseptoria tritici* και *Pyrenophora tritici-repentis*) ώστε να διαπιστωθεί ποιο από τα 2 ή και τα 2 παθογόνα έχουν προσβάλει το καλάμι του σκληρού σίτου (*Triticum durum*) που εξετάσαμε. Οι δύο αυτοί φυτοπαθογόνοι μύκητες είναι ευρέως διαδεδομένοι στην καλλιέργεια του σιταριού και παρουσιάζουν σημαντικό φυτοπαθολογικό ενδιαφέρον, καθώς προκαλούν σοβαρές απώλειες παραγωγής.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τέσσερα αγροτεμάχια από την ευρύτερη περιοχή της Λάρισας που καλλιεργείται εκτεταμένα σιτάρι. Από κάθε αγροτεμάχιο ελήφθησαν 150 καλάμια(μεμονωμένες καλαμιές) σκληρού σίτου (*Triticum durum*), τα οποία εξετάστηκαν μακροσκοπικά για την παρουσία του περιθηκίου που οφείλεται είτε στο *Ptr* είτε στο *Stb*. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν δέκα καλάμια με τυχαία δειγματοληψία, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στην παρούσα πειραματική διαδικασία.

Για την καταγραφή τους, εξετάστηκε το καλάμι κάθε 1cm. Καλάμια με μήκος 10cm χωρίστηκαν σε 10 ίσα μέρη του 1cm , μετρήθηκαν τα περιθήκια που είχε το κάθε καλάμι ανά εκατοστό με την βοήθεια στερεοσκοπίου

Η ανάλυση περιλάμβανε την καταγραφή των περιθηκίων σύμφωνα με το περιθήκιο του γένους του κάθε παθογόνου και των χαρακτηριστικών μαύρων στιγμάτων που υποδηλώνουν την παρουσία του μύκητα - κατά μήκος του κάθε καλαμιού, ανά εκατοστό(cm). Η παρατήρηση έγινε με τη χρήση στερεοσκοπίου, ώστε να καταμετρηθεί με ακρίβεια ο αριθμός των περιθηκίων σε κάθε τμήμα του καλαμιού. Ακολούθως, επιλεγμένα περιθήκια εξετάστηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο, σε μεγέθυνση 400X, προκειμένου να καταγραφεί ο αριθμός των ασκών ανά περιθήκιο, καθώς και ο αριθμός των ασκoσπορίων που περιείχε κάθε ασκός.

Στο εργαστήριο, αρχικά πραγματοποιήθηκε παρατήρηση καλαμιών στο στερεοσκόπιο, με σκοπό τη μακροσκοπική αναγνώριση των περιθηκίων του παθογόνου *Ptr* ή του *Stb*. Στον καλάμι ήταν εμφανής η παρουσία των χαρακτηριστικών μαύρων περιθηκίων, και η ύπαρξη σεταίων όπως απεικονίζεται στην εικόνα 8.

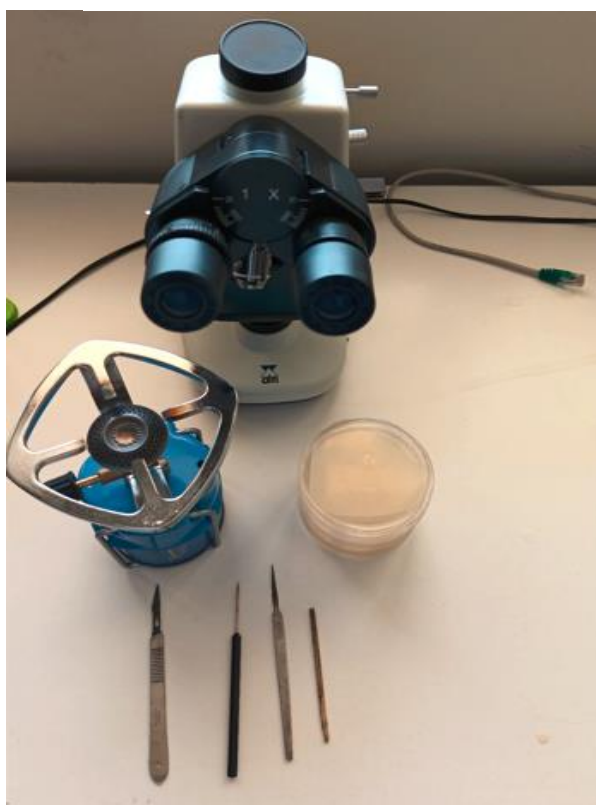
Ένα ιδιαίτερο μορφολογικό χαρακτηριστικό των περιθηκίων του *P. tritici-repentis* είναι η παρουσία σεταίων, δηλαδή λεπτών, σκουρόχρωμων τριχιδίων που εκφύονται από την επιφάνεια των περιθηκίων. Τα σέταια αποτελούν διαγνωστικό μορφολογικό γνώρισμα του συγκεκριμένου παθογόνου και επιτρέπουν τη διαφορική διάγνωση από άλλους φυτοπαθογόνους μύκητες (Εικόνα 8). Από τα περιθήκια, μέσω των σεταίων, απελευθερώνονται τα ασκοσπόρια, τα οποία διασπείρονται και είναι υπεύθυνα για την πρόκληση αρχικής μόλυνσης στο αγροτεμάχιο υπό κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Παράλληλα, δημιουργήθηκε μικροσκοπικό παρασκεύασμα για την περαιτέρω παρατήρηση των περιθηκίων στο οπτικό μικροσκόπιο. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε με χρήση χρωστικού υλικού, ώστε να αναδειχθούν ευκρινέστερα οι ασκοί στο εσωτερικό κάθε περιθηκίου και να υπολογιστεί ο αριθμός των ασκοσπορίων ανά ασκό.

Κάθε καλάμι χωρίστηκε σε 10 ισαπέχουσα τμήματα (segments), από τη βάση μέχρι την κορυφή. Η διαίρεση αυτή έγινε με τη χρήση χάρακα, ώστε να διασφαλιστεί η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια της μεθόδου. Η επιφάνεια κάθε τμήματος παρατηρήθηκε υπό οπτικό μικροσκόπιο με μεγέθυνση κατάλληλη για την ανάδειξη των καρποφοριών (Περιθηκίων). Για κάθε τμήμα καταγράφηκε ο αριθμός των καρποφοριών που ήταν ορατές μικροσκοπικά, ανεξαρτήτως του είδους του μύκητα που τις παρήγαγε. Ο τρόπος καταμέτρησης διαφαίνεται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 11: Καλάμια σκληρού σπαραγίου από τα οποία πάρθηκε δείγμα για την παρατήρηση των περιθηκίων. (Καθηγητής Ι. Βαγγέλας, εργαστήριο φυτοπαθολογίας Π.Θ)



Εικόνα 6: Οπτικός εξοπλισμός και εργαλεία μικροχειρισμού που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία παρατήρησης των καλάμιων σίτου. Διακρίνεται στερεοσκοπικό μικροσκόπιο, καυστήρας αερίου για αποστείρωση εργαλείων, δίσκος με θρεπτικό υπόστρωμα και εργαλεία όπως νυστέρι, λαβίδες και βελόνες παρασκευής. Ο εξοπλισμός χρησιμοποιήθηκε για την ακριβή τομή και προετοιμασία των δειγμάτων προς μικροσκοπική ανάλυση.



