

“ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, Διατμηματικό Πρόγραμμα  
Μεταπτυχιακών Σπουδών μεταξύ του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής  
Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος και του Τμήματος Γεωπονίας  
Ζωικής Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος”

Ε. Γ. Κουτσώνης

ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΕ ΕΙΔΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ  
ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ *Septoria pyricola* ΑΠΟ ΑΠΙΔΕΩΝΕΣ  
ΤΩΝ ΝΟΜΩΝ ΚΑΡΔΙΤΣΗΣ ΚΑΙ ΛΑΡΙΣΑΣ

**ΒΟΛΟΣ 2010**

ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΕ ΕΙΔΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ  
ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ *Septoria pyricola* ΑΠΟ ΑΠΙΔΕΩΝΕΣ ΤΩΝ  
ΝΟΜΩΝ ΚΑΡΔΙΤΣΗΣ ΚΑΙ ΛΑΡΙΣΑΣ



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	4
<b>2. Επιδημιολογία</b> .....	5
<b>3. Καταπολέμηση της σεπτορίωσης</b> .....	8
<b>4. Ανάπτυξη ανθεκτικότητας</b> .....	10
4.1 Γενετικός έλεγχος της ανθεκτικότητας .....	11
4.2 Ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα (ben) .....	12
4.3 Ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα που παρεμποδίζουν την απομεθυλίωση των στερολών (DMI's).....	13
4.4 Ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα της ομάδας των στρομπιλουρινών (QoI's).....	15
4.5 Ανθεκτικότητα στο boscalid.....	17
<b>5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	18
5.1 Υπόστρωμα.....	18
5.2 Απομόνωση παθογονου.....	18
5.3 Μυκητοκτόνα.....	20
5.4 Προετοιμασία μολύσματος – μόλυνση.....	20
5.5 Μετρήσεις.....	21
<b>6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ</b> .....	21
<b>7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	22
<b>8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	28
<b>9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	32
9.1 Διεθνής βιβλιογραφία.....	32
9.2 Ελληνική βιβλιογραφία.....	38
<b>10. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι</b> .....	39

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή αποτελεί τμήμα των υποχρεώσεων του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών μεταξύ των τμημάτων Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος και Γεωπονίας, Ζωικής Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας κατά τα έτη 2009-2010.

Θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Παππά Αθανάσιο για τις πολύτιμες συμβουλές και οδηγίες του καθώς και για την κατανόηση και υπομονή του καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας διατριβής, αλλά και συνολικότερα των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Επίσης στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Βέλλιο Ευάγγελο, Λέκτορα του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συμπαράσταση και τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών και στον κ. Παπαδόπουλο Νικόλαο, Καθηγητή του Εργαστηρίου Εντομολογίας, για την κριτική και τις υποδείξεις του στη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες :

Στους μεταπτυχιακούς συμφοιτητές μου κ. Παπαευαγγέλου Δημήτριο που ήταν συνοδοιπόρος και πολύτιμος συμπαραστάτης σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών και κα. Καρατσιώρη Ελένη για τη σημαντική της βοήθεια και ενθάρρυνση.

Στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Χατζηδημόπουλο Μιχάλη, για τη συνεργασία, βοήθεια και τεχνική υποστήριξη σε διάφορες φάσεις της παρούσας διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την σύζυγό μου Σταυρούλα για την υπομονή και τη συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

### Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

**Επιβλέπων:** κ. Παππάς Αθανάσιος, Καθηγητής Φυτοπαθολογίας τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Π. Θ.

**Μέλη:** κ. Βέλλιος Ευάγγελος, Λέκτορας Φυτοπαθολογίας τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Π. Θ.

κ. Παπαδόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής Εντομολογίας τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Π. Θ.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με τη μέθοδο της σημειακής εναπόθεσης αιωρήματος σπορίων σε τρυβλία με PDA εμπλουτισμένο με διαφορετικές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων διερευνήθηκαν φαινόμενα ανθεκτικότητας, *in vitro*, του μύκητα *S. pyricola*. Χρησιμοποιήθηκαν 40 απομονώσεις του μύκητα *S. pyricola* που συλλέχθηκαν από την ευρύτερη περιοχή του Νομού Καρδίτσας και του Νομού Λάρισας, τα μυκητοκτόνα carbendazim (Ben), bitertanol (DMIs), pyraclostrobin (Qol's) και το νέο μυκητοκτόνο boscalid της ομάδας των καρβοξαμιδικών.

Διαπιστώθηκε για πρώτη φορά, η ύπαρξη ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών του μύκητα *Septoria pyricola*, στις περιοχές του Νομού Καρδίτσας και του Νομού Λάρισας, από όπου έγιναν οι δειγματοληψίες, σε αρκετά υψηλό ποσοστό (21%). Όσον αφορά το bitertanol, η έρευνα έδειξε ότι για το μεγαλύτερο ποσοστό των απομονώσεων (85%) η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) κυμάνθηκε από 0,005 mg L<sup>-1</sup> έως 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Επίσης, διαπιστώθηκε η ύπαρξη μετρίως ευαίσθητων στο bitertanol στελεχών του *Septoria pyricola* σε ποσοστό 5%. Για το boscalid συμπεράναμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των απομονώσεων και συγκεκριμένα το 92%, παρουσίασαν MIC 0,1 mg L<sup>-1</sup>, καθώς απέτυχαν να σχηματίσουν αποικίες σε αυτή τη συγκέντρωση μυκητοκτόνου. Τέλος, διαπιστώθηκε η απουσία ανθεκτικών στο pyraclostrobin στελεχών του *Septoria pyricola*. Όλες οι απομονώσεις παρουσίασαν MIC 0,005 mg L<sup>-1</sup>, καθώς απέτυχαν να σχηματίσουν αποικίες στη χαμηλότερη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου και στο σύνολό τους χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες στο pyraclostrobin.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σεπτορίωση της αχλαδιάς είναι μια ασθένεια που προσβάλλει το φύλλωμα κυρίως της αχλαδιάς και έχει παρατηρηθεί σε πολλές χώρες της λεκάνης της Μεσογείου και όχι μόνο. Το παθογόνο αίτιο της ασθένειας είναι ο μύκητας *Septoria pyricola* (Αδηλομύκητες, Coelomycetes) που είναι η ατελής μορφή του Ασκομύκητα *Mycosphaerella pyri* (συνώνυμο *M. sentina*) (Dothideales). Το παθογόνο έχει αναφερθεί ότι προσβάλλει και την κυδωνιά, τη μηλιά και διάφορα άλλα είδη *Pyrus* (Jones and Aldwinckle, 1990). Η ασθένεια είναι ευρύτατα διαδεδομένη στην Ευρώπη και συγκεκριμένα στην Ελλάδα, στη Γερμανία, τη Μεγάλη Βρετανία την Ιταλία, την Ισπανία, τη Γαλιά αλλά και στην Τουρκία (Sivanesan, 1990). Επίσης έχει αναφερθεί στην Κίνα, στην Ινδία στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και στη Νότιο Αφρική (Sivanesan, 1990).

Η σεπτορίωση εμφανίζεται σε περιοχές όπου καλλιεργείται κυρίως η Ευρωπαϊκή αχλαδιά (*Pyrus communis*). Στην Ελλάδα, ο μύκητας που προκαλεί τη σεπτορίωση της αχλαδιάς, προσβάλλει κυρίως την ποικιλία Κρυστάλλι την στιγμή μάλιστα που το 50% της ελληνικής παραγωγής αχλαδιών ανήκουν σε αυτή την ποικιλία (Βασιλακάκης, 2004).

Ο μύκητας *Mycosphaerella pyri* προσβάλλει κυρίως το φύλλωμα και τους μίσχους των φύλλων, έχει παρατηρηθεί όμως και προσβολή των καρπών ( Παναγόπουλος, 2007). Η προσβολή των καρπών της αχλαδιάς από το μύκητα μπορεί να επιφέρει μείωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών μέχρι και μείωση της παραγωγής των προσβεβλημένων δένδρων (Sivanesan, 1990). Προκαλεί τον σχηματισμό κυκλικών ή ακανόνιστων κηλίδων που στα πρώτα στάδια της προσβολής είναι καστανές και τελικά εξελίσσονται σε τεφρόλευκες περιοχές που περιβάλλονται από ερυθροκάστανη ζώνη. Η κεντρική ζώνη των κηλίδων καταλαμβάνεται από τα πυκνίδια του μύκητα εμφανίζοντας το σημείο πολυστιγμία. Η τέλεια μορφή του μύκητα δημιουργείται κατά τη διάρκεια του χειμώνα στα πεσμένα στο έδαφος φύλλα. (Tzavella – Klonari and Tamoutseli, 1986). Σε ορισμένες περιπτώσεις ο νεκρωτικός ιστός στις κηλίδες πέφτει προσδίδοντας την εμφάνιση του χτυπήματος από σκάγια στα φύλλα. Όταν η ασθένεια είναι σοβαρή προκαλείται φυλλόπτωση αργά το καλοκαίρι (Jones and Aldwinckle, 1990).

## 2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η ασθένεια που προκαλείται από το μύκητα *Septoria pyricola* στην αχλαδιά είναι πολυκυκλική ασθένεια. Θερμοκρασίες γύρω στους 10 °C και υγρός καιρός ευνοούν τις πρωτογενείς μολύνσεις καθώς επίσης και τις δευτερογενείς που γίνονται αργότερα και ευνοούνται με βροχερό, υγρό και σχετικά θερμό καιρό (Παναγόπουλος, 2007). Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ταχύτερη εξέλιξη της ασθένειας είναι οι 22 με 25 °C παρουσία σχετικής υγρασίας αέρα τουλάχιστον 90% (Schwabe and Knox-Davies, 1966; Sivanesan, 1990).

Το μόλυσμα για τη δημιουργία των πρωτογενών μολύνσεων την άνοιξη είναι τα ασκοσπόρια (Jones and Aldwinckle, 1990) και προέρχονται από την τέλεια μορφή του παθογόνου μύκητα *Mycosphaerella pyri*. Ο μύκητας διαχειμάζει στα πεσμένα φύλλα στο έδαφος κατά τη διάρκεια του χειμώνα και τον Φεβρουάριο σχηματίζονται οι τέλειες καρποφορίες, τα περιθήκια (Tzavella – Klonari and Tamoutseli, 1986). Η διαχειμάζουσα μορφή, τα περιθήκια είναι σφαιροειδή σκούρου καστανού χρώματος με οστιόλη διαστάσεων έως 150 μm και περιέχουν ροπαλοειδείς ασκούς (Sivanesan, 1990). Οι ασκοί είναι επιμήκεις με διπλό τοίχωμα και περιέχουν οχτώ ασκοσπόρια. Τα ασκοσπόρια είναι υαλώδη, επιμήκη και ελλειπτικά, δικύτταρα, διαστάσεων 26-33x4μm (Παναγόπουλος, 2007).

Ο σχηματισμός των ασκοσπορίων πραγματοποιείται σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα και μερικές ημέρες με αυξημένη σχετική υγρασία ή βροχές είναι αρκετές για τον σχηματισμό τους. Τα ασκοσπόρια εκτινάσσονται μετά τον σχηματισμό τους την άνοιξη από τα περιθήκια και μεταφερόμενα με τον άνεμο και την βροχή στους ευπαθείς ξενιστές προκαλούν τις πρωτογενείς μολύνσεις. Σχετικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι η μεταφορά των ασκοσπορίων γίνεται σε κοντινές μόνο αποστάσεις (Παναγόπουλος, 2007). Τα αρχικά συμπτώματα της προσβολής από τα ασκοσπόρια εμφανίζονται περίπου δυο εβδομάδες μετά από τις αρχικές μολύνσεις, αυτός είναι και ο χρόνος επώασης της ασθένειας (Jones and Aldwinckle, 1990; Gabadze, 1971)

Τα πυκνιδιοσπόρια τα οποία σχηματίζονται στα προσβεβλημένα φύλλα συνιστούν το μόλυσμα για την έναρξη των δευτερογενών μολύνσεων. Τα πυκνίδια είναι οι ατελείς καρποφορίες του παθογόνου και σχηματίζονται στο κέντρο των κηλίδων που



παρουσιάζονται στα προσβεβλημένα φύλλα. Είναι σφαιροειδή, βυθισμένα μέσα στους ιστούς και οι διαστάσεις τους είναι 180x150μm με άνοιγμα οστιόλης γύρω στα 30μm (Sivanesan, 1990). Η ατελής αυτή καρποφορία δημιουργείται μόνο επί των ζωντανών προσβεβλημένων οργάνων του φυτού (Παναγόπουλος, 2007). Η εμφάνιση των πυκνιδιοσπορίων γίνεται κατά τη διάρκεια της παρασιτικής φάσης του παθογόνου, περίπου ένα μήνα μετά από τις αρχικές μολύνσεις από τα ασκοσπόρια (Jones and Aldwinckle, 1990).

Τα πυκνιδιοσπόρια του μύκητα *Septoria pyricola* είναι υαλώδη ή ελαφρά ελαιώδη, σκωληκόμορφα με καμπύλη, μακριά και λεπτά με διαστάσεις 40-58 X 3-5 μm και φέρουν συνήθως 2 septa οπότε είναι τρικύτταρα και σπανίως 1 septum οπότε είναι δικύτταρα. Σχηματίζονται πάνω σε αχλαδοειδή κονιδιογενή κύτταρα στην εσωτερική κοιλότητα των πυκνιδίων (Sivanesan, 1990). Τα σπόρια του μύκητα βλαστάνουν με τη δημιουργία βλαστικού σωλήνα είτε επάκρια σαν προέκταση των κυττάρων του σπορίου που βρίσκονται στα άκρα είτε από το ενδιάμεσο κύτταρο στα σημεία των διαφραγμάτων, είτε ταυτόχρονα και με τους δύο τρόπους. Ο τρόπος βλάστησης των πυκνιδιοσπορίων του μύκητα είναι όμοιος με αυτόν του μύκητα *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter (με ατελή μορφή *Septoria graminicola* Rob.ex.Desm.) (Stergiopoulos and De Waard, 2002) που είναι το παθογόνο αίτιο της σεπτορίωσης του σιταριού καθώς επίσης και με αυτόν του μύκητα *Mycosphaerella pistaciarum* Chitz. (με ατελή μορφή *Septoria pistaciarum* Caracc.) (Tzavella – Klonari, 1989) που είναι το παθογόνο αίτιο της σεπτορίωσης της φυσιτικής. Τα πυκνιδιοσπόρια είναι και αυτά όπως τα ασκοσπόρια, μυξοσπόρια και για την απελευθέρωσή και διασπορά τους απαιτείται βροχή και άνεμος (Παναγόπουλος, 2007).

