

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

**Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού
Περιβάλλοντος**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Αξιολόγηση μυκητοκτόνων ως προς την βλάστηση
σπορίων και την ανάπτυξη μυκηλίου απομονώσεων του
μύκητα *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt.,
συλλεχθέντων κατά τα έτη 2014-2015**

Παντούλα Βασιλική

ΒΟΛΟΣ 2018

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί τμήμα των υποχρεώσεων προπτυχιακών σπουδών του τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας κατά τα έτη 2016-2018.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον επιβλέποντα καθηγητή κ.Βέλλιο Ευάγγελο, Επίκουρο καθηγητή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Π.Θ. για την πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας διατριβής, στην εκτέλεση και σύνταξη της καθώς και στην υπομονή που έδειξε για την πραγματοποίησή της.

Επίσης στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Καρκάνη Ανέστη, Επίκουρο καθηγητή του Εργαστηρίου Ζιζανιολογίας τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Π.Θ για την συμβολή και υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια των προπτυχιακών σπουδών μου και κ. Δαναλάτο Νικόλαο, Καθηγητής Γεωργίας - Οικολογίας Φυτών Μεγάλης Καλλιέργειας τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Π.Θ, για την συμβολή, την κριτική ανάγνωση και αξιολόγηση του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στην κ. Παναγιωτάκη Ευαγγελία μέλος ΕΤΕΠ του τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Π.Θ, για τις συμβουλές, την υπομονή και την απεριόριστη τεχνική υποστήριξη, τον κ. Χατζηδημόπουλο Μιχάλη διδάσκοντα και διδάκτορα στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Π.Θ για τη συνεργασία, βοήθεια και τεχνική υποστήριξη του σε όλη τη διάρκεια της παρούσας διατριβής, καθώς και την κ. Λιολιοπούλου Φεβρωνία ΠΕ Γεωτεχνικών, διδάκτορα και προσωπικό στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Π.Θ, για τις χρήσιμες συμβουλές και υποδείξεις που μου πρόσφερε.

Τέλος, οφείλω θερμές και μεγάλες ευχαριστίες στην οικογένεια μου και στους φίλους μου Χρήστο, Γωγώ, Χριστίνα, Κώστα και Μάρω για τη στήριξη, την υπομονή και τη συμπαράσταση τους κατά τη συγγραφή της παρούσας διατριβής και καθ' όλη την διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών, που συνέλαβαν με τον πιο σημαντικό τρόπο στην πραγματοποίηση της έρευνας αυτής αλλά και στο να φέρω εις πέρας τις προπτυχιακές μου σπουδές.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

**Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού
Περιβάλλοντος**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αξιολόγηση μυκητοκτόνων ως προς την βλάστηση σπορίων και την ανάπτυξη μυκηλίου απομονώσεων του μύκητα *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt., συλλεχθέντων κατά τα έτη 2014-2015

Παντούλα Βασιλική

Τριμελής επιτροπή

1. Ευάγγελος Βέλλιος, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)
2. Νικόλαος Δαναλάτος, Καθηγητής (μέλος)
3. Ανέστης Καρκάνης, Επίκουρος Καθηγητής (μέλος)

Περίληψη

Στην παρούσα έρευνα μελετάται η ασθένεια σεπτορίωσης του σίτου που προκαλείται από το παθογόνο *Mycosphaerella graminicola* (με ατελή μορφή *Zymoseptoria tritici*). Εξετάστηκαν *in vitro* 35 φαινότυποι του μύκητα *Zymoseptoria tritici* από υποκαλλιέργειες που προέρχονταν από δείγματα προέλευσης τριών περιοχών της Θεσσαλικής πεδιάδας, από Βελεστίνο, από Καλαμπάκα και από Φάρσαλα. Οι φαινότυποι εξετάστηκαν σε τέσσερις δραστικές ουσίες διαφορετικών ομάδων, με βάση τη βλάστηση σπορίων και την ανάπτυξη μυκηλιακής αποικίας. Δημιουργήθηκαν πυκνά διαλύματα των δραστικών ουσιών boscalid, cyproconazole, carbendazim, pyraclostrobin από όπου παρασκευάστηκαν οι συγκεντρώσεις 0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA όπου τοποθετήθηκε σε τρυβλία petri. Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με εναιώρημα μολύσματος του μύκητα και τοποθέτηση σε θάλαμο επώασης 22°C. Ο έλεγχος ανάπτυξης βλαστικού σωλήνα πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση 42h υπό 22°C και συνθήκες σκότους, ενώ η μυκηλιακή ανάπτυξη εξετάστηκε μετά από ένα χρονικό διάστημα 8 ημερών και περισσότερων από 30 ημερών. Δεν ανιχνεύτηκαν ανθεκτικές απομονώσεις, ενώ εξετάστηκε η ευαισθησία του μύκητα και η αποτελεσματικότητα των δραστικών ουσιών. Η ευαισθησία των απομονώσεων του παθογόνου που παρουσιάστηκε στις δραστικές ουσίες, αξιολογήθηκε με βάση τις μορφολογικές αλλοιώσεις που προκλήθηκαν από τα μυκητοκτόνα στο στάδιο της βλάστησης και με βάση την ακτινωτή ανάπτυξη αποικίας.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	4
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	14
II.1 Η σεπτορίωση του σίτου.....	15
II.2 Οικονομική σημασία ασθένειας.....	15
II.3 Ξενιστές.....	16
II.4 Ταξινόμηση παθογόνου αιτίου.....	16
II.5 Μορφολογία.....	17
II.6 Επιδημιολογία.....	17
II.6.1 Διαχείμαση παθογόνου.....	17
II.6.2 Διασπορά μολύσματος.....	18
II.6.3 Μόλυνση και αποικισμός των φύλλων.....	18
II.6.4 Συνθήκες ανάπτυξης του παθογόνου.....	19
II.6.5 Στάδια και διάρκεια επιβίωσης.....	20
II.7 Συμπτώματα και σημεία.....	21
II.8 Αντιμετώπιση της ασθένειας.....	21
II.8.1 Καλλιεργητικές μέθοδοι αντιμετώπισης.....	21
II.8.2 Αντιμετώπιση με συνθετικές χημικές δραστικές ουσίες.....	22
II.9 Εμφάνιση ανθεκτικότητα μυκήτων σε δραστικές ουσίες.....	23
II.9.1 Είδη ανθεκτικότητας κι οι μηχανισμοί τους.....	24
II.9.2 Ανθεκτικότητα του μύκητα <i>Z. tritici</i>	24
II.9.2.1 Boscalid.....	25
II.9.2.2 Carbendazim.....	26
II.9.2.3 Cyproconazole.....	26
II.9.2.4 Pyraclostrobin.....	27
III.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
III.1 Απομονώσεις του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Z.tritici</i> - Ταυτοποίηση απομονώσεων του μύκητα	31

III.2.1 Δραστικές ουσίες – παρασκευάσματα που αξιολογήθηκαν για τον περιορισμό ανάπτυξης αποικίας του παθογόνου	32
III.2.2 Παρασκευή θρεπτικού διαλύματος PDA – προσθήκη δραστικών ουσιών στο θρεπτικό υπόστρωμα	33
III.3 Συλλογή σποριών από αποικίες του φυτοπαθογόνου μύκητα.....	36
III.4 Εφαρμογή μολύσματος (πυκνιδιοσποριών) σε τρυβλία εμπλουτισμένα με μυκητοκτόνα	37
III.5 Μέτρηση βλαστικότητας σποριών - σχηματισμός μυκηλίου	37
III. 6 Μέτρηση διαστάσεων αποικιών σε τρυβλία εμπλουτισμένα με μυκητοκτόνα	38
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
IV.1 Ταυτοποίηση απομονώσεων του μύκητα.....	40
IV.2.1 Επίδραση της δραστικής ουσίας boscalid στην αύξηση του βλαστικού σωλήνα	41
IV.2.2 Επίδραση της δραστικής ουσίας cyproconazole στην αύξηση του βλαστικού σωλήνα	44
IV.2.3 Επίδραση της δραστικής ουσίας carbendazim στην αύξηση του βλαστικού σωλήνα	47
IV.2.4 Επίδραση της δραστικής ουσίας pyraclostrobin στην αύξηση του βλαστικού σωλήνα	50
IV.3 Ανάπτυξη αποικίας.....	52
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	63
VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65
VII.1 Ελληνική Βιβλιογραφία.....	66
VII.2 Διεθνής Βιβλιογραφία.....	67
VII.3 Ηλεκτρονικές Αναφορές.....	73
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	76

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Κωδικοποίηση απομονώσεων του <i>Z.tritici</i> που εξετάστηκαν.....	31
Πίνακας 2. Παρασκευή πυκνού διαλύματος stock, συγκέντρωσης 1000mg/L.....	32
Πίνακας 3. Παρασκευή πυκνών διαλυμάτων stock για κάθε μυκητοκτόνο.....	33
Πίνακας 4. Παρασκευή τελικής συγκέντρωσης 100mg/L, για κάθε μυκητοκτόνο.....	35
Πίνακας 5. Παρασκευή τελικών συγκεντρώσεων μυκητοκτόνων σε θρεπτικό υλικό PDA.....	35
Πίνακας 6. Έλεγχος ευαισθησίας των απομονώσεων του <i>Z.tritici</i> στο boscalid.....	76
Πίνακας 7. Έλεγχος ευαισθησίας των απομονώσεων του <i>Z.tritici</i> στο cyproconazole.....	77
Πίνακας 8. Έλεγχος ευαισθησίας των απομονώσεων του <i>Z.tritici</i> στο carbendazim.....	78
Πίνακας 9. MIC για τη βλάστηση των σπορίων (mg/L) παρουσία μυκητοκτόνων.....	79

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Βλάστηση σπορίων <i>Z.tritici</i> μετά από επώαση σε 42h στο σκοτάδι στους 22°C, σε τρυβλία Petri με PDA, παρουσία boscalid (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L).....	41
Διάγραμμα 2. Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα απομονώσεων <i>Z.tritici</i> μετά από επώαση σε 42h στο σκοτάδι στους 22°C, σε τρυβλία Petri με PDA, παρουσία boscalid (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L).....	42
Διάγραμμα 3. Βλάστηση σπορίων <i>Z.tritici</i> μετά από επώαση σε 42h στο σκοτάδι στους 22°C, σε τρυβλία Petri με PDA, παρουσία cyproconazole (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L).....	44
Διάγραμμα 4. Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα απομονώσεων <i>Z.tritici</i> μετά από επώαση σε 42h στο σκοτάδι στους 22°C, σε τρυβλία Petri με PDA, παρουσία cyproconazole (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L).....	45
Διάγραμμα 5. Βλάστηση σπορίων <i>Z.tritici</i> μετά από επώαση σε 42h στο σκοτάδι στους 22°C, σε τρυβλία Petri με PDA, παρουσία carbendazim (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L).....	47
Διάγραμμα 6. Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα απομονώσεων <i>Z.tritici</i> μετά από επώαση σε 42h στο σκοτάδι στους 22°C, σε τρυβλία Petri με PDA, παρουσία carbendazim (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L).....	48
Διάγραμμα 7. Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα απομονώσεων <i>Z.tritici</i> μετά από επώαση σε 42h στο σκοτάδι στους 22°C, σε τρυβλία Petri με PDA, παρουσία pyraclostrobin (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L).....	50
Διάγραμμα 8. Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την ακτινωτή ανάπτυξη αποικίας μετά από 8 μέρες στις συγκεντρώσεις 0,001/0,01/0,1/1/10/100mg/L στους 22°C υπό συνθήκες σκότους παρουσία boscalid (BOS), cyproconazole (CYP), carbenadazim (BEN), pyraclostrobin (PYR).....	52

Διάγραμμα 9. Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την ακτινωτή ανάπτυξη αποικίας μετά από 30 μέρες στις συγκεντρώσεις 0,001/0,01/0,1/1/10/100mg/L στους 22°C υπό συνθήκες σκότους παρουσία boscalid (BOS), cyproconazole (CYP), carbenadazim (BEN), pyraclostrobin (PYR).....54

Διάγραμμα 10. Αποτελεσματικότητα των boscalid (BOS), cyproconazole (CYP), carbenadazim (BEN), pyraclostrobin (PYR), εκφρασμένη ως ο αριθμός των απομονώσεων επί της 100 που παρεμποδίστηκε για την ανάπτυξη μυκηλίου στις 8 μέρες σε 0,001/0,01/0,1/1/10/100mg/L υπό συνθήκες σκότους.....56

Διάγραμμα 11. Αποτελεσματικότητα των boscalid (BOS), cyproconazole (CYP), carbenadazim (BEN), pyraclostrobin (PYR), εκφρασμένη ως ο αριθμός των απομονώσεων επί της 100 που παρεμποδίστηκε για την ανάπτυξη μυκηλίου μετά από περισσότερες από 30 μέρες σε 0,001/0,01/0,1/1/10/100mg/L υπό συνθήκες σκότους.....56

Διάγραμμα 12. Αποτελεσματικότητα των boscalid, cyproconazole, carbenadazim, pyraclostrobin, εκφρασμένη ως ο αριθμός των απομονώσεων επί της 100 που παρεμποδίστηκε για την βλάστηση των σπορίων στις συγκεντρώσεις 0,001/0,01/0,1/1mg/L στους 22°C σε συνθήκες σκότους μετά από σε 42h.....80

Κατάλογος Εικόνων

- Εικόνα 1.** Παρατήρηση πυκνιδιοσπορίων του *Z.tritici* με χρήση μικροσκοπίου Nikon Laborhot-2 (80x) και μέτρηση διαστάσεων μέσω του προγράμματος Adobe Photoshop 7.0. (32-59μm x 2-3,3μm) σε PDA, μετά από 24h σε 22°C υπό συνθήκες σκότους (κωδικός απομόνωσης. B21).....40
- Εικόνα 2.** Βλάστηση σπορίων σε PDA με 0,1mg/L boscalid μετά από 42h σε συνθήκες σκότους, στους 22°C, με βραχύ βλαστικό σωλήνα (B11)(Πίν. 7).....43
- Εικόνα 3.** Παρατήρηση βλάστησης πυκνιδιοσπορίων του *Z.tritici* (3,2μm x 25μm) με χρήση μικροσκοπίου Nikon Laborhot-2 (40x) και προγράμματος Adobe Photoshop 7.0. Διογκωμένα σπόρια του μύκητα σε PDA με 1mg/L boscalid μετά από 72h σε 22°C υπό συνθήκες σκότους (κωδικός απομόνωσης B1) (Πίνακας 8.). Επίδραση μυκητοκτόνου στη δομή των σπορίων.....43
- Εικόνα 4.** Βλάστηση σπορίων σε PDA με 0,1mg/L cyproconazole μετά από 42h σε συνθήκες σκότους, στους 22°C με βραχύ βλαστικό σωλήνα (B13)(Πίν. 8).....46
- Εικόνα 5.** Παρατήρηση βλάστησης πυκνιδιοσπορίων του *Z.tritici* (3,2μm x 25μm) με χρήση μικροσκοπίου Nikon Laborhot-2 (40x) και προγράμματος Adobe Photoshop 7.0. Βλαστημένα σπόρια σε PDA με 1mg/L cyproconazole μετά από 72h σε 22°C υπό συνθήκες σκότους (κωδικός απομόνωσης. B10)(Πίνακας 8.).....46
- Εικόνα 6.** Βλάστηση σπορίων σε PDA με 0,001mg/L carbendazim μετά από 42h σε συνθήκες σκότους, στους 22°C (B13)(Πίν. 9).....49
- Εικόνα 7.** Διογκωμένα, παραμορφωμένα σπόρια του *Z.tritici* με παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα σε PDA με 1mg/L carbendazim μετά από 42h στους 22°C σε συνθήκες σκότους (B3)(Πίν. 9).....49
- Εικόνα 8.** Βλάστηση σπορίων σε θρεπτικό υλικό PDA με 0,001mg/L pyraclostrobin μετά από 42h σε συνθήκες σκότους, στους 22°C, με πολύ βραχείς βλαστικούς σωλήνες και με λίγα βλαστημένα σπόρια (B11)(Πίν. 10).....51
- Εικόνα 9.** Πυκνιδιοσπόρια του *Z.tritici* που δεν έχουν βλαστήσει σε PDA με 0,001mg/L pyraclostrobin μετά από 72h στους 22°C σε συνθήκες σκότους (B6)(Πίν. 10).....51
- Εικόνα 10.** Καμία ένδειξη αποικίας σε PDA με 0,001mg/L boscalid μετά από 42h στους 22°C σε συνθήκες σκότους (απομονώσεις ομάδας C, (Φ1-Φ8)).....53

Εικόνα 11. Εμφάνιση ανάπτυξης αποικίας σε PDA χωρίς δραστική ουσία (μάρτυρας) μετά από 5 μέρες στους 22°C σε συνθήκες σκότους (απομονώσεις ομάδας Β, (K2-K12)).....	53
Εικόνα 12. Ακτινωτή ανάπτυξη αποικίας (Ομάδα C) μετά από επώαση 8 ημερών στους 22°C υπό συνθήκες σκότους σε τριβλία Petri με PDA παρουσία δραστικών ουσιών	55

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σεπτορίωση του σίτου, είναι μια από τις σημαντικότερες ασθένειες του σιταριού παγκοσμίως. Αυτό οφείλεται στην σπουδαιότητα του βασικότερου ξενιστή της ασθένειας που είναι ο μαλακός και σκληρός σίτος (*Triticum aestivum* L. και *Triticum durum* αντίστοιχα), ο οποίος εντάσσεται στην παγκόσμια καθημερινή διατροφή του ανθρώπου, αλλά και λόγω της καταστρεπτικής ζημιάς που προκαλεί ο μύκητας *Zymoseptoria tritici* (παλαιότερα γνωστού ως *Mycosphaerella graminicola/Septoria tritici*) (Wiese, 1987; Goodwin et al., 2011).

Το παθογόνο προκαλεί δυσμενείς επιδράσεις, καταστρέφοντας εύκολα, μεγάλες εκτάσεις καλλιεργήσιμης γης, εξαιτίας του κύκλου ζωής του και της μολυσματικής του ικανότητας. Πιο αναλυτικά και η τέλεια και η ατελής μορφή του, δημιουργούν εστίες μόλυνσης καθ όλη τη διάρκεια του χρόνου, μολύνοντας περιοδικά την καλλιεργητική περίοδο στην οποία προσβλήθηκε πρώτη φορά αλλά και την επόμενη καλλιεργητική περίοδο, με κίνδυνο την επιβίωση του μύκητα και την προσβολή της καλλιέργειας για περισσότερα χρόνια (Eyal et al., 1987; Suffert et al., 2011; Simon et al., 2012).

Η κύρια καταπολέμηση της ασθένειας έγκειται εκτός από καλλιεργητικές μεθόδους, που στοχεύουν στη μείωση του μολύσματος πριν την έναρξη της καλλιεργητικής περιόδου, στη χρήση μυκητοκτόνων που αποτελούν σήμερα τη μεγαλύτερη δαπάνη. Αυτή ανέρχεται στο 70% των δαπανών για αγορά μυκητοκτόνων που προορίζονται για καταπολέμηση διάφορων ασθενειών. Στην Ευρώπη πλέον είναι η πιο οικονομικά σημαντική ασθένεια, ενώ οι ζημιές που προκαλεί φθάνουν στα 1-1,5 δις € το χρόνο και τείνουν να μεγενθυνθούν περισσότερο (Torriani et al., 2015; Graeme & Kostya, 2016).

Οι δαπάνες των μυκητοκτόνων αποκαλύπτουν την εκτεταμένη χρήση τους από τους καλλιεργητές λόγω αναγκαιότητας αλλά έχουν και ως συνέπεια την ανάπτυξη ανθεκτικότητας που έχει εμφανιστεί σε Ευρώπη και Βόρεια Αμερική, Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία (Torriani et al., 2009; Cools & Fraaije, 2013; Hollaway, 2014; Estep et al., 2015). Ανθεκτικότητα του *M.graminicola* έχει βρεθεί σε διάφορες ομάδες μυκητοκτόνων που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της ασθένειας. Η χρήση των διασυστηματικών μυκητοκτόνων στη δεκατία του 60', οδήγησε σιγά σιγά στο αποτέλεσμα αυτό με πρώτη την

ένδειξη ανθεκτικότητας του *M.graminicola* τη δεκαετία του 80' στα βενζιμιδαζολικά (MBCs [Methyl Benzimidazole Carbamates]), τη δεκαετία του 90' στις αζόλες (DMIs [DeMethylation Inhibitors]) και την επόμενη δεκαετία στα καρβοξαμιδικά (SDHIs [Succinate DeHydrogenase Inhibitors]) και τις στρουμπιλουρίνες (QoIs [Quinone outside Inhibitors]).

Υπολογίζεται αύξηση της ζήτησης σίτου μέχρι το 2050 έως και 70%, ενώ ο *Z.tritici* έχει ήδη εμφανίσει ανθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα και σε ανθεκτικές ποικιλίες που έχουν δημιουργηθεί για την αντιμετώπισή του (Ponomarenko et al., 2011; O'Driscoll et al., 2014). Πολλές ανθεκτικές ποικιλίες δεν είναι αρκετά αποτελεσματικές και τείνουν να εμφανίζουν ευαισθησία, ειδικά σε ποικιλίες που χρησιμοποιούνται για πρώιμη σπορά, ανάλογα με τη γενετική σύνθεση του τοπικού πληθυσμού του παθογόνου και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Ponomarenko et al., 2011; HGCA, 2012). Η γενετική ποικιλομορφία και η ταχεία ικανότητα μετάλλαξης γονιδίων στο πληθυσμό των παθογόνων αποδεικνύουν τον δυναμισμό του γονιδιώματος του *Z.tritici* και την απειλή που θα αποτελέσει τις επόμενες δεκαετίες (Brown JKM et al. 2015).

Στον παρών πείραμα διεξήχθη έρευνα, η οποία κρίθηκε αναγκαία για τον έλεγχο ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας απομονώσεων του μύκητα που προκαλεί η ασθένεια σε τέσσερα μυκητοκτόνα, που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες: carbendazim (MBCs), cyproconazole (DMIs), boscalid (SDHIs) και pyraclostrobin (QoIs) και σε τι συγκέντρωση. Δοκιμάστηκαν 35 απομονώσεις του μύκητα *in vitro* σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις για κάθε μυκητοκτόνο, με στόχο την έρευνα της αποτελεσματικότητας των μυκητοκτόνων, προκειμένου να καταγραφεί η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC). Οι απομονώσεις που μελετήθηκαν, προέρχονταν από 3 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Θεσσαλίας, το Βελεστίνο, Καλαμπάκα και Φάρσαλα, τοποθεσίες με σημαντικές εκτάσεις καλλιέργειας σίτου. Ο *Z.tritici* είναι ένας μύκητας με μεγάλη ποικιλομορφία, γι αυτό αντικείμενο της έρευνας ήταν η μελέτη της αποτελεσματικότητας των δραστικών ουσιών στη MIC σε σχέση με τη διαφορετική μορφολογική αλλοίωση που υπέστησαν τα σπόρια, σύμφωνα με τις επιδράσεις της κάθε δραστικής ουσίας.

II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

II.1 Η σεπτορίωση του σίτου

Η σεπτορίωση του σιταριού προκαλείται από τον μύκητα *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt in Cohn (με ατελή μορφή *Zymoseptoria tritici* Rob. in Desm) (Mycobank 1, 1/1/18; Indexfungorum 1, 1/1/18. Σήμερα βρίσκεται σε όλες τις χώρες με καλλιέργειας σιταριού στη Βόρεια, Δυτική (Dreisigacker et al., 2015) και Κεντρική Ασία (Duveiller et al., 2007), Η.Π.Α. (Adhikari et al. 2004), Λατινική Αμερική (Duveiller et al., 2007), Βόρεια Αφρική (Brown JKM et al. 2015) Αυστραλία , Νέα Ζηλανδία και Ευρώπη. (Halama, 1996; Sanderson & Hampton, 1978).

Αποτελεί το παθογόνο αίτιο της ασθένεια *Septoria tritici* leaf blotch (STB) (κηλίδα φύλλου της *Septoria tritici*) του μαλακού σίτου (*Triticum aestivum* L.) η οποία προκαλεί κηλίδωση στα φύλλα (O'Driscoll et al., 2014; Graeme & Kostya., 2016). Με βάση το σύμπτωμα της STB, η ασθένεια ονομάζεται αλλιώς κηλίδωση φύλλων σεπτορίωσης (Wiese, 1987).

II.2 Οικονομική σημασία ασθένειας

Στην Ευρώπη, η σεπτορίωση του σίτου είναι η πιο επιζήμια ασθένεια του σιταριού. Καταστρέφει το 2% των σιτηρών κάθε χρόνο, λόγω μόλυνσης φυταρίων και μόλυνσης σπόρων κατά το γέμισμα, οι οποίοι χάνονται με το άχυρο κατά τη συγκομιδή (Wiese, 1987) ενώ μπορεί να μειώσει την παραγωγή μέχρι και 50% (Eyal et al., 1987; Goodwin et al., 2011). Οι δαπάνες για τον έλεγχο της, αλλά και την αντιμετώπιση του μύκητα ανέρχονται στα 1,2 δις € ετησίως μέχρι και για το 70% αγοράς των μυκητοκτόνων (Torriani et al., 2015; Graeme & Kostya, 2016)

Για τη μόλυνση των φυτών και την εξέλιξη της ασθένειας απαραίτητος παράγοντας είναι η υψηλή σχετική υγρασία και η ύπαρξη ελεύθερου νερού πάνω στους ιστούς για την ελευθέρωση και βλάστηση πυκνιδιοσπορίων με αποτέλεσμα να γίνεται επικίνδυνη σε περιοχές της Γαλλίας, Γερμανίας και Ηνωμένου Βασιλείου. (McDonald & Mundt, 2016). Στην βορειοανατολική Ελλάδα, Θράκη και Μακεδονία, και κεντρικά της Θεσσαλίας όπου καλλιεργείται σιτάρι (Σφήκας, 1991; Δαναλάτος, 2005), η ασθένεια πλέον θεωρείται επικίνδυνη, όχι μόνο λόγω ευνοϊκών κλιματολογικών συνθηκών, που οφείλονται και στην

παγκόσμια κλιματική αλλαγή αλλά κυρίως λόγω ανάπτυξης ανθεκτικότητας/ευαισθησίας της σε μυκητοκτόνα (Dreisigacker et al., 2015).