Εικόνα 7: κηλίδες (*tan spots*) στα φύλλα των προσβεβλημένων φυτών *Ptr.*

Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται στα φύλλα, ως ελλειπτικές-φακοειδείς κηλίδες καστανού χρώματος περιβαλλόμενες από έντονη, κίτρινη ζώνη. Με την παρουσία υγρού καιρού, στο κέντρο της κηλίδας εμφανίζεται ένα σκούρο στίγμα (εξ ου και το όνομα «*tan spot*»). Οι κηλίδες αυτές σταδιακά συνενώνονται κι εξελίσσονται σε νεκρώσεις του ελάσματος. Οι καρποφορίες που σχηματίζονται στις κηλίδες, καθ' όλη την διάρκεια της βλαστικής περιόδου, είναι κονιδιοφόροι που παράγουν πολυκύτταρα σπόρια (κονίδια). Τα κονίδια μεταφέρονται από τον αέρα και τις σταγόνες της βροχής και δημιουργούν νέες μολύνσεις σε άλλα φύλλα.



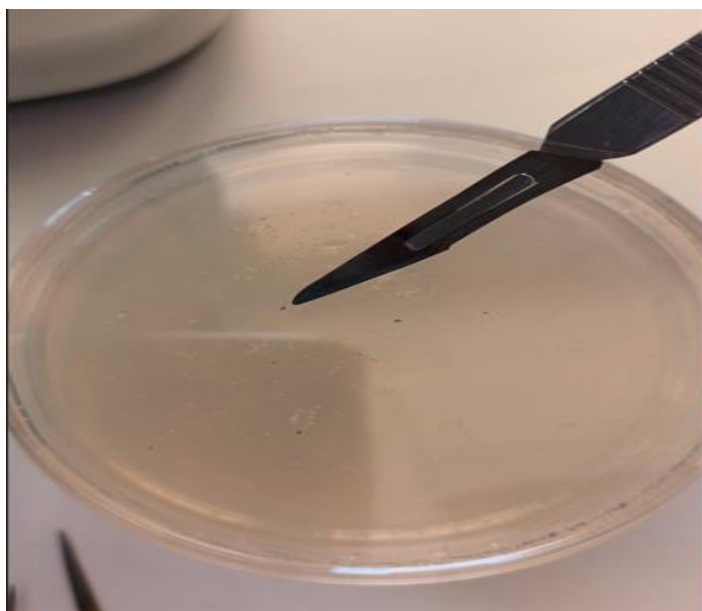
Εικόνα 8: Δείγματα καλαμιού σκληρού σίτου (*Triticum durum*) με εμφανείς ζώνες νέκρωσης και αλλοιώσεων, πιθανώς λόγω προσβολής από μύκητες του γένους *Zymoseptoria* ή *Pyrenophora*. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από προσβεβλημένα φυτά και χρησιμοποιήθηκαν για μικροσκοπική καταμέτρηση καρποφοριών κατά μήκος του στελέχους. Η τοποθέτηση χάρακα χρησιμοποιήθηκε για την ομοιόμορφη διαίρεση των δειγμάτων σε 10 ισαπέχοντα (ανά cm) τμήματα (segments).



Εικόνα 9: Καλάμι σπαριού μετρημένο σε εκατοστά για τον ακριβή καθορισμό των τμημάτων (segments) προς μικροσκοπική παρατήρηση. Κάθε καλάμι χωρίστηκε σε 10 ίσα μέρη από τη βάση (λαιμός) ως την κορυφή, με στόχο την αξιολόγηση της χωρικής κατανομής των καρποφοριών.



Εικόνα 16: Αφαίρεση καρποφοριών (περιθηκίων) με την χρήση νυχτερινού προκειμένου να γίνει ανάπτυξη και παρατήρηση του παθογόνου σε τριβλίο



Εικόνα 17: Στιγμιότυπο από τοποθέτηση δείγματος σε τρυβλίο Petri. Το νυστέρι χρησιμοποιείται για να μεταφερθεί μικρό τεμάχιο από το καλάμι στον θρεπτικό παράγοντα, στο πλαίσιο προκαταρκτικής εργαστηριακής παρατήρησης ή καλλιέργειας.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση DNA για την ταυτοποίηση ειδών φυτοπαθογόνων μυκήτων στην καλαμιά έγινε με την μέθοδο CTAB με λειοτρίβηση με υγρό άζωτο του τμήματος της καλαμιάς που φέρουν τα μολύσματα σε αποστειρωμένο γουδί μέχρι να προκύψει λεπτή και ομοιογενής σκόνη. Η απομόνωση του DNA με τη μέθοδο CTAB

(https://opsdiagnostics.com/notes/protocols/ctab_protocol_for_plants.htm), πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά τη διάρκεια δύο σταδίων όπως παρουσιάζεται παρακάτω.

ΜΕΘΟΔΟΣ CTAB: ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 1^{ου} Σταδίου

- Σε σωληνάριο Eppendorf των 2 ml τοποθετείται ποσότητα φυτικού ιστού και προστίθενται 800 μ l διαλύματος CTAB και 10 μ l β -μερκαπτοαιθανόλης ανά δείγμα και κατόπιν ακολουθεί ανάδευση (vortex) για 10 δευτερόλεπτα.
- Γίνεται επώαση δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 65°C για 30 λεπτά και ανά 10 λεπτά ανάδευση με vortex.
- Γίνεται φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό (rpm) για 10 λεπτά και έπειτα μεταφέρεται το supernatant σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο των 2 ml.
- Στο δείγμα προστίθενται 800 μ l χλωροφόρμιο και αναδεύεται με vortex για 10 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί η φυγοκέντρηση στους 7.000 rpm για 20 λεπτά, και έπειτα η ανώτερη φάση μεταφέρεται σε νέο μικροσωληνάριο των 1,5 ml.
- Επαναλαμβάνεται η διαδικασία από τη φυγοκέντρηση και μετά.
- Στο καθαρό supernatant προστίθενται: α) Ισοπροπανόλη: 2/3 του όγκου του δείγματος και β) Οξικό νάτριο (3M): 1/10 του όγκου του δείγματος, και η ανάμιξη γίνεται απαλά με pipetting.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στην κατάψυξη στους -20°C και παραμένουν όλη τη νύχτα.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΤΑΒ: ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 2^{ου} Σταδίου

Μετά το πέρας της κατάψυξης στους -20°C, στα δείγματα πραγματοποιήθηκε,

- φυγοκέντρωση στις 10.000 rpm για 10 λεπτά και απομακρύνθηκε το supernatant.
- Στο ίζημα προστέθηκε με 1 ml αιθανόλης 70%, έγινε φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά, και απομακρύνθηκε το supernatant. Επαναλήφθηκε η προσθήκη αιθανόλης, η φυγοκέντρωση και η απομάκρυνση του supernatant.
- Μετά από 10 λεπτά, χρόνος για να απομακρυνθεί η αλκοόλη προστέθηκε 50 µl διαλύματος TE και 2 µl RNase και το δείγμα επωάζεται στους 37°C για 45 λεπτά, αναδεύοντας με πιπέτα.
- Το δείγμα χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή προϊόντων PCR.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Στη διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο MasterMix

