

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΪΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

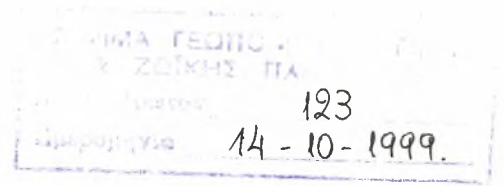
“ Μελέτη της βιολογικής δράσης μυκητοκτόνων της ομάδας των στρομπιλουρινών επί απομονώσεων του μύκητα *Pyricularia oryzae* ”.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΪΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

“ Μελέτη της βιολογικής δράσης μυκητοκτόνων της ομάδας των
στρομπιλουρινών επί απομονώσεων του μύκητα *Pyricularia oryzae* ”.

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΙΣΗΤΗΤΗΣ: Α.Χ.ΠΑΠΠΑΣ (Καθηγητής)

ΜΕΛΗ: Ι.Α ΤΣΙΤΣΙΠΗΣ(Καθηγητής)
Σ. ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΥ(Καθηγήτρια)

ΤΣΙΛΙΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 47/1

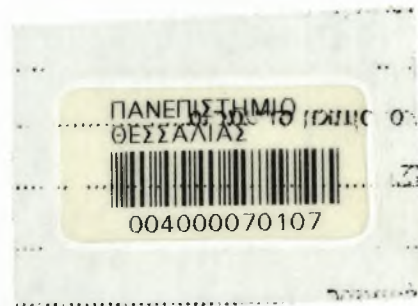
Ημερ. Εισ.: 25-08-2003

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΓΦΖΠ

1999

ΤΣΙ



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	σελ.1
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	2
ΜΕΡΟΣ Α΄ -ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1. ΤΟ ΡΥΖΙ ΩΣ ΦΥΤΟ ΚΑΙ ΩΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	6
1.1 Καταγωγή και διάδοση.....	6
1.2 Βοτανικά γνωρίσματα.....	6
1.3 Οικολογικές απαιτήσεις.....	7
1.4 Η τεχνική της καλλιέργειας.....	8
1.5 Εχθροί και ασθένειες.....	8
1.6 Σημασία του ρυζιού.....	9
2. ΠΥΡΙΚΟΥΛΑΡΙΩΣΗ. Ασθένεια του ρυζιού οφειλόμενη στο μύκητα <i>P.oryzae</i> ...11	
2.1 Ιστορία και κατανομή.....	11
2.2 Συμπτώματα.....	12
2.3 Παθογόνο αίτιο-Συνθήκες αναπτύξεως.....	13
2.3.1 Ξενιστές.....	14
2.3.2 Μορφολογία.....	15
2.3.3 Διαδικασία μόλυνσης.....	18
2.3.4 Βιοσύνθεση της μελανίνης.....	19
2.3.5 Προϊόντα μεταβολισμού.....	21
2.4 Επιδημιολογία.....	22
2.5 Απώλειες και οικονομική σημασία.....	22
3. ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ.....	23
3.1 Γενικά.....	23
3.2 Τρόποι καταπολέμησης.....	23
3.2.1 Καλλιεργητικές πρακτικές.....	23
3.2.2 Ανθεκτικές ποικιλίες.....	24
3.2.2.1 Αντιδράσεις άμυνας του φυτού.....	24