Ο Gabadze (1971) διενεργώντας πειράματα στον αγρό συμπέρανε ότι όταν η μέση ημερήσια θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 16 και 20°C η περίοδος επώασης διαρκεί 12-14 μέρες και με μέσες ημερήσιες θερμοκρασίες 20 -24 °C, διαρκεί 10 με 13 ημέρες.

Η βλάστηση των κονιδίων παρεμποδίζεται σε θερμοκρασίες κάτω των 12°C και άνω των 32°C ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία βλάστησης των κονιδίων είναι 20-25°C (Sivanesan, 1990; Gabadze, 1971). Τα σπόρια κατά τη βλάστηση τους σχηματίζουν βλαστικούς σωλήνες οι οποίοι εισχωρούν στο μεσόφυλλο από τα στομάτια των φύλλων.

Μερικές φορές παρατηρείται εκτεταμένη ανάπτυξη πάνω στη φυλλική επιφάνεια πριν την εισχώρηση από τα στομάτια (Schwabe and Knox-Davies, 1966). Η ανάπτυξη των υφών μέσα στο μεσόφυλλο διεξάγεται διακυτταρικά μέχρι την πλήρη καταστροφή των κυττάρων (Kema *et al*, 1996; Sivanesan, 1990). Η καταστροφή των κυττάρων του μεσόφυλλου είναι ταχεία καθώς το αναπτυσσόμενο μυκήλιο λαμβάνει θρεπτικά στοιχεία από αυτά, ύστερα από την κατάρρευσή τους. Η γρήγορη καταστροφή των κυττάρων του μεσοφύλλου δημιουργεί κοιλότητες κάτω από τα στόματα όπου και τελικά δημιουργούνται τα πυκνίδια του παθογόνου (Kema *et al*, 1996).



**Εικόνα 1.** Προσβολή από το παθογόνο *S. pyricola* σε φύλλα αχλαδιάς.



**Εικόνα 2.** In vitro καλλιέργεια του παθογόνου *S. pyricola* σε PDA.

### 3. ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΗΣ ΣΕΠΤΟΡΙΩΣΗΣ

Η σεπτορίωση της αχλαδιάς είναι ασθένεια η οποία αντιμετωπίζεται συνήθως με την εφαρμογή προγράμματος ψεκασμών για την καταπολέμηση άλλων ασθενειών της αχλαδιάς, όπως του φουζικλαδίου που οφείλεται στον Ασκομύκητα *Venturia pyrina* Aderh. [ατελής μορφή *Fusicladium pyrorum* (Lib) Fuckel] (Μπίρης κ. α., 1991) ή της *fabraea leaf spot* που οφείλεται στο μύκητα *Fabraea maculata* Atk. [συνώνυμο *Diplocarpon mespili* (Sor.) Sutton] με ατελή μορφή *Entomosporium maculatum* Lev., (Jones and Aldwinckle, 1990). Η σεπτορίωση θεωρείται ασθένεια μικρής οικονομικής σημασίας, εκτός αν εμφανίζεται σε μικρά δενδρύλλια (Jones and Aldwinckle, 1990). Το γεγονός αυτό είχε σαν αποτέλεσμα το ενδιαφέρον των ερευνητών για την καταπολέμηση της σεπτορίωσης της αχλαδιάς να είναι μειωμένο, τόσο σε ελληνικό όσο και σε διεθνές επίπεδο (Μπίρης κ. α., 1991). Ωστόσο τα τελευταία χρόνια εξάρσεις της ασθένειας σε αχλαδεώνες τόσο της Ιταλίας όσο και της Ελλάδας έχουν καταγραφεί (Μπίρης κ. α., 1991; Aloj *et al.*, 1994; Pappas *et al.*, 2006; Pappas *et al.*, 2010 ).

Τα Περιφερειακά Κέντρα Φυτοπροστασίας συστήνουν για την καταπολέμηση της ασθένειας προστατευτικούς ψεκασμούς. Οι ψεκασμοί, θα πρέπει να ξεκινούν από το στάδιο της πράσινης κορυφής και να συνεχίζονται στα στάδια της ρόδινης κορυφής, της

πτώσης του 90% των πετάλων και του σχηματισμού νεαρών καρπών. Σε πολύ προσβεβλημένες περιοχές συνιστώνται 1-2 συμπληρωματικοί ψεκασμοί με χρήση χαλκούχων σκευασμάτων ή άλλων προστατευτικών σκευασμάτων, όπως είναι ο οξυχλωριούχος χαλκός, βορδιγάλιος πολτός, chlorothalonil, mancozeb, thiram (Παναγόπουλος, 2007). Για την καταπολέμηση του παθογόνου έχουν καταρτιστεί πίνακες με τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία έχουν πάρει έγκριση κυκλοφορίας από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων της χώρας μας.

Η αντιμετώπιση του παθογόνου με τον αποτελεσματικότερο τρόπο διεξάγεται με τη χρήση των διασυστηματικών μυκητοκτόνων. Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα μυκητοκτόνα ανήκουν στην ομάδα των βενζιμιδαζολικών και είναι σκευάσματα με βάση το carbendazim (μεταβολίτης του benomyl) και από την ομάδα των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης τα bitertanol, flusilazole και prochloraz. Μόλις πρόσφατα και συγκεκριμένα το 2008, δόθηκε έγκριση για τη χρήση των μυκητοκτόνων pyraclostrobin και boscalid από τις ομάδες των στρομπιλουρινών και καρβοξαμιδικών/ανιλίδια, αντίστοιχα. Ο Μπίρης και συνεργάτες (1991) σε πειράματα αξιολόγησης μυκητοκτόνων ότι τα μυκητοκτόνα της ομάδας των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά εναντίον της σεπτορίωσης ενώ τα βενζιμιδαζολικά δεν καταπολέμησαν ικανοποιητικά την ασθένεια. Η συνεχής χρήση των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων, οδήγησαν στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου (Pappas *et al.*, 2006; Pappas *et al.*, 2010).

Η αντιμετώπιση της σεπτορίωσης της αχλαδιάς δεν θα πρέπει να βασίζεται αποκλειστικά στη χρήση μυκητοκτόνων. Στα πλαίσια της ολοκληρωμένης παραγωγής μηλοειδών θα πρέπει να συμπεριληφθούν μέτρα που προάγουν την υγιεινή του οπωρώνα και μειώνουν το ποσό των αρχικών μολυσμάτων της ασθένειας. Η απομάκρυνση και η καταστροφή με παράχωμα ή ελαφρύ όργωμα των φύλλων και στη συνέχεια η εφαρμογή ψεκασμών, έδωσε καλύτερα αποτελέσματα στην καταπολέμηση της ασθένειας (Gabadze, 1971). Ο Παναγόπουλος (2007) προτείνει την εφαρμογή χειμερινού πολτού δινιτροβουτυλοφαινόλης στα πεσμένα φύλλα για την καταστροφή των περιθηκίων και ο Sivanesan (1990), προτείνει την ετήσια απομάκρυνση των πεσμένων φύλλων για τη μείωση του αρχικού μολύσματος.

#### 4. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών με τη χρήση χημικών ουσιών αποτέλεσε και συνεχίζει να αποτελεί την πιο αποτελεσματική, οικονομική και αξιόπιστη μέθοδο, στη γεωργική πράξη. Η χρήση μεθόδων όπως η εφαρμογή καλλιεργητικών μέτρων, η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών και βιολογικών παραγόντων, αποκλειστικά πολύ συχνά δεν επαρκεί για να αντιμετωπιστούν καταστάσεις αυξημένου κινδύνου στον αγρό. Παράδειγμα καταστάσεων αυξημένου κινδύνου είναι οι επιδημίες σοβαρών παθογόνων όπως είναι οι περονόσποροι, τα ωΐδια, η φαιά σήψη, το φουζικλάδιο και άλλα. Τα πλεονεκτήματα αυτά της χημικής καταπολέμησης ώθησαν τους παραγωγούς στην αποκλειστική και πολλές φορές αλόγιστη χρήση τους. Το αποτέλεσμα, αφενός δημιουργήθηκαν περιβαλλοντικά προβλήματα και αφετέρου απωλέσθηκε η αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων λόγω της εμφάνισης και επικράτησης ανθεκτικών σε αυτά στελεχών (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Το πρόβλημα της εμφάνισης ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα στελεχών αρχικά και μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 1960 ήταν σπάνιο. Το γεγονός αυτό οφειλόταν στο ότι όλα τα ευρέως χρησιμοποιούμενα μυκητοκτόνα, χαρακτηρίζονταν από μη εξειδικευμένη δράση σε υποκυτταρικό επίπεδο, που δεν ευνοούσε την εμφάνιση του προβλήματος. Ουσίες που παρουσιάζουν μη εξειδικευμένη δράση σε υποκυτταρικό επίπεδο χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα χωρίς απώλεια της αποτελεσματικότητάς τους.

Το πρόβλημα της ανάπτυξης ανθεκτικότητας παρουσιάστηκε αργότερα αφού ανακαλύφθηκαν τα διασυστηματικά μυκητοκτόνα, που καλύπτουν τις ανάγκες για αυξημένη αποτελεσματικότητα και θεραπευτική δράση αλλά και είναι ασφαλέστερα για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Τα διασυστηματικά αυτά μυκητοκτόνα έχουν εξειδικευμένο μηχανισμό δράσης σε υποκυτταρικό επίπεδο για να μπορούν να κινηθούν μέσα στους ιστούς του φυτού χωρίς να έχουν τοξική για αυτό δράση. Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν τα μυκητοκτόνα αυτά είναι πολλά. Τα σπουδαιότερα είναι ότι καταπολεμούν παθογόνα που βρίσκονται στο εσωτερικό των φυτών δρώντας με αυτόν τον τρόπο θεραπευτικά, παρεμποδίζοντας τη δράση και ανάπτυξη του παθογόνου ακόμα και μετά τη μόλυνση. Επίσης δεν απαιτείται πλήρη κάλυψη της φυτικής επιφάνειας στην οποία γίνεται η εφαρμογή καθώς μέρος του μυκητοκτόνου εισέρχεται και κυκλοφορεί

στο φυτό. Τέλος, τα διασυστηματικά μυκητοκτόνα δίνουν τη δυνατότητα προστασίας νεαρών φυτών όταν γίνει επένδυση των σπόρων με το κατάλληλο φυτοπροστατευτικό προϊόν (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

#### **4.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ**

Ανθεκτικότητα των παθογόνων στις αντιμικροβιακές ενώσεις ορίζεται ως η σταθερή και κληρονομούμενη στους απογόνους προσαρμογή ενός μικροοργανισμού στην παρουσία μιας αντιμικροβιακής ένωσης που έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της ευαισθησίας του πληθυσμού του παθογόνου στον συγκεκριμένο παρεμποδιστή (Ζιώγας, 2000).

Η ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα συμπερασματικά είναι αποτέλεσμα γενετικών αλλαγών. Στους μύκητες, η ανθεκτικότητα που προκύπτει από μεταλλάγες σε γονίδια του παθογόνου διακρίνεται σε χρωμοσωματική και εξωχρωμασωματική ανάλογα με το αν τα γονίδια αυτά εδράζονται στο χρωμοσωματικό ή εξωχρωματωσωματικό DNA του μύκητα αντίστοιχα. Η περίπτωση της χρωμοσωματικής ανθεκτικότητας αποτελεί τον κανόνα στους μύκητες αν και υπάρχουν περιπτώσεις όπου η ανθεκτικότητα ελέγχεται από εξωχρωματωσωματικά γονίδια, κυρίως μιτοχονδριακής προέλευσης. Ανεξάρτητα από την προέλευση των γονιδίων η ανθεκτικότητα των μυκήτων στα μυκητοκτόνα, διακρίνεται σε μειζόνων γόνων ή ολιγογονική και σε πολυγονική ( Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Στην ολιγογονική ανθεκτικότητα συνήθως προκαλείται από μεταλλαγή σε ένα μόνο γονίδιο η οποία οδηγεί στην πλήρη αποτυχία της λειτουργικής δράσης του μυκητοκτόνου. Όταν αναπτυχθεί αυτού του είδους η ανθεκτικότητα τείνει να είναι σταθερή (Brent, 1995). Μυκητοκτόνα όπως είναι τα βενζιμιδαζολικά και οι στρομπιλουρίνες που έχουν πού εξειδικευμένο τρόπο δράσης, είναι ευαίσθητα για την ανάπτυξη ολιγογονικής ανθεκτικότητας.

Η πολυγονική ανθεκτικότητα αντίθετα από την ολιγογονική καθορίζεται από μεταλλάξεις σε μερικά γονίδια και οδηγεί σε διάφορα επίπεδα ανθεκτικότητας σε ένα μυκητοκτόνο. Η πολυγονική ανθεκτικότητα εμφανίζεται βαθμιαία και μπορεί να προκύψει από την ταυτόχρονη μείωση του ελέγχου του παθογόνου και μείωση της ευαισθησίας του παθογόνου στο μυκητοκτόνο. Αναστρέφεται γρήγορα σε μια πιο

ευαίσθητη κατάσταση , με μείωση της πίεσης επιλογής που μπορεί να προκύψει με τη διακοπή της χρήσης του μυκητοκτόνου στο οποίο εμφανίστηκε ή με εναλλαγή με μυκητοκτόνα άλλων ομάδων (Brent, 1995). Πολυγονική ανθεκτικότητα εμφανίζουν οι παρεμποδιστές απομεθυλίωσης στερολών (DMI's).

#### **4.2 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ BENZIMΙΔΑΖΟΛΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ (Ben)**

Βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα είναι διασυστηματικά, ευρέως φάσματος, παράγωγα της βενζιμιδαζόλης (benzimidazole). Το πιο γνωστό μυκητοκτόνο της ομάδας αυτής είναι το benomyl το οποίο ανακαλύφθηκε το 1963 από τους Delp και Kloring. Αμέσως μετά την ανακάλυψή του σχηματίστηκε η εντύπωση ότι είχε αρχίσει μια νέα εποχή στη χημική καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών. Πραγματικά τα μυκητοκτόνα αυτά δρουν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, καταπολεμούν τις κυριότερες μυκητολογικές ασθένειες, με κύρια εξαίρεση αυτές που οφείλονται σε ωομύκητες, είναι διασυστηματικά και έχουν μεγάλη διάρκεια δράσης στο εσωτερικό του φυτού.