MASTER MIX	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (Για 1 δείγμα)
DNA	2µL
dNTP's	0.5µL
MgCl ₂	0.75µL
Buffer	2.5µL
Primer F (1270)	1µL
Primer R (1273)	1µL
Taq	0.5µL
H ₂ O	16.75µL
TOTAL	25µL

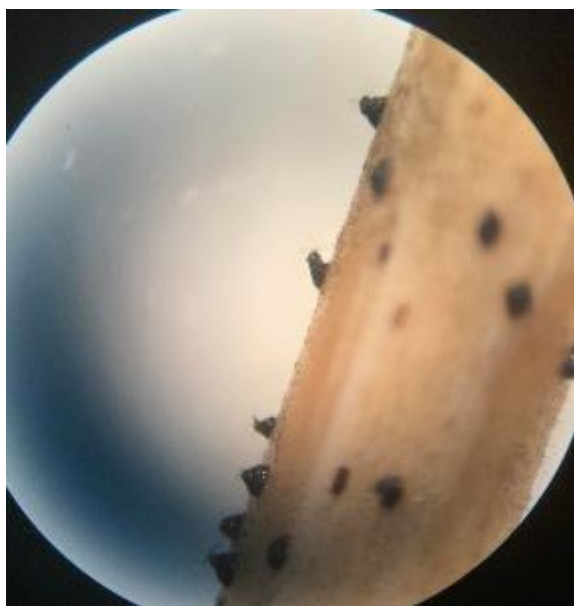
Πίνακας 1 : MasterMix που χρησιμοποιήθηκε για την διαδικασία της PCR

Στατιστική ανάλυση

Η καταγραφή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε αρχικά σε υπολογιστικό φύλλο Excel. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με χρήση του στατιστικού πακέτου JASP ([JASP - A Fresh Way to Do Statistics](#)). Υπολογίστηκαν μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις για τον αριθμό των καρποφοριών ανά τμήμα, ενώ για τη διερεύνηση ύπαρξης στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των σημείων του καλαμιού εφαρμόστηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA μονής κατεύθυνσης).

Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο επίπεδο $p < 0.05$. Το μοντέλο της ANOVA περιελάμβανε ως ανεξάρτητη μεταβλητή το τμήμα του καλαμιού (segment: 1 έως 10) και ως εξαρτημένη μεταβλητή τον αριθμό καρποφοριών. Ο σχεδιασμός της ανάλυσης επιτρέπει την αξιολόγηση πιθανής προτίμησης των μυκήτων για συγκεκριμένα σημεία του φυτικού ιστού, βάσει του αριθμού αναπαραγωγικών δομών που καταγράφηκαν σε κάθε θέση.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 18(αριστερά): Περιθήκια πάνω στο καλάμι του σπαριού όπως παρατηρήθηκαν με την χρήση στερεοσκοπίου, με σκοπό την αναγνώριση-διάκριση του παθογόνου μύκητα (Καθηγητής Ι. Βαγγέλας, εργαστήριο φυτοπαθολογίας Π.Θ)



Εικόνα 19(δεξιά): Παρατήρηση δείγματος καλαμιού σκληρού σίτου με χρήση ψηφιακού μικροσκοπίου USB, συνδεδεμένου με υπολογιστή. Η εικόνα του δείγματος προβάλλεται σε πραγματικό χρόνο στην οθόνη και καταγράφεται για σκοπούς καταμέτρησης των καρποφοριών κατά μήκος του στελέχους.



Εικόνα 20: Μικροσκοπική εικόνα από οπτικό φακό, όπου διακρίνεται καρποφορία μύκητα(περιθήκιο) πάνω σε καλάμι σκληρού σίτου. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε μέσω στερεοσκοπίου, με στόχο την καταμέτρηση του αριθμού των περιθηκίων κατά μήκος του καλαμιού.

Καθώς Θεωρείται σχετικά δύσκολο να διακριθούν τα συμπτώματα του μύκητα *pyrenophora tritici-repentis* από αυτά που προκαλούνται από τον μύκητα *Septoria tritici*. Η ασφαλής διάγνωση γίνεται με στερεοσκοπική ή μικροσκοπική εξέταση και μοριακή ανάλυση των καρποφοριών του μύκητα (περιθήκια) όπως βλέπουμε στην παραπάνω εικόνα, ώστε να εντοπίσουμε εάν υπάρχει παρουσία του μύκητα *pyrenophora tritici-repentis*. Στην προκειμένη περίπτωση παρατηρήσαμε με το στερεοσκόπιο (Βλ. Εικόνα18) τα χαρακτηριστικά σετσαί και μέσω των μοριακών αναλύσεων που αναδείχθηκαν νωρίτερα οδηγηθήκαμε στο ασφαλές συμπέρασμα πως πρόκειται για τον μύκητα *Ptr*.

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Για την ανάλυση του δείγματος χρησιμοποιήθηκε η διορθωμένη αλληλουχία μέσω του προγράμματος CHROMAS και στη συνέχεια με το εργαλείο BLAST μέσω της ιστοσελίδας <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τα οποία ενισχύουν την αρχική μας υπόθεση ότι το γενετικό υλικό μυκητολογικής προέλευσης της καλαμιάς οφείλεται στον μύκητα *Pyrenophora tritici repentis*.

Αποτελέσματα αλληλούχισης, ITS region - Sequence

```
CATTACACAAATATGAAGCCGGAGTGGGATAGGGCCTCGCTGCCTTGCCC  
GTCTGGCGCCATATTCACCCATGTCTTTTTGCGTACTACTTGTTCCTTGGC  
GGGTCCGCCCGCCAATTGGACCTTATTCAAACCTTTTTTTTCAGTTGCAATC  
AGCGTCAGCTAAACAAATGTAATCAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTT  
GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATT  
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT  
ATTCCAAAGGGCACGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCT  
TGGTGTGTTGGGCGTTTTGTCTCTCTCCCGAGACTCGCCTTAAAATCATTGGC  
AGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACATTATTTGCGCTCTTGTCCAG  
CCGCGGCCGCGCGTCAATGAAGCTTCTTTCAACCTTTTGACCTCGGATCAG  
GTAGG
```

Αποτελέσματα του BLAST, BLAST RESULTS

☒ select all	100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer			
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
☒	Pyrenophora tritici-repentis isolate USDA10A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pyrenophora tritici-repentis	928	928	100%	0.0	99.03%	517	AY739821.1
☒	Pyrenophora tritici-repentis isolate WR4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pyrenophora tritici-repentis	924	924	100%	0.0	98.84%	522	AY739862.1
☒	Pyrenophora tritici-repentis isolate AKLON-A1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pyrenophora tritici-repentis	924	924	100%	0.0	98.84%	529	AY739827.1
☒	Pyrenophora tritici-repentis isolate B208-44F small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pyrenophora tritici-repentis	922	922	100%	0.0	98.84%	651	PP175310.1
☒	Pyrenophora tritici-repentis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pyrenophora tritici-repentis	922	922	100%	0.0	98.84%	576	EF452481.1