II.3 Εύρος ξενιστών

Με κύριο ξενιστή το σιτάρι, το παθογόνο έχει αποδειχθεί ότι προσβάλλει κι άλλα καλλιεργούμενα είδη σιτηρών όπως σίκαλη, κεχρί, βρώμη (Suffert et al., 2011), τριτικάλε, κριθάρι καθώς και γένη αγρωστωδών ή ποοειδών οικογενειών. Ζιζάνια όπως *Agrostis capillaris*, *Anisantha sterilis*, *Bromus hordeaceus subsp. hordeaceus*, *Festuca arundinacea*, *Poa annua* and *P. pratensis* αποδείχθηκαν ευαίσθητα στον *Z.tritici* και εναλλακτικοί ξενιστές του (Suffert et al., 2011), προκαλώντας μικρότερη ζημιά και με περιορισμένες δευτερογενής μολύνσεις (Wiese, 1987).

II.4 Ταξινόμηση παθογόνου αιτίου

Η σεπτόρια του σιταριού προκαλείται από τον ασκομύκητα *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt in Cohn (Mycobank 1; 2, 1/1/18; Indexfungorum 1;2, 1/1/18) και παλαιότερα και ως *Septoria tritici*, ο οποίος ταξινομείται από το 2011 σύμφωνα με τους Quaedvlieg et al.,(2011), με την ατελής μορφή *Zymoseptoria tritici* (Roberge ex Desmaz.), έναν αδηλομύκητα της οικογένειας των *Mycosphaerellaceae*. Λόγω της πολυφυλετικότητας του γένους *Mycosphaerella* και *Septoria*, πλέον τα είδη του *Zymoseptoria* ονομάζονται εκείνα που διαχειμάζουν σε ξενιστές αγρωστωδών και ξεχωρίζουν από τα είδη του *Septoria*, χάρη στην ανάπτυξη τους που μοιάζει με ζύμη και τον σχηματισμό διαφορετικών μορφολογικά κονιδίων. (Quaedvlieg et al., 2011).

Σύμφωνα με τη συστηματική του κατάταξη στο βασίλειο των μυκήτων, ο μύκητας ανήκει στο φύλλο των Ασκομυκήτων, στη κλάση *Dothideomycetes*, της υπόκλασης *Dothideomycetidae*, της τάξης *Carpodiales*, της οικογένειας *Mycosphaerellaceae*, γένους *Zymoseptoria* και είδος *Z.tritici*. (Stukenbrock et al., 2010).

II.5 Μορφολογία

Η σепτορίωση του σίτου είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από νεκρωτικές κηλίδες στο φύλλωμα όπου αναπτύσσεται αγενή (πυκνίδια) και εγγενή (ψευδοθήκια) καρποφορία του μύκητα.

Η εγγενής και η πιο συχνή αναπαραγωγή (Zhan et al., 2003), προερχόμενη από την τέλεια μορφή του μύκητα *Mycosphaerella graminicola*, αποτελείται από τα περιθήκια (ψευδοθήκια) διαστάσεων 76-80 x 77-100 μm, τα οποία σχηματίζονται κάτω από την επιδερμίδα του ξενιστή, σφαιρικά, χρώματος σκούρου καφέ, διαμέτρου 68-114μm (Bockus et al., 2010). Τα ψευδοθήκια σχηματίζουν 19-45 ασκούς με μέσο όρο 26, μεγέθους 11-14 x 34-41 μm με 8 ασκοσπόρια στο εσωτερικό τους, μεγέθους 2,5-4 x 9-16μm, υαλώδη δικύτταρα και ελλειψοειδή (Wiese, 1987; Suffert et al., 2011).

Η αγενής αναπαραγωγή προερχόμενη από την ατελής μορφή του μύκητα *Zymoseptoria tritici* αποτελείται από πυκνίδια, σφαιροειδή ή ωοειδή, χρώματος γκριζοκαστανού έως μαύρου με 100-200 μm διάμετρο, διατεταγμένα σε σειρές, αραιά μεταξύ τους, όπου όταν υγραθούν εκκρίνουν μια κολλοειδές μάζα (cirrhi) ή μορφή ζύμης (Eyal et al., 1987; Wiese, 1987, Ponomarenko et al., 2011; Steinberg, 2015). Είναι μια κολλώδες λευκή προς κίτρινη μάζα, που φέρει υαλώδη, νηματοειδή πυκνιδιοσπόρια μεγέθους 1,4-3,8 x 20-98μm με 3 μέχρι 7 σέπτα (Eyal et al., 1987; Ponomarenko et al., 2011; Morais et al., 2015).

II.6 Επιδημιολογία

II.6.1 Διαχείριση παθογόνου

Ο μύκητας *Z.tritici* διαχειμάζει με τα ασκοσπόρια και πυκνιδιοσπόρια που απελευθερώνονται από τα ψευδοθήκια και τα πυκνίδια αντίστοιχα που βρίσκονται στα μολυσμένα υπολειμμάτα παλαιότερης καλλιέργειας σίτου, που παραμένουν στο έδαφος μετά τη συγκομιδή (Eyal et al., 1987; Suffert et al., 2011; Simon et al., 2012). Εξαπλώνεται από δέματα και υπολλείματα αχύρου που μένουν στο χωράφι, τα οποία γίνονται πηγές μόλυνσης. Αγρωστώδη ζιζάνια ως φυτά ξενιστές του παθογόνου αποτελούν εστίες μόλυνσης με πρωτογενές μόλυσμα, ενώ μπορούν να το διατηρήσουν μακροπρόθεσμα και να διασπείρουν

την ασθένεια μέσω ασκοσπορίων κυρίως κατά την διάρκεια του χειμώνα (Suffert et al., 2011). Πιο σπάνια εξαπλώνεται μέσω μολυσμένων σπόρων σίτου καθώς ο μύκητας μπορεί και παραμένει ανενεργός στον σπόρο για διάστημα ενός χρόνου (Θανασουλόπουλος, 1996; Suffert et al., 2011).

II.6.2 Διασπορά μολύσματος

Ο *Z. tritici* μεταφέρεται μέσω ανέμων και σταγονιδίων της βροχής και όταν εγκατασταθεί πάνω στην επιφάνεια του φύλλου ξεκινά τον κύκλο ασθένειας του (Palmer & Skinner, 2002; Graeme & Kostya, 2016). Σύμφωνα με τον Θανασουλόπουλο (1996) υγρές συνθήκες και ανεμώδης καιρός ευνοούν την εξάπλωση της ασθένειας, ενώ ξηρές συνθήκες εμποδίζουν την επέκταση και σταματούν την εξέλιξη της αρχικής βλάστησης.

Τα ασκοσπόρια τα οποία αποτελούν πρωτογενές μόλυσμα, μεταδίδονται με τον άνεμο σε μεγάλες αποστάσεις, διαχειμάζοντας αργά το καλοκαίρι με φθινόπωρο (Hunter et al., 1999). Τα πυκνιδιοσπόρια που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια υγρών περιόδων, μεταδίδονται με σταγόνες της βροχής προκαλώντας μολύνσεις καθ' όλης της καλλιεργητικής περιόδου ενώ ο ξηρός καιρός σταματάει την ανάπτυξη των πυκνιδίων και την επέκταση των νεκρωτικών περιοχών, ειδικά τους καλοκαιρινούς μήνες. Ένας συνδυασμός ανέμου και βροχής παρέχει τις ευνοϊκότερες συνθήκες για την εξάπλωση αυτής της ασθένειας στις καλλιέργειες (Hollaway, 2014).

II.6.3 Μόλυνση και αποικισμός των φύλλων

Η είσοδος του μύκητα γίνεται μέσω των στομάτων των κυττάρων ή διαπερνούν απ' ευθείας το φυτό μέσω διάτρησης των ίδιων ιστών (Graeme & Kostya, 2016). Όταν προσγειωθούν τα πυκνιδιοσπόρια μέσω σταγονιδίων της βροχής πάνω στην επιφάνεια του φύλλου, αναπτύσσουν υφές μετά από 12-24 ώρες και εισχωρούν μέσω των στομάτων (Kema et al., 1996; O'Driscoll et al., 2014; Steinberg, 2015), όπου αναπτύσσουν μυκήλιο (αποικία) στον αποπλαστικό χώρο μεταξύ των μεσοφυλλικών κυττάρων με πολύ αργό ρυθμό (Sanderson et al., 1985; Kema et al., 2000). Η πλειονότητα των υφών αναπτύσσεται κατά

μήκος του φύλλου και παραμένουν αποκλειστικά στον ενδοκυτταρικό χώρο του φυτικού ιστού, όπου μετά από 9-15 ημέρες μετά τη μόλυνση, έχει αποικηθεί ο περισσότερος χώρος και πυκνίδια αρχίζουν να εμφανίζονται στις κοιλότητες αυτές (Kema et al., 1996b; Shetty et al., 2003).

Π.6.4 Συνθήκες ανάπτυξης του παθογόνου

Μετά από βροχή ή δρόσο τέλη φθινοπώρου, από αρχές Οκτωβρίου έως το Δεκέμβριο, τα ασκοσπόρια απελευθερώνονται από τα ψευδοθήκια που σχηματίστηκαν σε υπολείμματα φυτών περσινής καλλιέργειας. Τα ασκοσπόρια αυτά, όταν προσγειωθούν σε ευπαθείς ιστούς και με κατάλληλες συνθήκες προκαλούν στα φύλλα, κηλίδες, στις οποίες παράγονται πυκνίδια και με συνθήκες υγρασίας σχηματίζονται πυκνιδιοσπόρια τα οποία εκτινάσσονται σε γειτονικούς ιστούς μετά την πτώση σταγόνας βροχής, όπου προκαλούν δευτερογενείς μολύνσεις (Shetty et al., 2003; Hollaway, 2014). Παρουσιάζεται μια δεύτερη αιχμή ασκοσπορίων τον Ιούνιο ή Ιούλιο, από ψευδοθήκια των φύλλων της τρέχουσας καλλιέργειας (Suffert et al., 2011; Simon et al., 2012). Το επιδημιολογικό στάδιο του STB, συμβαίνει μεταξύ Μαρτίου και Ιουλίου (Suffert et al., 2011) όπου εξαρτάται από τη βροχή και γίνεται σοβαρότερη με υπερβολική βροχόπτωση (Hollaway, 2014).

Τα πυκνιδιοσπόρια ζουν για μήνες σε συνθήκες των 2-10°C θερμοκρασίας, εκκρινόμενα από πυκνίδια σε σπειράματα, εφόσον προστατεύονται από ακτινοβολία (Wiese, 1987) και με χαμηλή σχετική υγρασία παραμένουν βιώσιμα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (95% βλάστηση μετά από 50 ημέρες σε 35-55% RH) (Gough & Lee, 1985). Η μόλυνση απαιτεί 6 ώρες σε βρεγμένη περιοχή ή σταγόνες νερού και 10 με 20 μέρες για παραγωγή δευτερογενών σπορίων. Η βλάστηση και η μόλυνση αυτών των σπορίων γίνονται σε θερμοκρασίες 20-25°C (Θανασουλόπουλος, 1996; Kema et al., 1996a; Palmer & Skinner, 2002), ενώ τα συμπτώματα του *Z.tritici* ευνοούνται ανάμεσα σε θερμοκρασίες των 15-20°C (Wiese, 1987). Αν ξεπερνά τους 32°C και κατεβαίνει τους 3°C, μειώνεται η βιωσιμότητα τους (Θανασουλόπουλος, 1996).

II.6.5 Στάδια και διάρκεια επιβίωσης

Ο μύκητας περιγράφεται ως ημιβιοτροφικός και αναπτύσσεται σε δύο στάδια επιβίωσης (διμορφικός) (Mehrabi et al., 2006; Graeme & Kostya, 2016).

Το πρώτο στάδιο επιβίωσης εμφανίζεται ως μη παρασιτικό ή ασυμπτωματικό, δεν υπάρχει διείσδυση εντός των ιστών των ξενιστών, άρα δεν εμφανίζει παρασιτική συμπεριφορά ή συμπτώματα (Kema et al., 1996b). Επίσης ονομάζεται βιοτροφικό κι ο *Z. tritici* αυτότροφος καθώς τρέφεται με λιπίδια του ξενιστή (π.χ., κηρώδεις επιφάνειες φύλλων) που διασπά με ένζυμα που εκκρίνει (π.χ. κουτινάσες, λιπάσες) (Goodwin et al., 2011; Rudd et al., 2015). Η φάση αυτή διαρκεί 7-10 ημέρες μετά την εγκατάσταση του μύκητα (Rudd et al., 2015; Palma-Guerrero et al. 2016), ο οποίος θεωρείται, ότι εξασφαλίζει ενέργεια για την αποικοδόμηση κυτταρικών τοιχωμάτων και πως αναπτύσσει αμυντικούς μηχανισμούς (π.χ. έκκριση LysM (Lysin motifs) που αποτρέπουν την αναγνώριση της χιτίνης από τον ξενιστή) (Lee et al., 2014). Ο *Z. Tritici* είναι ικανός να καταστείλει τη ανοσοποίηση του ξενιστή, διότι η μόλυνση του, είναι μικρή κι αναπτύσσεται με πολύ αργό ρυθμό μετά τη είσοδό του στο φυτό (Kema et al., 2000), με αποτέλεσμα ο ξενιστής δύσκολα θα εμφανίσει κάποια αντίδραση άμυνας (Keon et al., 2007; Yang et al., 2013; Rudd et al., 2015).

Το δεύτερο στάδιο λέγεται συμπτωματικό ή νεκρότροφο. Με την έναρξη του, το παθογόνο παράγει πυκνίδια, χαρακτηρίζεται από έντονη ενζυμική δραστηριότητα (πρωτεάσες, λιπάσες για αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος και λιπιδίων αντίστοιχα) ως προς τη διατροφή και την ανάπτυξή του. (Keon et al., 2007; Kema et al., 2008; Yang et al., 2013), μέχρι να μεταβεί στη σαπροφυτική περίοδος, όπου τροφοδοτείται από τον νεκρό ιστό του ξενιστή και παράγει ψευδοθήκια (Steinberg G., 2015; Palma-Guerrero et al., 2016). Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται την 11^η μέρα μετά τη μόλυνση του ξενιστή, με νέκρωση όλο και περισσότερων κυττάρων, (Keon et al., 2007), από την 14^η τα φύλλα σαπίζουν, παράγονται πυκνίδια και από την 21^η-56^η ξεκινά η σαπροτροφική περίοδος (Ponomarenko et al., 2011; O'Driscoll et al., 2014; Palma-Guerrero et al., 2015). Η νεκροτροφική φάση χαρακτηρίζεται επίσης από έντονη έκφραση, κωδικοποίηση και ρύθμιση των γονιδίων που αφορούν την αμυντική στάση των φυτών και όλων των παραπάνω μεταβολικών λειτουργιών του παθογόνου (Kellner et al., 2014; Rudd et al., 2015).

II.7 Συμπτώματα και σημεία

Τα συμπτώματα του *Z.tritici* αναπτύσσονται σε όλα τα υπέργεια μέρη και σε όλη τη διάρκεια ανάπτυξης των ξενιστών. Εμφανίζονται όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Αρχικά εμφανίζονται μικρά χλωρωτικά στίγματα στα χαμηλότερα φύλλα ή σε αυτά που έρχονται σε επαφή με το έδαφος, τα οποία εξελίσσονται σε κηλίδες, το φθινόπωρο ή την άνοιξη (Ponomarenko et al., 2011). Οι κηλίδες επεκτείνονται σε ακανόνιστου σχήματος περιοχές ή πληγές, αρχικά υδαρείς κι αργότερα αφού στεγνώσουν, σε κίτρινες μέχρι καστανέρυθρες ξηρικές περιοχές, περίπου 1-5 x 4-15mm μεγέθους (Wiese, M.V., 1987).

Αναπτύσσεται γκριζοκαστανή ή τεφρά απόχρωση στο κέντρο τους, ενώ συνεχίζουν να επεκτείνονται κατά μήκος πάνω στα φύλλα και σε μικρότερο βαθμό τους μίσχους και την ταξικαρπία (Ponomarenko et al., 2011). Τα συμπτώματα αυτά επεκτείνονται περισσότερο, πιθανότατα λόγω παραγωγής τοξινών, ενώ σε περίπτωση αποχρωματισμού μεγάλης έκτασης στα πλευρά του μίσχου ή από τη βάση του φύλλου, μπορεί να ξεραθεί όλο το φύλλο (Θανασουλόπουλος, 1996; Hollaway G., 2014). Ακόμα ένα σύμπτωμα της σεπτορίωσης του σίτου είναι η συρρίκνωση ή ρυτίδιασμα των σπόρων, οι οποίοι χάνονται με το άχυρο κατά τη συγκομιδή (Wiese, 1987).

Τα σημεία της σεπτορίωσης του σίτου είναι τα πυκνίδια, ορατά με γυμνό μάτι μέσα στις κηλίδες, στις οποίες εμφανίζουν βύθιση και σκούρο χρώμα (Wiese, 1987) στις προσβεβλημένες περιοχές-πληγές με χαρακτηριστική πολυστιγμία. Αν απουσιάζουν τα πυκνίδια, παρόμοια συμπτώματα κηλίδωσης μπορεί να οφείλονται άλλα αίτια όπως κηλίδες κίτρινων φύλλων ή διατροφικές διαταραχές όπως τοξικότητα αργιλίου ή έλλειψη ψευδαργύρου (Hollaway, 2014).

II.8 Αντιμετώπιση της ασθένειας

II.8.1 Καλλιεργητικές μέθοδοι αντιμετώπισης

Η αντιμετώπιση της ασθένειας βασίζεται σε καλλιεργητικές μεθόδους, που θα μειώσουν τα μολύσματα πριν την έναρξη της επιδημίας (Lovell et al., 2004). Μερικές από τις

μεθόδους που χρησιμοποιούνται είναι η αμειψισπορά κάθε τρία χρόνια και διαχείριση των υπολειμμάτων, δεμάτων άχυρου και φυτών εθελοντών με καταστροφή ή απομάκρυνσή τους (Palmer & Skinner, 2002; Suffert et al., 2011; Hollaway, 2014). Πυκνιδιοσπόρια σε υπολείμματα καλλιέργειας που θάβονται αφού έχουν αναμοχλευτεί, επιβιώνουν λιγότερο (<10% επέζησαν μετά από 50 ημέρες), σε βάθος ταφής 5-7cm, υπό συνθήκες άνυδρου εδάφους (Suffert et al., 2011). Επίσης η μόλυνση ελαχιστοποιείται με χρήση ανθεκτικών ποικιλιών (Hollaway, 2014), παρόλο που δεν εμφανίζουν πάντα υψηλή αποτελεσματικότητα (Ponomarenko et al., 2011) και με χρήση υγιούς σπόρου.

Η ένταση της ασθένειας περιορίζεται με τη διαφοροποίηση ημερομηνίας της σποράς και πυκνότητας της σποράς (Suffert et al., 2011). Καλλιέργειες με μεγάλες αποστάσεις μεταξύ των σειρών και με επαρκή γονιμοποίηση, περιορίζουν την πυκνότητα του φυλλώματος με αποτέλεσμα την μείωση της σχετικής υγρασίας του φυτού. Σε δροσερά κλίματα, η σπορά αργά το φθινόπωρο καθυστερεί την ανάπτυξη της καλλιέργειας, με αποτέλεσμα το περισσότερο φύλλωμα να αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια των θερμότερων περιόδων, έτσι μειώνεται η πιθανότητα προσβολής (Eyal et al., 1987; Wiese, 1987).

Π.8.2 Αντιμετώπιση με συνθετικές χημικές δραστικές ουσίες

Στην Ευρώπη για την αντιμετώπιση της ασθένειας της σεπτορίωσης σίτου χρησιμοποιείται το 70% των μυκητοκτόνων που εφαρμόζονται στην καλλιέργεια σίτου, ανά καλλιεργητική περίοδο. Η αντιμετώπισή της ασθένειας βασίζεται στη χρήση μυκητοκτόνων με μίγμα αζόλης με αναστολέα του ενζύμου αφυδρογονάσης (succinate dehydrogenase inhibitor) (SDHI) (Quaedvlieg et al., 2011; Torriani et al., 2015). Συστήνεται ψεκασμός σε πρώιμες ποικιλίες, αρχικά στο στάδιο ανάπτυξης GS31-GS32 του φυτού για την προστασία των αναδιδόμενων φύλλων, καθώς επίσης και για την πλήρη ανάπτυξη του φύλλου σημαίας, στο στάδιο GS39 (CropPro; Palmer & Skinner, 2002; Hollaway, 2014). Ψεκασμός τριαζολης στα φύλλα της βάσης, μειώνει την παραγωγή πυκνιδιοσπορίων μέχρι και 5 μήνες μετά τη σπορά ενώ η εμβάπτιση σπόρων σίτου μειώνει το πρωτογενές μόλυσμα του *M. graminicola*.

Όταν ανιχνευθεί σταθερή ανθεκτικότητα επιβάλλεται άμεση διακοπή των μυκητοκτόνων στην περιοχή που εμφανίσθηκε, ενώ σε συνθήκες μη σταθερής ανθεκτικότητας, το μυκητοκτόνο μπορεί να ξαναεφαρμοστεί στην επόμενη καλλιεργητική περίοδο για 1-2 εφαρμογές μη διαδοχικές, με εναλλαγή στα μυκητοκτόνα που δεν έχουν διασταυρωτή

ανθεκτικότητα (Ποδάρας, 2001) π.χ. σε τριαζόλες, καθώς δεν έχουν όλα τα μυκητοκτόνα τριαζόλης την ίδια επίδραση στις διάφορες μεταλλάξεις του μύκητα. Επιπλέον επιθυμητή είναι η χρήση μίγματος τριαζολών, (propiconazole–cyproconazole, tebuconazole-flutriafol), εξειδικευμένα για το STB, ή με διαφορετικούς τρόπους δράσης (στρομπιλουρίνης[ομάδα 11] - τριαζόλης[ομάδα 3], π.χ tebuconazole-azoxystrobin) (Hollaway, 2014).

II.9 Εμφάνιση ανθεκτικότητα μυκήτων σε δραστικές ουσίες

Η χημική αντιμετώπιση με μυκητοκτόνα, εξαιτίας συνεχούς χρήσης, οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας ή μείωση της ευαισθησίας ενός μικροοργανισμού στα μυκητοκτόνα. Αυτό συμβαίνει γιατί μυκητοκτόνα με τον ίδιο τρόπο δράσης, επιλέγουν να δράσουν σε ανθεκτικά (μη ευαίσθητα) στελέχη, τα οποία μπορεί να επιβιώσουν και να εμφανίσουν δυσκολία αντιμετώπισης (Brent & Hollomon, 2007).

Οι πιθανότητες για ανάπτυξη ανθεκτικότητας αυξήθηκαν με τη δημιουργία διασυστηματικών μυκητοκτόνων που δρουν σαν εξειδικευμένοι παρεμποδιστές σε συγκεκριμένα ενζυμικά συστήματα. Αυτό συμβαίνει γιατί δρουν συνήθως σε μία μόνο θέση σε υποκυτταρικό επίπεδο του παθογόνου και επομένως μία μετάλλαξη στη συγκεκριμένη θέση δέσμευσης της δραστικής ουσίας ως αποτέλεσμα την απώλεια αποτελεσματικότητας της δραστικής ουσίας, ενώ τα προστατευτικά δρουν σε πολλές ζωτικές μεταβολικές διαδικασίες στο κύτταρο του παθογόνου και επομένως χρειάζονται πολλές μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό του μικροοργανισμού για να αποφύγει τη τοξική δράση του φαρμάκου (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Η καλή προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών δεν επιτρέπει τη χρήση φαρμάκου σε ευαίσθητο πληθυσμό, με αποτέλεσμα την απότομη απώλεια της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου και την άμεση διακοπή του, η οποία μπορεί να είναι και μακροχρόνια όταν η συχνότητα των ανθεκτικών στελεχών στον πληθυσμό αυτό και στην ίδια περιοχή, παραμένει υψηλή για πολλά χρόνια μετά τη διακοπή εφαρμογής του (Γεωργόπουλος, 1992).

Π.9.1 Είδη ανθεκτικότητας κι οι μηχανισμοί τους

Η μειωμένη ευαισθησία που ανήκει σε γενετική αλλαγή ή μετάλλαξη του παθογόνου κι όχι σε φαινοτυπική προσαρμογή (μη γενετική αλλαγή αλλά με επιλογή από τον φυσικό πληθυσμό του παθογόνου) είναι σταθερή, μεταβιβάζεται κληρονομικά και καταλήγει στην εμφάνιση ανθεκτικότητας. Η μετάλλαξη αυτή στους μύκητες, γίνεται με μετάλλαξη εξωχρωματοσωματικού γονιδίου που εδράζονται στο μιτοχονδριακού DNA.

Η ανθεκτικότητα των παθογόνων στα μυκητοκτόνα διαχωρίζεται σαν ανθεκτικότητα κυρίαρχων γόνων ή ολιγογονική και σαν πολυγονική. Ολιγογονική ανθεκτικότητα ονομάζεται το αυξημένο επίπεδο ανθεκτικότητας με μια μόνο μετάλλαξη. Στην περίπτωση της πολυγονικής ανθεκτικότητας, το επίπεδο είναι μικρό έως μέτριο και ο κάθε γόνος επηρεάζει τον φαινότυπο σε πολύ μικρή έκταση και δύσκολα δημιουργεί συνθήκες αντοχής στον αγρό. Η χρήση ενός μυκητοκτόνου στον αγρό μπορεί να δημιουργήσει μια μικρή αντοχή σε στελέχη. Αν η ανθεκτικότητα είναι ολιγογονική η πολυγονική εξαρτάται από το μυκητοκτόνο και όχι από τον μύκητα που εκτίθεται σε αυτό (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Οι τρόποι για την καταπολέμηση ανθεκτικότητας βασίζονται στην αναίρεση ή εμπόδιση της ανάπτυξης μηχανισμών της. Τέτοιες είναι η αλλαγή στην ευαίσθητη θέση, δηλαδή στο κυτταρικό συστατικό (ένζυμο ή άλλο) που αντιδρά με το φάρμακο, η μείωση της εισόδου του τοξικού μορίου στο κύτταρο του παθογόνου με μετάλλαξη σε γόνο που ελέγχει την περατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, η παρεμπόδιση λειτουργίας του μυκητοκτόνου υπό την δέσμευσή του στο κυτταρικό τοίχωμα, ενώ αξίζει να αναφερθεί και ο μηχανισμός της αποτοξικοποίησης (detoxification), δηλαδή της εξουδετέρωσης της τοξικότητας του ξένου μορίου (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Π.9.2 Ανθεκτικότητα του μύκητα *Z. tritici*

Η αντοχή του ξενιστή και η δράση του *Z. tritici* είναι κατά κύριο λόγο ποσοτική (Brown et al., 2015; Stewart & McDonald, 2014). Η μειωμένη αποτελεσματικότητα σε διάφορες ομάδες μυκητοκτόνων εμφανίστηκε γρήγορα σε Ευρώπη και Βόρεια Αμερική (Cools & Fraaije, 2012; Torriani et al., 2009) που απεικονίζει το υψηλό εξελικτικό δυναμικό του παθογόνου. Έχουν αναγνωριστεί 20 διαφορετικές γενετικές θέσεις (Stb loci) που προσδίδουν ποιοτική, συχνά απομονωμένη, αλλά εξειδικευμένη αντίσταση στον *Z. tritici* και έχουν

χαρτογραφηθεί πολλά γονίδια και θέσεις ποσοτικών γνωρισμάτων (quantitative trait loci) (QTL), που βοηθούν στην διερεύνηση του φαινοτύπου αντίστασης του *Z. tritici* (Brown et al. 2015).