Το benomyl συνεχίζει να είναι ένα σημαντικό μυκητοκτόνο, αλλά όμως η γενική εικόνα του εμφανίζεται λιγότερο αισιόδοξη, για δύο λόγους, την ευκολία με την οποία οι ευαίσθητοι μύκητες αναπτύσσουν ανθεκτικά στελέχη στον αγρό, μετά από μεταλλάξεις και τη γενετική ενεργότητα των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων ( Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Ο μηχανισμός μυκητοτοξικής δράσης των βενζιμιδαζολικών είναι πολύ εξειδικευμένος. Έχουν επίδραση στη μιτωτική πυρηνοτομία των μυκήτων. Τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα αλληλεπιδρούν με την τουμπουλίνη παρεμποδίζοντας τον σχηματισμό των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου, αποκλείοντας έτσι τον κανονικό αποχωρισμό των θυγατρικών χρωματοσωμάτων. Υπό κανονικές συνθήκες οι μικροσωληνίσκοι σχηματίζονται με πολυμερισμό υπομονάδων πρωτεΐνης (tubulin). Όμως το carbendazim προσκολλάται στις υπομονάδες αυτές, εμποδίζοντας έτσι τον πολυμερισμό και το σχηματισμό ατράκτου και, κατά συνέπεια, και την ανάπτυξη του μύκητα (Davidse and Flach, 1977).

Ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα έχει παρατηρηθεί σε πολλούς φυτοπαθογόνους μύκητες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ανθεκτικότητα

οφείλεται, σε σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη β-τουμπουλίνη (Koenraadt *et al.*, 1992). Σημειακές μεταλλάξεις σε διαφορετικά κωδικόνια του γονιδίου μπορούν να επιφέρουν διαφορετικά επίπεδα ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα (Ma and Michailides, 2005). Υπό συνθήκες εργαστηρίου μεταλλάξεις σε πολλά διαφορετικά κωδικόνια στο γονίδιο της τουμπουλίνης μπορούν να δημιουργήσουν ανθεκτικά στελέχη, σε συνθήκες όμως αγρού αυτές οι μεταλλάξεις περιορίζονται στα κωδικόνια 198 και 200. Η πιο κοινή μετάλλαξη είναι η αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από αλανίνη, γλυκίνη ή λυσίνη στο κωδικόνιο 198 (Koenraadt *et al.*, 1992).

### **4.3 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΛΩΝ (DMI's)**

Οι παρεμποδιστές απομεθυλίωσης στερολών είναι ευρέως φάσματος και χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση σημαντικών ασθενειών όπως είναι τα ωΐδια, οι σκωριάσεις, τα φουζικλάδια, η φαϊά σήψη, οι κερκοσποριώσεις και οι μετασυλλεκτικές σήψεις. Τα μυκητοκτόνα τις ομάδας αυτής παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης παρεμποδίζοντας την απομεθυλίωση του C-14 στο μόριο της λανοστερόλης ( Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Συγκεκριμένα, αναστέλλουν τη δράση του κυτοχρώματος P-450, το οποίο είναι προσθετική ομάδα της 14α απομεθυλάσης, που καταλύει την απομεθυλίωση του μορίου της λανοστερόλης. Η λανοστερόλη είναι πρόδρομη ουσία της εργοστερόλης και για το λόγο αυτό τα μυκητοκτόνα αυτά αποκαλούνται και παρεμποδιστές βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (EBIs) (Brent, 1995; Sanglard *et al.*, 1998). Η παρεμπόδιση της απομεθυλίωσης αυτής έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση πρόδρομων στερολών, οι οποίες όμως δεν είναι κατάλληλες να αντικαταστήσουν την εργοστερόλη στη δόμηση των μεμβρανών των μυκηλιακών κυττάρων ( Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Το γονίδιο CYP51 εκφράζει τη 14α απομεθυλάση, ένα ένζυμο κλειδί για τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης και στόχος των μυκητοκτόνων της ομάδας DMI's. Ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα αυτά μπορεί να προκύψει στους μύκητες με μετάλλαξη του γονιδίου CYP51 σε συγκεκριμένη θέση. Έρευνες με στελέχη των φυτοπαθογόνων



μυκήτων *Uncinula necator* και *Erysiphe graminis* έδειξαν ότι μια μετάλλαξη στο γονίδιο CYP51A1 προσέδωσε ανθεκτικότητα στα στελέχη αυτά στα μυκητοκτόνα της ομάδας των παρεμποδιστών απομεθυλίωσης στερολών. Η μετάλλαξη αυτή αφορούσε την αντικατάσταση του αμινοξέος φαινυλαλανίνη από το αμινοξύ τυροσίνη στη θέση 136 ενός νουκλεοτιδίου του γονιδίου CYP51A1 (Delye *et al.*, 1997; Delye *et al.*, 1998). Επίσης, μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο CYP51 έχει αναφερθεί ότι προσδίδει ανθεκτικότητα σε στελέχη του μύκητα *Aspergillus fumigatus* (Diaz- Guerra *et al.*, 2003).

Η υπερέκφραση του γονιδίου CYP51 είναι ένας ακόμα μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα DMI's μυκητοκτόνα. Έρευνα με στελέχη του μύκητα *Venturia inaequalis* καταλήγει στο ότι η υπερέκφραση του γονιδίου CYP51A1 οδηγεί σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας και όχι σημειακές μεταλλάξεις του. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του γονιδίου αυτού συνδέεται με την παρουσία ενός τμήματος 553 ζευγών βάσεων στην περιοχή που ελέγχει τη μεταγραφή του γονιδίου. Το τμήμα αυτό λειτουργεί ως ενισχυτής της μεταγραφής γονιδίου και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ποσοτήτων του ενζύμου της απομεθυλάσης και ανάπτυξη ανθεκτικότητας ( Schnabel & Jones, 2001). Ανθεκτικότητα που οφείλεται στην υπερέκφραση του γονιδίου CYP51 διαπίστωσαν και οι Ma και συνεργάτες (2006) σε έρευνα με το μύκητα *Blumeriella jaarii*. Είσης οι Hamamoto και συνεργάτες (2000) διαπίστωσαν υπερέκφραση του γονιδίου CYP51 σε ανθεκτικά στελέχη του μύκητα *Penicillium digitatum*. Συγκεκριμένα, διαπίστωσαν ότι στην περιοχή του 'promoter' του γονιδίου (ρυθμιστική περιοχή που ελέγχει τη μεταγραφή του γονιδίου), μια μοναδική αλληλουχία 126 ζεύγη βάσεων, επαναλαμβανόταν 5 φορές στη σειρά στα ανθεκτικά στελέχη ενώ ήταν παρούσα μόνο μια φορά στα ευαίσθητα στελέχη του μύκητα. Επίσης διαπίστωσαν ότι όταν στα ανθεκτικά στελέχη μειωνόταν η επανάληψη της αλληλουχίας των 126 ζευγών βάσεων από 5 φορές στις δύο, μειωνόταν το επίπεδο ανθεκτικότητας των στελεχών αλλά και η υπερέκφραση του γονιδίου.

Τέλος, ένας τρίτος μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας χρησιμοποιεί τις διόδους ABC των κυτταρικών μεμβρανών για την εκροή της δραστικής ουσίας των DMI's, από το κύτταρο. Οι δίοδοι αυτοί ( ATP- binding cassettes) είναι πρωτεΐνες που δεσμεύονται στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων, προκαρυωτικών και

ευκαρυωτικών οργανισμών, οι οποίες και οδηγούν την λήψη ή εκροή συστατικών με υδρόλυση της ATP (Higgins, 2001). Ο μηχανισμός αυτός ανάπτυξης ανθεκτικότητας έχει διαπιστωθεί στα παθογόνα *P. digitatum* (Nakaune *et al.*, 1998), *A. nidulans* (Del Sorbo *et al.*, 1997) και *M. graminicola* (Zwiers *et al.*, 2002)

#### 4.4 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ ΤΩΝ ΣΤΡΟΜΠΙΛΟΥΡΙΝΩΝ (QoI's)

Οι στρουμπιλουρίνες είναι η πρώτη ομάδα γεωργικών μυκητοκτόνων με εξειδικευμένη δράση στο σύμπλοκο III της αναπνευστικής αλυσίδας που εμφανίστηκε στη γεωργική πράξη το 1996. Είναι συνθετικά παράγωγα της στρουμπιλουρίνης A (strobilurin A), που αποτελεί δευτερογενή μεταβολίτη του βασιδιομύκητα *Strobilurus tenacellus*. Η μυκητοτοξική δράση των Qo παρεμποδιστών οφείλεται στην ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τη μιτοχονδριακή αναπνοή με τη σύνδεσή τους στη θέση Qo του κυτοχρώματος b. Το κυτόχρωμα b αποτελεί υπομονάδα του κυτοχρωμικού συμπλόκου bc1 που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων των μυκήτων. Στην περίπτωση που ένας από τους παρεμποδιστές συνδεθεί, μπλοκάρει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα b στο κυτόχρωμα c1, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την διαταραχή του ενεργειακού κύκλου και την διακοπή παραγωγής ενέργειας, ATP. Η σύνδεση αυτή είναι αντιστρεπτή αφού καθένα από τα παράγωγα αυτά μπορεί να αντικαταστήσει το άλλο στη συγκεκριμένη θέση πρόσδεσης (Bartlett *et al.*, 2002).

Τα μυκητοκτόνα που ανήκουν στην κατηγορία των Qo παρεμποδιστών είναι επιτυχημένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Η επιτυχία αυτή οφείλεται στις ιδιότητες τους και συγκεκριμένα στο ότι έχουν ευρύ φάσμα δράσης, εξειδικευμένο τρόπο δράσης και ενίοτε διασυστηματική και θεραπευτική δράση. Η εξειδικευμένη αυτή δράση σε υποκυτταρικό επίπεδο αποτελεί πιθανότητα εμφάνισης ανθεκτικότητας από μια και μόνο σημειακή μεταλλαγή.

Μια τέτοια μεταλλαγή παρατηρήθηκε στις περισσότερες περιπτώσεις ανθεκτικότητας και αφορά την αντικατάσταση ενός αμινοξέως, της γλυκίνης από την αλανίνη στη θέση 143 (G143A) της πρωτεΐνης του κυτοχρώματος b. Αυτή η μεταλλαγή

έχει αναγνωριστεί σε ανθεκτικά στελέχη των μυκήτων *Alternaria alternata*, *A. tenuissima* και *A. Arborescens* (Ma *et al.*, 2003; Ma and Michailides, 2004). Επίσης στους φυτοπαθογόνους μύκητες *Plasmopara viticola* (Heaney *et al.*, 2000), *Pseudoperonospora cubensis* (Ishii *et al.*, 2001), *Mycosphaerella fijiensis* (Sierotzki *et al.*, 2000) αλλά και σε άλλους. Μια άλλη μεταλλαγή που έχει εντοπιστεί είναι αυτή της αντικατάστασης της φαινυλαλανίνης από τη λευκίνη στη θέση 129 (F129L) της πρωτεΐνης του κυτοχρώματος b. Αυτή η μεταλλαγή έχει αναγνωριστεί σε ανθεκτικά στελέχη των μυκήτων *Pyricularia grisea* (Kim *et al.*, 2003), *Alternaria solani* (Pasche *et al.*, 2002), *Plasmopara viticola* (Heaney *et al.*, 2000) αλλά και σε άλλους φυτοπαθογόνους μύκητες. Η G143A μεταλλαγή οδηγεί σε υψηλούς παράγοντες ανθεκτικότητας ενώ έρευνες υποστηρίζουν ότι η ανθεκτικότητα προκύπτει από μεταβολή στην κοιλότητα πρόσδεσης και έτσι στην δυσκολία πρόσδεσης του παρεμποδιστή (Fisher and Meunier, 2005). Από την άλλη μεριά η μεταλλαγή F129L οδηγεί σε πολύ μικρότερους παράγοντες ανθεκτικότητας. Η μεταλλαγή αυτή αποσταθεροποιεί την πρόσδεση του παρεμποδιστή, η οποία πρόσδεση στην περίπτωση των ευαίσθητων στελεχών επιτυγχάνεται μέσω δεσμών van der Waals μεταξύ του φαινολικού δακτυλίου του F129 αμινοξέος και του δεύτερου θειαζολικού δακτυλίου των μεθοξυακρυλικών παραγώγων (Fisher and Meunier, 2005). Πρακτικά προβλήματα απώλειας της αποτελεσματικότητας των μυκητοκτόνων της ομάδας των Qo παρεμποδιστών έχουμε μόνο στην περίπτωση της G143A μεταλλαγής ενώ στις άλλες περιπτώσεις παρατηρείται μικρή ή και καθόλου απώλεια της αποτελεσματικότητας στον αγρό (Avila-Adame and Koller, 2003).

Ένας άλλος διαφορετικός μηχανισμός ανθεκτικότητας στους Qo αλλά και στους Qi παρεμποδιστές είναι η λειτουργία του εναλλακτικού συστήματος αναπνοής μέσω του οποίου παρακάμπτονται τα σύμπλοκα III και IV του κυτοχρωμικού συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της εναλλακτικής οξειδάσης (AOX) (Wood and Hollomon, 2003; Koller *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2000). Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα στους Qo παρεμποδιστές αλλά τα επίπεδα ανθεκτικότητας είναι μικρά ενώ η αποτελεσματικότητα του μηχανισμού αυτού είναι περιορισμένη *in planta*. Αυτό οφείλεται στα αντιοξειδωτικά που παράγονται από το φυτό και καταστέλλουν την επαγωγή της εναλλακτικής οξειδάσης η και από την αδυναμία του

παθογόνου να παράγει την απαραίτητη ενέργεια για να πραγματοποιήσει την προσβολή με την εναλλακτική αυτή οδό. (Olaya and Koller, 1999; Olaya *et al.*, 1998; Ziogas *et al.*, 2003). Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι σε μελέτες ανθεκτικότητας με στρομπιλουρίνες βρέθηκε ότι η χρήση σαλικυλ- υδροξαμικού οξέος (SHAM) αναστέλλει την δραστηριότητα της εναλλακτικής οξειδάσης (Avila-Adame and Koller, 2003). Όταν υπάρξει η αναστολή αυτή η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στις στρομπιλουρίνες εξαρτάται μόνο από τυχόν μεταλλαγή στις πρωτεΐνες του κυτοχρώματος b.

#### 4.5 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ BOSCALID

Το boscalid είναι μέλος της τάξης των ανιλιδών μυκητοκτόνων (anilide fungicides) στην ομάδα των καρβοξαμιδίων (carboxamide group). Ο τρόπος δράσης, σε μοριακό επίπεδο στην κυτταρική αναπνοή, βασίζεται στη δέσμευση στα μιτοχόνδρια των κυττάρων των μυκήτων, ενός εξαιρετικά σημαντικού ενζύμου, της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος στο σύμπλοκο II.

Το σύμπλοκο II αποτελείται από 4 υπομονάδες, μια φλαβοπρωτεΐνη (Fp), μια πρωτεΐνη σιδήρου-θείου (Ip) και δύο πρωτεϊνικές υπομονάδες προσκολλημένες στη μεμβράνη (SdhC and SdhD). Το boscalid εμποδίζει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το ηλεκτρικό οξύ στο συνένζυμο Q, προκαλεί συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος, παρεμπόδιση του κύκλου του Krebs και συνεπώς της αναπνοής (Lu *et al.*, 2004)

Το boscalid παρεμποδίζοντας το σύμπλοκο II, παρεμποδίζει την βλάστηση των σπορίων, την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα, την μυκηλιακή αύξηση και τη δημιουργία σπορίων. Συνίσταται για χρήση εναντίον των μυκήτων, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia*, *Alternaria*, και *Monilinia* spp., καθώς και εναντίον των ωιδίων και διαφόρων άλλων παθογόνων των λαχανικών και της αμπέλου (Avenot and Michailides, 2007).