3.2.2.2 Φύση της ανθεκτικότητας.....	24
3.2.2.3 Προσδιορισμός της ενδοποικιλιακής ανθεκτικότητας.....	25
3.2.2.4 Κριτήρια και κλίμακες ανθεκτικότητας ή ευαισθησίας.....	25
3.2.2.5 Τεχνητή ανθεκτικότητα.....	26
3.2.2.6 Βελτίωση για ανθεκτικότητα.....	26
3.2.3 Χημική καταπολέμηση.....	27
3.2.3.1 Χημικά μέσα κατά της πυρικουλαρίωσης.....	27
3.2.3.2 Χρήση μυκητοκτόνων με νέο εξειδικευμένο τρόπο δράσης.....	31
ΜΕΡΟΣ Β' -ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ.....	40
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	41
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	43
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
4.1 ΠΕΙΡΑΜΑ I: 'Επίδραση μυκητοκτόνων στην ανάπτυξη μυκηλίου'.....	47
4.2 ΠΕΙΡΑΜΑ II: 'Επίδραση μυκητοκτόνων στη βλάστηση σπορίων'.....	49
4.3 ΠΕΙΡΑΜΑ III: 'Επίδραση μυκητοκτόνων επί της παραγωγής σπορίων.....	50
4.4 ΠΕΙΡΑΜΑ IV: 'Υπολογισμός των τιμών ED ₅₀ των μυκητοκτόνων azoxystrobin και kresoxim-methyl για την ανάπτυξη μυκηλίου και τη βλάστηση σπορίων.....	52
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
5.1 Επίδραση στην ανάπτυξη του μυκηλίου.....	53
5.2 Επίδραση στη βλάστηση σπορίων.....	61
5.3 Επίδραση στην παραγωγή σπορίων.....	65
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής και Ζωϊκής παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από τον Νοέμβριο του 1998 έως τον Απρίλιο του 1999. Την επίβλεψη της διαδικασίας είχε ο Καθηγητής Φυτοπαθολογίας Δρ. Α.Χ. Παππάς, τον οποίο και ευχαριστώ διότι μου πρότεινε το θέμα της εργασίας, παρακολούθησε την πορεία των εργασιών και συμμετείχε στη διεξαγωγή των πειραμάτων, παραχώρησε τον Η/Υ για την επεξεργασία του κειμένου και επιμελήθηκε της παρουσίασης του κειμένου της μελέτης.

Επίσης ευχαριστώ τη συμφοιτήτριά μου Ροδούλα Μπονταρούδη για τη βοήθειά της κατά το πειραματικό μέρος της μελέτης και τους Βασίλη και Καλλιόπη Δημητράντζου για τη βοήθειά τους κατά τη συγγραφή της μελέτης. Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου για τη συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αντικείμενο της παρούσης εργασίας είναι η μελέτη της βιολογικής δράσης μυκητοκτόνων της ομάδας των στρομπιλουρινών επί απομονώσεων του μύκητα *Pyricularia oryzae*.

Η εργασία αυτή αποτελείται από δύο επιμέρους τμήματα, το βιβλιογραφικό, και το πειραματικό μέρος.

Στο βιβλιογραφικό μέρος γίνεται μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με το ρύζι τόσο ως φυτό (βοτανικά γνωρίσματα) όσο και ως καλλιέργεια όπως εφαρμόζεται στην Ελλάδα (τρόπος καλλιέργειας, απαιτήσεις κ.α). Επίσης περιγράφεται η κυριότερη ασθένεια του ρυζιού διεθνώς, η πυρικούλαρίωση (rice blast disease), με αναφορά στα συμπτώματα, τη μορφολογία του παθογόνου μύκητα *P. oryzae*, τις συνθήκες αναπτύξεως, τις απώλειες και την οικονομική σημασία της ασθένειας τόσο σε Ελληνικό όσο και διεθνές επίπεδο. Το μεγαλύτερο τμήμα του βιβλιογραφικού μέρους κατέχει η αναφορά στους τρόπους καταπολέμησης δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στη χημική καταπολέμηση και ειδικότερα στη χρήση των μυκητοκτόνων με νέο τρόπο δράσης, των στρομπιλουρινών.

Το πειραματικό μέρος περιλαμβάνει μια σύντομη εισαγωγή σχετικά με τη δράση μυκητοκτόνων της ομάδας των στρομπιλουρινών επί απομονώσεων του παθογόνου *P. oryzae in vitro*. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων και η συζήτηση αυτών με παρεμφερή δεδομένα εκ της βιβλιογραφίας.