Έχουν βρεθεί ανθεκτικές απομονώσεις του *Z. tritici* σε εκλεκτικές στρομπιλουρίνες [ομάδα11] κι η ανθεκτικότητα βασίζεται στη λειτουργία εναλλακτικών συστημάτων του μύκητα με σκοπό να αποφύγει τη δράση του μυκητοκτόνου στο Ην. Βασίλειο και τη Ν.Ζηλανδία (Hollaway, 2014). Ακόμα, ανθεκτικές απομονώσεις εντοπίστηκαν σε τριαζόλες [ομάδα3], όπως tebuconazole, propriconazole, epxiconazole στην Αυστραλία από τον Milgate A., που βασίζεται στη μετάλλαξη γονιδίων του μύκητα της ασθένειας. Ο Frac έχει κατηγοριοποιήσει τον *M. graminicola* με μέτριο κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα. Γι'αυτό είναι σημαντικό να υπάρχει δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα έγκαιρα ώστε να ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα.

II.9.2.1 Boscalid

Το boscalid είναι ευρέος φάσματος μυκητοκτόνο των καρβοξαμιδικών (SDHIs) και ο μηχανισμός δράσης του αφορά την παρεμπόδιση του ενζυμικού συμπλόκου της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDH) στο σύμπλοκο II, που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, η οποία παρεμπόδιση οδηγεί στην διακοπή του ενεργειακού κύκλου του κυττάρου και συνεπώς στην αναπνοή του (Ζιώγας και Μαρκόγλου 2010; Matheron & Porchas, 2004) Η ανθεκτικότητα σχετίζεται με μια αντικατάσταση αμινοξέος στο γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα πρωτεΐνης σιδήρου-θείου (Ip) στο σύμπλοκο II (SDH), όπου μια ισολευκίνη αντικαθίσταται από μια λευκίνη η τυροσίνη).

Τα καρβοξαμιδικά αποτελούν ομάδα μέτριου με υψηλού κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας, ενώ εμφανίζει αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα με τα δικαρβοξυμιδικά, τα βενζιμιδαζολικά και τις ανιλνοπυριμιδίνες (Frac, 2017; Ζιώγας και Μαρκόγλου 2010). Η εφαρμογή του boscalid, είναι ιδιαίτερα επιτυχής μέχρι σήμερα, είτε μόνο του, είτε σε μίγμα με μυκητοκτόνα της ομάδας QoIs (Myresiotis et al., 2008). Ο διαβρέξιμος κόκκος (wetable granule, WG) του φυτοφάρμακου που χρησιμοποιείται στο σιτάρι περιέχει ένα μίγμα boscalid (25,2% ενεργό) και pyraclostrobin (12,8% ενεργό). Συνήθως, οι ψεκασμοί γίνονται σε διαστήματα 1-3 εβδομάδες (USEPA 2003).

II.9.2.2 Carbendazim

Το carbendazim είναι ένα διασυστημικό μυκητοκτόνο των βενζιμιδαζολικών (MBCs). Πρώτη χρήση έγινε το 1974 και δρα αναστέλλοντας τον διπλασιασμό των κυττάρων, παρεμβαίνοντας στο σχηματισμό της ατράκτου κατά τη μίτωση (διαίρεση των κυττάρων), που είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της με την τουμπουλίνη (β-tubulin), μια βασική πρωτεϊνική υπομονάδα των μικροσωληνίσκων (Ζιώγας και Μαρκόγλου 2010). Τελευταία χρησιμοποιήθηκε σε πολύ λίγες χώρες λόγω φυτοτοξικότητας και χρήσης τριαζολών και QoIs ως πιο αποτελεσματικά (PPDB).

Τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα είναι ομάδα υψηλού κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας, καθώς προκαλούν κληρονομικές γενετικές αλλοιώσεις, με μεταλλαγές κυρίαρχων γονιδίων, χωρίς να επηρεάζουν την προσαρμοστικότητα των μεταλλαγμένων στελεχών. Μίγμα βενζιμιδαζολικού και φαινυλοκαρβαμιδικού μυκητοκτόνου, εμφανίζει αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα των συστατικών τους, άρα καταπολεμεί ανθεκτικά στελέχη, ενώ μίγματα βενζιμιδαζολικών όχι. Η ανθεκτικότητα οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου της πρωτεΐνης β-τουμπουλίνη που εκφράζεται στο στάδιο σχηματισμού των μικροσωληνίσκων. (Frac, 2017).

Σε καλλιέργεια απομονώσεων του μύκητα *in vitro*, σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμένο με βενζιμιδαζολικά, τα μυκητοκτόνα επιτρέπουν μεν τη βλάστηση των σπορίων αλλά προκαλούν μορφολογικές αλλοιώσεις επηρεάζοντας την ανάπτυξη και επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα. Τα σπόρια των ευαίσθητων απομονώσεων θα βλαστήσουν, αλλά οι βλαστικοί σωλήνες που αναπτύσσονται μόνο κατά μερικά κύτταρα σε μήκος, παραμορφώνονται, διογκώνονται και συχνά διαρρηγνύονται. Η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα μπορεί να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο συνήθως μετά από 16- 20 ώρες. (Αντωνιάδης, 2000).

II.9.2.3 Cyproconazole

Το cyproconazole είναι ένα διασυστημικό μυκητοκτόνο των τριαζολών (DMIs). Πρώτη χρήση έγινε το 1989 και προκαλεί την αναστολή της βιοσύνθεσης εργοστερόλης, ενός συστατικού της κυτταρικής μεμβράνης του μύκητα (Sanglard et al., 1998; Brent & Hollomon, 2007), όπου δεσμεύεται το ένζυμο C-14a απομεθυλάσης στο γονίδιο *erg11/cyp51*

καταστέλλοντας την παραγωγή εργοστερόλης (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992). Στοχεύει στην αναστολή της ανάπτυξης μυκήτων και το θάνατο τους, αλλά δεν επιδρά στη βλάστηση σπορίων, επειδή τα σπόρια περιέχουν αρκετή στερόλη, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη βλαστικών σωληνών τους. Άρα η χρήση τους έγκειται στα αρχικά πλαίσια της ασθένειας ή στη μέγιστη ανάπτυξη των μυκήτων (Esker & Proost, 2010). Πλέον αποτελούν ομάδα μέτριου κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας, καθώς μίγμα τους εμφανίζει αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ τους, άρα καταπολεμεί ανθεκτικά στελέχη (Frac, 2017).

Αναφορικά με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μυκήτων στις τριαζόλες έχει ανιχνευθεί μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας με μετάλλαξη στο σημείο προσκόλλησης του ενζύμου-στόχου (Delye et al., 1997) ή με αύξηση του ποσού του ενζύμου που βρίσκεται μέσα στο κύτταρο (Schnabel & Jones, 2001). Στον *M. graminicola* (Zwiers et al., 2002) έχει ανιχνευθεί, μια πρωτεΐνη της δραστικής ουσίας, η οποία χρησιμοποιείται για να ελευθερώσει το κύτταρο από την ζημιογόνο δράση της, χρησιμοποιώντας ως πρωτεΐνες, τις διόδους ABC των κυτταρικών μεμβρανών. Οι δίοδοι αυτοί (ATP-binding cassettes) απομακρύνουν τη δραστική ουσία από το κυτόπλασμα και δημιουργούν υπερέκφραση γονιδίων των πρωτεϊνών των ABC Χατζηδημόπουλος, 2014). Αυτός ο μηχανισμός δεν έχει διαπιστωθεί σε ανθεκτικά στελέχη στον αγρό.

Σε καλλιέργειες παθογόνων *in vitro*, σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με τριαζόλες, τα μυκητοκτόνα παρεμποδίζουν την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα με την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης εργοστερόλης. Τριαζόλες δρουν στην βλάστηση σπορίων, εμφανίζοντας κοντύτερους, διογκωμένους και παραμορφωμένους βλαστικούς σωλήνες. Η παρεμπόδιση της βλάστησης σπορίων, μπορεί να αργήσει να εμφανιστεί, ενώ εξαρτάται από το ρυθμό σύνθεσης και αποδόμησης των στερολών και τα αποθέματα στερολών στα σπόρια, με αποτέλεσμα να καθυστερούν την βλάστηση σπορίων (Αντωνιάδης, 2000). Γι αυτό σημαντικότερο ρόλο έχει η εμφάνιση ανάπτυξης της αποικίας κι όχι της βλάστησης σπορίων του μύκητα, για να αξιολογηθούν τα στελέχη του ως ανθεκτικά.

II.9.2.4 Pyraclostrobin

Το pyraclostrobin ανήκει στην ομάδα των μεθοξυκαρβαμιδικών των εξωτερικών παρεμποδιστών της κινόνης (QoIs), αναπτύχθηκε από φυσικά παράγωγα μυκήτων όπως η strobilurin A και η oudemansin A. Ο μηχανισμός δράσης είναι η παρεμπόδιση της

μιτοχονδριακής αναπνοής, στη θέση III, στο οξειδωτικό κέντρο της ουμπικινόνης (Qo θέση ή σύμπλοκο bc1), δημιουργώντας παρεμπόδιση της μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ κυτοχρώματος b και c1 (Frac, 2017; Ζιώγας και Μαρκόγλου 2010). Παρέχουν προστατευτική και θεραπευτική δράση παρεμποδίζοντας τη βλάστηση των σπορίων, την πρόωμη ανάπτυξη του μυκηλίου και την παραγωγή σπορίων του μύκητα (Esker & Proost, 2010).

Αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Frac, 2017). Οι Zheng et al. (2000) απέδειξαν ότι ανθεκτικότητα τους μπορεί να εμφανιστεί είτε από σημειακές μεταλλάξεις σε γονίδιο στη Qo θέση, είτε από την αύξηση της μεταφοράς ηλεκτρονίων διαμέσου της μεταβολικής οδού της εναλλακτικής οξειδάσης (AOX) (Χατζηδημόπουλος, 2014). Λίγες περιπτώσεις QoIs ανθεκτικών στελεχών έχουν βρεθεί σε απομονώσεις αγρού εκτός από τη μετάλλαξη στη θέση 143 (G143A) του γονιδίου του κυτοχρώματος b στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, η οποία οδήγησε σε αντικατάσταση της γλυσίνης από αλανίνη.

Η λειτουργία του εναλλακτικού 'μονοπατιού' της αναπνοής (AOX), έχει αποδηχθεί αποτελεσματικός μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας στην δραστική ουσία azoxystrobin. Η χρήση σαλικυλ-υδροξαμικού οξέος (SHAM) αναστέλλει την δραστηριότητα της (AOX). Το SHAM δρα σαν παρεμποδιστής του εναλλακτικού 'μονοπατιού' της αναπνοής κι έχει μελετηθεί με συνδυασμό παρεμποδιστών ίδιου τρόπου δράσης, όπως παράγωγα methoxyacrylate ή antimycin A. Ταυτόχρονη δράση ή αλλιώς συνεργισμός, μπορεί να προκύψει από την εισαγωγή του εναλλακτικού 'μονοπατιού' από προηγούμενους παρεμποδιστές και την παρεμπόδιση του εισαγόμενου εναλλακτικού μονοπατιού από το SHAM, (Hayashi, et al, 1996).

Σκοπός παρούσας πτυχιακής διατριβής

Η παρούσα διατριβή μελετά τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Z.tritici* για πρώτη φορά στην Ελλάδα. Αφού διαπιστώθηκε, μέσω της έρευνας αυτής, ότι ο μύκητας δεν εμφανίζει ανθεκτικότητα σε δραστικές ουσίες όπως boscalid, cyproconazole, carbendazim και pyraclostrobin που εξετάστηκε από δείγματα του μικροοργανισμού που προέρχονται από την Θεσσαλική πεδιάδα, παρατηρήθηκε για την ευαισθησία του. Αρχικά στοχεύει στην παρατήρηση της ευαισθησίας που εμφανίζει, και των παραμέτρων της και τελικά στην κατανόηση της, για περεταίρω ενδείξεις. Σκοπός της εργασίας ήταν να ερευνηθεί ο έλεγχος ευαισθησίας του μύκητα για τις 42h επώασής του σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA σε 22°C υπό συνθήκες σκότους και να αξιολογηθεί με βάση την επίδραση των δραστικών ουσιών στο στάδιο βλάστησης του μύκητα και στα στάδια ανάπτυξης αποικίας, με απώτερο σκοπό την κατανόηση της ανάπτυξης του μύκητα και την διευκόλυνση της περεταίρω έρευνά του. Η έρευνα υπολογίζει την ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) της βλάστησης των σπορίων αλλά και της ανάπτυξης μυκηλίου και σημειώνει τον τρόπο και την αποτελεσματικότητα των δραστικών ουσιών. Η παρούσα διατριβή αποτελεί ένα βοήθημα για την πιθανή μελλοντική αντίχνευση ανθεκτικότητας του παθογόνου στις δραστικές ουσίες που εξετάστηκε και με τον τρόπο που μελετήθηκε.

III.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

\

III.1 Απομονώσεις του φυτοπαθογόνου μύκητα *Z.tritici* - Ταυτοποίηση απομονώσεων του μύκητα

Για τις μολύνσεις χρησιμοποιήθηκαν 35 απομονώσεις του παθογόνου *Zymoseptoria tritici* του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας από το Τμήμα Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 18 απομονώσεις από δείγματα προέλευσης του Βελεστίνου, 9 απομονώσεις από την Καλαμπάκα και 8 απομονώσεις από τα Φάρσαλα (Πίν. 5). Έγιναν υποκαλλιέργειες για τις ανάγκες του πειράματος, υπό άσηπτες συνθήκες και από τις 35 απομονώσεις με στόχο τον έλεγχο της σταθερότητας της βιωσιμότητας των απομονώσεων (Αντωνιάδης, 2000). Με τη χρήση αποστειρωμένης βακτηριολογικής βελόνας και της απλής επαφής της πάνω στις αποικίες που είχαν αναπτύξει, σπόρια μεταφέρθηκαν σε καινούριους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν PDA σε κλίση. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 22°C και σε συνθήκες σκότους. Μετά από 30 μέρες, το παθογόνο είναι ώριμο και εύρωστο για να πραγματοποιηθεί η μόλυνση, δηλαδή συλλογή και μεταφορά σπορίων, με την παρασκευή του υπερκείμενου υγρού στα τρυβλία.

Πίνακας 1. Κωδικοποίηση απομονώσεων του *Z.tritici* που εξετάστηκαν.

Κωδικός	Περιοχή	Αρίθμηση απομον.	Σύνολο απομονώσ.
B	Βελεστίνo	1-18	18
K	Καλαμπάκα	28-36	9
Φ	Φάρσαλα	37-44	8

Πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των απομονώσεων κατά την μικροσκοπική παρατήρηση πυκνιδιοσπορίων του παθογόνου από φωτογραφίες που πάρθηκαν με τη χρήση σύνθετου οπτικού υλικού Nikon Labophot-2 EFD3, από τη ψηφιακή κάμερα Motic 10 Mp. Με τη χρήση λογισμικού Adobe Photoshop 7.0 πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις των διαστάσεών τους, όσον αναφορά το μήκος, πλάτος κι αριθμών σέπτων τους. Με σκοπό την ταυτοποίησή τους, έγινε σύγκριση με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των σπορίων της περιγραφής της βιβλιογραφίας.

III.2.1 Δραστικές ουσίες – παρασκευάσματα που αξιολογήθηκαν για τον περιορισμό ανάπτυξης αποικίας του παθογόνου

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 4 χημικά σκευάσματα με δραστικές ουσίες που προέρχονταν από 4 διαφορετικές ομάδες διασυστηματικών μυκητοκτόνων με διαφορετικό τρόπο δράσης. Αυτές οι δραστικές ουσίες ήταν boscalid (BAS 510 50% WG), cyproconazole (Atemi 10WG), carbendazim (Derozal 50% WP, Hoechst, Germany) και pyraclostrobin (F 500 25% EC, BASF, Germany). Σκοπός είναι να παρασκευαστεί μια σειρά δόσεων πυκνών διαλυμάτων για την παρασκευή τελικών συγκεντρώσεων σε θρεπτικό υλικό PDA. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία που έφεραν μόνο διαλύτη, στην ίδια συγκέντρωση με τα υπόλοιπα τρυβλία με την διαφορά ότι δεν έφεραν δραστική ουσία (Αντωνιάδης, 2000).

Παρασκευάστηκαν πυκνά διαλύματα (stock) των 1000mg/L, 100mg/L, 10mg/L, 1mg/L, 0,1mg/L δραστικής ουσίας για κάθε μυκητοκτόνο. Επειδή τα stock αποθηκεύτηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 25ml, για να παρασκευαστούν τα 1000mg/L (ή 1000 ppm), θα χρειαστούν 25mg δραστικής ουσίας για κάθε μυκητοκτόνο σε 25ml H₂O. Η ποσότητα σκευάσματος υπολογίστηκε σύμφωνα με την περιεκτικότητα δραστικής ουσίας, ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό και διαλύθηκε σε 25ml H₂O. Το boscalid και το carbendazim περιέχουν 50% δραστική ουσία, το cyproconazole 10% και το pyraclostrobin 25%. (Πίν. 1).

Πίνακας 2. Παρασκευή πυκνού διαλύματος stock συγκέντρωσης 1000mg/L.

Μυκητόνα	Ποσότητα σκευάσματος (mg)	Σε ποσότητα διαλύτη H ₂ O (ml)	Πυκνό διάλυμα stock (mg/l)
Boscalid	50	25	1000
Carbendazim	50	25	1000
Cyproconazole	250	25	1000
Pyraclostrobin	100	25	1000

Από το πυκνό διάλυμα 1000mg/L δραστικής ουσίας ανά L αποστειρωμένου νερού, (Πίν. 1) με κατάλληλες αραιώσεις (προσθήκη απιονισμένου αποστειρωμένου νερού) έγιναν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πυκνών διαλυμάτων. Πιο συγκεκριμένα, 1ml της αρχικής συγκέντρωσης κάθε μυκητοκτόνου, (δηλαδή των 1000mg/L) προστέθηκε σε 10ml

διαλύτη (H₂O). Από αυτή την αραιώση παρασκευάστηκε η συγκέντρωση των 100mg/L σε H₂O και με τη ίδια διαδικασία παρασκευάστηκαν οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις (Πίν. 2). Αργότερα τοποθετήθηκαν σε ψυγείο στους 2,5°C για διατήρηση μέχρι την χρήση.

Πίνακας 3. Παρασκευή πυκνών διαλυμάτων stock για κάθε μυκητοκτόνο.

Μυκητοκτόνα	Από διάλυμα (mg/L)	πυκνό stock	Ποσότητα (ml)	Σε ποσότητα διαλύτη H ₂ O (ml)	Πυκνό διάλυμα stock (mg/L)
Boscalid	1000		1	10	100
	100		1	10	10
	10		1	10	1
	1		1	10	0,1
Carbendazim	1000		1	10	100
	100		1	10	10
	10		1	10	1
	1		1	10	0,1
Cyproconazole	1000		1	10	100
	100		1	10	10
	10		1	10	1
	1		1	10	0,1
Pyraclostrobin	1000		1	10	100
	100		1	10	10
	10		1	10	1
	1		1	10	0,1

III.2.2 Παρασκευή θρεπτικού διαλύματος PDA – προσθήκη δραστικών ουσιών στο θρεπτικό υπόστρωμα

Για την πραγματοποίηση του πειράματος, οι απομονώσεις αναπτύχθηκαν και διατηρήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato-Dextrose-Agar, πατάτα-δεξτρόζη-άγαρ

) σε τριβλία Petri, με ή χωρίς την προσθήκη μυκητοκτόνων. Για την παρασκευή του απαιτήθηκε: 200g πατάτας, 15g γλυκόζης, 15g άγαρ και 1000ml απιονισμένου νερού.

Κόνδυλοι πατάτας τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια και εμβαπτίστηκαν σε απιονισμένο νερό εν ώρα βράσης σε κωνική φιάλη των 2L, και αφέθηκαν να βράσουν μέχρι να μαλακώσουν αρκετά ώστε να λιώσουν μετά από ελαφρά πίεση. Το εκχύλισμα περάστηκε από τουλπάνι και συμπληρώθηκε μέχρι 1L. Μικρή του ποσότητα αναμίχθηκε με γλυκόζη και άγαρ σε ποτήρι ζέσεως για να λιώσει το άγαρ και αναδεύτηκε με το υπόλοιπο διάλυμα μέχρι να γίνει ομοιογενές και να υπάρξει πλήρης διάλυση τους, ενώ έβραζε. Όταν το μίγμα ομογενοποιήθηκε, συμπληρώθηκε μέχρι 1L και μοιράστηκε σε γιάλινες θερμοανθεκτικές φιάλες ή σε δοκιμαστικούς σωλήνες.

Με τη βοήθεια του αυτόκαυστου, πραγματοποιήθηκε αποστείρωσή του, στους 121°C για 15 min υπό πίεση 1.2 atm. Το υπόστρωμα στους δοκιμαστικούς σωλήνες αφέθηκε για να σταθεροποιηθεί, ώστε να πραγματοποιηθεί εν καιρώ εμβολιασμός και δημιουργία υποκαλλιέργειας του μύκητα. Αντίθετα στο θρεπτικό υλικό που ήταν στις κωνικές φιάλες και το οποίο προορίζεται για τη δοκιμή ανάπτυξης του μύκητα σε μυκητοκτόνα, προστέθηκε η κατάλληλη συγκέντρωση των μυκητοκτόνων και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε τριβλία Petri με διάμετρο 9cm, όπου σταθεροποιήθηκε.

Η πρόσμιξη πυκνών διαλυμάτων (mg/l) σε θρεπτικό υλικό PDA, πραγματοποιήθηκε όταν αυτό ήταν λιωμένο (121 °C) μέσα στις κωνικές θερμοανθεκτικές φιάλες των 100 ml με πεπλατυσμένα τοιχώματα (medicine bottles), και πριν να πήξει (Αντωνιάδης, 2000). Εκεί δέχθηκε τα διαλύματα των δραστικών ουσιών, ώστε τελικά να προκύψει η επιθυμητή συγκέντρωση για κάθε δραστική. Αναδεύτηκε καλά και περιχύθηκε σε τριβλία Petri σε ισοδύναμη ποσότητα (10ml το τριβλίο).

Παρασκευάστηκαν διαλύματα τελικών συγκεντρώσεων των 100mg/L, 10mg/L, 1mg/L, 0,1mg/L, 0,01mg/L, 0,001mg/L δραστικής ουσίας σε PDA για κάθε μυκητοκτόνο. Επειδή το θρεπτικό υπόστρωμα αποθηκεύτηκε σε κωνικές θερμοανθεκτικές φιάλες (medicine bottles) των 100 ml, για να παρασκευαστούν τα 100mg/L (ή 100 ppm), χρειάστηκαν 10mg δραστικής ουσίας για κάθε μυκητοκτόνο σε 100ml PDA. Υπολογίστηκε η ποσότητα μυκητοκόνου με βάση την περιεκτικότητα της σε δραστικής ουσία (boscalid 50%, carbendazim 50%, το cyproconazole 10%, pyraclostrobin 25%) (Πίν. 3) και ζυγίστηκε σε

αναλυτικό ζυγό. Στις συγκεντρώσεις του pyraclostrobin προστέθηκε salicylhydroxamic acid (SHAM) συγκέντρωσης 100mg/L.

Πίνακας 4. Παρασκευή τελικής συγκέντρωσης 100mg/L, για κάθε μυκητοκτόνο

Μυκητόνα	Ποσότητα σκευάσματος (mg)	Σε ποσότητα υποστρώμ. PDA(ml)	Τελική συγκέντρωση (ml/L)
Boscalid	20	100	100
Carbendazim	20	100	100
Cyproconazole	100	100	100
Pyraclostrobin	40 + 10mg SHAM	100	100

Ακολουθεί η παρασκευή των υπόλοιπων 5 τελικών συγκεντρώσεων mg δραστικών ουσιών ανά L υποστρώματος ανάπτυξης PDA, για κάθε δραστική (Πίν. 4) από τις αραιώσεις των 5 πυκνών διαλυμάτων που παρασκευάσαμε παραπάνω (Πίν. 2). Πιο συγκεκριμένα, 1ml συγκέντρωσης πυκνού διαλύματος (mg/l) κάθε μυκητοκτόνου (δηλαδή των 1000mg δραστικής ουσίας ανά L αποστειρωμένου νερού), προστίθεται σε 100ml PDA, απ' όπου παρασκευάζεται τελική συγκέντρωση 10mg/L (mg δραστικής ουσίας ανά L PDA). Η ίδια διαδικασία εκτελείται για τις υπόλοιπες τελικές συγκεντρώσεις (Πίν. 4).

Πίνακας 5. Παρασκευή τελικών συγκεντρώσεων μυκητοκτόνων σε θρεπτικό υλικό PDA.