## 5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 5.1 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Όλες οι απομονώσεις διατηρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar (PDA). Η παρασκευή του θρεπτικού υλικού περιελάμβανε την εξής διαδικασία. Σε κωνική φιάλη βάζουμε 1000ml απιονισμένο νερό και θερμαίνουμε κατάλληλα. Ακολουθεί η προσθήκη 39gr σκόνης PDA (Oxoid-CM0139), με συνεχή ανάδευση. Μόλις το μίγμα γίνει ομοιογενές και φτάσει στην κατάλληλη θερμοκρασία εγχέεται σε γυάλινες θερμοανθεκτικές φιάλες και σε δοκιμαστικούς σωλήνες, πριν προλάβει να στερεοποιηθεί. Στη συνέχεια αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά και σε πίεση 1.2atm. Μετά τη στερεοποίηση του μίγματος, το PDA μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για καλλιέργειες μυκήτων.

### 5.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ

Κατά το έτος 2009 συλλέχθηκαν φύλλα από απιδεώνες και μεμονωμένα δένδρα αχλαδιάς, της περιοχής της Καρδίτσας και του Σταυρού Φαρσάλων που έφεραν συμπτώματα και σημεία της ασθένειας. Συγκεκριμένα, έγινε συλλογή δειγμάτων προσβεβλημένων φύλλων αχλαδιάς από 3 χωριά της Καρδίτσας, την Κρασιά, την Κυψέλη και το Ανώγειο και από τον Σταυρό Φαρσάλων. Στις 02/07/2009 πραγματοποιήθηκε η πρώτη δειγματοληψία στην Κρασιά Καρδίτσας και ακολούθησε στις 17/07/2009 δειγματοληψία από τα χωριά Κυψέλη και Ανώγειο Καρδίτσας. Τέλος, στις 18/08/2009 πραγματοποιήθηκε η τελευταία δειγματοληψία από τον Σταυρό Φαρσάλων. Το πρόγραμμα των δειγματοληψιών καθώς και ο αριθμός των απομονώσεων του παθογόνου που προέκυψε από κάθε δειγματοληψία παρουσιάζεται στον πίνακα 1. Οι απιδεώνες αλλά και τα μεμονωμένα δένδρα αχλαδιάς από τα οποία συλλεχθήκαν τα δείγματα, δεν είχαν δεχθεί οποιαδήποτε εφαρμογή με μυκητοκτόνα, την καλλιεργητική περίοδο που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία.

Τα φύλλα, μετά τη συλλογή τους τοποθετήθηκαν μέσα σε ξεχωριστές σακούλες πολυαιθυλενίου που περιείχαν υγρασία και μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Στο εργαστήριο ακολουθούσε επιφανειακή απολύμανση με εμβάπτιση σε διάλυμα sodium hypochlorite 5% (Fluka Chemika) για 1,5 min και στη συνέχεια εμβάπτιση σε αποστειρωμένο νερό για 2min. Τέλος τα φύλλα στεγνωνόταν με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού. Εν συνεχεία, τοποθετούταν τα δείγματα σε αποστειρωμένα τριβλία Petri και εναποθέτονταν πάνω στις κηλίδες προσεκτικά 2 με 3 σταγόνες απιονισμένου νερού για 5min έτσι ώστε να εξέλθουν τα πυκνιδιοσπόρια από τα πυκνίδια στο υπερκείμενο νερό. Τέλος, μικρή ποσότητα αιωρήματος πυκνιδιοσπορίων μεταφέρονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με PDA. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25°C στο σκοτάδι και μετά από 2 εβδομάδες ανάπτυξης τοποθετήθηκαν στους 4°C και παρέμειναν εκεί μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Συνολικά δημιουργήθηκαν 42 απομονώσεις.

Πίνακας 1. Περιοχές και ημερομηνίες δειγματοληψιών για τη δημιουργία απομονώσεων *S. pyricola*.

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ
ST	Σταυρός, Φάρσαλα	22	18/08/2009
KR	Κρανιά, Καρδίτσα	6	02/07/2009
KPS	Κυψέλη, Καρδίτσα	5	17/07/2009
AN	Ανώγειο, Καρδίτσα	9	17/07/2009

Στις 16/12/2009 χρησιμοποιήθηκαν οι πιο εύρωστες και χωρίς επιμολύνσεις απομονώσεις για τη δημιουργία καθαρών υποκαλλιεργειών. Υπό ασηπτικές συνθήκες και με τη βοήθεια αποστειρωμένης βελόνας, αποκόπτονταν ένα τμήμα του θρεπτικού υλικού που περιείχε τις καρποφορίες του μύκητα και μεταφερόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν PDA και οι οποίοι εν συνεχεία τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης στους 25°C στο σκοτάδι. Με τη μέθοδο αυτή δημιουργήθηκαν 40 καθαρές απομονώσεις για τον έλεγχο της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα.

### 5.3 ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

Χρησιμοποιήθηκαν 4 μυκητοκτόνα στη μορφή των εμπορικών σκευασμάτων. Αυτά ήταν το carbendazim 50% WP, (Cequisa S.A., Spain), pyraclostrobin ως F 500 25% EC, (BASF, Germany), bitertanol ως Baycor 25% WP (Bayer AG, Germany) και boscalid ως Nicobifen 50% WG (BASF, Germany) . Τα μυκητοκτόνα διαλύθηκαν σε Dimethylsulfoxide (DMSO) και προετοιμάστηκαν πυκνά διαλύματα, συγκέντρωσης 1000 mg/ml δραστικής ουσίας. Στη συνέχεια έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις χρησιμοποιώντας ως διαλύτη πάλι το Dimethylsulfoxide (DMSO) και έγινε ενσωμάτωση του διαλύματος των μυκητοκτόνων σε λιωμένο θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar έτσι ώστε να δημιουργηθούν οι εξής συγκεντρώσεις: carbendazim: 0.1, 10 και 100 mg·l<sup>-1</sup>, pyraclostrobin: 0.005, 0.01, 0.1, 1 και 10 mg·l<sup>-1</sup>, bitertanol: 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, και 1 mg·l<sup>-1</sup> και boscalid: 0.005, 0.01, 0.1 και 1 mg·l<sup>-1</sup> . Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό που περιείχε μόνο διαλύτη. Η συγκέντρωση του διαλύτη στο θρεπτικό διάλυμα δεν ξεπερνούσε το 1%.

### 5.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΟΛΥΣΜΑΤΟΣ – ΜΟΛΥΝΣΗ

Επιλέχθηκαν 40 απομονώσεις του μύκητα *Septoria pyricola* ηλικίας περίπου 3 εβδομάδων που είχαν αναπτυχθεί υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό P.D.A. (Oxoid) και εμφάνιζαν μακροσκοπικά πυκνίδια. Η ανίχνευση ανθεκτικότητας των απομονώσεων αυτών έγινε με την μέθοδο της σημειακής εναπόθεσης σταγόνας κατάλληλα τροποποιημένης (Pappas, 1997).

Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά και για τα τέσσερα μυκητοκτόνα ήταν 17 και ο μάρτυρας. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν 18 επίπεδα θερμοανθεκτικά μπουκάλια, κάθε ένα από τα οποία περιείχε 100ml θρεπτικό υλικό. Μετά την τήξη του θρεπτικού υλικού στους 45°C περίπου, προστέθηκε στα μπουκάλια τα διαλύματα των μυκητοκτόνων σε Dimethylsulfoxide (DMSO), δημιουργώντας έτσι θρεπτικό υλικό με την ανάλογη συγκέντρωση μυκητοκτόνου. Σε ένα από τα θερμοανθεκτικά μπουκάλια προστέθηκε μόνο ο διαλύτης Dimethylsulfoxide (DMSO) και λειτούργησε σαν μάρτυρας. Το περιεχόμενο κάθε μπουκαλιού μετά από καλή

ανακίνηση διασκορπίστηκε ισοδύναμα σε 10 τρυβλία Petri. Δημιουργήθηκαν έτσι συνολικά 180 τρυβλία Petri 10 για κάθε συγκέντρωση μυκητοκτόνου και 10 για το μάρτυρα. Σε κάθε τρυβλίο προσημειώθηκαν 4 θέσεις ώστε να γίνουν οι μολύνσεις.

Για τη μόλυνση χρησιμοποιήθηκε αιώρημα πυκνιδιοσπορίων. Υπό ασηπτικές συνθήκες σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε τις καθαρές απομονώσεις, προστέθηκαν 2cm περίπου αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό. Με τη βοήθεια συμπαγούς γυάλινης ράβδου ξύναμε ελαφρώς την επιφάνεια των αποικιών του παθογόνου ώστε να εξέλθουν τα πυκνιδιοσπόρια από τα πυκνίδια. Η μόλυνση έγινε με μεταφορά μιας σταγόνας αυτού του αιωρήματος σε κάθε προσημειωμένη θέση κάθε τρυβλίου με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur. Μετά τη μόλυνση τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 24 °C σε συνθήκες σκότους.

## 5.5 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

Οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν στις 17/01/2010. Οι μετρήσεις βλάστησης σπορίων σε όλα τα τρυβλία έλαβαν χώρα 3 μέρες μετά τη μόλυνση και συγκεκριμένα στις 20/01/2010. Η μέτρηση έγινε παρατηρώντας τη βλάστηση των σπορίων σε τυχαία οπτικά πεδία, στη μεγέθυνση X100 του κοινού μικροσκοπίου

Επίσης 8 ημέρες μετά τη μόλυνση και συγκεκριμένα στις 25/01/2010, έγινε παρατήρηση των αποικιών του μύκητα που διακρίνονταν με γυμνό οφθαλμό, σε όλες τις επεμβάσεις.

## 6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο S.P.S.S. 13 ( ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι).



## 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα του πειράματος εξήχθησαν μετά από έλεγχο για τη βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη αποικιών του μύκητα στις διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων και στους μάρτυρες. Από τις 40 αρχικά επιλεγμένες απομονώσεις μια, συγκεκριμένα η KPS9 είχε επιμόλυνση με βακτήριο και για αυτό το λόγο δεν λήφθηκε υπόψη στην ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ο έλεγχος για τη βλάστηση των σπορίων πραγματοποιήθηκε 3 ημέρες μετά τις μολύνσεις. Συγκεκριμένα οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν στις 17/01/2010 και οι μετρήσεις για την βλάστηση των σπορίων στις 20/01/2010. Στην παρούσα έρευνα, ένα σπόριο θεωρήθηκε βλαστημένο όταν είχε εμφανίσει τουλάχιστον 1 βλαστικό σωλήνα, μήκους μεγαλύτερου ή ίσου του μισού του συνολικού μήκους του σπορίου. Στη συνέχεια και μετά το πέρας 8 ημερών και συγκεκριμένα στις 25/01/2010, πραγματοποιήθηκε η εξέταση των τρυβλίων, μακροσκοπικά δια γυμνού οφθαλμού για την ανάπτυξη ή όχι μυκηλίου του μύκητα.

### **Carbendazim**

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος για το carbendazim έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό (38%) των απομονώσεων και συγκεκριμένα οι 15 από τις 39 παρουσίασαν ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC)  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , καθώς απέτυχαν να αναπτύξουν μυκήλιο ακόμα και στη χαμηλότερη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου. Από τις υπόλοιπες απομονώσεις, οι 9 παρουσίασαν ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , 7 παρουσίασαν ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση  $100 \text{ mg L}^{-1}$  και 8 απομονώσεις έδωσαν μυκήλιο που δε διέφερε μακροσκοπικά από αυτό του μάρτυρα ακόμα και στην υψηλότερη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου,  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .

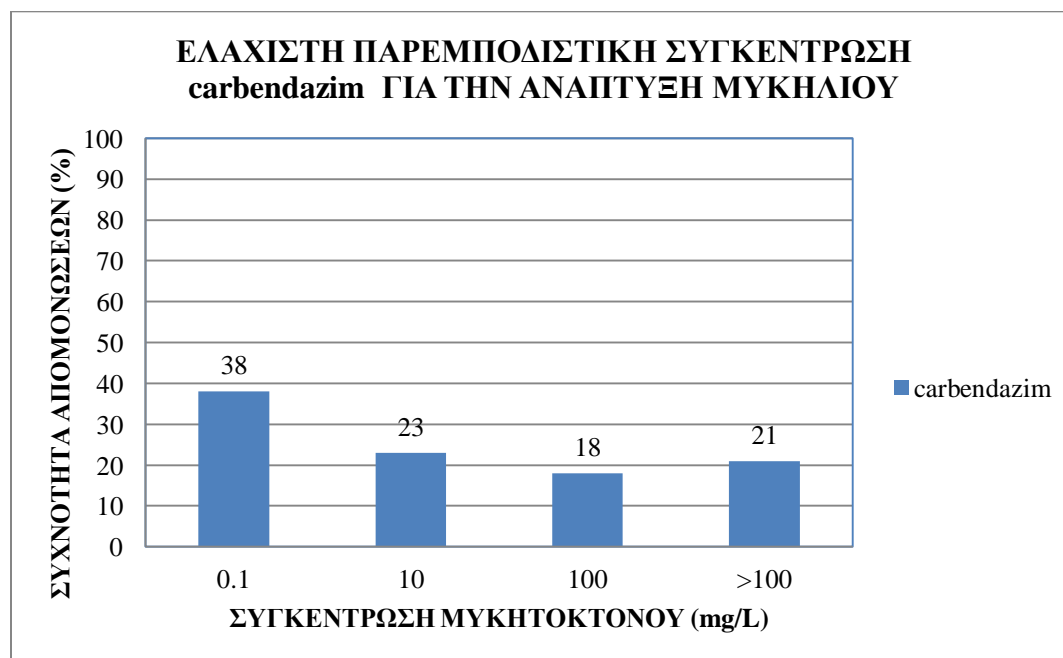
Συγκεκριμένα στη συγκέντρωση  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , οι απομονώσεις ST7, ST23, ST19, ST20, ST6, ST9, KR8 και KPS4 που προήλθαν από το Σταυρό Φαρσάλων, την Κρανιά και την Κυψέλη Καρδίτσας παρουσίασαν βλάστηση σπορίων που δεν διέφερε από το μάρτυρα. Επίσης, ο έλεγχος για την ανάπτυξη του μυκηλίου έδειξε ότι αυτές απομονώσεις δεν διέφεραν μακροσκοπικά από την ανάπτυξη μυκηλίου του μάρτυρα

ακόμα και στην υψηλότερη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου carbendazim. Για το λόγο αυτό οι παραπάνω απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικές στο carbendazim.