Pyrenophora tritici-repentis isolate USDA10A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [AY739821.1](#) Length: 517 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 1 to 517 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
928 bits(502)	0.0	512/517(99%)	0/517(0%)	Plus/Plus
Query 1	CATTACACAAATATGAAGCCGGAGTGGGATAGGGCTCGCTGCCTTGCCCGTCTGGCGCC	60		
Sbjct 1	CATTACACAAATATGAAGCCGGAGTGGGATAGGGCTCGCTGCCTTGCCCGTCTGGCGCC	60		
Query 61	ATATTACCCATGCTCTTTTGGCTACTTGTTCCTTGGCGGGTCCGCCGCCCAATTG	120		
Sbjct 61	ATATTACCCATGCTCTTTTGGCTACTTGTTCCTTGGCGGGTCCGCCGCCCAATTG	120		
Query 121	GACCTTATTCAAACCTTTTTTTCAGTTGCAATCAGCGTCAGCTAAACAAATGTAATCAA	180		
Sbjct 121	GACCTTATTCAAACCTTTTTTTCAGTTGCAATCAGCGTCAGCTAAACAAATGTAATCAA	180		
Query 181	TTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGGAATGC	240		
Sbjct 181	TTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGGAATGC	240		
Query 241	GATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC	300		
Sbjct 241	GATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC	300		
Query 301	CCTTTGGTATTCCAAGGGCAGCGCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCCTCAAGCTTTGCTT	360		
Sbjct 301	CCTTTGGTATTCCAAGGGCAGCGCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCCTCAAGCTTTGCTT	360		
Query 361	GGTGTGGGCGTTTTGTCTCTCTCCGAGACTCGCCTTAAATCATTGGCAGCCGGCCCTA	420		
Sbjct 361	GGTGTGGGCGTTTTGTCTCTCTCCGAGACTCGCCTTAAATCATTGGCAGCCGGCCCTA	420		
Query 421	CTGGTTTCGGAGCGCAGCACATTATTGCGCTCTTGTCCAGCCGCGCCGCGCTCAATG	480		
Sbjct 421	CTGGTTTCGGAGCGCAGCACATTATTGCGCTCTTGTCCAGCCGCGCTCGCGCTCCATG	480		
Query 481	AAGCTTCTTTCAACCTTTTGACCTCGGATCAGGTAGG	517		
Sbjct 481	AAGCTTCTTTCAACCTTTTGACCTCGGATCAGGTAGG	517		

Εφόσον μετρήθηκαν όλα τα καλαμάκια με την μέθοδο που αναδείξαμε νωρίτερα, πήραμε το μέσο όρο περιθηκίων ανά εκατοστό (πχ στο 1ο εκατοστό έχουμε κατά μέσο όρο 33.6 περιθήκια) 1ο cm:34 , 2ο cm:29 , 3ο cm:25 , 4ο cm: 21 , 5ο cm: 20 , 6ο cm: 21 , 7ο cm: 19 , 8ο cm: 16 , 9ο cm: 17 και 10ο cm: 18 περιθήκια , Άρα συνολικά έχουμε κατά μέσο όρο $(34+29+25+21+20+21+19+16+17+18)=220$ περιθήκια , στα 10cm καλαμιού άρα στο 1cm κατά προσέγγιση έχουμε $220/10=22$ περιθήκια/cm

(Για ευκολία πράξεων και διότι δεν μπορεί να μετρηθεί 0.3 του περιθηκίου στρογγυλοποιήθηκαν οι μέσοι όροι ανά εκατοστό)

Λαμβάνοντας υπόψη λοιπόν ότι κάθε περιθήκιο περιέχει κατά μέσο ορο 55 ασκούς μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο, κάθε ασκός έχει 8 ασκοσπόρια και υπολογίζεται ότι σε 1 cm ιστού εντοπίζονται περίπου 34 περιθήκια , οπότε συνολικά έχουμε $22 \times 55 \times 8 = 9.680$ σπόρια του μήκη του γένους *Pyrenophora*.

Κάθε δείγμα καλαμιάς που χρησιμοποιήθηκε ήταν περίπου 10cm ,άρα σε ένα δείγμα καλαμιάς υπολογίστηκαν περίπου $9.680 \times 10 = 96.800$ σπόρια του γένους *Pyrenophora*.

Ο πίνακας παρουσιάζει περιγραφική στατιστική για τις μεταβλητές data 1 έως data 10, οι οποίες αντιστοιχούν σε τμήματα (segments) του καλαμιού. Για κάθε τμήμα εμφανίζεται ο αριθμός των έγκυρων παρατηρήσεων (Valid), ο μέσος όρος (Mean), το σφάλμα του μέσου (Std. Error of Mean), η τυπική απόκλιση (Std. Deviation), καθώς και οι ελάχιστες (Minimum) και μέγιστες τιμές (Maximum).

Ο αριθμός των έγκυρων παρατηρήσεων για τα segments 1-10 κυμαίνεται από 17 έως 39, με τα περισσότερα τμήματα να διαθέτουν 39 τιμές. Οι μέσοι όροι των καταγραφών κυμαίνονται από 33.615 (data 1) έως 18,2 (data 10). Η τυπική απόκλιση είναι υψηλότερη στα πρώτα τμήματα (π.χ. data 1: 17.462), ενώ

μειώνεται προοδευτικά σε άλλα (π.χ. data 6: 12.317). Οι μέγιστες τιμές φτάνουν έως 61 σε αρκετά τμήματα, ενώ οι ελάχιστες κυμαίνονται από 0 έως 4.

Το εύρος των τιμών, σε συνδυασμό με τη διακύμανση μεταξύ των segments, καταδεικνύει διαφοροποίηση στις παρατηρούμενες μετρήσεις ανά τμήμα του καλαμιού.

Πίνακας 2: Περιγραφική στατιστική για τον αριθμό καρποφοριών ανά τμήμα (segment) του καλαμιού σκληρού σίτου. Για κάθε τμήμα παρουσιάζονται οι έγκυρες παρατηρήσεις, ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση, το σφάλμα του μέσου, καθώς και οι ελάχιστες και μέγιστες τιμές.

Descriptive Statistics

	data								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Valid	39	39	39	39	39	38	36	30	22
Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	33.615	28.667	24.615	21.103	19.615	20.895	19.194	16.200	16.864
Std. Error of Mean	2.796	2.845	2.465	2.094	1.972	2.283	2.440	2.357	3.145
Std. Deviation	17.462	17.767	15.392	13.078	12.317	14.073	14.640	12.912	14.753
Minimum	1.000	1.000	2.000	1.000	3.000	3.000	4.000	3.000	3.000
Maximum	61.000	61.000	55.000	52.000	53.000	58.000	57.000	51.000	58.000

Ο πίνακας παρουσιάζει περιγραφικά στατιστικά για τα segments 1 έως 14. Σε σχέση με τον προηγούμενο πίνακα, εδώ περιλαμβάνονται και επιπλέον πέντε τμήματα (data 10 έως 14), στα οποία παρατηρείται σημαντική μείωση του αριθμού έγκυρων παρατηρήσεων .

Συγκεκριμένα, οι στήλες data 1-9 διαθέτουν από 30 έως 39 έγκυρες τιμές, με τα περισσότερα τμήματα να διαθέτουν 39 τιμές περιθηκίων, ενώ οι στήλες data 10-14 περιλαμβάνουν σταδιακά λιγότερες παρατηρήσεις (17, 8, 4, 3 και 2 αντίστοιχα). Η μείωση αυτή επηρεάζει και τη στατιστική αξιοπιστία των μέσων

όρων και των τυπικών αποκλίσεων σε αυτά τα τμήματα όσο αφορά τα περιθώκια.