Μυκητοκτόνα	Από πυκνό διάλυμα (mg/L)	Ποσότητα stock (ml)	Ποσότητα (ml)	Σε ποσότητα υποστρώμ. PDA(ml)	Τελική συγκέντρωση (mg/L)
Boscalid	1000	1	100	10	
	100	1	100	1	
	10	1	100	0,1	
	1	1	100	0,01	
	0,1	1	100	0,001	
Carbendazim	1000	1	100	10	
	100	1	100	1	
	10	1	100	0,1	
	1	1	100	0,01	

	0,1	1	100	0,001
Cyproconazole	1000	1	100	10
	100	1	100	1
	10	1	100	0,1
	1	1	100	0,01
	0,1	1	100	0,001
Pyraclostrobin	1000	1	100	10
	100	1	100	1
	10	1	100	0,1
	1	1	100	0,01
	0,1	1	100	0,001

Αναλυτικά οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 0.001mg, 0.01mg, 0.1mg, 1mg, 10mg, και 100mg boscalid ανά λίτρο θρεπτικού υποστρώματος PDA, 0.001mg, 0.01mg, 0.1mg, 1mg, 10mg, και 100mg cyprocanazole ανά λίτρο θρεπτικού υποστρώματος PDA, 0.001mg, 0.01mg, 0.1mg, 1mg, 10mg, και 100mg carbendazim ανά λίτρο θρεπτικού υποστρώματος PDA, 0.001mg, 0.01mg, 0.1mg, 1mg, 10mg, και 100mg pyraclostrobin με 100mg/L SHAM ανά λίτρο θρεπτικού υποστρώματος PDA. Η τελική συγκέντρωση δραστικής ουσίας στο υπόστρωμα ανάπτυξης είναι πάντα 1% (Αντωνιάδης, 2000). Μετά την παρασκευή των διαλυμάτων προστέθηκαν στο θρεπτικό υλικό με ταυτόχρονη ανάδευση. Στη συνέχεια το υλικό μοιράστηκε σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm (10 ml σε κάθε τρυβλίο) και αφέθηκε να στερεοποιηθεί. Τέλος τοποθετήθηκαν σε ψυγείο στους 2,5°C για διατήρηση μέχρι τον εμβολιασμό. Τρυβλία Petri με απουσία δραστικών ουσιών χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες.

III.3 Συλλογή σποριών από αποικίες του φυτοπαθογόνου μύκητα

Σαν μολύσματα χρησιμοποιήθηκαν τα πυκνιδιοσπόρια των αποικιών του μύκητα. Για την παρασκευή του μολύσματος προστέθηκαν 5ml απιονισμένο αποστειρωμένο νερό σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα με αποικία κάθε απομόνωσης του παθογόνου. Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε υάλινη ράβδος για την ανάδευση και ανατομική βελόνη για την

απελευθέρωση των σπορίων από τα πυκνίδια στο υπερκείμενο νερό. Επάνω σε αποστειρωμένο υάλινο χωνί τοποθετήθηκε αποστειρωμένο τουλπάνι, απ' όπου εκχύθηκε το αιώρημα σε δοκιμαστικό σωλήνα κι από κεί, αφού αναδεύτηκε μεταφέρθηκε με γυάλινες πιπέτες στο θρεπτικό υπόστρωμα. Το τουλπάνι χρησιμοποιήθηκε για την συγκράτηση θραυσμάτων μυκηλίου και θρεπτικού υλικού. Αφού μετρήθηκε μικροσκοπικά ο πληθυσμός των πυκνιδιοσπορίων ανά σταγόνα στο αιματοκυττόμετρο (Neubauer, Rhône-Poulenc), υπολογίστηκε αραίωση για 100.000 σπόρια ανά σταγόνα, με 20ml H₂O για κάθε απομόνωση. Ανάδευση του διαλύματος πριν την τοποθέτηση στο θρεπτικό υπόστρωμα, γίνεται για την αποφυγή καθίζησης των σπορίων μέσα στον σωλήνα (Αντωνιάδης, 2000).

III.4 Εφαρμογή μολύσματος (πυκνιδιοσπορίων) σε τρυβλία εμπλουτισμένα με μυκητοκτόνα

Σε κάθε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα PDA και συγκεκριμένη συγκέντρωση μυκητοκτόνου τοποθετούνται 9 σταγόνες με αιώρημα σπορίων σε συγκεκριμένες θέσεις. Οι σταγόνες τοποθετούνται περιφερειακά σε 9 προσημειωμένες θέσεις, για μεγαλύτερο εύρος απομονώσεων, στο θρεπτικό υλικό PDA παρουσία δραστικής ουσίας με ξεχωριστά κάθε φορά περιεκτικότητα. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με PDA χωρίς μυκητοκτόνο. Αφού στεγνώσουν οι σταγόνες πάνω στο θρεπτικό υπόστρωμα, τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης στους 22°C για 24 ώρες τουλάχιστον. Ακολουθεί μικροσκοπική εξέταση των τρυβλίων για την προκαθορισμένη ώρα στην οποία βλασταίνουν τα σπόρια και ύστερα έλεγχο για αποικία.

III.5 Μέτρηση βλαστικότητας σπορίων - σχηματισμός μυκηλίου

Ο έλεγχος ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε με τις δραστικές ουσίες εμπορικών σκευασμάτων boscalid, cyproconazole, carbendazim και pyraclostrobin που ανήκουν στις ομάδες καρβοξαμιδικών (ανιλίδια), τριαζολών, βενζιμιδαζολικών και στρομπιλουρινών αντίστοιχα. Οι δραστικές ουσίες είναι εγκεκριμένες από το Υπουργείο Γεωργίας και Αγροτικού Περιβάλλοντος, όπου χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις 0,001mg, 0,01mg, 0,1mg, 1mg, 10mg, και 100mg δραστικού συστατικού ανά λίτρο υποστρώματος ανάπτυξης

PDA. Ο *in vitro* έλεγχος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρωτόκολλο της FRAC (Fungicide Resistnce Action Commitee).

Τα εμπλουτισμένα με μυκητοκτόνο τριβλία υποβάλλθηκαν σε μικροσκοπική εξέταση σε 42h μετά τον εμβολιασμό και ύστερα ακολούθησε έλεγχος για δημιουργία αποικίας μετά από 8 μέρες. Με τη βοήθεια του σύνθετου οπτικού υλικού Nikon Labophot-2 EFD3 όπου είχε προσαρμοστεί ψηφιακή κάμερα Motic 10 Mr, τα σπόρια παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά και φωτογραφήθηκαν. Οι ψηφιακές φωτογραφίες πάρθηκαν μετά από 40-42h και μετά 72h από όλες τις συγκεντρώσεις 0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L για κάθε μυκητοκτόνο καθώς και για μάρτυρες. Σε καθεμία απ' αυτές τις χρονικές στιγμές παρατηρείται η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα των σπορίων.

Οι συλλεχθέντες φωτογραφίες χρησιμοποιήθηκαν για να αξιολογηθεί η επίδραση των μυκητοκτόνων στην ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα των σπορίων, για να διαπιστωθεί αν αυτές οι απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις και δραστικές ουσίες.

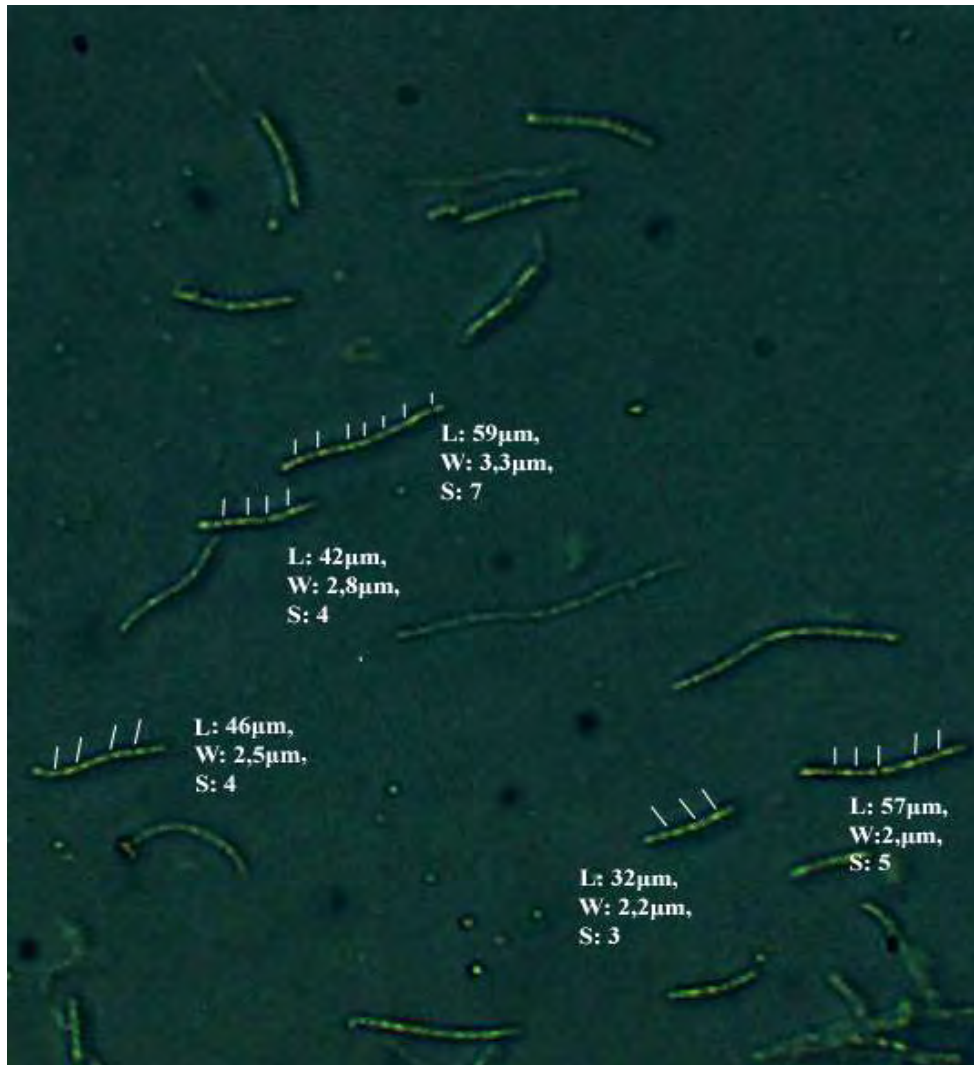
III.6 Μέτρηση διαστάσεων αποικιών σε τρυβλία εμπλουτισμένα με μυκητοκτόνα

Μετά την πάροδο 8 ημερών μετρήθηκε η ανάπτυξη της αποικίας που προέκυψε μετά την εναπόθεση σταγόνας αιωρήματος σπορίων των απομονώσεων του *Z.tritici* σε συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων. Καταγράφηκε η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση MIC δραστικής ουσίας που ανέστειλε την ανάπτυξη αποικίας στις απομονώσεις του *Z.tritici*. Με βάση τις MIC για την ανάπτυξη αποικίας σημειώθηκε η αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων στα χρονικά αυτά στάδια. Για την ανάπτυξη της αποικίας, της κάθε απομόνωσης και για κάθε συγκέντρωση δραστικής ουσίας, μετρήθηκαν δύο κάθετοι διάμετροι της αποικίας με τη βοήθεια με μιλιμετρέ χαρτιού A4 (Αντωνιάδης, 2000).

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

IV.1 Ταυτοποίηση απομονώσεων του μύκητα

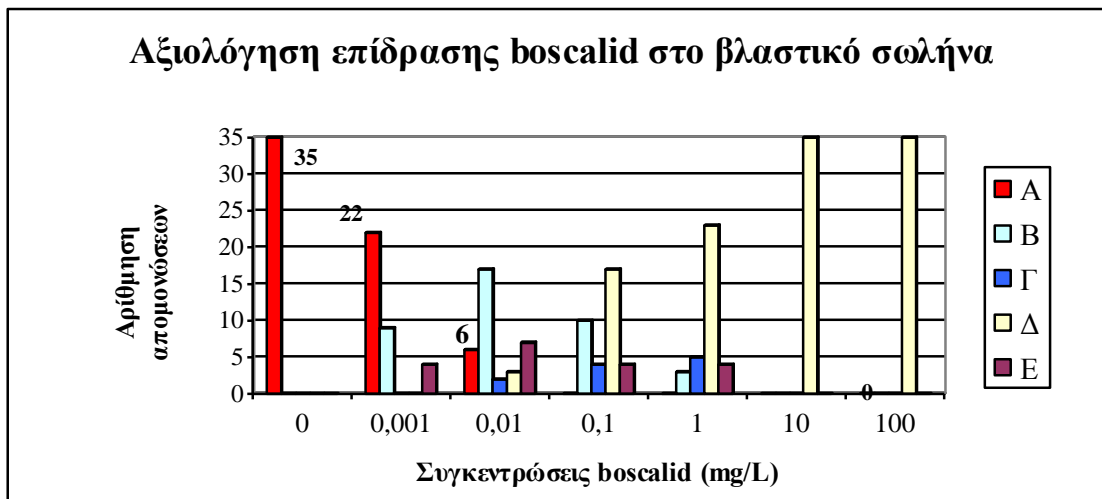
Για την εξακρίβωση ότι οι αποικίες σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, που είχαν διατηρηθεί στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας ανήκαν στο φυτοπαθογόνο μύκητα *Z.tritici*, μετρήθηκαν οι διαστάσεις των σπορίων και ο αριθμός των εγκάρσιων διαφραγμάτων. Για την παραγωγή των πυκνιδιοσπορίων στους δοκιμαστικούς χρειάστηκαν 20-30 μέρες. Τα σπόρια των απομονώσεων που μετρήθηκαν, είχαν μήκος από 22 έως 86 μm και πλάτος από 1,7 έως 3,7 μm ενώ ο αριθμός των σέπτων τους ήταν από 3 έως 7, τα σπόρια ήταν υαλώδη, νηματοειδή και σκωληκόμορφα.



Εικόνα 1. Παρατήρηση πυκνιδιοσπορίων του *Z.tritici* με χρήση μικροσκοπίου Nikon Laborhot-2 (80x) και μέτρηση διαστάσεων μέσω του προγράμματος Adobe Photoshop 7.0. (32-59 μm x 2-3,3 μm) σε PDA, μετά από 24h σε 22°C υπό συνθήκες σκότους (κωδικός απομόνωσης B21).

IV.2.1 Επίδραση της δραστικής ουσίας boscalid στην αύξηση του βλαστικού σωλήνα

Από τις 35 απομονώσεις του *Z.tritici* που ελέγχθηκαν για ευαισθησία στο boscalid, μετά από 42h στο σκοτάδι στους 22°C, παρατηρήθηκε άνιση ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα ανά συγκέντρωση και απομόνωση (Διάγρ. 1). Ελάχιστη παραμόρφωση που παρατηρήθηκε στις συγεντρώσεις, σημειώθηκε σε βραχύτερους βλαστικούς σωλήνες, ενώ ταυτόχρονα παρατηρήθηκαν σπόρια με μη παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα, αλλά με βραχύτερο σε σχέση με τον μάρτυρα.

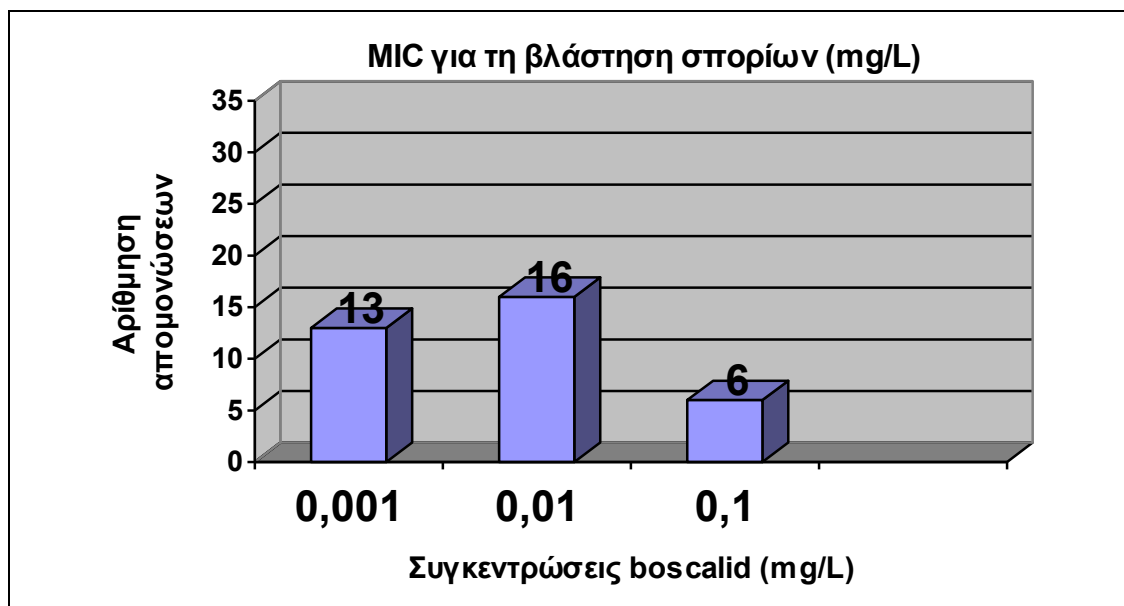


Διάγραμμα 1. Βλάστηση σπορίων *Z.tritici* μετά από επώαση σε 42h στο σκοτάδι στους 22°C, σε τρυβλία Petri με PDA, παρουσία boscalid (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L). A : βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα, B : βλάστηση σπορίων με βραχύ βλαστικό σωλήνα, Γ : βλάστηση με παραμορφωμένο ή μη, βραχύ βλαστικό σωλήνα, Δ : μη βλάστηση σπορίων μετά από στους 22°C στο σκοτάδι για 42h, E : βλάστηση ελάχιστων σπορίων με βραχύ ή μακρύ βλαστικό σωλήνα.

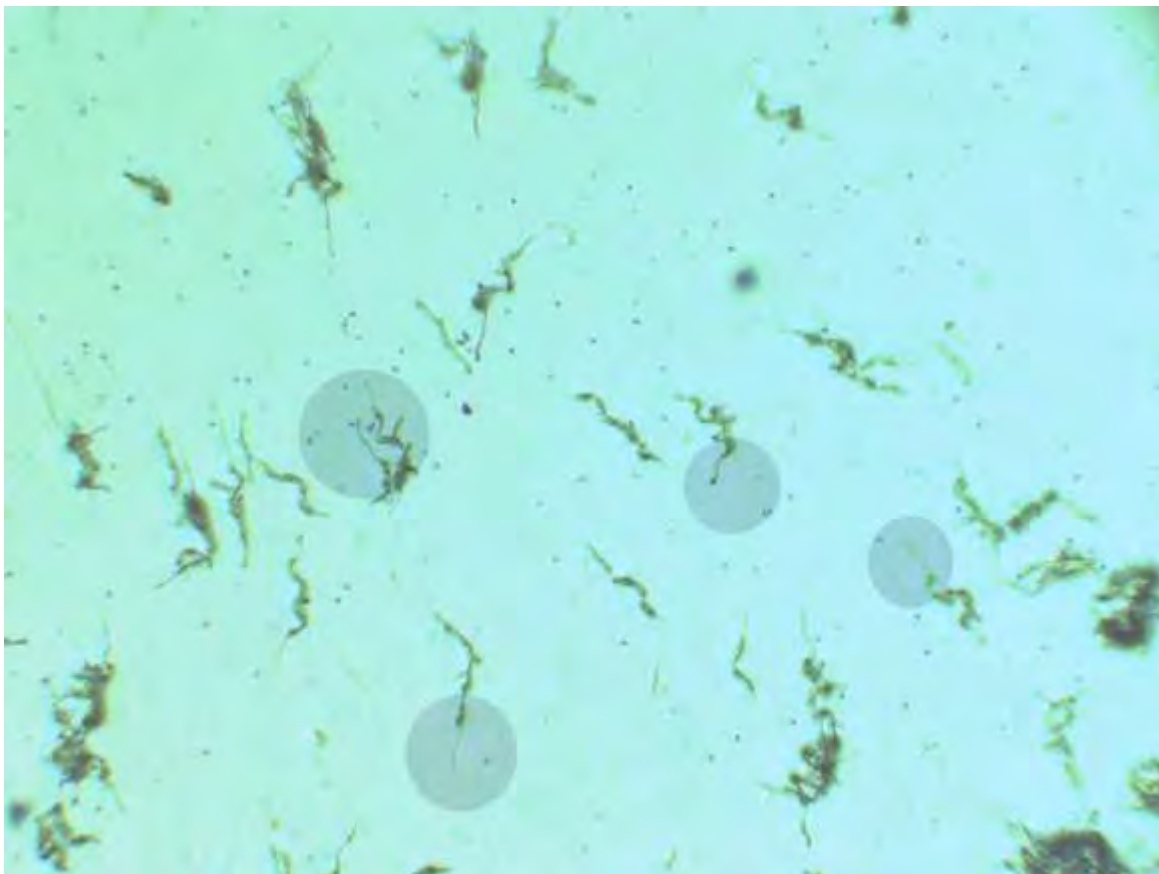
Στη συγκέντρωση 0,01mg/L boscalid, από τις 35 απομονώσεις, βλάστησαν οι 32. Από αυτές 6 βλάστησαν με τυπικό βλαστικό σωλήνα, 17 βλάστησαν με βραχύ βλαστικό σωλήνα 2 με παραμορφωμένο ή μη, βραχύ βλαστικό σωλήνα, και 7 με ελάχιστα βλαστημένα σπόρια με βραχύ ή τυπικό βλαστικό σωλήνα. Άρα βλάστησαν σπόρια με τυπικό βλαστικό σωλήνα στις 6 απομονώσεις και 26 απομονώσεις βλάστησαν με αλλοιωμένη ανάπτυξη κυρίως βραχύτερου βλαστικού σωλήνα (Πίν. 6). Στη συγκέντρωση 0,1mg/L boscalid, από τις 35 απομονώσεις, βλάστησαν 18 απομονώσεις, 10 βλάστησαν με βραχύ βλαστικό σωλήνα, 4 με παραμορφωμένο ή μη, βραχύ βλαστικό σωλήνα, και 4 με ελάχιστα βλαστημένα σπόρια με βραχύ ή τυπικό βλαστικό σωλήνα. Στη συγκέντρωση 1mg/L boscalid, από τις 35

απομονώσεις, βλάστησαν 12 απομονώσεις, 3 βλάστησαν με βραχύ βλαστικό σωλήνα, 5 με παραμορφωμένο ή μη, βραχύ βλαστικό σωλήνα, και 4 με ελάχιστα βλαστημένα σπόρια με βραχύ ή τυπικό βλαστικό σωλήνα

Με βάση την αξιολόγηση της ανάπτυξης βλαστικού σωλήνα, υπολογίστηκε η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) της βλάστησης σπορίων με ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα (Διάγρ. 2). Στην συγκέντρωση 0,001mg/L boscalid, από τις 35 απομονώσεις βλάστησαν 22 απομονώσεις με τυπικό βλαστικό σωλήνα (Πίν. 6). ενώ οι υπόλοιπες 13 βλάστησαν με αλλοιωμένη ανάπτυξη κυρίως βραχύτερου βλαστικού σωλήνα (13 απομονώσεις MIC σε 0,001 mg/L) όπου και θεωρήθηκαν υψηλά ευαίσθητες (HS). Στην συγκέντρωση 0,01mg/L boscalid από τις 22 απομονώσεις που βλάστησαν στη συγκέντρωση 0,001mg/L με τυπικό βλαστικό σωλήνα, βλάστησαν 6 απομονώσεις με ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα, ενώ οι υπόλοιπες 16 βλάστησαν με αλλοιωμένη ανάπτυξη κυρίως βραχύτερου βλαστικού σωλήνα (16 απομονώσεις MIC σε 0,01mg/L). Τέλος οι 6 απομονώσεις που ανέπτυξαν τυπικό βλαστικό σωλήνα σε 0,01mg/L boscalid, στην 0,1mg/L παρουσίασαν μορφολογική αλλοίωση (6 απομονώσεις MIC σε 0,1mg/L). Από αυτές, οι 5 βλάστησαν με βραχύ βλαστικό σωλήνα στην 0,1mg/L (Εικ. 2) ενώ οι ίδιες βλάστησαν και σε 1mg/L boscalid με βραχύ ή παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα ή με λίγα βλασθέντα σπόρια όπου και θεωρήθηκαν ευαίσθητες (S) (Διάγρ. 1, 2 Πίν. 6).



Διάγραμμα 2. Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα απομονώσεων *Z. tritici* μετά από επώαση σε 42h στο σκοτάδι στους 22°C, σε τρυβλία Petri με PDA, παρουσία boscalid (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L). Δεν συμπεριλαμβάνονται βλαστημένα σπόρια με βραχύ ή παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα.



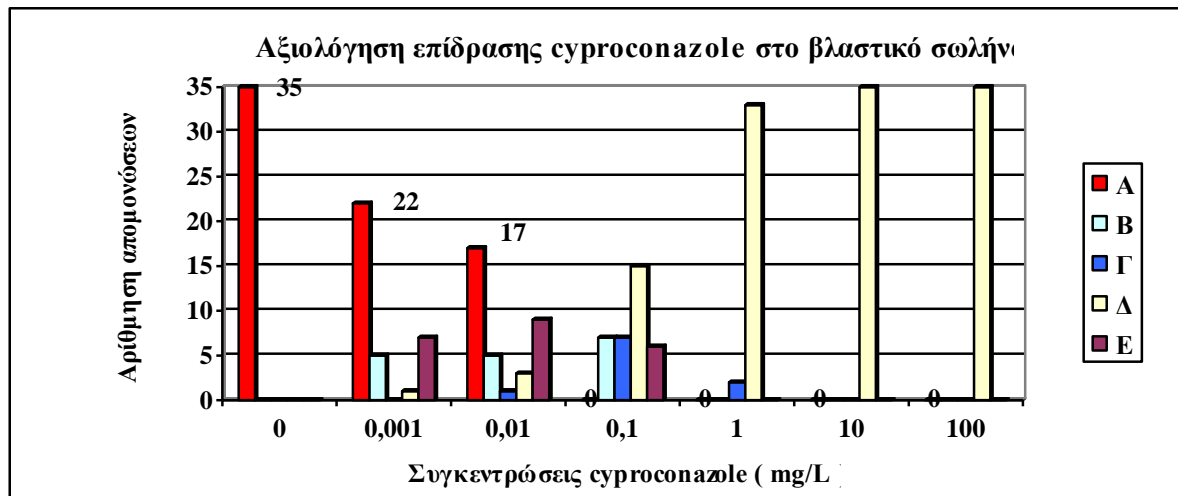
Εικόνα 2. Βλάστηση σπορίων σε PDA με 0,1mg/L boscalid μετά από 42h σε συνθήκες σκότους, στους 22°C, με βραχύ βλαστικό σωλήνα (B11)(Πίν. 7).



Εικόνα 3. Παρατήρηση βλάστησης πυκνιδιοσπορίων του *Z. tritici* (3,2μm x 25μm) με χρήση μικροσκοπίου Nikon Laborphot-2 (40x) και προγράμματος Adobe Photoshop 7.0. Διογκωμένα σπόρια του μύκητα σε PDA με 1mg/L boscalid μετά από 72h σε 22°C υπό συνθήκες σκότους (κωδικός απομόνωσης B1) (Πίνακας 8.). Επίδραση μυκητοκτόνου στη δομή των σπορίων.