Οι απομονώσεις KR9, KR5, KR2, KPS5, KPS7, AN13 και AN20 που προήλθαν από την Κρασιά, την Κυψέλη και το Ανώγειο Καρδίτσας επίσης έδωσαν βλάστηση σπορίων που δεν διέφερε μακροσκοπικά από τη βλάστηση των σπορίων του μάρτυρα. Απέτυχαν όμως να δώσουν ανάπτυξη μυκηλίου όταν η συγκέντρωση του carbendazim ξεπερνούσε τα  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Για το λόγο αυτό οι παραπάνω απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως μετρίως ανθεκτικές στο carbendazim.

Τέλος οι απομονώσεις KR1, KPS15, AN10, AN16, AN6, AN15, AN21, AN4 και AN12 παρουσίασαν ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , ενώ όλες οι υπόλοιπες απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα απέτυχαν να δώσουν βλάστηση μυκηλίου στη μικρότερη συγκέντρωση μυκητοκτόνου carbendazim και χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες στο μυκητοκτόνο.

**Διάγραμμα 1.** Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την ανάπτυξη μυκηλίου, απομονώσεων *S. pyricola* στο carbendazim.



Το carbendazim δεν παρεμπόδισε τη βλάστηση των σπορίων του μύκητα σε όλες τις απομονώσεις, παρεμπόδισε όμως την καλή ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα στις ευαίσθητες απομονώσεις. Συγκεκριμένα, στις απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στον έλεγχο για τη βλάστηση των σπορίων και χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες, είχαμε βλάστηση των σπορίων με παραμορφωμένο όμως βλαστικό σωλήνα. Στις 7 μετρίως ανθεκτικές απομονώσεις είχαμε μικρότερης έντασης παρεμπόδιση ανάπτυξης του βλαστικού σωλήνα ενώ στις υπόλοιπες 8 ανθεκτικές απομονώσεις η βλάστηση των σπορίων δεν διέφερε μακροσκοπικά με τη βλάστηση που παρουσίασε ο μάρτυρας.

### **Bitertanol**

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος για το bitertanol έδειξε για το μεγαλύτερο ποσοστό των απομονώσεων (85%) η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) κυμάνθηκε από 0,005 mg L<sup>-1</sup> έως 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Από το σύνολο των απομονώσεων οι 14 παρουσίασαν ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση 0,005 mg L<sup>-1</sup>, καθώς απέτυχαν να αναπτύξουν μυκήλιο σε αυτή τη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου. Από τις υπόλοιπες απομονώσεις, 8 παρουσίασαν ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση 0,01 mg L<sup>-1</sup>, ενώ 11 απομονώσεις δεν κατάφεραν να αναπτύξουν μυκήλιο σε συγκέντρωση bitertanol, 0,1 mg L<sup>-1</sup>.

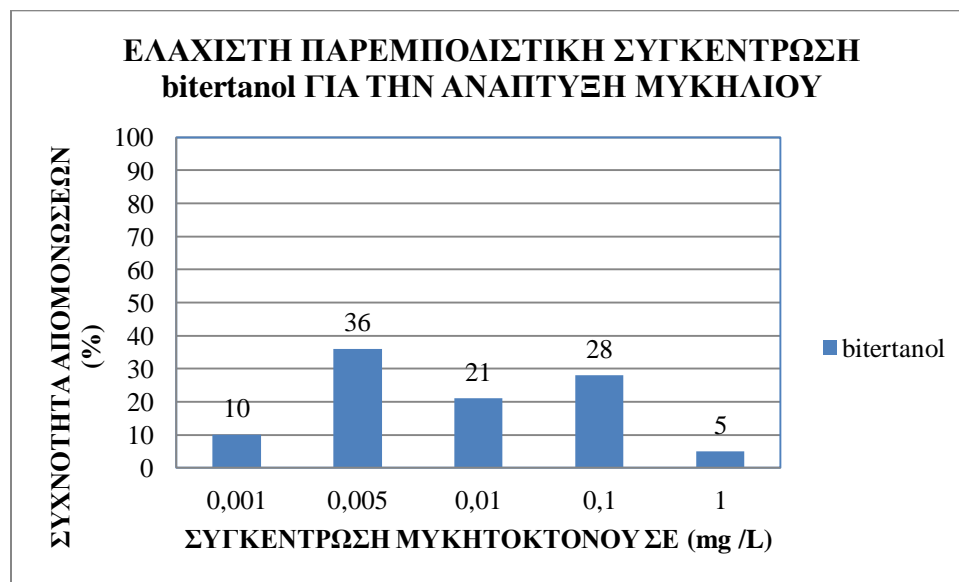
Συγκεκριμένα, οι απομονώσεις ST23, ST12, ST10, ST16, ST19, ST20, ST18, ST3, ST14, ST4, ST5, AN12, AN4 και KPS4 που προήλθαν από τρεις διαφορετικές περιοχές και συγκεκριμένα από το Σταυρό Φαρσάλων, το Ανώγειο και την Κυψέλη Καρδίτσας παρουσίασαν βλάστηση σπορίων που δεν διέφερε από το μάρτυρα στη συγκέντρωση 0,001 mg L<sup>-1</sup>. Επίσης, ο έλεγχος για την ανάπτυξη μυκηλίου έδειξε ότι αυτές απομονώσεις παρουσίασαν ανάπτυξη μυκηλίου η οποία παρεμποδίστηκε σε συγκέντρωση μυκητοκτόνου μεγαλύτερη της 0,005 mg L<sup>-1</sup>.

Οι απομονώσεις ST11, ST7, ST21, ST1, ST2, ST6, AN13 και AN20 που προήλθαν από το Σταυρό Φαρσάλων και το Ανώγειο Καρδίτσας επίσης παρουσίασαν βλάστηση σπορίων με παρεμπόδιση όμως της καλής ανάπτυξης του βλαστικού σωλήνα.

Η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση για την ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων αυτών ήταν  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ .

Τέλος, οι απομονώσεις ST15, ST9, KR8, KR1, KR2, KPS5, KPS7, AN10, AN16, AN6 και AN15 που προήλθαν και από τις 4 διαφορετικές περιοχές δειγματοληψιών, είχαν ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ . Δύο απομονώσεις, οι KR9 και KR5, είχαν ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση για την ανάπτυξη μυκηλίου  $1 \text{ mg L}^{-1}$  και για το λόγο αυτό χαρακτηρίστηκαν μετρίως ευαίσθητες στο bitertanol.

**Διάγραμμα 3.** Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την ανάπτυξη μυκηλίου, απομονώσεων *S. pyricola* στο bitertanol.

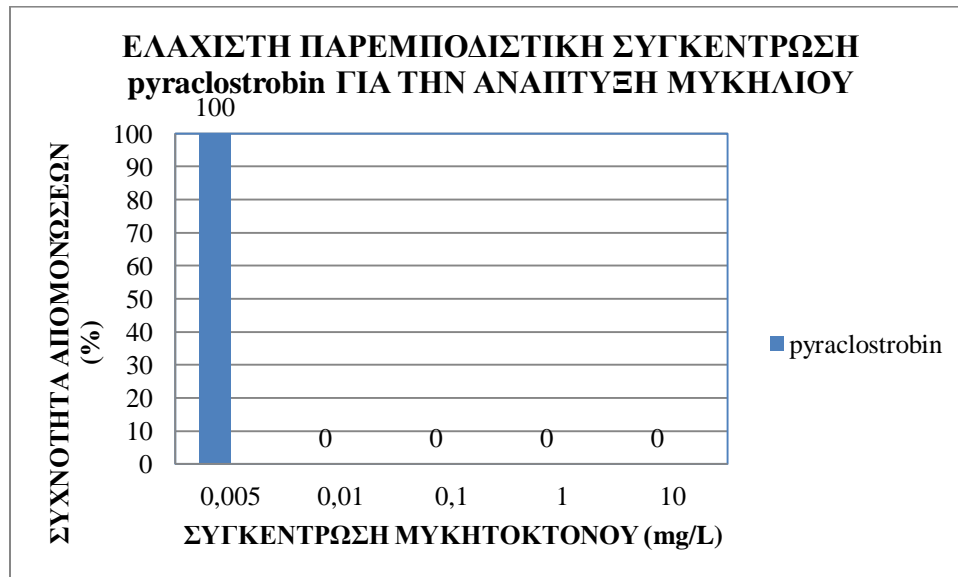


Το bitertanol δεν παρεμπόδισε τη βλάστηση των σπορίων του μύκητα σε όλες τις απομονώσεις, παρεμπόδισε όμως την καλή ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα. Γενικά, καθώς η συγκέντρωση του μυκητοκτόνου αυξανόταν, μειωνόταν σταδιακά το μήκος του βλαστικού σωλήνα.

## Pyraclostrobin

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος για το pyraclostrobin έδειξε ότι το σύνολο των απομονώσεων παρουσίασαν ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση  $0,005 \text{ mg L}^{-1}$ , καθώς απέτυχαν να αναπτύξουν μυκήλιο ακόμα και στη χαμηλότερη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου. Όλες οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες στο μυκητοκτόνο pyraclostrobin.

**Διάγραμμα 2.** Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την ανάπτυξη μυκηλίου, απομονώσεων *S. pyricola* στο pyraclostrobin.



Το pyraclostrobin παρεμπόδισε επίσης και την βλάστηση των σπορίων του μύκητα. Σε καμία από τις 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου δεν παρουσιάστηκε βλάστηση σπορίων. Η μικρότερη συγκέντρωση, που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα,  $0,005 \text{ mg L}^{-1}$ , θεωρήθηκε η ελάχιστη που παρεμποδίζει πλήρως τη βλάστηση των σπορίων του μύκητα.

## Boscalid

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος για το boscalid έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των απομονώσεων και συγκεκριμένα το 92%, παρουσίασαν

ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , καθώς απέτυχαν να αναπτύξουν μυκήλιο. Μόλις 2 απομονώσεις παρουσίασαν ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση για την ανάπτυξη του μυκηλίου  $0,005 \text{ mg L}^{-1}$  και 1 απομόνωση  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ .

**Διάγραμμα 4.** Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την ανάπτυξη μυκηλίου, απομονώσεων *S. pyricola* στο boscalid.



Η βλάστηση των σπορίων όλων των απομονώσεων του πειράματος, παρεμποδίστηκε σε συγκεντρώσεις πάνω από  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  ή έδωσαν ανάπτυξη αραιών αποικιών δύσκολά ορατών δια γυμνού οφθαλμού.

## 8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε, με τη μέθοδο της σημειακής εναπόθεσης αιωρήματος σπορίων σε τρυβλία με PDA εμπλουτισμένο με διαφορετικές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων, η ευαισθησία, *in vitro*, 40 απομονώσεων του μύκητα *S. pyricola*. Οι απομονώσεις του μύκητα συλλέχθηκαν το έτος 2009, από 4 περιοχές και συγκεκριμένα, τον Σταυρό Φαρσάλων του νομού Λάρισας, την Κυψέλη, το Ανώγειο και την Κρασιά του νομού Καρδίτσας. Για τον σκοπό του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 4 επιλεγμένα μυκητοκτόνα που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες και έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης. Τα μυκητοκτόνα αυτά ήταν, από την ομάδα των βενζιμιδαζολικών (Ben), το carbendazim, από την ομάδα των παρεμποδιστών απομεθυλίωσης στερολών (DMIs), το bitertanol, από τις στρομπιλουρίνες (Qol's), το pyraclostrobin και τέλος το boscalid.

Η σεπτορίωση μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ασθένεια με μικρή σημασία και οι συνήθεις επεμβάσεις με μυκητοκτόνα εναντίον του παθογόνου *Venturia pirina* είναι αποτελεσματικές και εναντίον των προσβολών από το μύκητα *S. pyricola*. Όμως, τα τελευταία χρόνια έχουν αναφερθεί σοβαρά προβλήματα σε οπωρώνες αχλαδιάς εξαιτίας της σεπτορίωσης στην Ιταλία αλλά και στην Ελλάδα (Μπίρης κ. α., 1991; Aloj *et al.*, 1994; Pappas *et al.*, 2006; Pappas *et al.*, 2010).

Τα τελευταία χρόνια, η συνεχής και εκτεταμένη χρήση μυκητοκτόνων της ομάδας των βενζιμιδαζολικών και των παρεμποδιστών απομεθυλίωσης στερολών σε μηλιές και αχλαδιές, οδήγησε στην εμφάνιση ανθεκτικότητας σε πολλά παθογόνα που προκαλούν εσχάρωσεις στα γιγατόκαρπα (Shabi & Ben-Yephet, 1976; Stanis & Jones, 1985; Köller *et al.*, 1991). Πρόσφατα αναφέρθηκαν και τα πρώτα ανθεκτικά στελέχη του παθογόνου *V. inaequalis*, που προκαλεί την ασθένεια του φουζικλαδίου της μηλιάς, στη νέα ομάδα μυκητοκτόνων των στομπιλουρινών (Zheng *et al.*, 2000; Bartlett *et al.*, 2002). Μέχρι πρόσφατα δεν υπήρχε καμία διαθέσιμη πληροφορία για την ευαισθησία του μύκητα *S. pyricola* στις διάφορες ομάδες μυκητοκτόνων. Οι Pappas και συνεργάτες το 2006, έδειξαν για πρώτη φορά την ύπαρξη υψηλά ανθεκτικών στελεχών του μύκητα στο carbendazim, της ομάδας των βενζιμιδαζολικών, *in vitro*, από απομονώσεις που συλλέχθηκαν από την ευρύτερη περιοχή του νομού Μαγνησίας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθούν φαινόμενα ανθεκτικότητας *in vitro*, ικανού αριθμού απομονώσεων, που συλλέχθηκαν από την ευρύτερη περιοχή του

νομού Καρδίτσας και του νομού Λάρισας, του μύκητα *S. pyricola*, στα μυκητοκτόνα carbendazim (Ben) και bitertanol (DMIs), τα οποία χρησιμοποιούνται εκτεταμένα επί δεκαετίες. Επίσης, σκοπός της παρούσας εργασίας, ήταν η αξιολόγηση της ευαισθησίας των απομονώσεων αυτών, στα μυκητοκτόνα, pyraclostrobin (QoI's) και το νέο μυκητοκτόνο boscalid, που πρόσφατα πήραν έγκριση για την εισαγωγή τους στη ελληνική γεωργική πρακτική, εναντίον της σεπτορίωσης. Τέλος, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο υπολογισμός, *in vitro*, των ελάχιστων συγκεντρώσεων (MIC) των παραπάνω μυκητοκτόνων που παρεμποδίζουν πλήρως την ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα του πειράματος συμπεραίνουμε ότι, το carbendazim δεν παρεμπόδισε τη βλάστηση των σπορίων του μύκητα σε όλες τις απομονώσεις, παρεμπόδισε όμως τη φυσιολογική ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα στις ευαίσθητες απομονώσεις. Επίσης, σε όλες τις απομονώσεις το bitertanol δεν παρεμπόδισε τη βλάστηση των σπορίων του μύκητα, παρεμπόδισε όμως τη φυσιολογική ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα και καθώς η συγκέντρωση του μυκητοκτόνου αυξανόταν, μειωνόταν σταδιακά το μήκος του βλαστικού σωλήνα. Αυτό οφείλεται στο ότι μυκητοκτόνα όπως το bitertanol (DMIs) που παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης δεν δρουν εναντίον της βλάστησης των σπορίων (Buchenaue, 1977). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι το παθογόνο προμηθεύεται την εργοστερόλη που χρειάζεται για την βλάστηση των σπορίων από τα αποθέματα εργοστερόλης που υπάρχουν μέσα σε αυτά (Hansler and Kuck, 1987).