ΜΕΡΟΣ Α΄
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ρύζι (*Oryza sativa*) είναι εαρινό σιτηρό της οικογένειας Gramineae και η καλλιέργειά του, που εντοπίζεται στα βάθη των αιώνων, περιορίζεται σε τροπικές και υποτροπικές χώρες. Μέσα στο φάσμα των συνθηκών που αναπτύσσεται, ανήκει και η Ελλάδα. Στη χώρα μας αν και δεν αποτελεί βασική καλλιέργεια ως προς την έκταση που καταλαμβάνει, αποδίδει ικανοποιητικά με υψηλές στρεμματικές αποδόσεις 600-1200 kg/στρ και αποσκοπεί στην αξιοποίηση και βελτίωση των αλατούχων και αλκαλικών εδαφών.

Η ασθένεια που δημιουργεί σοβαρότατα προβλήματα στις περισσότερες χώρες που καλλιεργείται το ρύζι, είναι η πυρικουλαρίωση. Το παθογόνο αίτιο της ασθένειας, ο μύκητας *Pyricularia oryzae*, ευνοείται από υψηλή υγρασία (πάνω από 90%) και θερμοκρασία 25-28°C, που πολλές φορές δημιουργεί επιδημίες σε κλίμακα περιοχών αλλά και χωρών ολόκληρων, αποφέροντας απώλειες της τάξης του 50% της παραγωγής.

Η καταπολέμηση της ασθένειας αποτέλεσε αντικείμενο ερευνών από πολύ παλιά και ακόμη και σήμερα δεν έχει βρεθεί αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης. Εφαρμόστηκαν κατά καιρούς διάφορες καλλιεργητικές πρακτικές, όπως η πρόωμη σπορά ή μεταφύτευση, η μείωση των εισροών και κυρίως αζωτούχων λιπασμάτων και άρδευσης καθώς και ο έλεγχος της θερμοκρασίας του νερού. Στην Ελλάδα η αντιμετώπιση επιτυγχάνεται ικανοποιητικά με χρήση ανθεκτικών ποικιλιών και απολύμανση του σπόρου ενώ η εκτεταμένη χρήση χημικών, όπως συμβαίνει σε άλλες χώρες π.χ Ιαπωνία, δεν αποτελεί οικονομικό τρόπο αντιμετώπισης για τη χώρα μας.

Οι χαλκούχες ενώσεις ήταν εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την καταπολέμηση της ασθένειας, αργότερα οι ενώσεις υδραργύρου, ακολούθησαν τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα (blasticidin-S, kasugamycin), οι οργανοφωσφορικές ενώσεις (iprobentfon, edifenphos) και οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης μελανίνης (tricyclazole, pyroquilon, carpropramid). Το έντονο ενδιαφέρον του κοινού για την τοξικότητα των χρησιμοποιούμενων χημικών προϊόντων και των υπολειμμάτων τους στα τρόφιμα οδήγησε τις έρευνες στην ανακάλυψη πιο 'ήπιων' φαρμάκων των οποίων η δημιουργία βασίζεται σε ουσίες που αποτελούν φυσικά προϊόντα μυκήτων, βακτηρίων και ανώτερων φυτών. Αντιπροσωπευτικό δείγμα αυτών των ουσιών αποτελούν τα μυκητοκτόνα azoxystrobin και kresoxim-methyl, που πρόσφατα πήραν έγκριση κυκλοφορίας (1996).

Και τα δύο είναι παράγωγα του φυσικού προϊόντος του βασιδιομύκητα *Strobilurus tenacellus* στρομπιλουρίνης A και δρουν εναντίον ενός μεγάλου εύρους φυτοπαθογόνων μυκήτων μεταξύ των οποίων και του *P. oryzae*, παρεμποδίζοντας τη μιτοχονδριακή αναπνοή με διακοπή της μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ κυτοχρώματος b και c₁.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να βρεθεί η επίδραση των δύο αυτών μυκητοκτόνων στην ανάπτυξη του μυκηλίου, τη βλάστηση των σπορίων και το σχηματισμό της πλάκας συγκράτησης (appressorium), και την παραγωγή σπορίων, για τρεις απομονώσεις του μύκητα, δύο από φυτά κτενάνθης (Ct.4 & Ct.6) και μιας από φυτά ρυζιού (R.9), προκειμένου να βρεθούν πιθανοί τρόποι αντιμετώπισης της ασθένειας τόσο στο ρύζι όσο και στην κτενάνθη.