IV.2.2 Επίδραση της δραστικής ουσίας cyproconazole στην αύξηση του βλαστικού σωλήνα

Οι 35 απομονώσεις του *Z.tritici* κατανομήθηκαν με βάση την ευαισθησία που εμφάνισε στο cyproconazole η ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα παρόμοια όπως και στο boscalid μετά από 42h στο σκοτάδι στους 22°C (Διάγρ. 3). Βλάστηση σπορίων με τυπικό βλαστικό σωλήνα σημειώθηκε στις συγκεντρώσεις 0.001mg/L, 0.01mg/L cyproconazole, ενώ υπήρξε μια αύξουσα συμπεριφορά του πλάτους των σπορίων στις διάφορες συγκεντρώσεις. Διόγκωση σπορίων σημειώθηκε για την ομάδα A στις συγκεντρώσεις 0,1/1/10/100mg/L και στις B,C σε 0,1/1/10/mg/L σε 40-42h σε συνθήκες σκότους στους 22°C. Η διόγκωση πραγματοποιήθηκε με ταυτόχρονη ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα αλλά με αρκετά βραχύτερο μήκος. (Εικ. 5).

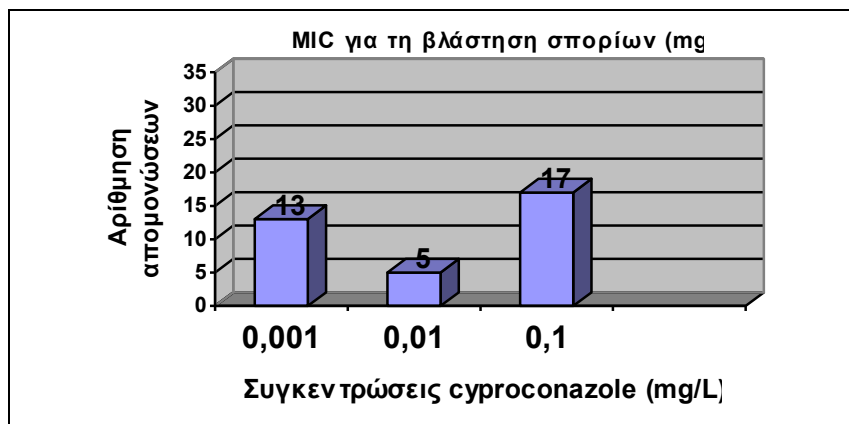


Διάγραμμα 3. Βλάστηση σπορίων *Z.tritici* μετά από επώαση σε 42h στο σκοτάδι στους 22°C, σε τρυβλία Petri με PDA, παρουσία cyproconazole (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L). A : βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα, B : βλάστηση σπορίων με βραχύ βλαστικό σωλήνα, Γ : βλάστηση με παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα, Δ : μη βλάστηση σπορίων μετά από στους 22°C στο σκοτάδι για 42h, E : βλάστηση ελάχιστων σπορίων με βραχύ ή μακρύ βλαστικό σωλήνα.

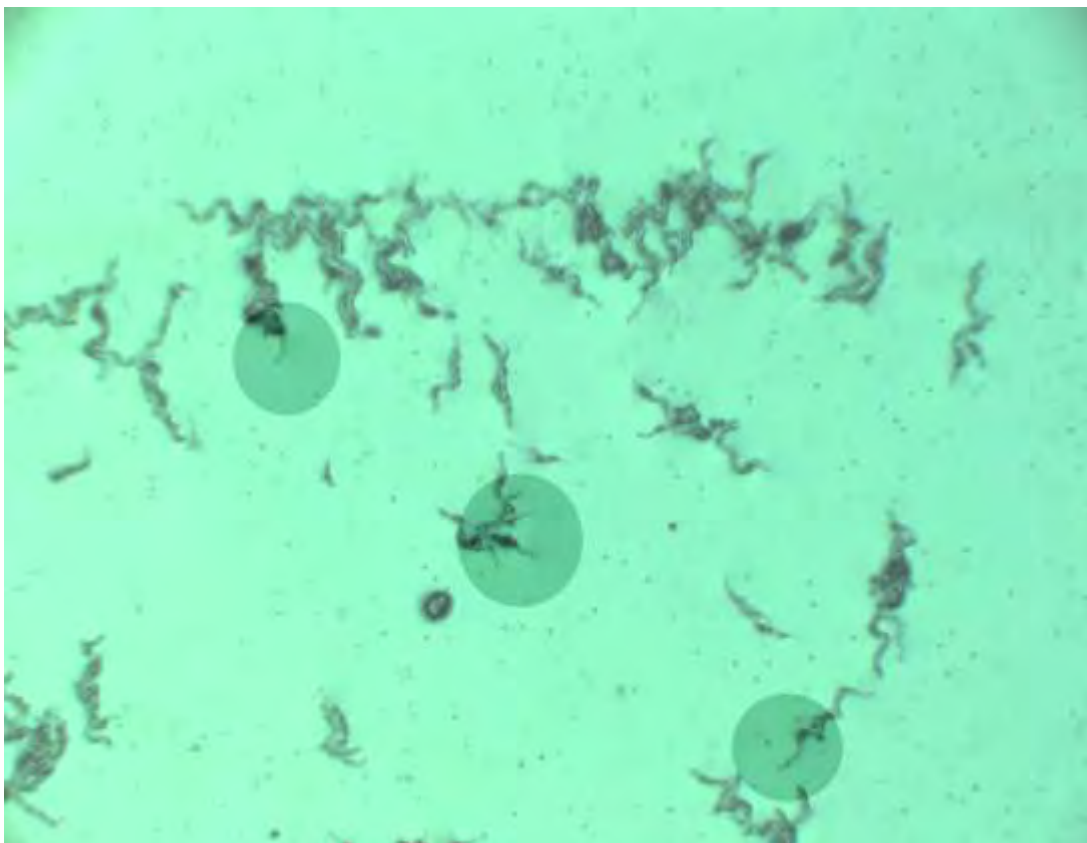
Στη συγκέντρωση 0,01mg/L cyproconazole, από τις 35 απομονώσεις, βλάστησαν οι 32. Από αυτές 17 βλάστησαν με τυπικό βλαστικό σωλήνα, 5 βλάστησαν με βραχύ βλαστικό σωλήνα 1 με παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα, και 9 με ελάχιστα βλαστημένα σπόρια με βραχύ ή τυπικό βλαστικό σωλήνα. Άρα βλάστησαν σπόρια με τυπικό βλαστικό σωλήνα στις 17 απομονώσεις και 15 απομονώσεις βλάστησαν με αλλοιωμένη ανάπτυξη κυρίως

βραχύτερου βλατικού σωλήνα (Πίν. 7). Στη συγκέντρωση 0,1mg/L cyproconazole, από τις 35 απομονώσεις, βλάστησαν 20 απομονώσεις, 7 βλάστησαν με βραχύ βλαστικό σωλήνα, 7 με παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα, και 6 με ελάχιστα βλαστημένα σπόρια με βραχύ ή τυπικό βλαστικό σωλήνα. Στη συγκέντρωση 1mg/L cyproconazole, από τις 35 απομονώσεις, βλάστησαν 2 με παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα.

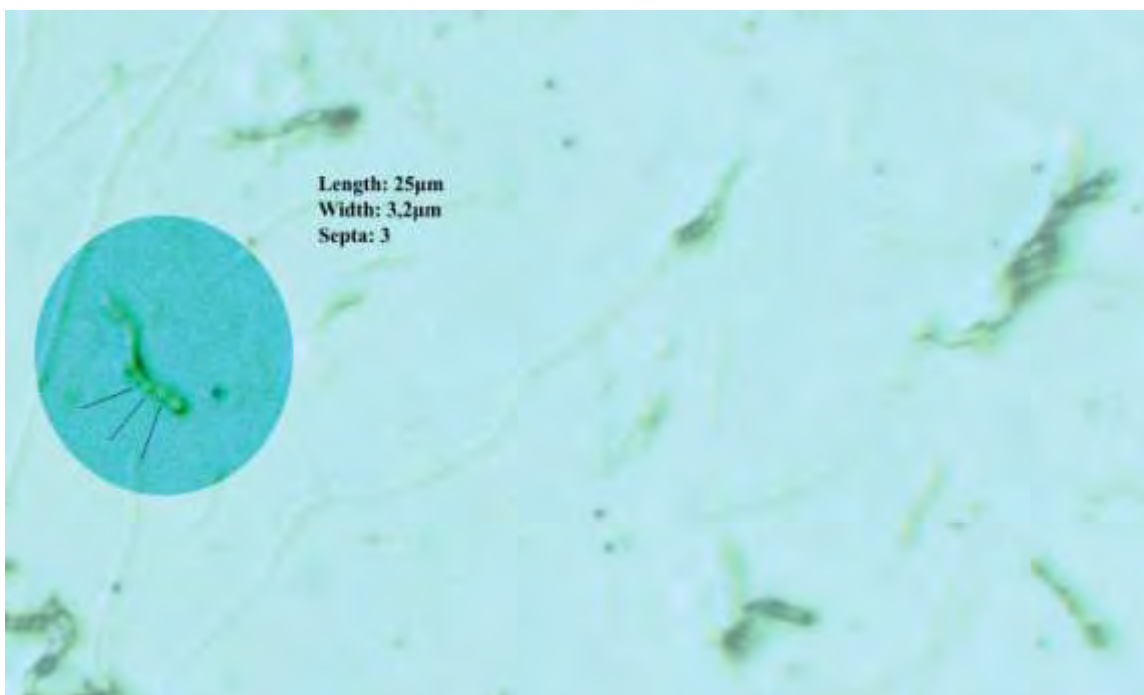
Με βάση την αξιολόγηση της ανάπτυξης βλαστικού σωλήνα, υπολογίστηκε η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) της βλάστησης σπορίων με ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα (Διάγρ. 4). Στην συγκέντρωση 0,001mg/L cyproconazole, από τις 35 απομονώσεις βλάστησαν οι 22 με τυπικό βλαστικό σωλήνα (Πίν. 7), 12 βλάστησαν με αλλοιωμένη ανάπτυξη βραχύτερου βλαστικού σωλήνα ή με ελάχιστα βλαστημένα σπόρια, ενώ μια δεν βλάστησε καθόλου (13 απομονώσεις MIC σε 0,001 mg/L) όπου και θεωρήθηκαν υψηλά ευαίσθητες (HS). Στην συγκέντρωση 0,01mg/L cyproconazole από τις 22 απομονώσεις που βλάστησαν στη συγκέντρωση 0,001mg/L με τυπικό βλαστικό σωλήνα, βλάστησαν 17 απομονώσεις με ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα, ενώ οι υπόλοιπες 5 βλάστησαν με αλλοιωμένη ανάπτυξη βραχύτερου βλατικού σωλήνα ή με ελάχιστα βλαστημένα σπόρια (5 απομονώσεις MIC σε 0,01mg/L). Τέλος οι 17 απομονώσεις που ανέπτυξαν τυπικό βλαστικό σωλήνα σε 0,01mg/L cyproconazole, στην 0,1mg/L παρουσίασαν μορφολογική αλλοίωση (17 απομονώσεις MIC σε 0,1mg/L). Από αυτές, οι 6 βλάστησαν με βραχύ βλαστικό σωλήνα στην 0,1mg/L (Εικ. 4) 5 παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα, και 3 με λίγα βλαστημένα σπόρια σε 0,1mg/L cyproconazole (MIC για τις 17) (Πίν. 7, Διάγρ. 3, 4), όπου και θεωρήθηκαν ευαίσθητες (S).



Διάγραμμα 4. Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα απομονώσεων *Z. tritici* μετά από επώαση σε 42h στο σκοτάδι στους 22°C, σε τρυβλία Petri με PDA, παρουσία cyproconazole (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L). Δεν συμπεριλαμβάνονται βλαστημένα σπόρια με βραχύ ή παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα.



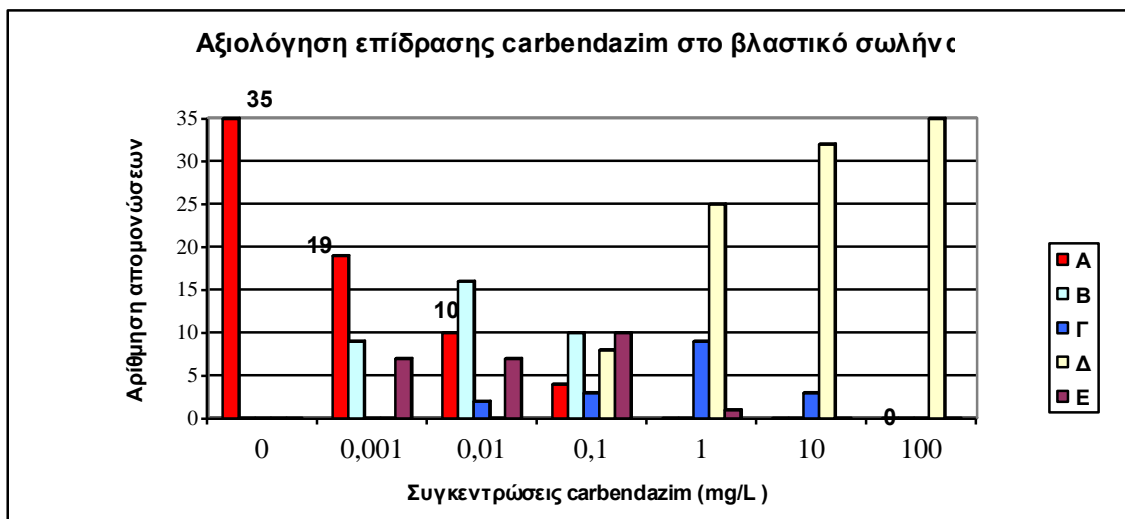
Εικόνα 4. Βλάστηση σπορίων σε PDA με 0,1mg/L cyproconazole μετά από 42h σε συνθήκες σκότους, στους 22°C με βραχύ βλαστικό σωλήνα (B13)(Πίν. 8).



Εικόνα 5. Παρατήρηση βλάστησης πυκνιδιοσπορίων του *Z. tritici* (3,2µm x 25µm) με χρήση μικροσκοπίου Nikon Labophot-2 (40x) και προγράμματος Adobe Photoshop 7.0. Βλαστημένα σπόρια σε PDA με 1mg/L cyproconazole μετά από 72h σε 22°C υπό συνθήκες σκότους (κωδικός απομόνωσης B10)(Πίνακας 8.).

IV.2.3 Επίδραση της δραστικής ουσίας carbendazim στην αύξηση του βλαστικού σωλήνα

Οι 35 απομονώσεις του *Z.tritici* που ελέγχθηκαν στο carbendazim με βάση τη βλάστηση των σπορίων τους μετά από 42 ώρες, για 22°C στο σκοτάδι, εμφάνισαν ευαισθησία. Τα ευαίσθητα σπόρια βλάστησαν, ενώ παρατηρήθηκε παραμόρφωση, διογκώση και συχνά διάρρηξη στην ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα (Εικ. 7). Με βάση αυτή την διάκριση, αξιολογήθηκε η επίδραση του μυκητοκτόνου στην ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα (Διάγρ. 5).



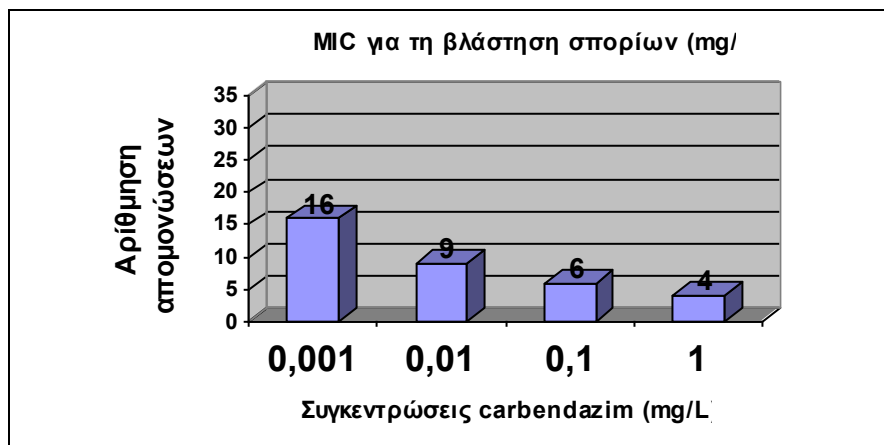
Διάγραμμα 5. Βλάστηση σπορίων *Z.tritici* μετά από επώαση σε 42h στο σκοτάδι στους 22°C, σε τρυβλία Petri με PDA, παρουσία carbendazim (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L). A : βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα, B : βλάστηση σπορίων με βραχύ βλαστικό σωλήνα, Γ : βλάστηση με παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα, Δ : μη βλάστηση σπορίων μετά από στους 22°C στο σκοτάδι για 42h, E : βλάστηση ελάχιστων σπορίων με βραχύ ή μακρύ βλαστικό σωλήνα.

Το carbendazim εμφάνισε διογκώση σπορίων και παραμόρφωση των φυσιολογικών τους χαρακτηριστικών η οποία παρατηρήθηκε στο σώμα του σπορίου και στο βλαστικό του σωλήνα. Πυκνιδιοσπόρια με παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα παρατηρήθηκαν με μήκος βλαστικό σωλήνα βραχύτερο από αυτό του μάρτυρα, ενώ συχνά αναπτύσσονταν υπό διογκωμένα σπόρια (Εικ. 7). Διογκώση σπορίων παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις 1/10/100mg/L και στις 3 ομάδες (A,B,C) σε 40-42h σε συνθήκες σκότους στους 22°C.

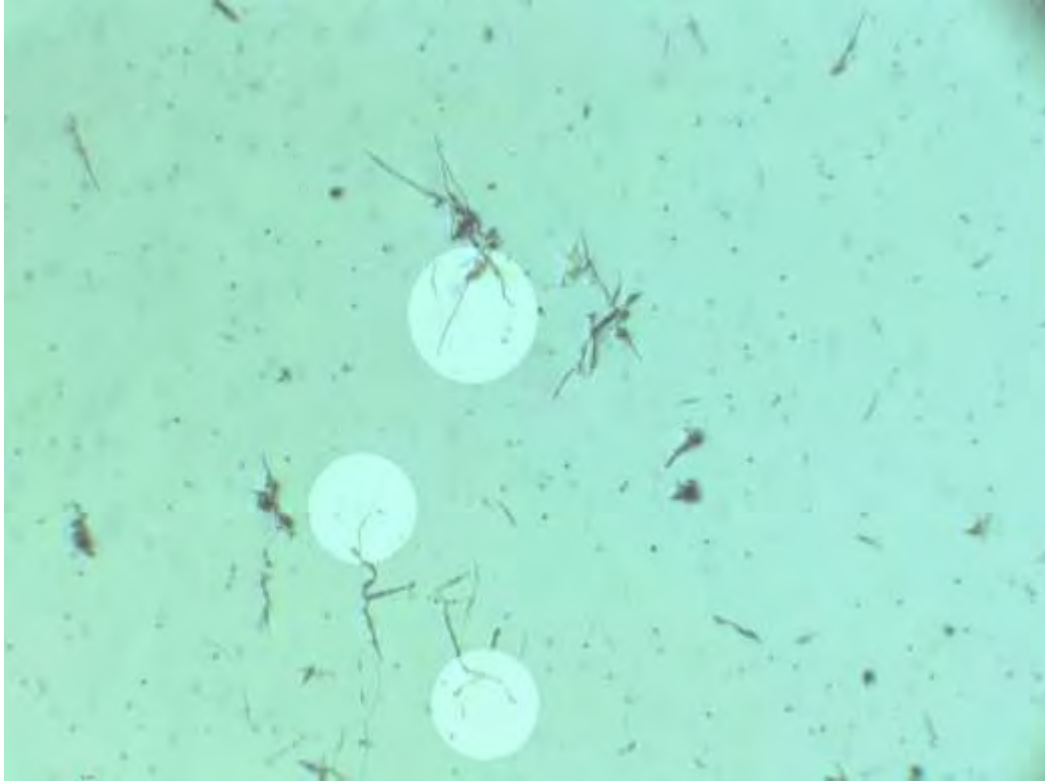
Στη συγκέντρωση 0,001mg/L carbendazim, από τις 35 απομονώσεις, βλάστησαν 19 με τυπικό βλαστικό σωλήνα (Εικ. 6) και 9 με βραχύ βλαστικό σωλήνα και 7 με ελάχιστα βλαστημένα σπόρια (Πίν. 8). Στη συγκέντρωση 0,01mg/L carbendazim, 10 απομονώσεις

βλάστησαν με τυπικό βλαστικό σωλήνα, 16 με βραχύτερο βλαστικό σωλήνα, 2 με παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα και 7 με λίγα βλαστημένα σπόρια. Στη συγκέντρωση 0,1mg/L carbendazim, βλάστησαν 4 με τυπικό βλαστικό σωλήνα, 10 με βραχύ βλαστικό σωλήνα, 3 με παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα, και 10 με ελάχιστα βλαστημένα σπόρια. Στη συγκέντρωση 1mg/L carbendazim, από τις 35 απομονώσεις, βλάστησαν 9 με παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα και 1 με ελάχιστα βλαστημένα σπόρια.

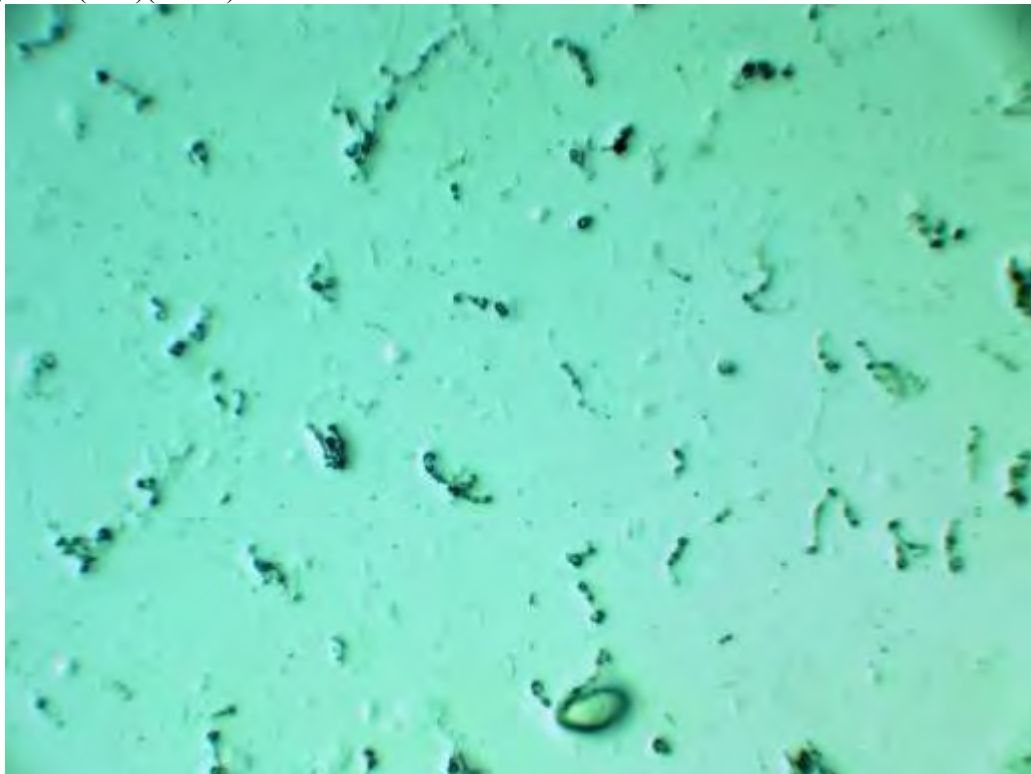
Η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) της βλάστησης σπορίων με ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα (Διάγρ. 6), υπολογίστηκε ως εξής: Στην συγκέντρωση 0,001mg/L carbendazim, από τις 35 απομονώσεις βλάστησαν οι 19 με τυπικό βλαστικό σωλήνα (Πίν. 8) και οι 16 βλάστησαν με βραχύτερο βλαστικό σωλήνα ή με ελάχιστα βλαστημένα σπόρια, (16 απομονώσεις MIC σε 0,001 mg/L). Στην συγκέντρωση 0,01mg/L carbendazim από τις 19 απομονώσεις που βλάστησαν στη συγκέντρωση 0,001mg/L με τυπικό βλαστικό σωλήνα, βλάστησαν 10 απομονώσεις με τυπικό βλαστικό σωλήνα, ενώ οι υπόλοιπες 9 βλάστησαν με βραχύτερο βλαστικό σωλήνα (9 απομονώσεις MIC σε 0,01mg/L). Από τις 10 απομονώσεις με τυπικό βλαστικό σωλήνα σε 0,01mg/L carbendazim, στην 0,1mg/L οι 4 βλάστησαν με τυπικό βλαστικό σωλήνα κι οι υπόλοιπες 6 με βραχύτερο βλαστικό σωλήνα ή δεν βλάστησαν καθόλου (6 απομονώσεις MIC σε 0,1mg/L). Από τις 4 απομονώσεις, βλάστησαν με τυπικό βλαστικό σωλήνα στην 0,1mg/L carbendazim, στην 1mg/L οι 3 βλάστησαν με παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα, και 1 δε βλάστησε καθόλου (4 απομονώσεις MIC σε 1mg/L) (Πίν. 8, Διάγρ. 3, 4), όπου και θεωρήθηκαν μετρίως ευαίσθητες (MS).



Διάγραμμα 6. Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα απομονώσεων *Z. tritici* μετά από επώαση σε 42h στο σκοτάδι στους 22°C, σε τρυβλία Petri με PDA, παρουσία carbendazim (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L). Δεν συμπεριλαμβάνονται βλαστημένα σπόρια με βραχύ ή παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα.