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προγενέστερες έρευνες οι οποίες αναφέρουν ότι τα 2 αυτά μυκητοκτόνα δεν επιδρούν στη βλάστηση των σπορίων. Το carbendazim, κυρίως παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μυκηλίου παρεμποδίζοντας μιτωτικές διεργασίες του κυττάρου (Davidse & Flach, 1978), ενώ το bitertanol, παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης (Sisler & Ragsdale, 1983).

Τέλος, σε όλες τις απομονώσεις το pyraclostrobin παρεμπόδισε αποτελεσματικά τη βλάστηση των σπορίων του μύκητα ακόμα και στη μικρότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα. Το γεγονός αυτό, οφείλεται στο βιοχημικό τρόπο δράσης των στρομπιλουρινών, οι οποίες παρεμβάλλονται και διαταράζουν την παραγωγή ενέργειας, που είναι απαραίτητη για ένα τόσο απαιτητικό ενεργειακά στάδιο στην



ανάπτυξη των μυκήτων, όπως είναι η βλάστηση των σπορίων (Leinhos *et al.*, 1997). Επίσης, το boscalid παρεμπόδισε τη βλάστηση των σπορίων όλων των απομονώσεων του πειράματος, σε συγκεντρώσεις πάνω από 0,1 mg L<sup>-1</sup>.

Στο carbendazim, τεκμηριώθηκε η ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *S. pyricola*. Από τις 39 συνολικά απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, οι 15 χαρακτηρίστηκαν ευαίσθητες (MIC 0,1 mg L<sup>-1</sup>), 8 απομονώσεις σχημάτισαν αποικίες που δε διέφεραν μακροσκοπικά από αυτές του μάρτυρα ακόμα και στην υψηλότερη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου και χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικές στο carbendazim (MIC >100 mg L<sup>-1</sup>). Ενώ 9 και 7 από τις υπόλοιπες απομονώσεις, παρουσίασαν ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση 10 mg L<sup>-1</sup> και 100 mg L<sup>-1</sup> αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα αναδεικνύουν την ύπαρξη ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών του μύκητα *Septoria pyricola* στις περιοχές του Ν. Καρδίτσας και τον Σταυρό Φαρσάλων, από όπου έγιναν οι δειγματοληψίες. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι το ποσοστό ανθεκτικών στελεχών του μύκητα ήταν αρκετά υψηλό (21%) παρά το γεγονός ότι το σύνολο των απομονώσεων προήλθαν από αγλαδεώνες και δένδρα που δεν είχαν δεχθεί επεμβάσεις με βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, την περίοδο των δειγματοληψιών. Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με πειράματα που έγιναν σε αγλαδεώνες του Ν. Μαγνησίας και έδειξαν αποτυχία καταπολέμησης της σεπτορίωσης της αγλαδιάς όταν οι ψεκασμοί βασίζονταν σε μονομερή χρήση βενζιμιδαζολικών (Μπίρης κ. α., 1991; Pappas *et al.*, 2006; Pappas *et al.*, 2010).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος για το bitertanol έδειξε ότι για το μεγαλύτερο ποσοστό των απομονώσεων (95%) η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) κυμάνθηκε από 0,001 mg L<sup>-1</sup> έως 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Οι απομονώσεις αυτές χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητες στο bitertanol. Το υπόλοιπο 5% των απομονώσεων (2 μόλις απομονώσεις), είχαν ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση 1 mg L<sup>-1</sup> και για το λόγο αυτό χαρακτηρίστηκαν μετρίως ευαίσθητες στο bitertanol.

Το bitertanol παρεμπόδισε *in vitro* την ανάπτυξη των αποικιών του μεγαλύτερου ποσοστού των απομονώσεων του μύκητα, γεγονός που είναι σε συμφωνία με τα δεδομένα από τα πειράματα των Μπίρη και συνεργατών (1991) καθώς και των Παππά και συνεργατών (2006 και 2010). Η ύπαρξη μετρίως ευαίσθητων στο bitertanol στελεχών του *Septoria pyricola* σε ποσοστό 5% οδηγεί στην ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης της

πιθανής ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα EBIs. Τα αποτελέσματα αυτά επισημαίνουν, τον πιθανό κίνδυνο αποτυχίας καταπολέμησης του μύκητα *Septoria pyricola*, από τα DMI μυκητοκτόνα και χρίζει περαιτέρω έρευνας.

Όλες οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες στο μυκητοκτόνο pyraclostrobin, καθώς απέτυχαν να σχηματίσουν αποικίες ακόμα και στη χαμηλότερη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου ( $0,005 \text{ mg L}^{-1}$ ). Επίσης, όλες οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες στο νέο μυκητοκτόνο boscalid καθώς η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) κυμάνθηκε από  $0,005 \text{ mg L}^{-1}$  έως  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ . Το γεγονός αυτό είναι ένδειξη ότι η κατηγορία των στρομπιλουρινών και το νέο μυκητοκτόνο boscalid μπορεί να αποτελέσει μία καλή εναλλακτική λύση για την καταπολέμηση της σεπτορίωσης της αχλαδιάς. Επίσης, η απουσία ανθεκτικών στο pyraclostrobin και στο boscalid στελεχών του *Septoria pyricola* ήταν αναμενόμενη μια και τα μυκητοκτόνα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί για μικρό χρονικό διάστημα για την καταπολέμηση του συγκεκριμένου μύκητα στην πράξη.

Συμπερασματικά λοιπόν διερευνήθηκαν φαινόμενα ανθεκτικότητας *in vitro*, 40 απομονώσεων, που συλλέχθηκαν από την ευρύτερη περιοχή του νομού Καρδίτσας και του νομού Λάρισας, του μύκητα *S. pyricola*, στα μυκητοκτόνα carbendazim (Ben), bitertanol (DMIs), pyraclostrobin (Qol's) και το νέο μυκητοκτόνο boscalid. Διαπιστώθηκε για πρώτη φορά, η ύπαρξη ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών του μύκητα *Septoria pyricola*, στις περιοχές του Ν. Καρδίτσας από όπου έγιναν οι δειγματοληψίες, σε αρκετά υψηλό ποσοστό (21%). Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία καταπολέμησης της ασθένειας όταν γίνει χρήση μόνο βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων.

Επίσης, διαπιστώθηκε η ύπαρξη μετρίως ευαίσθητων στο bitertanol στελεχών του *Septoria pyricola* σε ποσοστό 5% γεγονός που οδηγεί στην ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης της πιθανής ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα της ομάδας παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης. Τέλος, διαπιστώθηκε η απουσία ανθεκτικών, στο pyraclostrobin και στο boscalid, στελεχών του *Septoria pyricola*. Γεγονός που είναι ένδειξη ότι η κατηγορία των στρομπιλουρινών και το νέο μυκητοκτόνο boscalid μπορεί να αποτελέσει μία καλή λύση για την καταπολέμηση της

σεπτορίωσης της αχλαδιάς, σε περιπτώσεις αδυναμίας καταπολέμησης της ασθένειας από τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα και τους παρεμποδιστές απομεθυλίωσης στερολών.

## 9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 9.1 ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aloj, B., Nanni, B., Marziano, F., Noviello, C., 1994. Severe and unusual occurrence of leaf fleck on pear trees in Campania. *Informatore Fitopatologico* **9**, 25-29 (in Italian).
- Avenot, H. F., and Michailides, T. J. 2007. Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. *Plant Disease* **91**:1345-1350.
- Avila-Adame, C., Olaya, G., and Köller, W. 2003. Characterization of, *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to strobilurin-related QoI fungicides. *Plant Disease* **87**:1426-1432.
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B., 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* **58**, 649-662.
- Buchenauer, H., 1977. Mode of action and selectivity of fungicides which interfere with ergosterol biosynthesis. *Proceedings of the 1977 British Crop Protection Conference – Pest and Diseases*, 699-711.
- Brent, K. J., 1995. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? *FRAC Monograph No.1*, GIFAP, Brussels, 48pp.
- Brent, K. J., Hollomon, D.W., 1998. Fungicide resistance: the assessment of risk. *FRAC Monograph No2*, GCPF, Belgium.
- Davidse, L.C., Ishii, H., 1995. Biochemical and molecular aspects of the mechanisms of action of benzimidazoles, *N*-phenylcarbamates and *N*-phenylformamidoximes and the mechanisms of resistance to these compounds in fungi. In: Lyr H, eds. *Modern selective fungicides*. Stuttgart, Germany: Gustav Fischer Verlag, 305-322.
- Davidse, L. C., and W. Flach. 1977. Differential binding of methyl-benzimidazole-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* **72**:174-193.
- Del Sorbo, G., A. C. Andrade, J. G. Van Nistelrooy, J. A. Van Kan, E. Balzi, and M. A. De Waard. 1997. Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters. *Mol. Gen. Genet.* **254**: 417–426.

- Delye, C., L. Bousset, and M. F. Corio-Costet. 1998. PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14  $\alpha$ -demethylase (*CYP51*) gene from *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, a "recalcitrant" fungus. *Curr. Genet.* **34**:399-403.
- Delye, C., F. Laigret, and M.-F. Corio-Costet. 1997. A mutation in the 14 $\alpha$ -12 demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2966-2970.
- Diaz- Guerra, T. M., Mellado, M. Cuenca-Estrella, and J. L. Rodriguez- Tudela. 2003. A point mutation in the 14 $\alpha$ -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother* **47**:1120-1124.
- Fisher, N., and Meunier, B. 2005. Re-examination of inhibitor resistance conferred by Qo-site mutations in cytochrome *b* using yeast as a model system. *Pest Management Science* **61**:973-978.
- Gabadze, E.I., 1971. White Spot of Leaves of Pear (*Septoria piricola* Desm.) in Georgia and methods of its control. PhD Thesis. Tbilisi: *Georgian institute of subtropical husbandry*. 25 p. (In Russian).
- Gilpatrick, J.D., 1982. Case study 2: *Venturia* of pome fruits and *Monilinia* of stone fruits. In: Dekker J, Georgopoulos SG, eds. *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, the Netherlands: Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 195-206.
- Hamamoto, H., K. Hasegawa, R. Nakaune, Y. J. Lee, Y. Makizumi, K. Akutsu, and T. Hibi. 2000. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14  $\alpha$ -demethylase gene 1 (*CYP51A1*) in *Penicillium digitatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3421-3426.
- Hanssler, G. and Kuck, K.H., 1987. Microscopic studies on the effect of Folicur™ on pathogenesis of brown rust of wheat (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*). *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer* (English edn). **40**, 153-180.
- Heaney, S. P., Hall, A. A., Davis, S. A. and Olaya, G. (2000) Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross resistance group: current perspectives. *In Proceedings Brighton Crop Protection Conference- Pests and Diseases* **2**: 755-762.

- Higgins, CF, 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Research in Microbiology*. **152**, 205-210.
- Ishii, H., Fraaije, B. A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T. and Hollomon, D. W. 2001. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* **91**: 1166-1171.
- Jones, A. L. and Aldwinckle, H.S., 1990. *Compendium of Apple and Pear Diseases*. APS Press, Minnesota, USA, 32.
- Karaoglanidis, G.S., Ioannidis, P.M., Thanassoulopoulos, C.C., 2002. Changes in sensitivity of *Cercospora beticola* populations to sterol-demethylation-inhibiting fungicides during a 4-year period in northern Greece. *Plant Pathology* **51**, 55-62.
- Kema, G.H.J., Annone, J.G., Sayoud, R., van Silfhout, C.H., van Ginkel, M. & deBree, J. (1996). Genetic variation for virulence and resistance in the wheat *Mycosphaerella graminicola* pathosystem. I. Interactions between pathogen isolates and host cultivars. *Phytopathology*, **86**: 200–12.
- Kim, Y.S., Dixon, P., Vincelli, P. and Farman, M.L. (2003) Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology* **93**: 891-900.
- Koenraadt, H., S. C. Somerville, and A. L. Jones. 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* **82**:1348-1354.
- Köller, W., 1991. Fungicide resistance in plant pathogens. In: Pimentel D, Hanson AA, eds. *CRC Handbook of Pest Management in Agriculture*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 679-720.
- Köller, W., Scheinpflug, H., 1987. Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors: a new challenge. *Plant Disease* **71**, 1066-1074.
- Leinhos, G. M. E., Gold, R.E., Duggelin, M. and Guggenheim, R., 1997. Development and morphology of *Uncinula necator* following treatment with the fungicides kresoxim-methyl and penconazole. *Mycological Research* **101**, 1033-1046.
- Lu, Y., Ma, J., Sutton, T. B., and Ypema, H. 2004. Comparison of two assay methods for evaluating the sensitivity of *Alternaria mali* to boscalid. *Phytopathology* **94**:S63.

- Ma, Z., T. J. Proffer, J. L. Jacobs, and G. W. Sundin. 2006. Overexpression of the 14a-demethylase target gene (*cyp51*) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:2581-2585.
- Ma, Z. H., M. A. Yoshimura, and T. J. Michailides. 2003. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7145-7152.
- Ma, Z., Felts, D. and Michailides, T.J. (2003) Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **77**: 66-74.
- Ma, Z. and Michailides, T. J. (2004) An allele-specific PCR assay for detecting azoxystrobin-resistant *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Journal of Phytopathology* **152**: 118-121.
- Nakaune, R., K. Adachi, O. Nawata, M. Tomiyama, K. Akutsu, and T. Hibi. 1998. A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3983–3988.
- Olaya, G., Zheng, D., and Köller, W. 1998. Differential responses of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxim-methyl. *Pesticide Science* **54**:230-236.
- Olaya, G., and Köller, W. 1999. Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl. *Plant Disease* **83**:274-278.
- Pappas, A.C., 1997. Evolution of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in protected crops in Greece. *Crop Protection* **16**, 257-263.
- Pappas, A.C., Mylonopoulos, I.S., Vellios, E.K., 2006. Fungicide sensitivity in *Septoria pyricola* and leaf fleck control on pears in Greece. *Proc. 12<sup>th</sup> Congress of Mediterranean Phytopathological Union, Rodos*, 212-214.
- Pappas, A. C., Vellios, E. K., Mylonopoulos I. S., Chatzidimopoulos, M., Vlassacoudis, A. 2010. Sensitivity of *Septoria pyricola* isolates to carbendazim, DMI and QoI based fungicides and to boscalid, in Greece. *Phytopathol. Mediterr.* **49**, 229–240.
- Pasche, J.S., Wharam, C.M. and Gudmestad, N.C. 2002. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* (potato early blight) to strobilurin fungicides. *Proceedings of the BCPC Conference Pests & Diseases 2002*: 841-846.