1 . Το Ρύζι ως φυτό και ως καλλιέργεια

1.1 Καταγωγή και διάδοση

Η καλλιέργεια του ρυζιού είναι πανάρχαια. Το πιθανότερο είναι ότι κατάγεται από τις νότιες περιοχές της Ινδίας και της Ινδοκίνας και ιδίως της πρώτης χώρας, γιατί εκεί και περισσότερα αυτοφυή είδη υπάρχουν και οι καλλιεργούμενες ποικιλίες παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλομορφία. Στην Ευρώπη ήρθε περίπου το 700 μ.Χ.

Η καλλιέργειά του περιορίζεται σε τροπικές και υποτροπικές χώρες. Στο Βόρειο ημισφαίριο φτάνει τις 40° Β.Π στην Καλιφόρνια και τις 48° στην Κ.Ασία. Στο Νότιο ημισφαίριο κυμαίνεται μεταξύ 18 και 35° Ν.Π. Επίσης εκτείνεται από την επιφάνεια της θάλασσας σε υψόμετρο 3000m στα Ιμαλάια. Επιπλέον αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε ευρύ φάσμα υγρασιακού καθεστώτος.

Το 92% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής που ανέρχεται σε 300 εκατ. τόνους αναποφλοιώτου ρυζιού, παράγεται και καταναλίσκεται στην Ασία. Αρκετό ρύζι παράγουν επίσης η Βραζιλία, ΗΠΑ, Αίγυπτος, Πορτογαλία, Ισπανία, Ιταλία. Στην παγκόσμια κατανομή των εκτάσεων με γεωργικά φυτά καταλαμβάνει το 12.7 %, κατέχει τη 2^η θέση μετά το σιτάρι.

Στην Ελλάδα καλλιεργούνται περίπου 300 χιλ.στρ. και οι στρεμματικές αποδόσεις κυμαίνονται από 600-1200 Kg/στρ. Για τη χώρα μας αποτελεί συμπληρωματική καλλιέργεια που αποσκοπεί στην αξιοποίηση και βελτίωση των αλατούχων και αλκαλικών εδαφών (Γαλανοπούλου-Σενδουκά,1997, Φασούλας και Φωτιάδης,1984).

1.2 Βοτανικά γνωρίσματα

Το ρύζι είναι εαρινό σιτηρό και ανήκει στην οικογένεια Gramineae, υποοικογένεια Oryzaceae και το καλλιεργούμενο είδος είναι κυρίως το *Oryza sativa* L. (με 2n = 24 χρωμοσώματα) αλλά και το *O. glaberrima* Steudel (Αφρικάνικο).

Το φυτό έχει πλούσιο αλλά επιφανειακό, θυσσανώδες ριζικό σύστημα. Το βλαστίδιο βγαίνει πάνω από την επιφάνεια του νερού σε 8 - 15 ημ.

Το στέλεχος είναι άδειο με κοντά μεσογονάτια και ύψος 60 - 180 cm. Αδελφώνει σε μεγάλο βαθμό και αρχίζει 30 - 40 ημέρες μετά τη σπορά από τη βάση του 2^{ου} φύλλου. Το φύλλο αποτελείται από μακρύ έλασμα και κολεό και έχει μεγάλα ωτίδια.

Η ταξιανθία είναι φόβη με 100 - 150 σταχύδια (τριανθή) ή περισσότερα. Ο καρπός είναι καρύοψη, μήκους 5 - 10 mm ντυμένος με λέπυρα. Το χρώμα του κόκκου είναι λευκό ή ελαφρώς κίτρινο. Ανεπιθύμητο είναι το κόκκινο χρώμα.

Οι ποικιλίες του ρυζιού από άποψη προσαρμοστικότητας και της μεθόδου καλλιέργειας διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: 1) Πεδινών εδαφών (Lowland ή Paddy). Σ' αυτές εφαρμόζεται κατάκλιση σε εύκρατες έως τροπικές περιοχές και 2) Υψηλών υψομέτρων (upland). Καλλιεργούνται χωρίς κατάκλιση σε αρδευόμενες περιοχές ή με υψηλές βροχοπτώσεις.