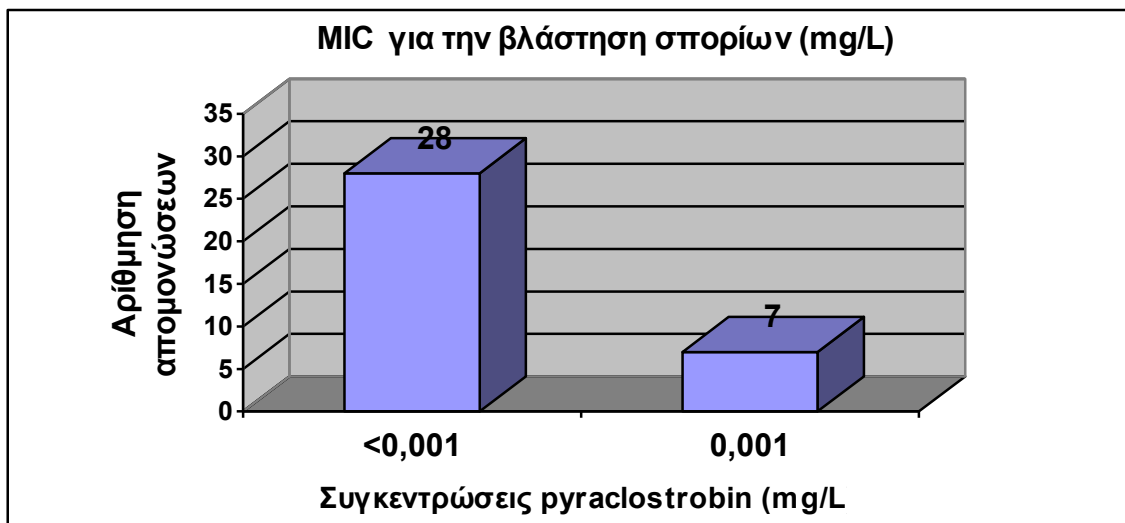
Εικόνα 6. Βλάστηση σπορίων σε PDA με 0,001mg/L carbendazim μετά από 42h σε συνθήκες σκότους, στους 22°C (B13)(Πίν. 9).



Εικόνα 7. Διογκωμένα, παραμορφωμένα σπόρια του *Z. tritici* με παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα σε PDA με 1mg/L carbendazim μετά από 42h στους 22°C σε συνθήκες σκότους (B3)(Πίν. 9).

IV.2.4 Επίδραση της δραστικής ουσίας pyraclostrobin στην αύξηση του βλαστικού σωλήνα

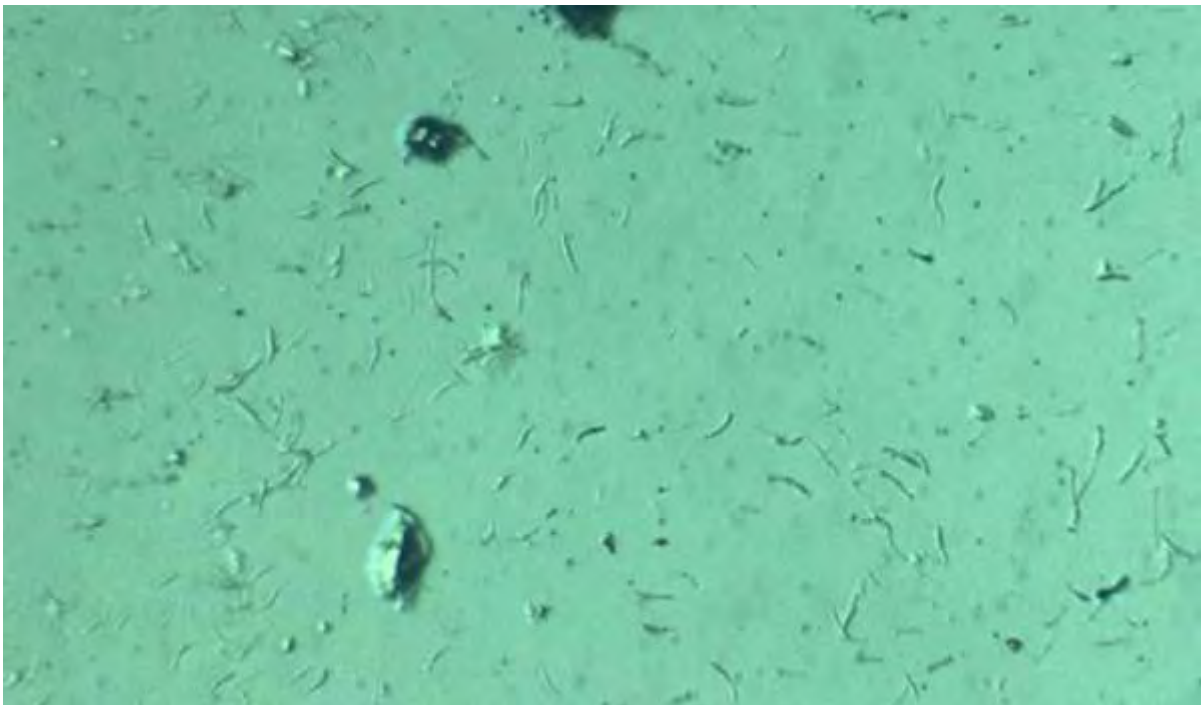
Οι 35 απομονώσεις του μύκητα που ελέγχθηκαν στο pyraclostrobin, σύμφωνα με τη βλάστηση των σπορίων του μάρτυρα στους 22°C για 42h σε συνθήκες σκότους, δεν εμφάνισαν βλάστηση σπορίων κι ανάπτυξη του τυπικού βλαστικού σωλήνα. Από τις 35 απομονώσεις, το παθογόνο βλάστησε σε 7 απομονώσεις στην συγκέντρωση 0,001mg/L pyraclostrobin, με βλάστηση ελάχιστων σπορίων με βραχύ ή μακρύ βλαστικό σωλήνα (7 απομονώσεις MIC σε 0,001mg/L pyraclostrobin) (Διάγρ. 7) και οι υπόλοιπες 28 απομονώσεις δεν εμφάνισαν καθόλου βλάστηση σπορίων (28 απομονώσεις MIC σε <0,001mg/L pyraclostrobin). Μετά από 70-72h δεν παρατηρείται καμία ανάπτυξη αποικίας στις συγκεντρώσεις αλλά ούτε και περαιτέρω βλάστηση (Εικ. 9).



Διάγραμμα 7. Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την για την βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα απομονώσεων *Z.tritici* μετά από επώαση σε 42h στο σκοτάδι στους 22°C, σε τρυβλία Petri με PDA, παρουσία pyraclostrobin (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L). <0,001



Εικόνα 8. Βλάστηση σπορίων σε θρεπτικό υλικό PDA με 0,001mg/L pyraclostrobin μετά από 42h σε συνθήκες σκότους, στους 22°C, με πολύ βραχείς βλαστικούς σωλήνες και με λίγα βλαστημένα σπόρια (B11)(Πίν. 10).

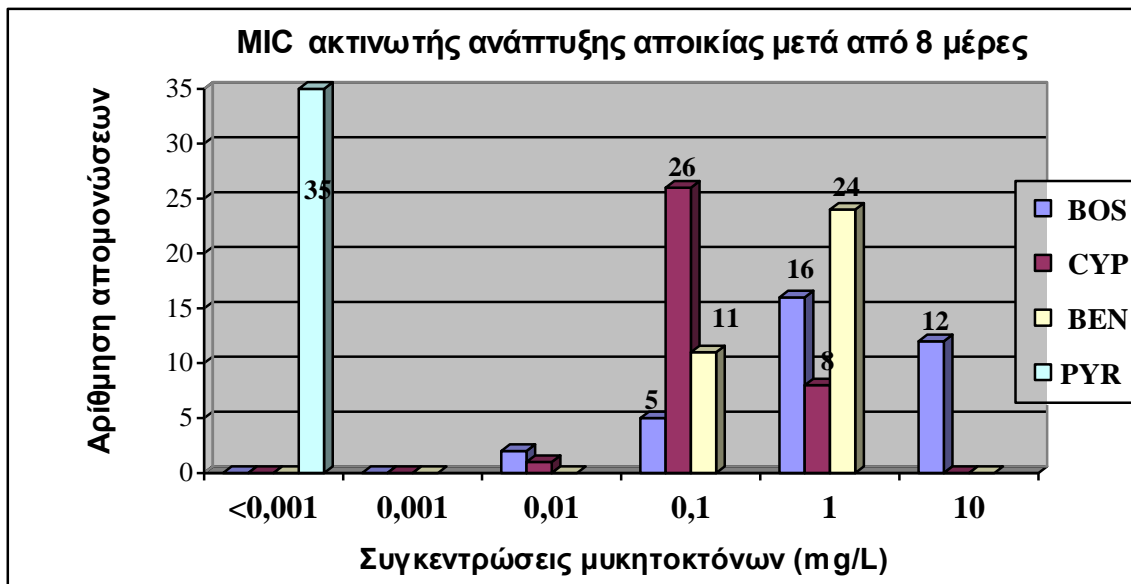


Εικόνα 9. Πυκνιδιοσπόρια του *Z. tritici* που δεν έχουν βλαστήσει σε PDA με 0,001mg/L pyraclostrobin μετά από 72h στους 22°C σε συνθήκες σκότους (B6)(Πίν. 10).

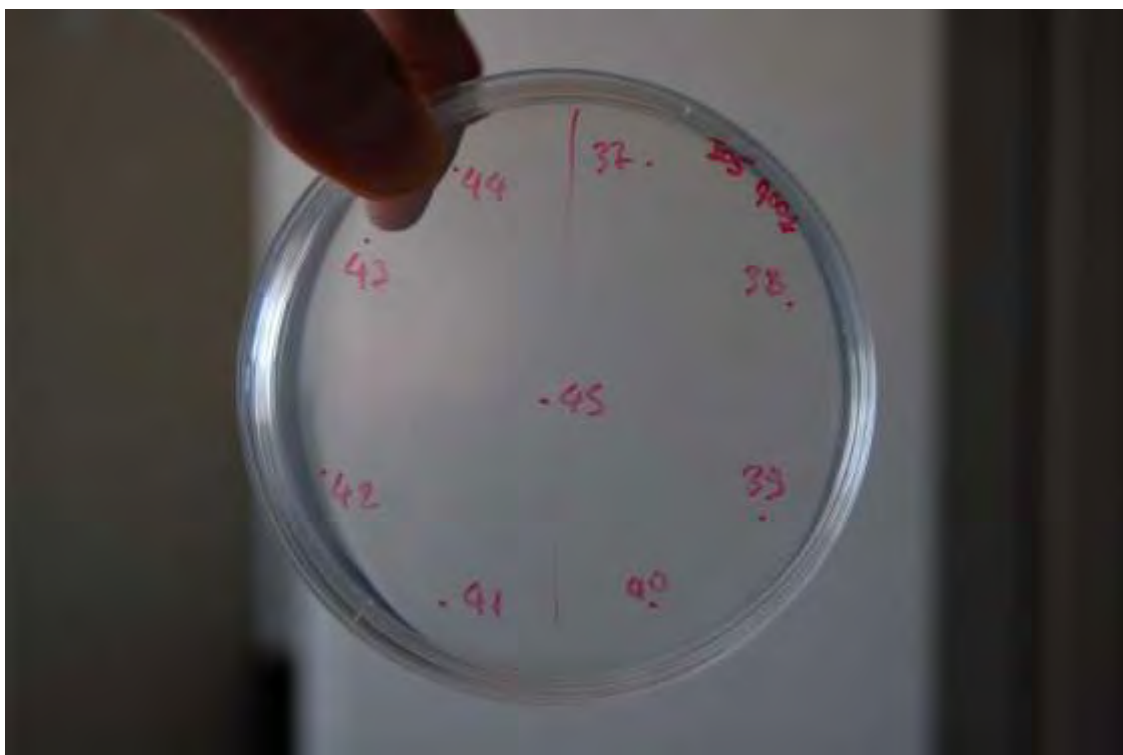
IV.3 Ανάπτυξη αποικίας

Ο μύκητας απέτυχε να αναπτύξει μυκήλιο μετά από 24h από τη μόλυνσή του (Εικ. 10), ενώ κατάφερε να εμφανίσει τα πρώτα δείγματα ακτινωτής μυκηλιακής ανάπτυξης μετά από 5 μέρες (Εικ. 11).

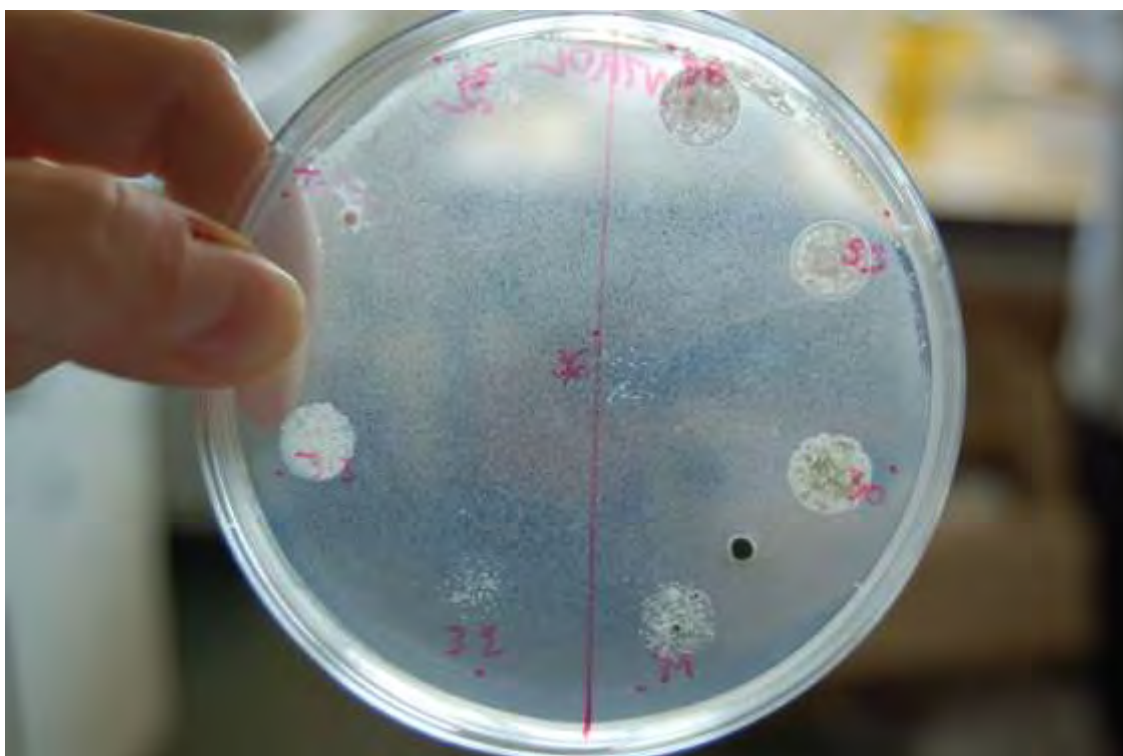
Το boscalid ανέπτυξε αποικία εμβαδού 0,9–2,37cm στις συγκεντρώσεις 0,001/0,01/0,1/1mg/L μετά από 8 μέρες. Από τις 35 απομονώσεις, οι 28 ανέπτυξαν ακτινωτή αποικία στη συγκέντρωση 0,1mg/L boscalid. Απ' αυτές, 16 απομονώσεις παρεμποδίστηκαν στην 1mg/l boscalid (16 απομονώσεις MIC σε 1mg/l boscalid) (μέτρια ευαίσθητες) όπου απέτυχαν να αναπτύξουν αποικία, κι υπόλοιπες παρεμποδίστηκαν στην συγκέντρωση 10 mg/L boscalid (MIC 10 mg/L) (χαμηλά ανθεκτικές) (Εικ. 12). Το cyproconazole ανέπτυξε αποικία εμβαδού 0,82 - 2,43 cm στις συγκεντρώσεις 0,001/0,01/0,1mg/L μετά από 8 μέρες. Παρεμπόδισε πλήρως την μυκηλιακή ανάπτυξη σε 26 απομονώσεις στη συγκέντρωση 0,1mg/L cyproconazole (26 απομονώσεις MIC σε 0,1mg/L cyproconazole) όπου και θεωρήθηκαν ευαίσθητες, ενώ 8 παρεμποδίστηκαν στην 1mg/L cyproconazole (8 απομονώσεις MIC σε 1mg/L cyproconazole) (μέτρια ευαίσθητες). Το carbendazim ανέπτυξε αποικία στις συγκεντρώσεις 0,001/0,01/0,1mg/L εμβαδού 0,78-2,26cm.



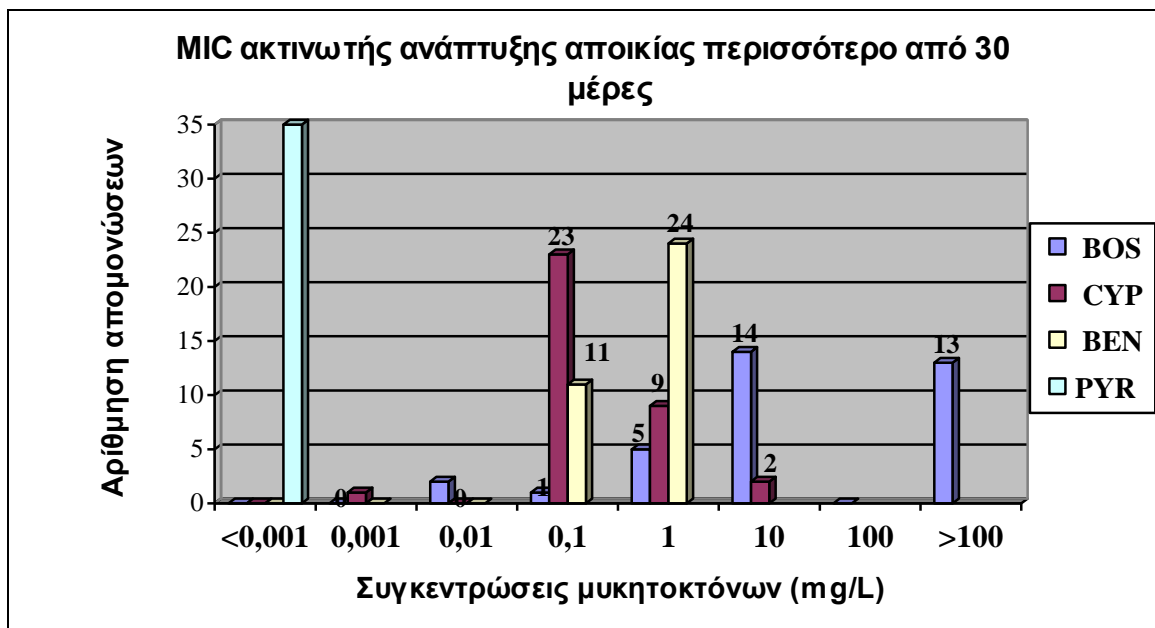
Διάγραμμα 8. Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την ανάπτυξη μυκηλίου μετά από 8 μέρες στις συγκεντρώσεις 0,001/0,01/0,1/1/10/100mg/L στους 22°C υπό συνθήκες σκότους παρουσία boscalid (BOS), cyproconazole (CYP), carbendazim (BEN), pyraclostrobin (PYR), ξεχωριστά.



Εικόνα 10. Καμία ένδειξη αποικίας σε PDA με 0,001mg/L boscalid μετά από 42h στους 22°C σε συνθήκες σκότους (απομονώσεις ομάδας C, (Φ1-Φ8)).



Εικόνα 11. Εμφάνιση ανάπτυξης αποικίας σε PDA χωρίς δραστική ουσία (μάρτυρας) μετά από 5 μέρες στους 22°C σε συνθήκες σκότους (απομονώσεις ομάδας B, (K2-K12)).



Διάγραμμα 9. Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την ανάπτυξη μυκηλίου μετά από 30 μέρες στις συγκεντρώσεις 0,001/0,01/0,1/1/10/100mg/L στους 22°C υπό συνθήκες σκότους παρουσία boscalid (BOS), cyproconazole (CYP), carbendazim (BEN), pyraclostrobin (PYR), ξεχωριστά

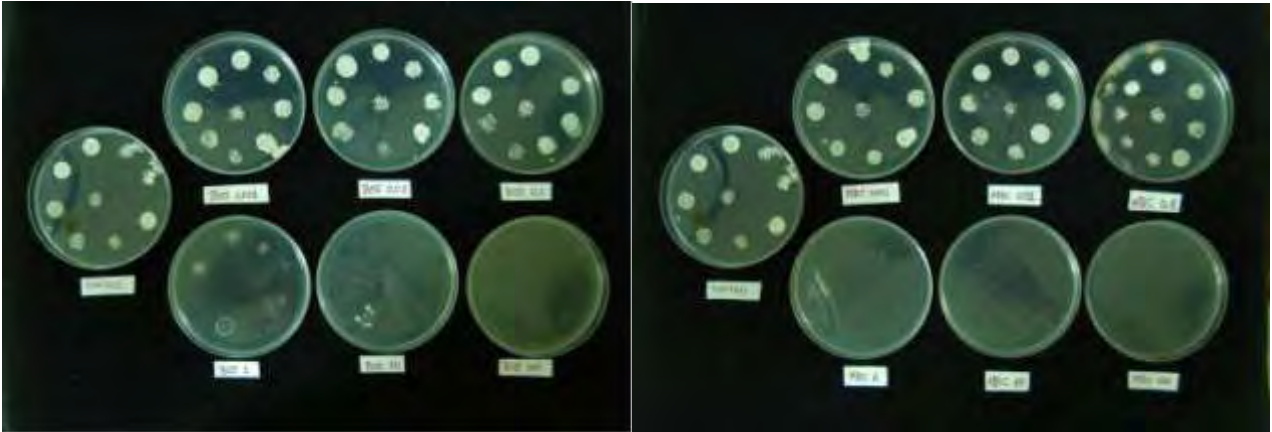
Από τις 35 απομονώσεις, το carbendazim παρεμπόδισε 11 απομονώσεις να αναπτύξουν μυκήλιο στην συγκέντρωση 0,1mg/L carbendazim (11 απομονώσεις MIC σε 0,1mg/L carbendazim) (ευαίσθητες) και τις υπόλοιπες 24 απομονώσεις τις παρεμπόδισε πλήρως σε 1mg/L (MIC) (μέτρια ευαίσθητες) (Διάγρ. 8).

Μετά από 30 μέρες το boscalid ανέπτυξε αποικίες στη συγκέντρωση 1mg/L boscalid όπου παρεμποδισε από τις 35, 5 απομονώσεις (5 απομονώσεις MIC σε 1mg/L boscalid) (μέτρια ευαίσθητες) και 14 απομονώσεις σε 10mg/L (14 απομονώσεις MIC σε 10mg/L boscalid) (χαμηλά ανθεκτικές) (Διάγρ. 10). Μυκήλιο του μύκητα αναπτύχθηκε και σε συγκέντρωση 100mg/L. Παρατηρήθηκε ότι το μυκήλιο του μύκητα συνέχισε να αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια επώασής του.

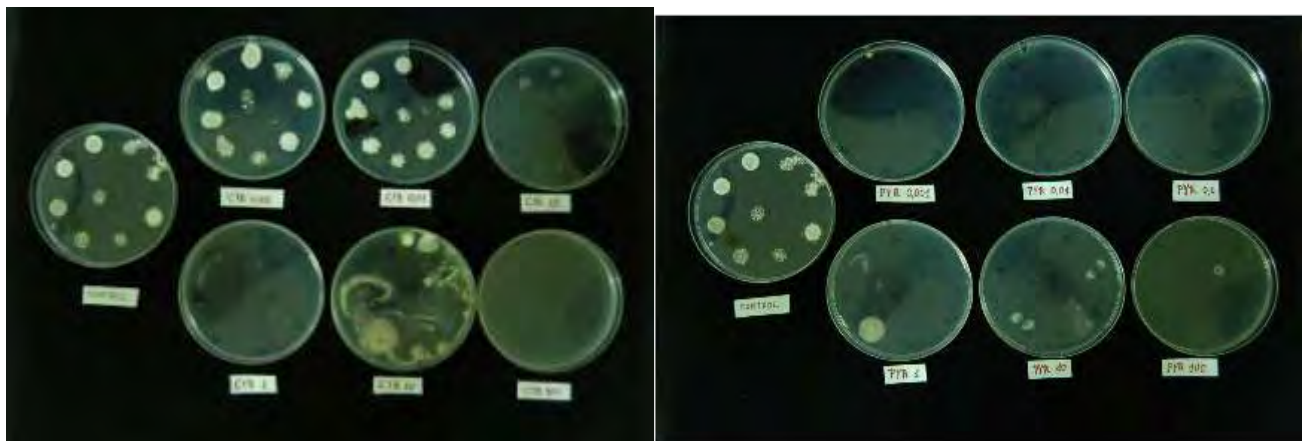
Μετά από 30 μέρες το cyproconazole ανέπτυξε αποικίες στη συγκέντρωση 0,1mg/L cyproconazole όπου παρεμπόδισε 23 απομονώσεις (23 απομονώσεις MIC σε 0,1mg/L cyproconazole) (ευαίσθητες), 9 σε 1mg/L (9 απομονώσεις MIC σε 1mg/L cyproconazole) (μέτρια ευαίσθητες) και 2 σε 10mg/L (2 απομονώσεις MIC σε 10mg/L cyproconazole) (χαμηλά ανθεκτικές).

Από τις 35 απομονώσεις, το carbendazim παρεμπόδισε 11 απομονώσεις να αναπτύξουν μυκήλιο στην συγκέντρωση 0,1mg/L carbendazim μετά από 30 μέρες (11 απομονώσεις MIC

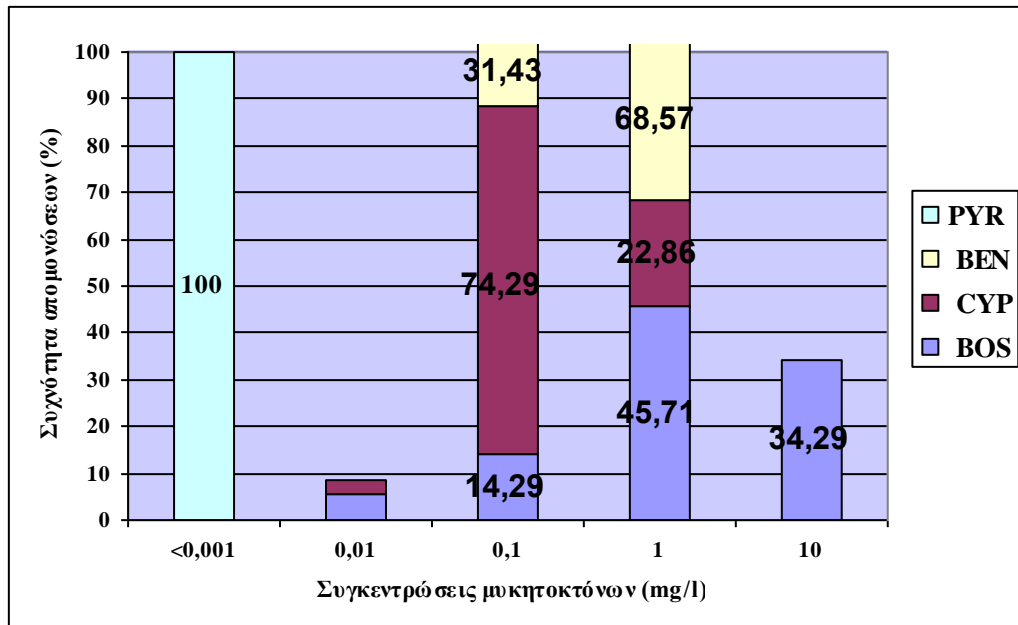
σε 0,1mg/L carbendazim) (ευαίσθητες) και τις υπόλοιπες 24 απομονώσεις τις παρεμπόδισε πλήρως σε 1mg/L (24 απομονώσεις MIC σε 1mg/L carbendazim) (μέτρια ευαίσθητες) (Διάγρ. 8)



Εικόνα 12. Ακτινωτή ανάπτυξη αποικίας (Ομάδα C) μετά από επώαση 8 ημερών στους 22°C υπό συνθήκες σκότους σε τριβλία Petri με PDA παρουσία δραστικών ουσιών. Πάνω αριστερά: Ανάπτυξη αποικίας σε 0,001/0,01/0,1mg/L boscalid. Πάνω δεξιά: Ανάπτυξη αποικίας σε 0,001/0,01/0,1mg/L carbendazim. Κάτω αριστερά: Ανάπτυξη αποικίας σε 0,001/0,01/0,1mg/L cyproconazole. Κάτω δεξιά: Απουσία ανάπτυξης αποικίας στις συγκεντρώσεις pyraclostrobin.