- Sanglard, D., Ischer, F., Koymans, L., Bille, J., 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **42**(2):241-53.
- Schnabel, G., and A. L. Jones. 2001. The 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology* **91**:102-110.
- Schwabe, W.F.S. & Knox-Davies, P.S. 1966. Piknosporontkieming en die infeksie van peerblare deur *Mycosphaerella sentina*. *South African Journal of Agricultural Science* **9**: 319-330.
- Shabi, E., Ben-Yephet, Y., 1976. Tolerance of *Venturia pirina* to benzimidazole fungicides. *Plant Disease Reporter* **60**, 451-454.
- Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfeld, U., Tenzer, I., Poirey, S. and Gisi, U. 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 complex of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science* **56**: 833-841.
- Sisler, H. D., Ragsdale, N.N., 1983. Biochemical and cellular aspects of the antifungal action of ergosterol biosynthesis inhibitors. In: Trinci APJ, Ryley JF, eds. *Mode of action of antifungal agents*. London, UK: Cambridge University Press, 257-282.
- Sivanesan, A., 1990. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No 989. *Mycosphaerella pyri*. *Mycopathologia* **109**, 59-60.
- Stanis, V.F., Jones, A.L., 1985. Reduced sensitivity to sterol-inhibiting fungicides in field isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **75**, 1098-1101.
- Stergiopoulos, I., De Waard, M. A., 2002. Activity of azole fungicides and ABC transporter modulators on *Mycosphaerella graminicola*. *J. Phytopathol.* **150**, 313-320.
- Turner, J. A., Elcock, S. J., Hims, M.J., 1996. Monitoring triazole fungicide sensitivity in populations of *Septoria tritici*. *Brighton Crop Protection Conference-Pest & Diseases*, 695-700.
- Tzavella-Klonari, K., Tamoutseli, D., 1986. The development and structure of the spermogonia and ascocarps of *Mycosphaerella sentina* (Fr.) Schroet. *Cryptogamie Mycologie* **7**, 267-273.



- Van Tuyl, J. M., 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen*, **77-2**, 1-136.
- Wood, P. M., Hollomon, D. W., 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pest management Science* **59**, 499-511.
- Ziogas, B. N., Baldwin, B. C., and Young, J. E. 1997. Alternative respiration: A biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pesticide Science* **50**:28-34.
- Zwiers, L.-H., and M. A. De Waard. 2000. Characterization of the ABC transporter genes *MgAtr1* and *MgAtr2* from the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet. Biol.* **30**:115–125

## 9.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βασιλακάκης, Μ., 2004. Γενική και Ειδική Δενδροκομία. Θεσσαλονίκη, Ελλάς. Εκδόσεις Γαρταγάνη.
- Γεωργόπουλος, Σ. Γ., Ζιώγας Β. Ν., 1992. Αρχές και μέθοδοι καταπολέμησης των ασθeneιών των φυτών. Αθήνα, Ελλάς.
- Ζιώγας Β. Ν., 2000. Ανθεκτικότητα των φυτοπαθογόνων στα μυκητοκτόνα. Γεωπονικά 386: 9-19.
- Μπίρης, Δ. Α., Ρούμπος, Ι. Χ., Γκουραμάνης, Γ. Δ., 1991. Πειραματική αξιολόγηση φυτοφαρμάκων για ταυτόχρονη καταπολέμηση του φουζικλαδίου [*Fusicladium pyrorum* (Lib.) Fuckel] και της σεπτόριας [*Septoria piricola* (Desm.)] στην αχλαδιά ποικιλία Κρυστάλλι. *Γεωργική Έρευνα* **15**, 27-39.
- Παναγόπουλος, Χ. Γ., 2007. Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου. (4<sup>η</sup> Έκδοση). Αθήνα, Ελλάς. Εκδόσεις Σταμούλη.
- Χατζηδημόπουλος, Μ., Παππάς, Α. Χ., 2006. Καταπολέμηση της σεπτορίωσης της απιδιάς σε πειραματικό τεχνητών μολύνσεων με ανθεκτικά και ευαίσθητα στα βενζιμιδαζολικά στελέχη του παθογόνου. *Πρακτικά 13<sup>ου</sup> Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου*.

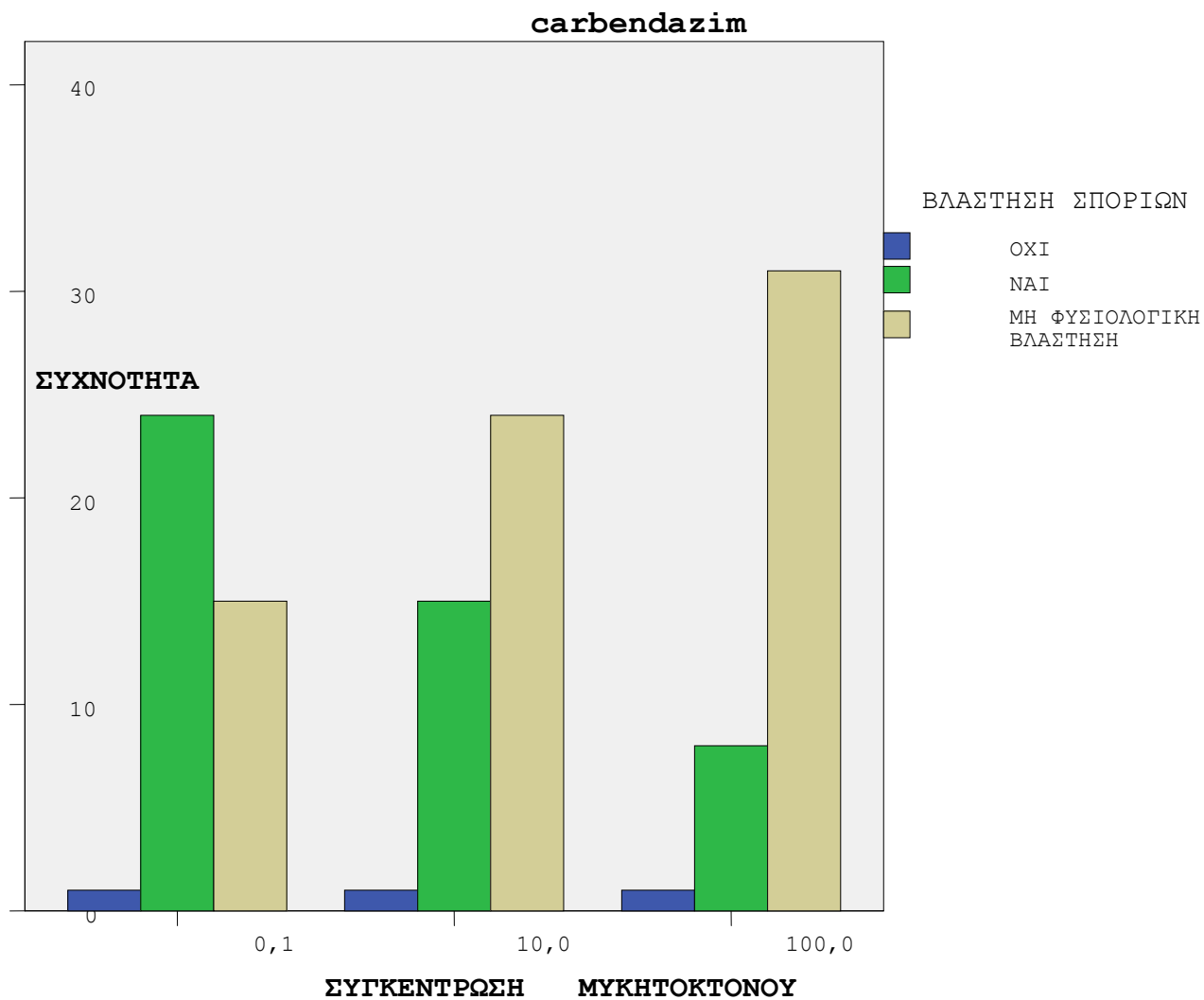
## 10. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