Πίνακας 3: Περιγραφική στατιστική για τον αριθμό καρποφοριών ανά τμήμα του καλαμιού (segments 1-14). Οι στήλες data 10 έως 14 περιλαμβάνουν λιγότερες παρατηρήσεις και παρουσιάζονται συμπληρωματικά σε σχέση με τα πλήρη δεδομένα των segments 1-9.

Descriptive Statistics

	data													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Valid	39	39	39	39	39	38	36	30	22	17	8	4	3	2
Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	33.6	28.6	24.6	21.1	19.6	20.8	19.1	16.2	16.8	18.2	14.0	16.2	16.6	8.50
Std. Deviation	17.4	17.7	15.3	13.0	12.3	14.0	14.6	12.9	14.7	14.3	8.21	12.9	10.5	6.36
Minimum	1.00	1.00	2.00	1.00	3.00	3.00	4.00	3.00	3.00	0.00	0.00	5.00	6.00	4.00
Maximum	61.0	61.0	55.0	52.0	53.0	58.0	57.0	51.0	58.0	58.0	27.0	33.0	27.0	13.0

Ο πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τη μεταβλητή "data", σε σχέση με τη θέση (segment) στο καλάμι. Η ανάλυση περιλαμβάνει 9 επίπεδα της ανεξάρτητης μεταβλητής (segment 1 έως 9) και 313 συνολικές παρατηρήσεις (df = 320, με 8 βαθμούς ελευθερίας για τα segments και 312 για τα υπολείμματα).

Το άθροισμα τετραγώνων για τη μεταβλητή "segment" ανέρχεται σε 9228.682 και για τα υπολείμματα (residuals) σε 69084.557. Ο μέσος όρος τετραγώνων είναι 1153.585 για τα segments και 221.425 για τα residuals. Η τιμή του

στατιστικού F είναι 5.210 και το επίπεδο σημαντικότητας είναι μικρότερο του 0.001 ($p < .001$), γεγονός που δείχνει την ύπαρξη σημαντικής διακύμανσης στις τιμές μεταξύ των segments.

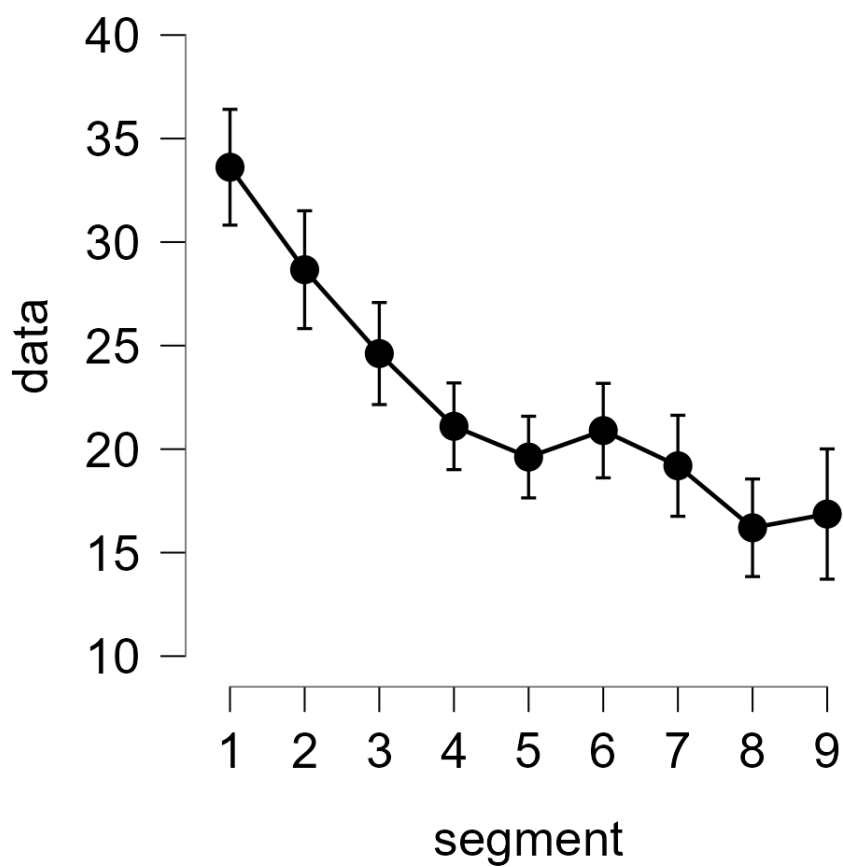
Πίνακας 4: Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για τον αριθμό καρποφοριών κατά μήκος των τμημάτων του καλαμιού. Η μεταβλητή "segment" περιλαμβάνει 9 επίπεδα (θέσεις στο καλάμι), ενώ η στατιστική σημαντικότητα εντοπίζεται σε επίπεδο $p < .001$.

ANOVA - data					
Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
segment	9228.682	8	1153.585	5.210	< .001
Residuals	69084.557	312	221.425		

Note. Type III Sum of Squares

Το γράφημα παρουσιάζει τη μέση τιμή του αριθμού καρποφοριών (άξονας y) για κάθε τμήμα του καλαμιού (segments 1-9, άξονας x), συνοδευόμενη από τις ράβδους διακύμανσης (standard error). Παρατηρείται σταδιακή μείωση των μέσων όρων από το segment 1 έως το segment 9.

Η μεταβλητότητα (error bars) είναι μεγαλύτερη στα πρώτα τμήματα (segments 1-3), ενώ σταθεροποιείται περισσότερο στα μεσαία και προς τα άκρα. Η γραφική απεικόνιση υποστηρίζει τα ευρήματα της περιγραφικής στατιστικής και της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA), επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη διαφοροποίησης μεταξύ των θέσεων στο καλάμι.



Διάγραμμα 1: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα για τον αριθμό καρποφοριών (περιθήκια) ανά τμήμα (segment) του καλαμιού. Οι τιμές αντιστοιχούν σε σημεία παρατήρησης κατά μήκος του φυτικού ιστού, από τη βάση (segment 1) προς την κορυφή (segment 9).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην μακροσκοπική , μικροσκοπική καταγραφή και την μοριακή ανάλυση καρποφοριών και συγκεκριμένα εγγενούς αναπαραγωγής (περιθήκια) των 2 παθογόνων (*Zymoseptoria tritici* και *Pyrenophora tritici-repentis*) ώστε να διαπιστωθεί ποιο από τα 2 ή και τα 2 παθογόνα έχουν προσβάλει το καλάμι του σκληρού σίτου (*Triticum durum*) που εξετάσαμε. Οι δύο αυτοί φυτοπαθογόνοι μύκητες είναι ευρέως διαδεδομένοι στην καλλιέργεια του σιταριού και παρουσιάζουν σημαντικό φυτοπαθολογικό ενδιαφέρον, καθώς προκαλούν σοβαρές απώλειες παραγωγής.