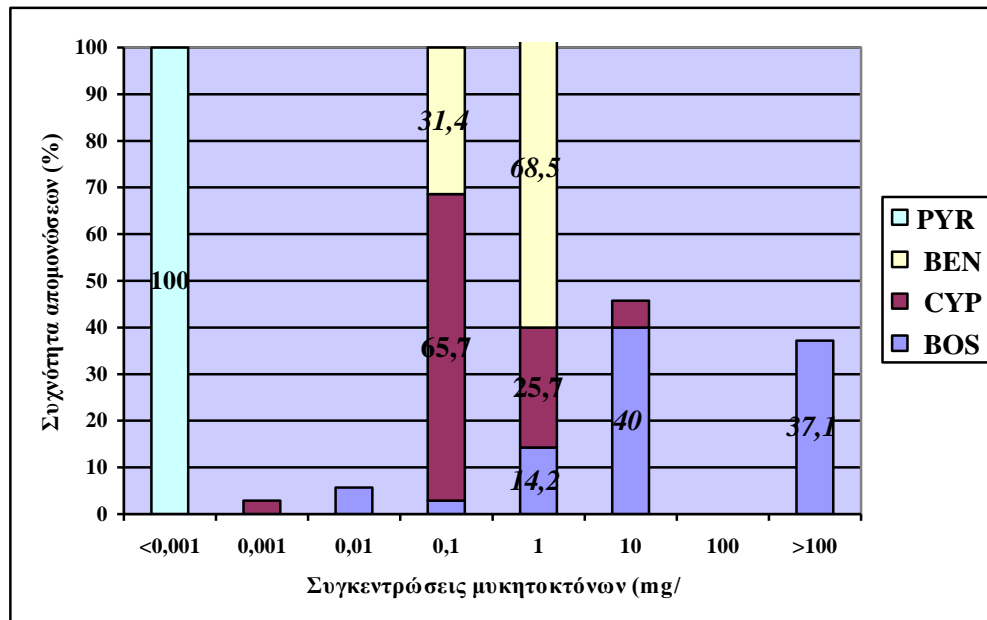


Αποτελεσματικότητα δραστικής ουσίας για την παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου σε 8 μέρες



Διάγραμμα 10. Αποτελεσματικότητα των boscalid (BOS), cyproconazole (CYP), carbenadazim (BEN), pyraclostrobin (PYR), εκφρασμένη ως ο αριθμός των απομονώσεων επί της 100 που παρεμποδίστηκε για την ανάπτυξη μυκηλίου στις 8 μέρες σε 0,001/0,01/0,1/1/10/100mg/L υπό συνθήκες σκότους.

Αποτελεσματικότητα δραστικής ουσίας για την παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου μετά από 30μέρες



Διάγραμμα 11. Αποτελεσματικότητα των boscalid (BOS), cyproconazole (CYP), carbenadazim (BEN), pyraclostrobin (PYR), εκφρασμένη ως ο αριθμός των απομονώσεων επί της 100 που παρεμποδίστηκε για την ανάπτυξη μυκηλίου μετά από περισσότερες από 30 μέρες σε 0,001/0,01/0,1/1/10/100mg/L υπό συνθήκες σκότους

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο μύκητας *Z.tritici* ο οποίος προκαλεί την ασθένεια της σεπτορίωσης του σίτου, αποτελεί μια οικονομική απειλή για την καλλιέργεια, λόγω της σημαντικότητας των καλλιεργειών του σίτου, αλλά κυριότερα λόγω κλιματικών συνθηκών που αναπτύχθηκαν εξαιτίας της κλιματικής αλλαγής, ευνοϊκών για την ανάπτυξή του, καθώς επίσης λόγω δυσκολίας αντιμετώπισης του από μυκητοκτόνα (Eyal et al., 1987; Goodwin et al., 2011; Simon et al., 2012; O'Driscoll et al., 2014; Brown JKM et al. 2015; Estep et al., 2015; Torriani et al., 2015). Στα μυκητοκτόνα αυτά έχει ήδη αρχίσει να αναπτύσει ανθεκτικότητα σε Ευρώπη, Βόρεια και Νότια Αμερική, Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία (Torriani et al., 2009; Cools & Fraaije, 2013; Hollaway, 2014; Estep et al., 2015).

Από το 2014 ο μύκητας έχει εντοπιστεί σε περιοχές της θεσσαλικές πεδιάδας, αφού αναγνωρίστηκε με την τέλεια μορφή *Mycosphaerella graminicola*, όπου και εξαπλώθηκε. Μελετήθηκε κατά το έτος 2016 στην παρούσα διατριβή σε υποκαλλιέργειες του *Zymoseptoria tritici*. Εξετάστηκε για ευαισθησία σε 4 δραστικές ουσίες 4 ομάδων μυκητοκτόνων (boscalid/ cyproconazole/ carbendazim/ pyraclostrobin με SHAM) σε 6 συγκεντρώσεις (0,001/0,01/0,1/1/10/100 mg/L) που κυμαίνονται σε επιτρεπόμενα όρια για χρήση τους στον αγρό.

Τα σπόρια των απομονώσεων του *Zymoseptoria tritici*, εξετάστηκαν ως υαλώδη, νηματοειδή και σκωληκόμορφα ενώ μετρήθηκαν οι διαστάσεις τους , είχαν μεγάλη διακύμαση μήκους (22 έως 86 μm) πλάτους (1,7 έως 3,7 μm) και αριθμός των σέπτων τους (3 έως 7) τα σπόρια ήταν ο οποίος συνέπιπτε με τη βιβλιογραφία (20-98 x 1,4-3,8μm, με 3 έως 7 σέπτα, Eyal et al., 1987; Θανασουλόπουλος Κ., 1996; Ponomarenko et al., 2011; Morais et al., 2015), βλ. (Εικ. 1,2,3). Για την παραγωγή των πυκνιδιοσπορίων στους δοκιμαστικούς χρειάστηκαν 20-30 μέρες (20 μέρες, Wiese, M.V., 1987). Η έναρξη της βλάστησης των πυκνιδιοσπορίων παρατηρήθηκε στους 24h στους 22°C (Εικ. 1) (20-25°C, χωρίς να ξεπερνά τους 32°C ούτε και να κατεβαίνει τους 3°C, Θανασουλόπουλος, 1996; Kema et al., 1996d; Palmer & Skinner, 2002).

Ο έλεγχος της ευαισθησίας των απομονώσεων βασίστηκε σε παρατηρήσεις που έγιναν κατά το στάδιο της βλάστησης των σπορίων της *Z. tritici* και της ανάπτυξης μυκηλίου με τη μέθοδο ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο PDA εμπλουτισμένο με τις συγκεντρώσεις ξεχωριστά για κάθε δραστική ουσία και παρατήρησης μέσω φωτονικού μικροσκοπίου (Nikon Labophot-2 EFD3) (FRAC).

Τα μολύσματα 35 απομονώσεων της *Z.tritici* αρχικά παρατηρήθηκαν 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό τους σε τρυβλία petri, σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνα, στους 22°C υπό συνθήκες σκότους. Αφού σημειώθηκε έναρξη βλάστησης βλαστικού σωλήνα που πρόκειται να βλαστήσει, στην οποία η βλάστηση ήταν πολύ μικρή, ή δεν αντιπροσώπευε περισσότερο απ'τον μισό αριθμό των σπορίων σε πληθυσμό, θεωρήθηκε αμελητέα.

Μετά από 42h στο σκοτάδι στους 22°C είχαμε βλάστηση των σπορίων με τυπικό βλαστικό σωλήνα στις συγκεντρώσεις 0.001/0.01mg/L boscalid, cyproconazole και 0.001/0.01/0.1mg/L carbendazim, με μια ποικιλομορφία της αποτελεσματικότητας των μυκητοκτόνων στην ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα γι αυτό και αξιολογήθηκε ξεχωριστά για την κάθε δραστική ουσία. Παρατηρήθηκε διόγκωση σπορίων σε συγκεντρώσεις που δεν είχαν βλαστήσει στις 42h, (1/10mg/L carbendazim, 0.1/1mg/L boscalid και cyproconazole) (Εικ. 7) και μετά από 70-72h σε 1/10/100 mg/L boscalid και cyproconazole (Εικ. 3, 5) εξαιρούμενες οι απομονώσεις με σπόρια του *Z.tritici* που αποδομήθηκαν (1/10/100 mg/L σε carbendazim) και σε συγκεντρώσεις του pyraclostrobin, όπου δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή.

Στην παρούσα έρευνα δε διαπιστώθηκε ανθεκτικότητα απομονώσεων σε καμία δραστική ουσία. Ο τρόπος διεξαγωγής της έρευνας και τα αποτελέσματά της επιβεβαιώνουν την ευαισθησία του μύκητα, μέσα από τον τρόπο μηχανισμού των δραστικών ουσιών ως προς τη σποριοποίηση και την ανάπτυξη μυκηλίου και τον τρόπο που τα εμφανίζει το καθένα. Πιο αναλυτικά συζητιούνται παρακάτω. Σύμφωνα με την Ανθούλη Ε. (2017), έλεγχος απομονώσεων *M.graminicola* σε πληθυσμούς θεσσαλικών περιοχών εμφάνισαν ευαισθησία σε azoxystrobin, propiconazole και epoxiconazole αφού οι τιμές των EC50 ήταν ιδιαίτερα χαμηλές.

Το boscalid ως καρβοξαμιδικό μυκητοκτόνο οφείλει την ανθεκτικότητα μυκήτων σ' αυτό, σε αντικατάσταση αμινοξέος ενός γονιδίου που παίρνει δράση στον τρόπο μηχανισμού μιας δραστικής ουσίας δηλαδή στο συμπλόκου της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDH) στο σύμπλοκο II. Αποτελεί ομάδα μέτριου με υψηλού κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Frac, 2017) ενώ ακόμα εφαρμόζεται επιτυχώς μόνο του, είτε σε μίγμα με QoIs (Myresiotis et al., 2008), Κατά την έναρξη της βλάστησης λειτουργεί περιοριστικά στη βλάστηση των σπορίων (HGCA. 2012).

Στην έρευνά μας το boscalid εμφάνισε βλάστηση σπορίων του *Z.tritici* με τυπικό βλαστικό σωλήνα σε συγκεντρώσεις 0,001mg/L και 0,01mg/L boscalid μετά από 42h στους 22°C υπό συνθήκες σκότους. Λειτουργήσε αποτελεσματικά κατά 45,7% (Διάγρ. 12) στην ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα σε 0,01mg/L boscalid σε απομονώσεις που θεωρήθηκαν υψηλά ευαίσθητες (HS) και 17,1% σε 0,1mg/l boscalid (ευαίσθητες) (S) (Διάγρ. 1, 2, 10 Πίν. 6). Η ανάπτυξη μυκηλίου παρεμποδήθηκε κατά 45,7% σε 1mg/L boscalid και κατά 34,3% σε 10mg/L boscalid μετά από επώαση 8 ημερών σε 22°C στο σκοτάδι εμφανίζοντας μέτρια ευαίσθητες και χαμηλά ανθεκτικές απομονώσεις (Διάγρ. 10). Έλεγχος σε περισσότερες από 30 μέρες οδήγησε την ανάπτυξη μυκηλίου σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 100mg/L (Διάγρ. 11). Σίγουρα οι απομονώσεις αυτές δε μπορούν να θεωρηθούν ανθεκτικές εφόσον ανθεκτικές απομονώσεις εμφανίζουν μυκηλιακή ανάπτυξη μέσα σε 24 ώρες ή σε περίοδο 5-7 ημερών, αλλά επικίνδυνες ως προς τη επιβίωσή τους.

Ανθεκτικότητα ευρωπαϊκών πληθυσμών του *M.graminicola*, σύμφωνα με Cools και Fraaije (2013), σε μυκητοκτόνα τριαζόλης έχει βασιστεί σε μετάλλαξη ή υπερέκφραση στερόλης, 14α-δεμεθυλάσης (MgCYP51) (Delye et al., 1997). Αποτελούν ομάδα μέτριου κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας, ενώ η εναλλαγή και η ανάμιξη διαφορετικών τριαζολών ενδέχεται να έχει κάποια πιθανότητα καθυστέρησης ή μείωσης του κινδύνου αυτού (HGCA. 2012; Frac, 2017). Οι τριαζόλες επιδρούν στη ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα των ευαίσθητων σπορίων, παρ' ότι συχνά δεν παρεμποδίζεται ή καθυστερείται λόγω αποθεμάτων των στερολών που θα χρησιμοποιηθούν από τα σπόρια, για την ανάπτυξη βλ.σωλήνα με αποτέλεσμα να προκαλείται διογκώση, παραμόρφωση και μη φυσιολογική ανάπτυξη βλ. σωλήνα (Esker & Proost, 2010).

Το cyproconazole όντως εμφάνισε σταθερή βλάστηση απομονώσεων του *Z.tritici* σε συγκεντρώσεις 0,001mg/L και 0,01mg/L cyproconazole μετά από 42h στους 22°C υπό συνθήκες σκότους, και παρατηρήθηκε απότομη επίδραση της δραστικής ουσίας σε 0,1mg/L cyproconazole (MIC 17 απομονώσεων) όπου σπόρια εμφάνισαν κοντύτερους, διογκωμένους και παραμορφωμένους βλαστικούς σωλήνες (Πίν. 7, Εικ. 4). Οι απομονώσεις θεωρήθηκαν ευαίσθητες ενώ το μυκητοκτόνο αντιμετώπισε τη βλαστικότητα κατά 48,5% (Διάγρ. 12). Μυκήλιο παρεμποδήθηκε κατά 74,3% σε 0,1mg/L cyproconazole και κατά 22,9% σε 1mg/L cyproconazole ενώ μετά από 30 μέρες η αποτελεσματικότητα παρέμεινε στις ίδιες διακυμάνσεις (Διάγρ. 10, 11).

Η συχνότητα ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά παραμένει υψηλή η οποία οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου της πρωτεΐνης β-τουμπουλίνη, ενώ η χρήση της διακόπτεται μετά την εμφάνιση της. Χρησιμοποιούνται ελάχιστα λόγω της επικινδυνότητάς τους σε γενετικές αλλοιώσεις, επικρατών γονιδίων, με μίγματα φαινυλοκαρβαμιδικών (Frac, 2017). Σε καλλιέργειες *in vitro* προκαλούν παραμόρφωση, διόγκωση και συχνά διάρρηξη στο βλαστικό σωλήνα.

Ο έλεγχος στο carbendazim στις 35 απομονώσεις της *Z.tritici* εμφάνισε σταδιακή αντιμετώπιση της δραστικής ουσίας μετά από 42 ώρες, για 22°C στο σκοτάδι, όπου όσο αυξάνονταν η συγκέντρωση τόσο η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα καταστέλλονταν με την πρόκληση παραμορφωμένων βλαστικών σωλήνων (Εικ. 7, Πίν. 8). Βλάστηση σπορίων του *Z.tritici* με τυπικό βλαστικό σωλήνα σημειώθηκε σε 0.001mg/L (Εικ. 6), 0.01mg/L και 0,1mg/L carbendazim. Η συγκέντρωση 0,1mg/L carbendazim αντιμετώπισε κατά 17,1% τις ευαίσθητες απομονώσεις του μύκητα και σε 1mg/l carbendazim κατά 11,4% τις μέτρια ευαίσθητες (Διάγρ. 6, 12). Το carbendazim εμφάνισε έντονες μορφολογικές αλλοιώσεις του *Z.tritici* γεγονός που προδίδει την ευαισθησία του, καθώς οι δραστικές ουσίες των βενζιμιδαζολικών δρουν στην βλάστηση σπορίων και καθυστερούν την καταστολή της (Εικ. 6). Όντως η μυκηλιακή αποικία αναπτύχθηκε σταθερά και παρεμποδίστηκε απότομα σε 1mg/L carbendazim κατά 68,5% μετά από επώαση 8 ημερών, ενώ παρέμεινε σταθερή για πάνω από 30 μέρες αφού δεν υπήρξε περαιτέρω ανάπτυξη (Διάγρ. 10, 11).

Οι στρομπιλουρίνες αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας βασιζόμενη στη μετάλλαξη της θέσης 143 (G143A), που αναγνώρισε ο FRAC το 2012. Έρευνα των Amand et al. (2003) μελέτησε ευρύ φάσμα ευαισθησίας του *M.graminicola* σε azoxystrobin από απομονώσεις αγρού στο Βέλγιο, με τιμές EC50 μεταξύ 0,002-0,7mg/L, με την υψηλότερη συχνότητα να μετατοπίζεται σταδιακά από τιμές EC50 0,01mg/L και 0,02mg/L το 2000, 0.02mg/L και 0.04ml/L το 2002, ενώ 5 στελέχη, με EC50 μικρότερες του 1mg/l. Με 100mg/L. SHAM, το 58% των απομονώσεων του 2002 αναστάλθηκε έντονα, ενώ βρέθηκαν δυο ανθεκτικές με EC50 3 και 30 mg/l αντίστοιχα.

Το pyraclostrobin έδρασε αρκετά αποτελεσματικά κατά το στάδιο βλάστησης των σπορίων και κατά το στάδιο ανάπτυξης μυκηλίου (Διάγρ.). Μόνο 7 απομονώσεις είχαν βλάστηση σπορίων αλλά ελάχιστων και με βραχύ βλαστικό σωλήνα σε 0,001mg/l (MIC 0,001mg/l) με παρουσία SHAM, μετά από 42h στους 22°C υπό συνθήκες σκότους, (Εικ. 8),

ο οποίος παρεμποδίζει την εναλλακτική αναπνοή που μπορεί να λειτουργήσει ως αντίδραση στην παρεμποδιστική δράση του pyralostrobin. Ο έλεγχος ευαισθησίας που πραγματοποιήθηκε για το pyralostrobin δεν επιβεβαίωσε τον υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας του *Z.tritici* στον οποίο ανήκει. αντίθετα τα 35 στελέχη θεωρήθηκαν υψηλά ευαίσθητα (HS)(Εικ.9). Αυτό ίσως να συμβαίνει γιατί in vitro οι απομονώσεις να είναι λιγότερο ανταγωνιστικές. Αυτό το υψηλό επίπεδο ευαισθησίας στο pyralostrobin επιβεβαιώθηκε με απουσία μυκηλίου σε PDA μετά από επώαση περισσότερων από 30 ημερών (Διάγρ. 12). Χωρίς την χρήση μίγματος SHAM ίσως να παρατηρούσαμε μεγαλύτερο εύρος ευαισθησίας, αλλά όχι ανθεκτικότητας.

VI. Συμπεράσματα

Η διεξαγωγή της παρούσας έρευνας κρίθηκε αναγκαία προκειμένου να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα μυκητοκτόνων ενάντια στο μύκητα *Zymoseptoria tritici*, που προκαλεί τη σεπτορίωση του σίτου, μια σοβαρή και συνεχή πρόκληση για την παγκόσμια παραγωγή σίτου. Η αυξημένη χρήση των πρακτικών διαχείρισης του εδάφους που αφήνουν μεγάλες ποσότητες υπολλειμάτων σιταριού στην επιφάνεια του εδάφους και η υπερθέρμανση του πλανήτη αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης επιδημιών της ασθένειας σ'όλες τις χώρες. Ο έλεγχος του παθογόνου, με μυκητοκτόνα και ανθεκτικές ποικιλίες γίνεται όλο και πιο δύσκολος λόγω της εξαιρετικά υψηλής διαφοροποίησης των στελεχών του λόγω γενετικής ποικιλότητας, καθώς έχει πολύ ασυνήθιστη βιολογία ως παθογόνο (Eyal et al., 1987; Torriani et al., 2009; Goodwin et al 2011; Suffert et al., 2011; Brown JKM et al. 2015).

Απαραίτητη κρίθηκε και η αξιολόγηση των μυκητοκτόνων: boscalid, ένα ανιλίδιο της ομάδας παρεμποδιστών συμπλόκου II, cyproconazole, μια τριαζόλη της ομάδας των παρεμποδιστών της βιοσύνθεσης εργοστερόλης, carbendazim, ένα βενζιμιδαζολικό και pyraclostrobin, ένα μεθοξυκαρβαμιδικό των εξωτερικών παρεμποδιστών της κινόνης, προκειμένου να διερευνηθούν φαινόμενα ανθεκτικότητας καθώς χρησιμοποιούνται εντατικά. Ο έλεγχος της ευαισθησίας των απομονώσεων βασίστηκε σε παρατηρήσεις που έγιναν κατά το στάδιο της βλάστησης των σπορίων της *Z. tritici* και της ανάπτυξης μυκηλίου.

Η χρήση μυκητοκτόνων για την καταπολέμηση του *M. graminicola* στη Θεσσαλία, ξεκίνησε κατά το έτος 2014. Σύμφωνα με τον FRAC, ανάπτυξη ανθεκτικότητας μιας δραστικής ουσίας για ένα συγκεκριμένο παθογόνο, επιτυγχάνεται 2 με 10 χρόνια μετά την έναρξη εφαρμογής της στο παθογόνο αυτό, υπό συστηματική χρήση. Στη παρούσα διατριβή, πληθυσμοί της Θεσσαλίας του *M.graminicola* συλλέχθηκαν απ'τον αγρό και το 2016 ερευνήθηκαν υπό καλλιέργειες in vitro για την ανίχνευση ή όχι ανθεκτικότητας. Τα αποτελέσματα ευαισθησίας που διεξήχθησαν επιβεβαιώνουν απόλυτα τη συνθήκη αυτή, αφού δεν παρατηρήθηκε καθόλου ανθεκτικότητα σε καμία δραστική ουσία.

Το boscalid αντιμετώπισε τη βλάστηση σπορίων του *Z.tritici* σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0,01mg/L - 0,1mg/L boscalid, μέσα σε 42h ενώ την μυκηλιακή αποικία μεταξύ 0,1mg/L, - 1mg/L boscalid μετά από 8 μέρες που καταγράφηκε. Η αντιμετώπιση του παθογόνου με boscalid θα πρέπει να επαναλαμβάνει τη χρήση του μυκητοκτόνου μετά από 7 μέρες, αλλιώς ο μύκητας θα επιβιώσει και θα εξαπλωθεί μέσω μολυσμάτων (υπολλείματα σίτου στον αγρό, ξενιστές). Το

cyproconazole καταπολέμησε τη βλάστηση σπορίων με το μεγαλύτερο ποσοστό στη συγκέντρωση 0,1mg/L cyproconazole, ενώ ανάπτυξη μυκηλίου σε 0,1mg/L - 1mg/L cyproconazole. Το carbendazim αντιμετώπισε το μύκητα σε συγκεντρώσεις των 0,001mg/L - 1mg/l carbendazim, ενώ η αποικία καταπολεμήθηκε σε 0,1mg/L - 1mg/L carbendazim. Το pyraclostrobin εμφάνισε ελάχιστη βλάστηση σε 0,001mg/L, ενώ δεν υπήρχε παρουσία μυκηλίου, οπότε αντιμετώπισε το παθογόνο με παρουσία SHAM σε 0,001mg/L pyraclostrobin.

Περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη τα επόμενα χρόνια γιατί εξακολουθεί να υπάρχει κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται, ενώ απαραίτητη είναι και η έρευνα ανίχνευσης αντιμετώπισης του μύκητα σε παρόμοια ή ίδια μυκητοκτόνα σε παρόμοιες συγκεντρώσεις σε φυτά αγρού.

VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

VI.1 Ελληνική Βιβλιογραφία

- Ανθούλη Ε.** (2017). Ανίχνευση εναέριου μολύσματος του μύκητα *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schröt και αξιολόγηση διαφόρων ομάδων μυκητοκτόνων για την αντιμετώπιση της ασθένειας σεπτορίωση του σίτου. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
- Αντωνιάδης, Δ.Γ.,** (2000). Ταξινόμηση ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα στελεχών του *Botrytis cinerea*, με τη χρησιμοποίηση μοριακών και βιοχημικών δεικτών. Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly 11/01/2018 23:38:25 EET - 79.107.236.128
- Γεωργόπουλος, Σ., και Ζιώγας, Β.Ν.,** (1992). *Αρχές και μέθοδοι καταπολέμησης των ασθενειών των φυτών*. Αθήνα.
- Δαναλάτος, Ν.,** (2005). *Σημειώσεις Γενικής και Ειδικής Γεωργίας*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Ζιώγας Β.Ν. και Μαρκόγλου Α.Ν.,** (2010). *Γεωργική Φαρμακολογία: Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί δράσης & Χρήσεις των Φυτοπρ. Προϊόντων*, Β Έκδοση.
- Θανασουλόπουλος, Κ.,** (1996). *Μυκητολογικές ασθένειες φυτών μεγάλης καλλιέργειας*. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, σελ:62-65.
- Σφήκας, Α.,** (1991). *Ειδική Γεωργία Ι. Σιτηρά, Ψυχανθή και Χορτοδοτικά Φυτά*. Α.Π.Θ., Εκδόσεις: Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Θεσσαλονίκη.
- Χατζηδημόπουλος Μ.Α.,** (2014). *Επιδημιολογία κι αντιμετώπιση του βοτρυτή σε υδροπονική καλλιέργεια μαρουλιού*, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Ν.Ιωνία Μαγνησίας, 2014.