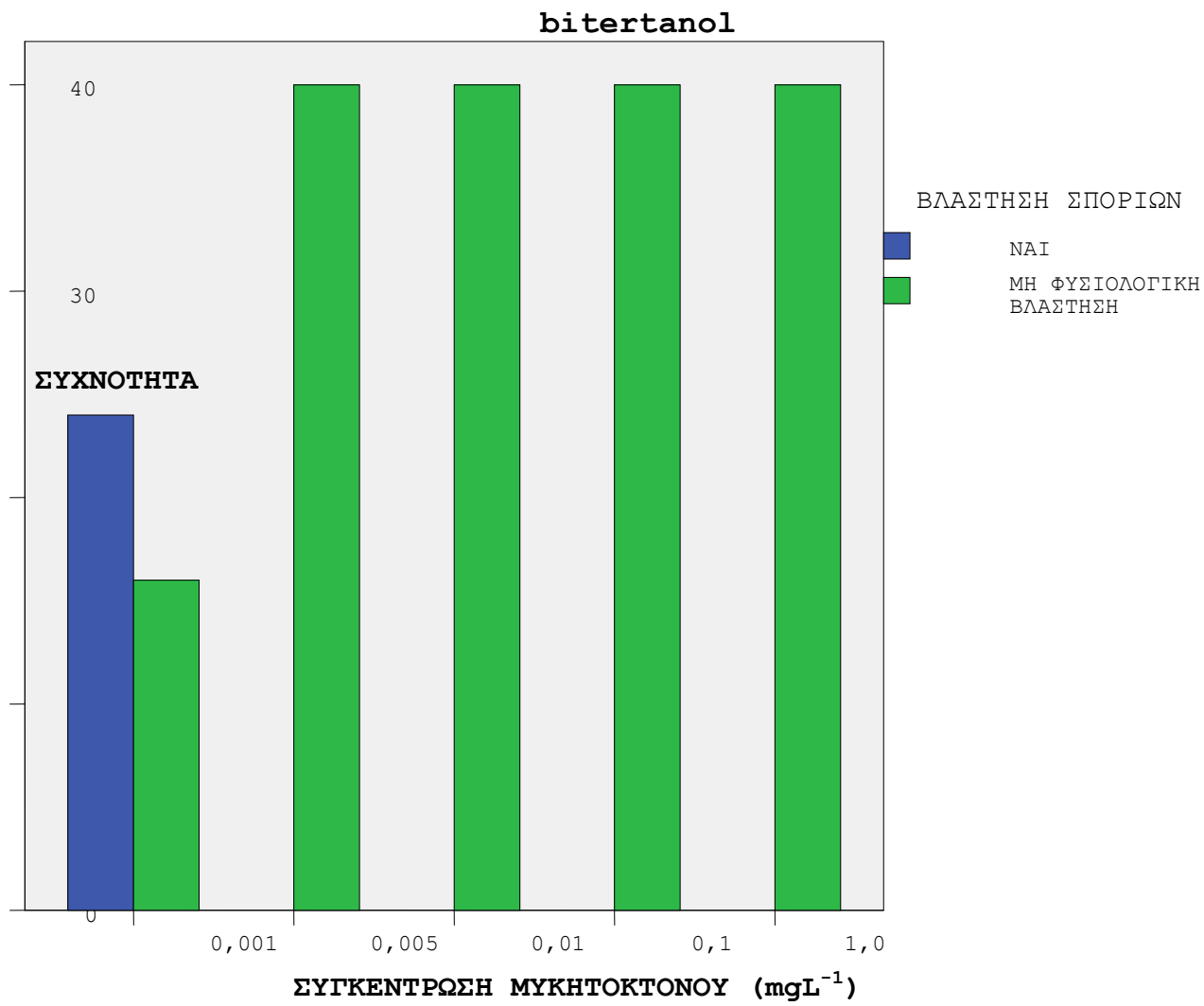
### Crosstabs

sygentrws \* ΒΛΑΣΤΗΣΗ ΣΠΟΡΙΩΝ \* mykhtokt Crosstabulation

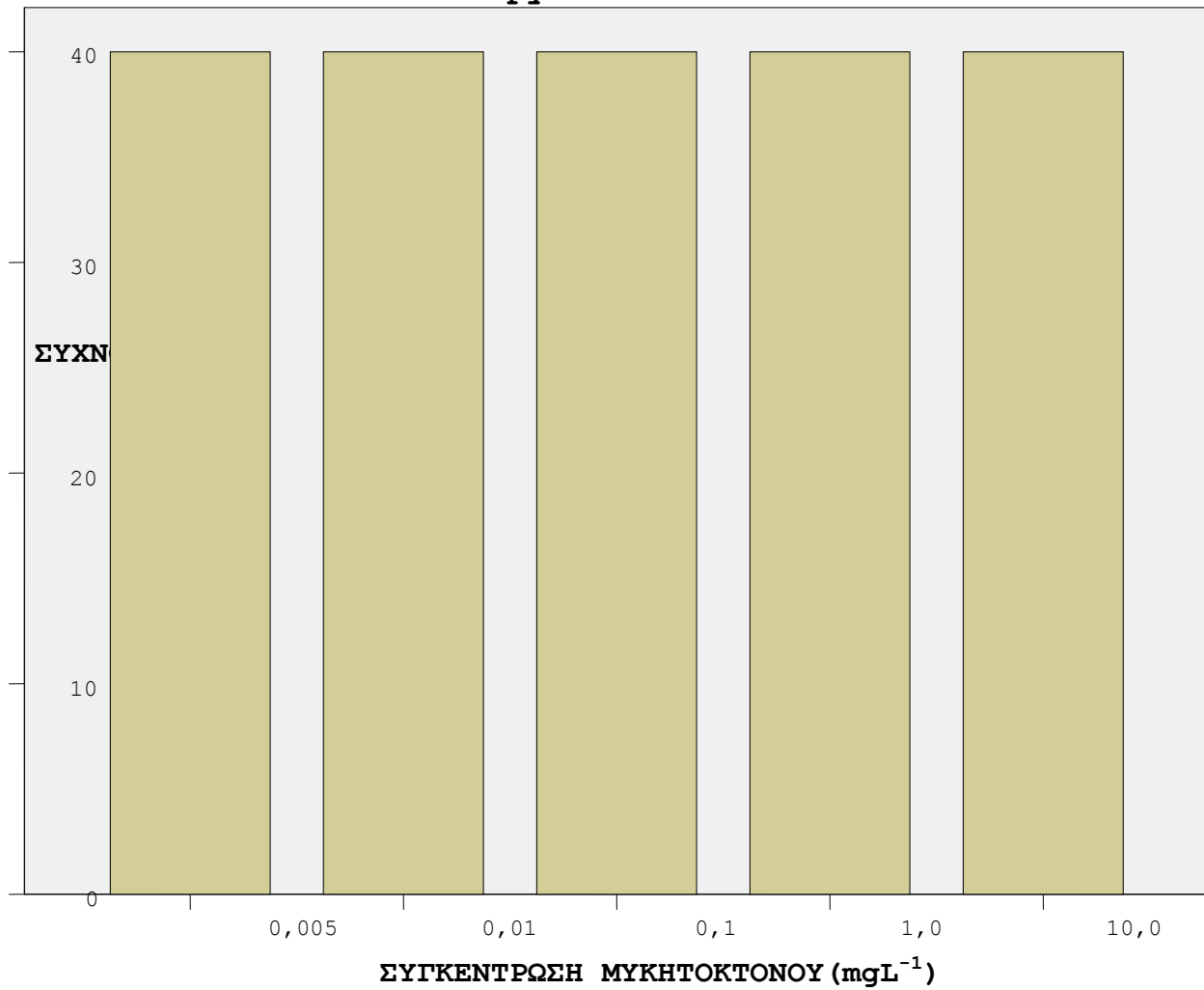
Count

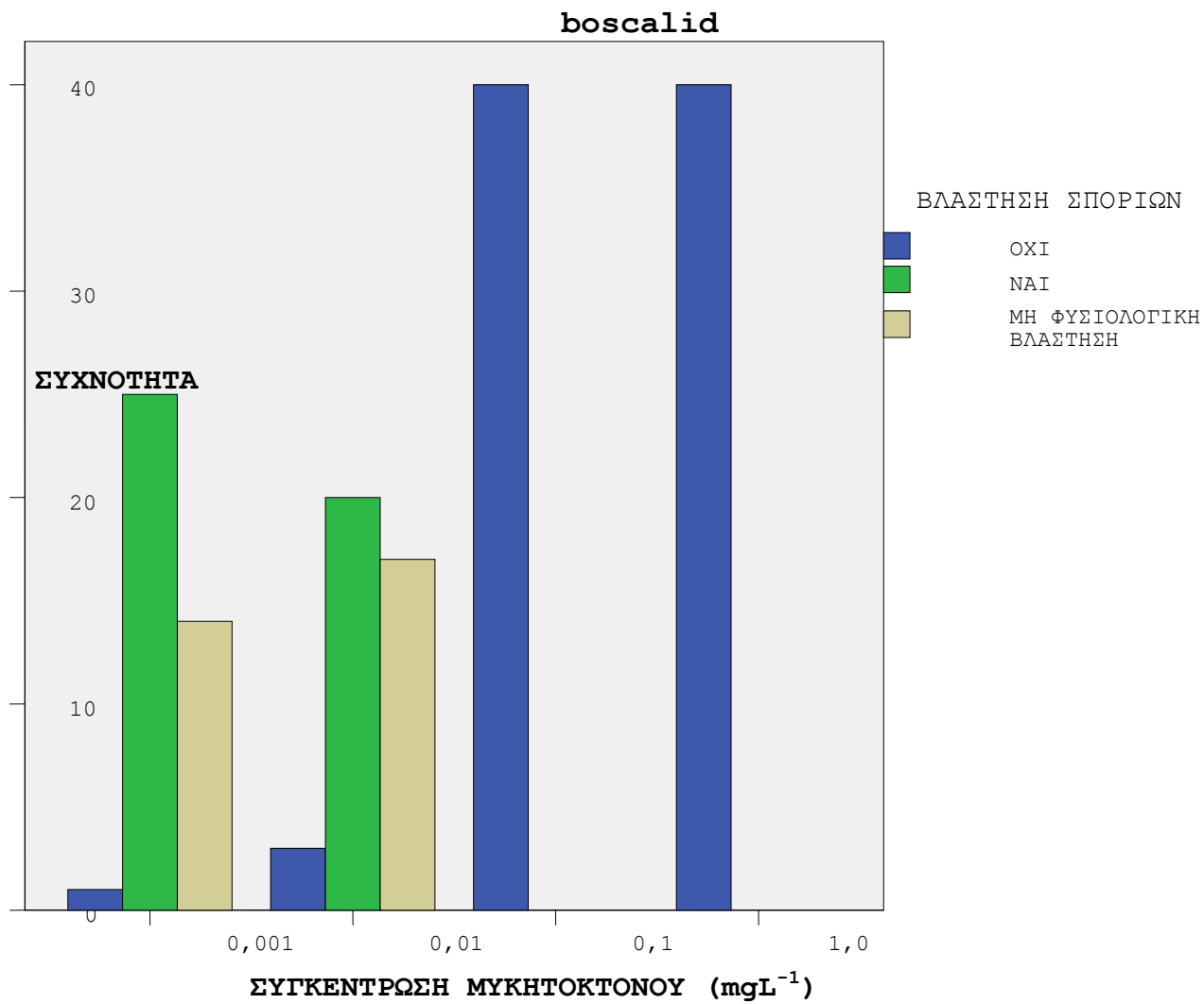
mykhtokt			ΒΛΑΣΤΗΣΗ ΣΠΟΡΙΩΝ			Total
			0	1	2	0
1	sygentrws	0,1	1	24	15	40
		10,0	1	15	24	40
		100,0	1	8	31	40
	Total		3	47	70	120
2	sygentrws	0,001		24	16	40
		0,005		0	40	40
		0,01		0	40	40
		0,1		0	40	40
		1,0		0	40	40
	Total			24	176	200
3	sygentrws	0,005	40			40
		0,01	40			40
		0,1	40			40
		1,0	40			40
		10,0	40			40
	Total		200			200
4	sygentrws	0,005	1	25	14	40
		0,01	3	20	17	40
		0,1	40	0	0	40
		1,0	40	0	0	40
	Total		84	45	31	160
5	sygentrws	,0		40		40
	Total			40		40





**pyraclostrobin**



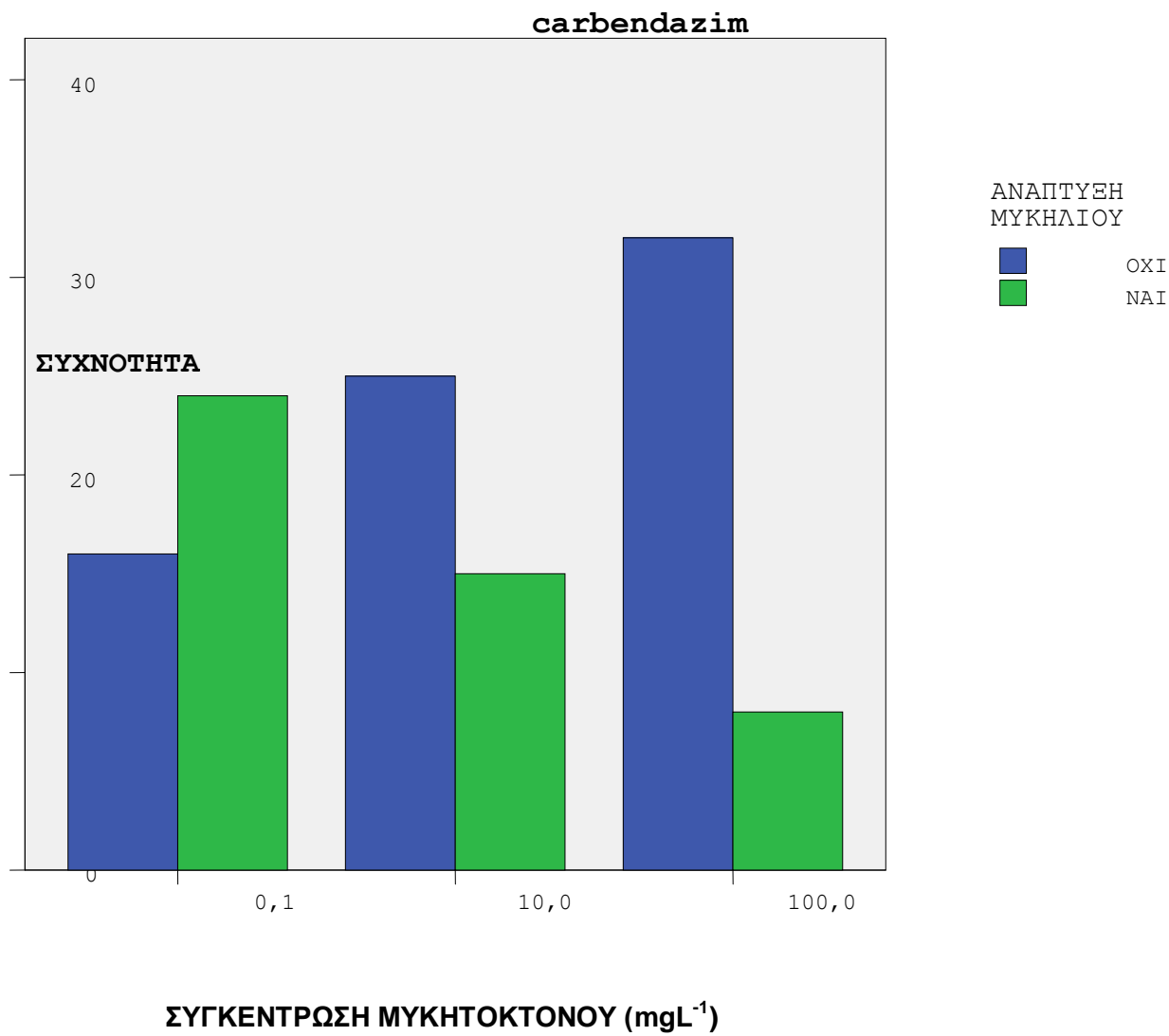


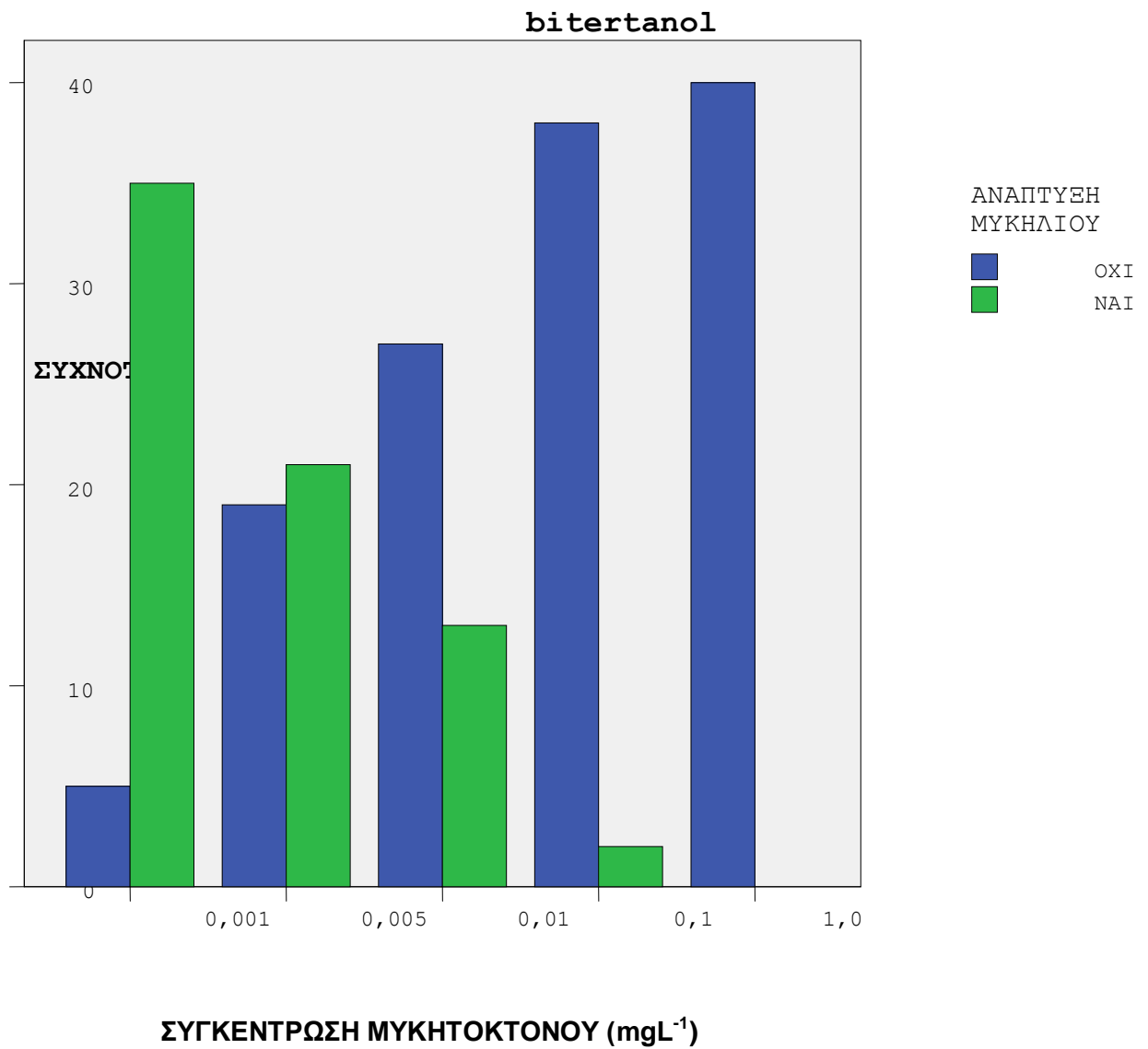
## Crosstabs

**sygentrws \* ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΚΗΛΙΟΥ \* mykhtokt Crosstabulation**

mykhtokt		Count			Total
		ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΚΗΛΙΟΥ		0	
		0	1		
1	sygentrws	,1	16	24	40
		10,0	25	15	40
		100,0	32	8	40
	Total	73	47	120	
2	sygentrws	,001	5	35	40
		,005	19	21	40
		,01	27	13	40
		,1	38	2	40
		1,0	40	0	40
	Total	129	71	200	
3	sygentrws	,005	40		40
		,01	40		40
		,1	40		40
		1,0	40		40
		10,0	40		40
	Total	200		200	
4	sygentrws	,005	3	37	40
		,01	4	36	40
		,1	40	0	40
		1,0	40	0	40
	Total	87	73	160	
5	sygentrws	,0		40	40
	Total		40	40	







**pyraclostrobin**