Στο εργαστήριο, αρχικά πραγματοποιήθηκε παρατήρηση καλαμιών στο στερεοσκόπιο , με σκοπό τη μακροσκοπική αναγνώριση των περιθηκίων του παθογόνου *Ptr* ή του *Stb* , στο καλάμι ήταν εμφανής η παρουσία των μαύρων καρποφόρων εγγενούς αναπαραγωγής (περιθήκια) και η ύπαρξη εξωτερικά των καρποφόρων χαρακτηριστικών εξαρτημάτων (setae), και βάση της μοριακής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε , οδηγούμαστε στο ασφαλές συμπέρασμα ότι πρόκειται για το παθογόνο *pyrenophora tritici-repentis* .

Η ανάλυση βασίστηκε στην καταγραφή των καρποφοριών σε 10 ισαπέχοντα τμήματα ανά καλάμι, χωρίς διαχωρισμό ανά είδος μύκητα. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε στα υλικά, τα δείγματα είχαν κατηγοριοποιηθεί ως προς την κυρίαρχη παρουσία του ενός ή του άλλου παθογόνου. Παρ' όλα αυτά, τα αποτελέσματα αναλύθηκαν αθροιστικά.

Τα αποτελέσματα της περιγραφικής στατιστικής έδειξαν σαφή διακύμανση στον αριθμό των καρποφοριών μεταξύ των τμημάτων. Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος των καρποφοριών ήταν υψηλότερος στα αρχικά segments (1–3), δηλαδή προς τη βάση του καλαμιού, και μειωνόταν σταδιακά όσο πλησίαζαν τα τμήματα προς την κορυφή (segments 8–10). Ο υψηλότερος μέσος όρος παρατηρήθηκε στο segment 1 ($M = 33,615$), ενώ οι μικρότερες τιμές καταγράφηκαν στα segments 9 και 10 ($M = 16,864$ και $M = 18,294$, αντίστοιχα), με επιπλέον πτώση στα συμπληρωματικά segments 11–14. Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) κατέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα τμήματα ($F = 5,210$, $p < .001$), επιβεβαιώνοντας ότι η θέση στο καλάμι επηρεάζει σημαντικά την

ποσότητα (αριθμό) των καρποφοριών εγγενούς αναπαραγωγής (περιθήκια) που σχηματίζονται.

Η καταμέτρηση αυτή δεν εγγυάται ακριβή εκτίμηση της ζημιάς, καθώς αυτός ο τύπος μέτρησης δεν συσχετίζεται με την σοβαρότητα της ασθένειας και την απώλεια παραγωγής, μιας και οι μετρηθείσες πολλαπλασιαστικές μονάδες δεν έχουν την ίδια ικανότητα παθογένεσης. Για αυτούς λοιπόν τους λόγους, εκτός από την μέτρηση του παθογόνου, είναι απαραίτητο να λάβει χώρα επιπλέον και μέτρηση της ασθένειας, συνδυάζοντας τους παράγοντες πολλαπλασιαστικές μονάδες-προσβεβλημένοι φυτικοί ιστοί μέσω της μέτρησης της έντασης προσβολής. Για την ολοκληρωμένη διαχείριση του παθογόνου αιτίου μέσω της εφαρμογής κατάλληλων μέτρων είναι αναγκαίο να ληφθούν υπόψη: α) το στάδιο του βιολογικού κύκλου του παθογόνου αιτίου, β) το στάδιο ανάπτυξης του σιτηρού.

Σχετικά με τον παράγοντα (α), στην παρούσα εργασία μελετώνται οι καρποφορίες εγγενούς αναπαραγωγής που παράλληλα αποτελούν και τις διαχειμάζουσες μορφές του παθογόνου δηλαδή τα περιθήκια που δίνουν το αρχικό μόλυσμα, τα ασκοσπόρια τα οποία ευθύνονται για τις πρωτογενείς μολύνσεις σε φυτικούς ιστούς στους οποίους μεταφέρονται μέσω του ανέμου και προκαλούν σοβαρή προσβολή συχνά μαζί με φυτοπαθογόνους μύκητες του γένους *Septoria*, . σχηματίζοντας σύμπλοκα κηλιδώσεων στα φύλλα από το στάδιο του φυτρώματος έως το στάδιο του 'φύλλου-σημαίας. Γνωρίζοντας ότι τα μολυσμένα φυτικά υπολείμματα της καλλιέργειας ευθύνονται για τη διατήρηση του μύκητα καθώς σε αυτά υπάρχουν τα περιθήκια, τότε καλό θα ήταν να επιλέγουμε την καλλιεργητική διαχείριση.

Σχετικά με τον παράγοντα (β), έχοντας υπόψη ότι τα περιθήκια που υπάρχουν στο καλάμι αποτελούν διαχειμάζουσες μορφές του μύκητα και μπορούν να απελευθερώσουν ασκοσπόρια σε όλη την καλλιεργητική περίοδο, θα πρέπει να προληφθεί η καταστροφή του 'φύλλου-σημαίας' η οποία επιδρά δυσμενώς στην ποσοτική και ποιοτική απόδοση του σίτου μέσω εφαρμογής μυκητοκτόνων. Επομένως για μια ολοκληρωμένη καλλιεργητική διαχείριση του παθογόνου αιτίου, αρχικά συνίσταται η προτίμηση ανθεκτικών ποικιλιών σίτου, έχοντας τη γνώση ότι το μαλακό σιτάρι είναι λιγότερο ευαίσθητο από το σκληρό σιτάρι.

Επίσης προτείνεται η μεσολάβηση αρκετών ετών μεταξύ των σπορών σίτου και άλλων φυτών με την εφαρμογή αμειψισποράς με φυτά-μη ξενιστές. Ακόμη η αποσύνθεση και η καταστροφή των καλαμιών (καλαμιάς) του σιτηρού και των υπολειμμάτων καλλιεργειών περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου αιτίου και τις πρωτογενείς μολύνσεις.

Η κατανομή αυτή των καρποφοριών ενδέχεται να σχετίζεται με τη φυσιολογία του φυτού και τις συνθήκες ανάπτυξης των μυκήτων. Όπως έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία, ο *Z. tritici* αναπτύσσεται κυρίως σε κατώτερα φύλλα και ιστούς, ιδίως όταν επικρατούν συνθήκες υψηλής υγρασίας και μέτριων θερμοκρασιών (Eyal, 1999). Η παρουσία καρποφοριών σε χαμηλότερα τμήματα του καλαμιού συνάδει με τη γνωστή βιολογική συμπεριφορά του παθογόνου, το οποίο εκκινεί την προσβολή από τα κατώτερα φύλλα και επεκτείνεται προς τα επάνω. Αντίστοιχα, ο *P. tritici-repentis*, που προκαλεί την κηλίδωση των φύλλων του σιταριού (*tan spot*), έχει επίσης καταγραφεί να σχηματίζει πυκνές καρποφορίες στους χαμηλότερους ιστούς, όπου η υγρασία παραμένει περισσότερο και ο ιστός είναι παλαιότερος και πιο ευάλωτος σε αποικοδόμηση (Krupinsky, 1992· Rees & Platz, 1983).

Η σταδιακή μείωση των καρποφοριών στα ανώτερα τμήματα του καλαμιού (καλαμιάς του σιτηρού) μπορεί να ερμηνευθεί σε σχέση με τη λιγότερη παραμονή υγρασίας στα σημεία αυτά, τη μεγαλύτερη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία και τη μικρότερη συγκέντρωση θρεπτικών ουσιών στους ώριμους ιστούς. Επιπλέον, τα ανώτερα σημεία του καλαμιού ενδέχεται να προσβάλλονται σε μεταγενέστερο στάδιο ανάπτυξης, με αποτέλεσμα να μην έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία παραγωγής καρποφοριών μέχρι τη στιγμή της συλλογής των δειγμάτων.