Από άποψη μεγέθους κόκκου διακρίνονται σε :

- 1) μικρόκαρπες, με μήκος κόκκου < 5,2 mm (μήκος / πλάτος < 2)
- 2) μεσόκαρπες, με μήκος κόκκου 5,2-6,0 mm (μήκος / πλάτος = 2-3)
- 3) μεγαλόκαρπες, με μήκος κόκκου >6 mm (μήκος / πλάτος = 2-3)

Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες στην Ελλάδα είναι δύο τύπων:

- 1) Ιαπωνικός (Japonica) - μικρόκαρπες, κοντές, που αντιδρούν στην αζωτούχο λίπανση, και
- 2) Ινδικός (Indica) - μεγαλόκαρπες, με ψηλά αδύνατα στελέχη.

Οι πρώτες, έχουν περισσότερο από 21% αμυλόζη και στο βράσιμο "λαπαδιάζουν". Για την Ελλάδα συνιστώνται οι : Τάϊ Μπονέτ, Ινκα (τύπου Indica) και Ισπανική Α, Στρυμόνας, Αζιός, Ευρώπη και Ρωξάνη (τύπου Japonica) (Γαλανοπούλου-Σενδουκά, 1997).

1.3 Οικολογικές απαιτήσεις

Κλίμα. Το ρύζι είναι φυτό τροπικών περιοχών και θέλει άφθονη υγρασία, υψηλή θερμοκρασία και μεγάλη ηλιοφάνεια.

Ο βιολογικός του κύκλος κυμαίνεται από 3-7 μήνες. Το ρύζι μπορεί να καλλιεργηθεί με επιτυχία μόνο σε περιοχές που έχουν μέση θερμοκρασία ανώτερη από 21°C καθ' όλο το διάστημα των 4-6 μηνών που χρειάζονται οι περισσότερες ποικιλίες για να κλείσουν το βιολογικό τους κύκλο.

Το ρύζι έχει τη μοναδική ιδιότητα ανάμεσα στα καλλιεργούμενα φυτά, να αναπτύσσεται μέσα στο νερό και η ρίζα του να αναπνέει μέσω των φύλλων. Οι αρδευτικές ανάγκες για τις Ελληνικές συνθήκες, κυμαίνονται από 1200-1300m³ /στρ.

Το ρύζι ευνοείται ιδιαίτερα από το άφθονο φως. Συννεφιασμένος καιρός μειώνει τις αποδόσεις. Όλες οι ποικιλίες χαρακτηρίζονται ως φυτά βραχείας φωτοπεριόδου.

Έδαφος. Το ρύζι μπορεί να αναπτυχθεί σε μεγάλη ποικιλία εδαφών, από τα πιο φτωχά ως τα πιο πλούσια, ακόμη και σε αλατούχα, από τα όξινα με ΡΗ γύρω στο 4, ως τα αλκαλικά με ΡΗ 8, αρκεί να υπάρχει αρκετό νερό που να κατακλύζει το φυτό μέχρι την ωρίμανση. Εκτός

από τις κατάλληλες φυσικές και χημικές ιδιότητες, τα εδάφη πρέπει να είναι ομαλά, ισοπεδωμένα, με μικρή κλίση, για να είναι δυνατή η διαμόρφωση του εδάφους χωρίς υπερβολική οικονομική επιβάρυνση (Γαλανοπούλου-Σενδουκά, 1997).

1.4 Η τεχνική της καλλιέργειας

1.4.1 Αμειψισπορά

Στην Ελλάδα καλλιεργείται 1-3 χρονιές ρύζι και ακολουθούν 2-4 χρόνια καλαμπόκι, τεύτλα, τριφύλλι, βαμβάκι. Πριν από το ρύζι, μπορεί να προηγηθεί χειμερινό σιτηρό. Στη χώρα μας το ρύζι χρησιμοποιείται για τη βελτίωση των αλατούχων εδαφών.