VI.2 Διεθνής Βιβλιογραφία

- Adhikari, T.B., Yang, X., Cavaletto, J.R., Hu, X., Buechley, G., Ohm, H.W., Shaner, G., Goodwin, S.B.** (2004). Molecular mapping of Stb1, a potentially durable gene for resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Theor Appl Genet* 109: 944-953.
- Amand, O., Calay, F., Coquillart, L., Legat, T., Bodson, B., Moreau, JM, Maraite, H.** (2013). First detection of resistance to QoI fungicides in *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat in Belgium. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 2003;68(4 Pt B):519-31.
- Bockus, W.W., Bowden, R.L., Hunger, R.M., Morill, W.L., Murray, T.D., Smiley, R.W.** (2010). Compendium of Wheat Diseases and Pests. 3rd Edition. *American Phytopathology Society.*
- Brent, KJ, Hollomon, D.** (2007). Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? 2nd, revised edition, *FRAC Monograph No 1.* Brussels, Belgium: Fungicide Resistance Action Committee 2007.
- Brown, J.K.M., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P., Saintenac, C.** (2015). Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology* 79 : 33–41.
- Cools, H.J., and Fraaije, B.A.** (2012). Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Manag Sci.* 2012 Feb; 69(2):150-5. doi: 10.1002/ps.3348.
- Delye, C., Laigret, F, Corio-Costet M.F.** (1997). A mutation in the 14 α -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8): 2966-70.

- Duveiller, E., Singh, R.P., Nicol, J.M.** (2007). The challenges of maintaining wheat productivity: pests, diseases and potential epidemics. *Euphytica* 157:417–430.
- Dreisigacker, S., Wang, Xiang, Martinez-Cisneros, B.A., Jing, R., Singh, P.K.** (2015). Adult plant resistance to *Septoria tritici* blotch in hexaploid spring wheat, *Theor Appl Genet* 128: 2317–2329.
- Eyal, Z, Scharen, A.L., Prescott, J.M., Ginkel, M.V.** (1987). The Septoria Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. Mexico City, Mexico: CIMMYT., pp1-38.
- Gough, F.J., Lee, T.S.** (1985). Moisture effects on the discharge and survival of conidia of *Septoria tritici*. *Phytopathology* 75, 180–182.
- Goodwin, S.B., M'Barek, S.B., Dhillon, B., Wittenberg, A.H.J., Crane, C.F.** (2011). Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure, Chromosome Plasticity, and Stealth Pathogenesis. *PLoS Genetics* 7(6).
- Graeme, J.K., Kostya, K.** (2016). Dissecting the Molecular Interactions between Wheat and the Fungal Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Plant Science* 2016; 7: 508.
- Halama, P.,** (1996). The occurrence of *Mycosphaerella graminicola*, teleomorph of *Septoria tritici* in France. *Plant Pathology* 45, 135–138.
- Hayashi, K., Watanabe, M., Tanaka, T., and Uesugi, Y.** (1996). Cyanide-insensitive Respiration of Phytopathogenic Fungi Demonstrated by Antifungal Joint Action of Respiration Inhibitors. *Journal of Pesticide Science* 21, 399-403.

- Hunter, T., Coker, RR, Royle, DJ,** (1999). The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of septoria tritici blotch on winter wheat in the UK. *Plant Pathology* 48,51–7.
- Kellner, R., Bhattacharrya, A., Poppe, S., Hsu, T.Y., Brem, R.B., Stukenbrock, E.H.** (2014). Expression Profiling of the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici* Reveals Genomic Patterns of Transcription and Host-Specific Regulatory Programs. *Genome Biology* 6(6): 1353-1365.
- Kema, G.H., Lee, T.A.J., Mendes, O., Verstappen, E.C., Lankhorst, R.K., Sandbrink, H., Burgt, A., Zwiers, L.H., Csukai, M., Waalwijk, C.** (2008). Large-scale gene discovery in the Septoria tritici blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* with a focus on in planta expression. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21(9): 1249–1260.
- Kema, G. H., Verstappen, E. C., and Waalwijk, C.** (2000). Avirulence in the wheat Septoria tritici leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* is controlled by a single locus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13(12): 1375–1379.
- Kema, G.H., Sayoud, R., Annone, J. G., and Van Silfhout, C. H.** (1996a). Genetic variation for virulence and resistance in the wheat *Mycosphaerella graminicola* pathosystem. II. Analysis of interactions between pathogen isolates and host cultivars. *Phytopathology* 86(2): 213- 220.
- Kema, G.H.J., Yu, D.Z., Rijkenberg, H.J., Shaw, M.W., Baayen, R.P.** (1996b). Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* 86, 777–786. 10.1094/Phyto-86-777.
- Keon, J., Antoniw, J., Carzaniga, R., Deller, S., Ward, J.L., Baker, J.M., et al.** (2007). Transcriptional adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to programmed cell death (PCD) of its susceptible wheat host. *Mol. Plant Microbe Interact* 20(2): 178–193. 10.1094/MPMI-20-2-0178.

- Lee, W.-S., Rudd, J.J., Hammond-Kosack, K.E., Kanyuka, K.** (2014). *Mycosphaerella graminicola* LysM effector-mediated stealth pathogenesis subverts recognition through both CERK1 and CEBiP homologues in wheat. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 27(3): 236–243.
- Lovell, D.J., Parker, S.R., Hunter, T., Welhama, S.J., Nicholsc, A.R.** (2004). Position of inoculum in the canopy affects the risk of *Septoria tritici* blotch epidemics in winter wheat. *Plant Pathology* 53, 11–21.
- Matheron, M.E., and Porchas, M.** (2004). Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, (fludioxonil and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. *Plant Disease* 88(6): 665-668.
- McDonald, B.A., and Mundt, C.C.** (2016). How knowledge of pathogen population biology informs management of Septoria Tritici Blotch. *Phytopathology* 106(9): 948-955.
- Mehrabi, R., Zwiers, L.H., Waard, M.A., Kema, G.H.J.** (2006). MgHog1 Regulates Dimorphism and Pathogenicity in the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *The American Phytopathological Society* 19(11): 1262–1269.
- Morais, D., Sache, I., Suffert, F., and Laval, V.** (2015). Is the onset of *Septoria tritici* blotch epidemics related to the local pool of ascospores?. *Plant Pathology* 65(2): 250-260.\
- Myresiotis, C.K., Bardas, G.A. and Karaoglanidis, G.S.** (2008). Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazoleresistant strains by these fungicides. *Plant Disease* 92(10):1427-1431.
- O’Driscoll, A.O., Kildea, S., Doohan, F., Spink, J., Mullins, E.** (2014). The wheat–*Septoria* conflict: a new front opening up? *Trends Plant Sci.*, 19(9): 602-610.

- Quaedvlieg, W., Kema, G.H.J., Groenewald, J.Z., Verkley, G.J.M., Seifbarghi, S., Razavi, M., Gohari, A.M., Mehrabi, R., Crous, P.W.,** (2011). *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 26: 57–69.
- Palma-Guerrero, J., Torriani, S.F.F., Zala, M., Carter, D., Coubort, M., Rudd, J.J., McDonald, B.A, and Croll D.,** (2016). Comparative transcriptomic analyses of *Zymoseptoria tritici* strains show complex lifestyle transitions and intraspecific variability in transcription profiles. *Molecular Plant Pathology* 17(6): 845-859, DOI: 10.1111/mpp.12333.
- Palmer, C.L. and Skinner, W.,** (2002). *Mycosphaerella graminicola* : latent infection, crop devastation and genomics. *Molecular Plant Pathology* 3(2): 63–70.
- Rudd, J.J., Kanyuka, K., Hassani-Pak K., Derbyshire, M., Andongabo, A., Devonshire, J., et al.** (2015). Transcriptome and metabolite profiling the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat (*Triticum aestivum*) reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions, and a variation on the hemi-biotrophic lifestyle definition. *Plant Physiol.* 167(3): 1158–1185.
- Sanderson, F.R. and Hampton, J.G.,** (1978). Role of the perfect states in the epidemiology of the common *Septoria* diseases on wheat. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21 (2): 277–81.
- Sanglard, D., Ischner, F., Koymans, L., Bile, J.,** (1998). Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42(2):241-253.
- Schnabel, F., Jones, A.L.,** (2001). The 14 α -demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology* 91(1): 102-110. .

- Shetty, N.P., Kristensen, B.K., Newman, M.A., Moller, K., Gregersen, P.L., Jorgensen, H.J.L.,** (2003). Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 62: 333–346.
- Simon, M.R., Cordo, C.A., Castillo, N.S., Struik, P.C., and Borner, A.,** (2012). Population Structure of *Mycosphaerella graminicola* and Location of Genes for Resistance to the Pathogen: Recent Advances in Argentina. Hindawi Publishing Corporation, *International Journal of Agronomy Volume 2012*, Article ID 680275.
- Steinberg G.,** (2015). Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat Infection. *Fungal Genetics and Biology* 79 (2015) 17–23.
- Stewart, E.L. and McDonald, B.A.,** (2014). Measuring quantitative virulence in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using high-throughput automated image analysis. *Phytopathology* 104(9): 985–992.
- Suffert, F., Sache, I., Lannou, C.,** (2011). Early stages of *Septoria tritici* Blotch epidemics of winter wheat: build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant. Pathol.*, 60(2): 166-177.
- Torriani, S.F.F., Brunner, P.C., McDonald B.A. and Sierotzkib, H.** (2009). QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci* 65(2): 155–162.
- Torriani, S.F.F., Melichar, J.P.E., Mills, C., Pain, N., Sierotzki, H., and Coumbort, M.** (2015). *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genet. Biol.* 79:8-12.
- Wiese, M.V.,** (1987). Compendium of wheat diseases. *American Phytopathological Society.* p. 124.

Zhan, J., Pettway, R.E., McDonald, B.A., (2003). The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genetics and Biology* 38(3): 286–97.

Zwiers, L.H., Stergiopoulos, I., Van Nistelrooy, J.G.M., De Waard, M.A., (2002). ABC transporters and azole susceptibility on laboratory strains of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(12): 3900-3906.

VI.3 Ηλεκτρονικές Αναφορές

CropPro. Crop Phenology - The Growth Stage. [Online]. Available at <http://www.croppro.com.au/crop_disease_manual/ch02s03.php> [Last Access: 1/1/18]

Esler, P. and Proost, R. (2010). Fungicide resistance management in corn, soybean, and wheat in Wisconsin. NPM A3878. University of Wisconsin extension service, Cooperative Extension in coop. with USDA. [Online]. Available at <<http://corn.agronomy.wisc.edu/Management/pdfs/A3878.pdf>> [Last Access: 1/1/18]

Frac. (2017). Code List : Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). [Online]. Available at <<http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2017-final.pdf>> [Last Access: 1/1/18]

Frac. (2013). PATHOGEN RISK LIST. [Online]. Available at <<http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf>> [Last Access: 1/1/18]

HGCA. (2012). Septoria tritici in winter wheat. Topic Sheet 113/Spring 2012. [Online]. Available at

<https://cereals.ahdb.org.uk/media/178045/ts113_septoria_tritici_in_winter_wheat.pdf>
[Last Access: 1/1/18]

Hollaway G., 2014. Septoria Tritici Blotch of Wheat, Department of Environment and Primary Industries, State Government Victoria, Available on
<<http://agriculture.vic.gov.au/agriculture/pests-diseases-and-weeds/plant-diseases/grains-pulses-and-cereals/septoria-tritici-blotch-of-wheat>> [Last Access: 31/12/17]

Index fungorum. [n.d].

1. Mycosphaerella graminicola. [Online]. Available on
<<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>> at
<<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=318177>> [Last
Access: 1/1/18]

2. Septoria tritici. [Online]. Available on
<<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>> at
<<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=205691>> [Last
Access: 1/1/18]

PPDB. Pesticide Properties DataBase. [n.d]. carbendazim. [Online]. Available at
<<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/116.htm>> [Last Access: 1/1/18]

Ponomarenko, A., Goodwin, S.B., Kema,G.H.J., 2011. Septoria tritici blotch (STB) of wheat. *Plant Health Instructor*.DOI:10.1094/PHI-I-2011-0407-01. [Online]. Available at
<<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/pages/septoria.aspx>>
[Last Access: 1/1/18]

Mycobank. [n.d].

1. Mycosphaerella graminicola. [Online]. Available on
<<http://www.mycobank.org/quicksearch.aspx>> at
<<http://www.mycobank.org/BioloMICSDetails.aspx?Rec=50925>> [Last Access: 1/1/18]

2. *Septoria tritici*. [Online]. Available on
<<http://www.mycobank.org/quicksearch.aspx>> at
<<http://www.mycobank.org/BioloMICSDetails.aspx?Rec=25522>> [Last Access: 1/1/18]

Stukenbrock, E.H., Jørgensen, F.G., Zala, M., Hansen, T.T., McDonald, B.A., Schierup, M.H., (2010). Whole-Genome and Chromosome Evolution Associated with Host Adaptation and Speciation of the Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS Genetics* 6 (12). Available at <<http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1001189>>

USEPA, (2003). Pesticide Fact Sheet: Boscalid, United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. [Online]. Available at https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-128008_01-Jul-03.pdf> [Last Access: 1/1/18]

Yang, F., Li, W., Jørgensen, H.J.L., (2013b). Transcriptional reprogramming of wheat and the hemibiotrophic pathogen *Septoria tritici* during two phases of the compatible interaction. *PLoS ONE* Available at <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081606>> [Last Access: 1/1/18]

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 6. Έλεγχος ευαισθησίας των απομονώσεων της *Z.septoria* στο boscalid

Ομάδα	Αρίθμηση	Κωδικός	Συγκεντρώσεις boscalid					
			0,001	0,01	0,1	1	10	100
A	1	B1	A	B	E	E	Δ	Δ
	2	B2	A	B	Γ	Δ	Δ	Δ
	3	B3	A	A	B	Γ	Δ	Δ
	4	B4	B	B	B	Δ	Δ	Δ
	5	B5	A	B	E	Δ	Δ	Δ
	6	B6	A	B	B	Γ	Δ	Δ
	7	B7	A	B	B	Γ	Δ	Δ
	8	B8	A	A	B	E	Δ	Δ
	9	B10	A	A	B	B	Δ	Δ
	10	B11	A	A	B	Γ	Δ	Δ
	11	B12	A	A	B	B	Δ	Δ
	12	B13	B	B	E	Δ	Δ	Δ
	13	B14	A	Γ	Δ	Δ	Δ	Δ
	14	B15	A	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	15	B16	B	Γ	Δ	Δ	Δ	Δ
	16	B17	A	B	E	Δ	Δ	Δ
	17	B20	E	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
	18	B21	B	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
B	28	K2	B	B	Γ	E	Δ	Δ
	29	K3	B	B	Γ	E	Δ	Δ
	30	K4	A	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	31	K5	A	B	Δ	Δ	Δ	Δ
	32	K7	A	A	Δ	Δ	Δ	Δ
	33	K8	E	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
	34	K9	B	B	Δ	Δ	Δ	Δ
	35	K11	A	B	Δ	Δ	Δ	Δ
	36	K12	A	B	Δ	Δ	Δ	Δ
C	37	Φ1	B	B	B	B	Δ	Δ
	38	Φ2	A	B	Γ	Γ	Δ	Δ
	39	Φ3	E	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	40	Φ4	A	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	41	Φ5	A	B	B	Δ	Δ	Δ
	42	Φ6	B	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	43	Φ7	A	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	44	Φ8	E	E	Δ	Δ	Δ	Δ

Πίνακας 6. Έλεγχος ευαισθησίας των απομονώσεων της *Z.septoria* στο boscalid με βάση την βλάστηση των σπορίων στους 22°C σε συνθήκες σκότους μετά από 42h. A : φυσιολογική βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα, B : βλάστηση σπορίων με βραχύ, Γ : βλάστηση με παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα, Δ : καμία βλάστηση σπορίων, E: βλάστηση ελάχιστων σπορίων με βραχύ ή μακρύ βλαστικό σωλήνα

Πίνακας 7. Έλεγχος ευαισθησίας των απομονώσεων της *Z.septoria* στο cyproconazole

Ομάδα	Αρίθμηση	Κωδικός	Συγκεντρώσεις cyproconazole					
			0,001	0,01	0,1	1	10	100
A	1	B1	A	B	Γ	Δ	Δ	Δ
	2	B2	A	B	Γ	Δ	Δ	Δ
	3	B3	A	A	B	Δ	Δ	Δ
	4	B4	B	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
	5	B5	A	A	Γ	Δ	Δ	Δ
	6	B6	A	A	Γ	Γ	Δ	Δ
	7	B7	A	A	B	Δ	Δ	Δ
	8	B8	A	A	B	Δ	Δ	Δ
	9	B10	A	A	Γ	Δ	Δ	Δ
	10	B11	A	A	Γ	Δ	Δ	Δ
	11	B12	A	A	Δ	Δ	Δ	Δ
	12	B13	E	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	13	B14	E	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	14	B15	Γ	Γ	Δ	Δ	Δ	Δ
	15	B16	B	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	16	B17	A	A	Δ	Δ	Δ	Δ
	17	B20	A	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	18	B21	B	E	Δ	Δ	Δ	Δ
B	28	K2	B	B	B	Γ	Δ	Δ
	29	K3	A	A	Γ	Δ	Δ	Δ
	30	K4	B	B	E	Δ	Δ	Δ
	31	K5	A	A	E	Δ	Δ	Δ
	32	K7	A	A	B	Δ	Δ	Δ
	33	K8	E	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
	34	K9	A	A	Δ	Δ	Δ	Δ
	35	K11	A	A	E	Δ	Δ	Δ
	36	K12	A	A	E	Δ	Δ	Δ
C	37	Φ1	A	A	B	Δ	Δ	Δ
	38	Φ2	A	B	E	Δ	Δ	Δ
	39	Φ3	E	E	E	Δ	Δ	Δ
	40	Φ4	E	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	41	Φ5	A	A	B	Δ	Δ	Δ
	42	Φ6	E	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	43	Φ7	A	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	44	Φ8	E	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ

Πίνακας 7. Έλεγχος ευαισθησίας των απομονώσεων της *Z.septoria* στο cyproconazole με βάση την βλάστηση των σπορίων στους 22°C σε συνθήκες σκότους μετά από σε 42h. A : φυσιολογική βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα, B : βλάστηση σπορίων με βραχύ βλ. σωλήνα, Γ : βλάστηση με παραμορφωμένο βλ. σωλήνα, Δ : καμία βλάστηση σπορίων, E: βλάστηση ελάχιστων σπορίων με βραχύ ή μακρύ βλ. σωλήνα

Πίνακας 8. Έλεγχος ευαισθησίας των απομονώσεων της *Z.septoria* στο carbendazim

Ομάδα	Αρίθμηση	Κωδικός	Συγκεντρώσεις carbendazim					
			0,001	0,01	0,1	1	10	100
A	1	B1	B	B	E	Γ	Δ	Δ
	2	B2	A	B	B	Γ	Δ	Δ
	3	B3	A	A	E	Γ	Δ	Δ
	4	B4	B	B	Δ	Δ	Δ	Δ
	5	B5	A	A	B	Δ	Δ	Δ
	6	B6	A	A	B	Γ	Γ	Δ
	7	B7	A	B	B	Δ	Δ	Δ
	8	B8	A	A	B	Δ	Δ	Δ
	9	B10	A	A	B	Δ	Δ	Δ
	10	B11	A	A	A	Γ	Δ	Δ
	11	B12	A	A	A	Γ	Δ	Δ
	12	B13	A	B	Δ	Δ	Δ	Δ
	13	B14	A	B	B	Δ	Δ	Δ
	14	B15	E	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	15	B16	A	B	Δ	Δ	Δ	Δ
	16	B17	B	B	Δ	Δ	Δ	Δ
	17	B20	E	E	Δ	Δ	Δ	Δ
	18	B21	E	E	Δ	Δ	Δ	Δ
B	28	K2	B	Γ	Γ	Γ	Δ	Δ
	29	K3	A	Γ	E	Δ	Δ	Δ
	30	K4	A	B	E	Δ	Δ	Δ
	31	K5	B	B	E	Δ	Δ	Δ
	32	K7	B	B	B	Δ	Δ	Δ
	33	K8	E	E	E	Δ	Δ	Δ
	34	K9	B	B	Γ	Γ	Γ	Δ
	35	K11	A	A	A	Δ	Δ	Δ
	36	K12	A	B	Γ	Δ	Δ	Δ
C	37	Φ1	A	A	A	Γ	Γ	Δ
	38	Φ2	B	B	B	E	Δ	Δ
	39	Φ3	E	E	E	Δ	Δ	Δ
	40	Φ4	E	E	E	Δ	Δ	Δ
	41	Φ5	A	A	Δ	Δ	Δ	Δ
	42	Φ6	E	E	E	Δ	Δ	Δ
	43	Φ7	A	B	B	Δ	Δ	Δ
	44	Φ8	B	B	E	Δ	Δ	Δ

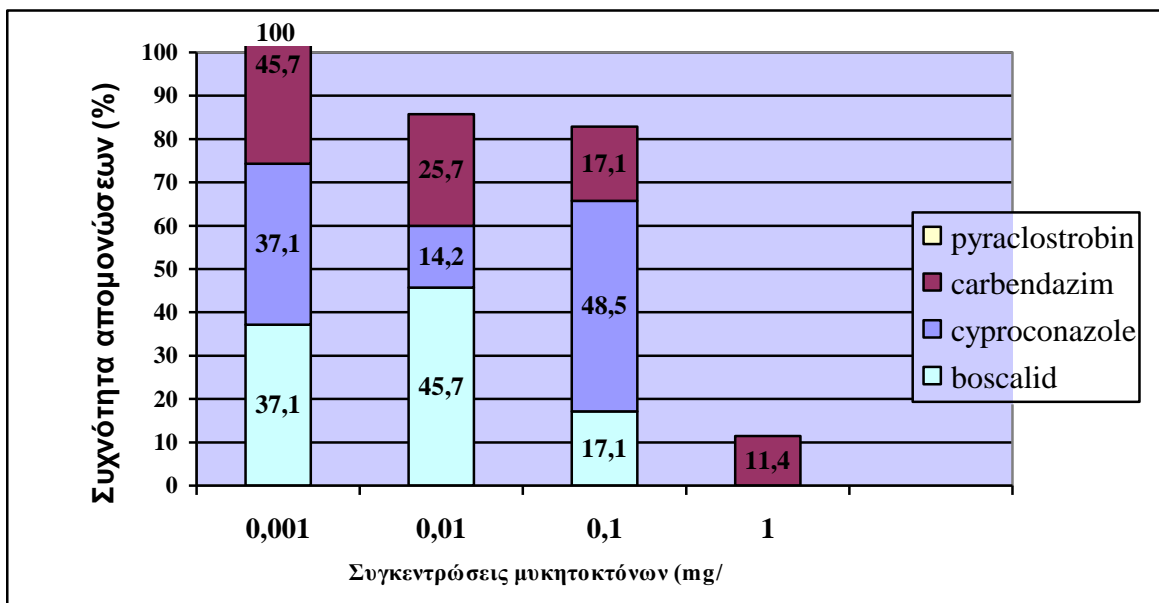
Πίνακας 8. Έλεγχος ευαισθησίας των απομονώσεων της *Z.septoria* στο carbendazim με βάση την βλάστηση των σπορίων στους 22°C σε συνθήκες σκότους μετά από 42h. A : φυσιολογική βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα, B : βλάστηση σπορίων με βραχύ βλ. σωλήνα, Γ : βλάστηση με παραμορφωμένο βλ. σωλήνα, Δ : καμία βλάστηση σπορίων, E: βλάστηση ελάχιστων σπορίων με βραχύ ή μακρύ βλ. σωλήνα.

Πίνακας 9. MIC για τη βλάστηση των σπορίων (ml/l)

		MIC για τη βλάστηση των σπορίων (mg/l)			
Ομάδα	Κωδικός	boscalid	cyproconazole	carbendazim	pyraclostrobin
A	B1	<0,01	<0,01	<0,001	<0,001
	B2	<0,01	<0,01	<0,01	<<0,001
	B3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,001
	B4	<0,001	<0,001	<0,001	<<0,001
	B5	<0,01	<0,1	<0,1	<<0,001
	B6	<0,01	<0,1	<0,1	<0,001
	B7	<0,01	<0,1	<0,01	<<0,001
	B8	<0,1	<0,1	<0,1	<<0,001
	B10	<0,1	<0,1	<0,1	<<0,001
	B11	<0,1	<0,1	<1	<0,001
	B12	<0,1	<0,1	<1	<0,001
	B13	<0,001	<0,001	<0,01	<<0,001
	B14	<0,01	<0,001	<0,01	<<0,001
	B15	<0,01	<0,001	<0,001	<<0,001
	B16	<0,001	<0,001	<0,01	<<0,001
	B17	<0,01	<0,1	<0,001	<<0,001
	B20	<0,001	<0,01	<0,001	<<0,001
B21	<0,001	<0,001	<0,001	<<0,001	
B	K2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	K3	<0,001	<0,1	<0,01	<<0,001
	K4	<0,01	<0,001	<0,01	<<0,001
	K5	<0,01	<0,1	<0,001	<<0,001
	K7	<0,1	<0,1	<0,001	<<0,001
	K8	<0,001	<0,001	<0,001	<<0,001
	K9	<0,001	<0,1	<0,001	<<0,001
	K11	<0,01	<0,1	<1	<0,001
	K12	<0,01	<0,1	<0,01	<<0,001
C	Φ1	<0,001	<0,1	<1	<<0,001
	Φ2	<0,01	<0,01	<0,001	<<0,001
	Φ3	<0,001	<0,001	<0,001	<<0,001
	Φ4	<0,01	<0,001	<0,001	<<0,001
	Φ5	<0,01	<0,1	<0,1	<<0,001
	Φ6	<0,001	<0,001	<0,001	<<0,001
	Φ7	<0,01	<0,01	<0,01	<<0,001
	Φ8	<0,001	<0,001	<0,001	<<0,001

Πίνακας 9. Ευαισθησία των απομονώσεων του *Z.septoria* στα μυκητοκτόνα εκφρασμένη ως ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση μυκητοκτόνου (minimum inhibitory concentration, MIC) για τη βλάστηση των σπορίων ή την κανονική ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα στους 22°C σε συνθήκες σκότους μετά από σε 42h

Αποτελεσματικότητα δραστικής ουσίας για την παρεμπόδιση της βλάστησης σπορίων



Διάγραμμα 12. Αποτελεσματικότητα των boscalid, cyproconazole, carbenadazim, pyraclostrobin, εκφρασμένη ως ο αριθμός των απομονώσεων επί της 100 που παρεμποδίστηκε για την βλάστηση των σπορίων στις συγκεντρώσεις 0,001/0,01/0,1/1mg/L στους 22°C σε συνθήκες σκότους μετά από σε 42h.