Η ερμηνεία των παραπάνω ενισχύεται από το θεωρητικό υπόβαθρο που παρατίθεται στο πρώτο μέρος της εργασίας, όπου γίνεται αναφορά στις οικολογικές και φυσιολογικές απαιτήσεις των δύο παθογόνων. Συγκεκριμένα, τόσο ο *Z. tritici* όσο και ο *P. tritici-repentis* προτιμούν περιοχές του φυτού με μεγαλύτερη σχετική υγρασία και πυκνότερη βλάστηση, δηλαδή τα κατώτερα

σημεία. Αυτή η προτίμηση πιθανώς συνδέεται και με τη διασπορά των σπορίων τους, η οποία διευκολύνεται από την απορροή υδάτων και την εγγύτητα με το έδαφος. Επομένως, η συγκέντρωση των καρποφοριών στη βάση του καλαμιού δεν αποτελεί απλώς ένα στατιστικό εύρημα, αλλά εντάσσεται στη γενικότερη παθογενετική στρατηγική των δύο μυκήτων.

Η παρατήρηση αυτή αποκτά μεγαλύτερη σημασία υπό το πρίσμα των πορισμάτων της μελέτης των Cotuna et al. (2022), στην οποία επισημαίνεται ότι η παρουσία του *P. tritici-repentis* σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης των φυτών είναι εντονότερη στη βάση του στελέχους. Ομοίως, σύμφωνα με τους Román Ramos et al. (2024), η πρόσληψη αζώτου και πυριτίου σχετίζεται με τη διαφοροποιημένη ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών, ενδεχομένως επηρεάζοντας τη θέση εντοπισμού των καρποφοριών. Επιπλέον, η εργασία των Ouaja et al. (2020) αναδεικνύει την ποικιλομορφία στην αντίσταση διαφόρων ποικιλιών σκληρού σίτου στον *Z. tritici*, κάτι που ίσως εξηγεί την ενδοομαδική διακύμανση στην ένταση της προσβολής, ακόμα και εντός ίδιου τμήματος.

Τέλος, οι σπόροι (κόκκοι του σιτηρού) που έχουν υποστεί επεξεργασία με Systiva μπορούν να ελαχιστοποιήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης *P. tritici-repentis* και *Septoria tritici*. Η επένδυση σπόρων με το μυκητοκτόνο Systiva (δ.ο fluxapyroxad) είναι ο πλέον κατάλληλος τρόπος πρόληψης της ασθένειας όπως αναφέρεται από τους Vagelas et al, (2022).

.

Τα επενδυτικά σπόρων μπορούν να προστατεύσουν από τις πρώιμες μολύνσεις του φθινοπώρου (τον χειμώνα οι χαμηλές θερμοκρασίες προκαλούν αναστολή της δημιουργίας σπορίων). Έτσι υπάρχει μείωση του τοπικού μολύσματος, που αργότερα θα μεταφέρει την ασθένεια στα νέα φύλλα υπό ευνοϊκές συνθήκες. (Καθηγητής Ι. Βαγγέλας, 2022).

Η πρακτική εφαρμογή των ευρημάτων αφορά κυρίως την ενίσχυση της γεωργικής διαχείρισης των καλλιεργειών. Αυτό πρέπει να γίνεται σε συνάρτηση με την παρατήρηση των καιρικών συνθηκών, καθώς τα παρατεταμένα διαστήματα βροχόπτωσης και υψηλής υγρασίας μεταφέρουν τα ασκοσπόρια και αυξάνουν την ένταση της προσβολής. Ακόμη, είναι μείζονος σημασίας να διατηρηθεί υγιές το «**φύλλο σημαία**», το οποίο είναι υπεύθυνο σε μεγάλο

ποσοστό για το γέμισμα του καρπού. Αυτό βρίσκεται ακριβώς κάτω από τον στάχυ. Καλό είναι να διατηρηθούν υγιή και τα αμέσως επόμενα φύλλα. Εφόσον οι συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη του παθογόνου θα πρέπει να εφαρμοστεί πρόγραμμα προληπτικών ψεκασμών. Στην συνέχεια εάν έχει ήδη μολυνθεί η καλλιέργεια πρέπει να γίνει ψεκασμός στο φύλλο σημαία του φυτού (τελευταίο φύλλο του φυτού στην κορυφή του), με κάποια Στρομπιλουρία (π.χ. *azoxystrobin*), ή μίγματα που περιέχουν τριαζόλες (π.χ. *propiconazole*, το *chlorophthanolin* κ.α.) Vagelas et al, (2022) .

Η στοχευμένη παρακολούθηση των χαμηλότερων τμημάτων του φυτού μπορεί να αποτελέσει πρώιμο δείκτη μόλυνσης και να συμβάλει στη λήψη έγκαιρων μέτρων περιορισμού της εξάπλωσης. Επιπλέον, η χρήση φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων θα μπορούσε να επικεντρωθεί σε περιοχές υψηλής καρποφορίας, ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα με λιγότερη περιβαλλοντική επιβάρυνση.

Βιβλιογραφία

Βαγγέλας Ι. 2020. Διδακτικές σημειώσεις Εργαστηρίου Μυκητολογικές Ασθένειες Χειμερινών Σιτηρών.

Abdullah, S. (2017). Characterization of *Pyrenophora Tritici-Repentis* in Wheat and Rye to Study Tan Spot Susceptibility and Insights Into Its Relationship with Stem Rust Resistance. Theses and Dissertations. 1183. <http://openprairie.sdstate.edu/etd/1183>

Alemu, A., Brazauskas, G., Gaikpa, D. S., Henriksson, T., Islamov, B., Jørgensen, L. N., Koppel, M., Koppel, R., Liatukas, Ž., Svensson, J. T., & Chawade, A. (2021). Genome-Wide Association Analysis and Genomic Prediction for Adult-Plant Resistance to *Septoria Tritici* Blotch and Powdery Mildew in Winter Wheat. *Frontiers in genetics*, 12, 661742. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.661742>

Andrie, R. M., Ciuffetti, L. M., & Turgeon, B. G. (2007). A gene cluster in *Cochliobolus victoriae* is responsible for biosynthesis of the host-selective toxin, victorin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(7), 790–799. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-7-0790>

Brennan, C.J., Benbow, H.R., Mullins, E., Doohan, F.M. (2019). A review of the known unknowns in the early stages of *septoria tritici* blotch disease of wheat. *Plant Pathology*, 68(8), 1427-1438. <https://doi.org/10.1111/ppa.13077>

Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2024, August 22). *wheat*. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/plant/wheat>

Ciufetti, L.M., Manning, V.A., Pandelova, I., Faris, J.D., Friesen, T.L., Strelkov, S.E., Weber, G.L., Goodwin, S.B., Wolpert, T.J., Figueroa, M. (2014). *Pyrenophora tritici-repentis*: A Plant Pathogenic Fungus with Global Impact. R. A. Dean et al. (eds.), *Genomics of Plant-Associated Fungi: Monocot Pathogens*, DOI: 10.1007/978-3-662-44053-7_1, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014. pp. 1-39.

- Cotuna, O., Popescu, G., & Popescu, M. (2022). Characterization of *Pyrenophora tritici-repentis* (tan spot of wheat) in Romania. *Phytopathologia Mediterranea*, 61(1), 3–13.
<https://oajournals.fupress.net/index.php/pm/article/view/13178>
- Cowger, C., McDonald, B. A., & Mundt, C. C. (2002). Frequency of Sexual Reproduction by *Mycosphaerella graminicola* on Partially Resistant Wheat Cultivars. *Phytopathology*, 92(11), 1175-1181.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.11.1175>
- Curtisa, B.C., Rajaram, S., Macpherson, H.G. (2002). *Bread Wheat: Improvement and production*. FAO Plant Production and Protection Series.
- De Wolf, E. (2008). *Septoria Tritici Blotch*. *Kstate Plant Pathology*, EP-133.
- De Wolf, E., Shroyer, J.P., Olson, B. (2011). *Wheat Disease Identification*. Kansas University.
- Del Pozo, A., Mendez-Espinoza, A.M., Castillo, D. (2023). Chapter 13-Triticale. In: M. Farooq & Siddique, K.H.M. *Neglected and Underutilized Crops*. Academic Press, pp. 352-362.
- Eyal, Z. (1999). *The Septoria diseases of wheat: Concepts and methods of disease management*. CIMMYT.
- Fones, H., & Gurr, S. (2015). The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: A review. *Fungal Genetics and Biology*
- Fraaije, B. A., Lovell, D. J., Coelho, J. M., Baldwin, S., & Hollomon, D. W. (2005). PCR-based assays to quantify *Zymoseptoria tritici* inoculum on wheat leaves and crop debris. *Phytopathology*, 95(11), 1331–1341.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1331>
- Ganeva, D., Filchev, L., Roumenina, E., Dragov, R., Nedyalkova, S., Bozhanova, V. (2024). Winter Durum Wheat Disease Severity Detection with Field Spectroscopy in Phenotyping Experiment at Leaf and Canopy Level. *Remote Sensing*, 16 (10), 1762. <https://doi.org/10.3390/rs16101762>

Guo, J., Zhou, L., Ma, Z. (2010). Development of a PCR-based method for detection of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Plant Disease*, 94(9), 1155–1161. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-9-1155>

Gourlie, R., McDonald, M., Hafez, M., Ortega-Polo, R., Low, K. E., Abbott, D. W., Strelkov, S. E., Daayf, F., & Aboukhaddour, R. (2022). The pangenome of the wheat pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* reveals novel transposons associated with necrotrophic effectors ToxA and ToxB. *BMC biology*, 20(1), 239. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01433-w>

Hailemariam, B.N., Kidane, Y. & Ayalew, A. Epidemiological factors of septoria tritici blotch (*Zymoseptoria tritici*) in durum wheat (*Triticum turgidum*) in the highlands of Wollo, Ethiopia. *Ecol Process* **9**, 61 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13717-020-00258-1>

Laribi, M., Yahyaoui, A. H., Abdedayem, W., Kouki, H., Sassi, K., & Ben M'Barek, S. (2022). Characterization of Mediterranean Durum Wheat for Resistance to *Pyrenophora tritici-repentis*. *Genes*, 13(2), 336. <https://doi.org/10.3390/genes13020336>

Vagelas, I., Cavalaris, C., Karapetsi, L., Koukidis, C., Servis, D., & Madesis, P. (2022). Protective Effects of Systiva® Seed Treatment Fungicide for the Control of Winter Wheat Foliar Diseases Caused at Early Stages Due to Climate Change. *Agronomy*. <https://www.mdpi.com/20734395/12/9/2000>

McDonald, B. A., & Mundt, C. C. (2016). How Knowledge of Pathogen Population Biology Informs Management of Septoria Tritici Blotch. *Phytopathology*, 106(9), 948-955. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-16-0131-RVW>

Ouaja, M., Aouini, L., Bahri, B., Ferjaoui, S., Medini, M., Marcel, T. C., & Hamza, S. (2020). Identification of valuable sources of resistance to *Zymoseptoria tritici* in the Tunisian durum wheat landraces. *European Journal of Plant Pathology*, 156(2), 647–661. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01925-1>

Porras R, Miguel-Rojas C, Lorite IJ, Pérez-de-Luque A, Sillero JC. Characterization of Durum Wheat Resistance against Septoria Tritici Blotch

under Climate Change Conditions of Increasing Temperature and CO₂ Concentration. *Agronomy*. 2023; 13(10):2638.

<https://doi.org/10.3390/agronomy13102638>

Rees, R. G., & Platz, G. J. (1983). Effects of yellow spot on yield components of wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34(6), 905–913.

<https://doi.org/10.1071/AR9830905>

Román Ramos, A.E., Randy Kutcher, H., & José Dallagnol, L. (2023). *Pyrenophora tritici-repentis*: A Worldwide Threat to Wheat. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.110306

Sall, A.T., Chiari, T., Legesse, W., Seid-Ahmed, K., Ortiz, R., van Ginkel, M., Bassi, F.M. (2019). Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.): Origin, Cultivation and Potential Expansion in Sub-Saharan Africa. *Agronomy*, 9(5), 263.

<https://doi.org/10.3390/agronomy9050263>

Sampaio, A. M., Tralamazza, S. M., Mohamadi, F., De Oliveira, Y., Enjalbert, J., Saintenac, C., & Croll, D. (2025). Diversification, loss, and virulence gains of the major effector AvrStb6 during continental spread of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *PLOS Pathogens*, 21(3), e1012983.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012983>

Shahbandeh, M. (2024). *Global leading wheat producing countries 2016/2017-2023-2024*. Διαθέσιμο στο: <https://www.statista.com/statistics/237908/global-top-wheat-producing-countries/> (Πρόσβαση 22 Αυγούστου 2024).

Steinberg G. (2015). Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 79, 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.002>

See PT, Schultz N, Moffat CS. (2020). Evaluation of *Pyrenophora tritici-repentis* Infection of Wheat Heads. *Agriculture*, 10(9),417.

<https://doi.org/10.3390/agriculture10090417>

Sommerhalder, R. J., McDonald, B. A., Mascher, F., & Zhan, J. (2006). Quantitative detection of *Stagonospora nodorum* in wheat leaves by real-time

PCR. FEMS Microbiology Letters, 255(1), 61–68.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00012.x>

Tissaoui, S., Hassine, M., Mourgou-Hamdane, A., Ben Araar, A.E., Nasraoui, R., Nasraoui, B. (2022). Varietal Screening of Durum Wheat Varieties for Resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* (Tan Spot) under Field Conditions. *BioMed Research International*, 2022(1), <https://doi.org/10.1155/2022/6433577>

Wang, C., Milgate, A.W., Solomon, P.S., McDonald, M.C. (2021). The identification of a transposon affecting the asexual reproduction of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Molecular Plant Pathology*, 22(7), 800-816.
<https://doi.org/10.1111/mpp.13064>

Wieser, H., Koehler, P., Scherf, K.A. (2020). *Wheat - An Exceptional Crop: Botanical Features, Chemistry, Utilization, Nutritional and Health Aspects*. Woodhead Publishing and AACC International Press