1.4.2 Σπορά

Η σπορά πρέπει να γίνεται πρώιμα ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη απόδοση. Για τη Β. Ελλάδα ευνοϊκές συνθήκες δημιουργούνται το 1^ο δεκαπενθήμερο του Μαΐου, όταν η θερμοκρασία του νερού υπερβεί τους 12°C. Η ποσότητα του σπόρου είναι 10-18 kg/στρ. Η σπορά γίνεται στα πεταχτά με το χέρι ή με μηχανές. Στην Ν.Α. Ασία το ρύζι μεταφυτεύεται εξασφαλίζοντας δύο σοδειές το χρόνο.

1.4.3 Λίπανση

Οι συνήθεις δόσεις λιπασμάτων που εφαρμόζονται σήμερα με τις υψηλές στρεμματικές αποδόσεις είναι: 14-17kg / στρ. N, 0-10 P και 0-20 K. Μερικές φορές χρειάζεται και Ca που προστίθεται ως γύψος.

1.4.4 Άρδευση

Η σπορά του ρυζιού γίνεται στο νερό. Μετά τη σπορά διατηρείται μικρό ύψος νερού 5-10cm. Το νερό ανανεώνεται τακτικά (στα αλατούχα εδάφη κάθε εβδομάδα) και όταν τα φυτά μεγαλώσουν το ύψος του νερού αυξάνεται σε 15-20cm.

1.4.5 Συγκομιδή

Πρέπει να γίνεται όταν η υγρασία του σπόρου είναι μεταξύ 20-22%. Το ρύζι είναι ώριμο όταν τα φύλλα και η ράχη κιτρινίσουν και το περικάρπιο είναι λευκό. Η συγκομιδή γίνεται με θεριζοαλωνιστικές μηχανές. Ο καρπός στη συνέχεια ξηραίνεται σε ξηραντήρια μέχρι υγρασίας 13-14% και αποθηκεύεται (Γαλανοπούλου-Σενδουκά, 1997).

1.5 Εγθροί και ασθένειες

Ζωικοί εγθροί. Το μαλακόστρακο (*Apus cancriformis*) αναδεύει το έδαφος και δυσχεραίνει το φύτευμα. Αντιμετωπίζεται με στράγγιση και χρησιμοποίηση εντομοκτόνων π.χ. παραθείο.

Έντομα. Υπάρχουν περιορισμένες ζημιές στην Ελλάδα. Συνήθως η προνύμφη *Hydrelia* spp. τρώει τα φύλλα των νεαρών φυτών. Καταπολεμάται με παραθείο, καρμπαρύλ, κ.α. Οι προνύμφες του *Ephydra attica* προσβάλλουν τα νεαρά φυτά και καταπολεμώνται με παραθείο ή πυρεθρίνες. Σοβαρή ζημιά προκαλεί η *Sesamia* spp, που μετά το ξεστάχασμα κατατρώγει τα στελέχη. Καταπολεμείται με πυρεθρίνες. Στην αποθήκη ζημιές προκαλούν τα: *Callandra granaria* (Κολεόπτερο) και τα λεπιδόπτερα *Sitotroga cerealella* και *Plodia interpunctella*, καθώς και τα ποντίκια. Για την αντιμετώπιση συνιστάται καθαρισμός των αποθηκών, υποκαπνισμοί και χρήση εντομοκτόνων σκονών για τα μη εδώδιμα προϊόντα (π.χ. σπόρος σποράς) (Γαλιανοπούλου-Σενδουκά, 1997).

Ασθένειες. Οι ασθένειες που έχουν καταγραφεί στην Ελλάδα είναι οι ακόλουθες:

A) Μυκητολογικές: 1) Πυρικούλαριωση. Προκαλεί κηλίδωση φύλλων και άλλων τμημάτων του φυτού. Το παθογόνο αίτιο είναι ο μύκητας *Pyricularia oryzae* (Briosi & Cavaia). Έχει εντοπισθεί στη Μεσσηνία, στη Σκάλα Λακωνίας, στην Ηλεία, Αιτωλοακαρνανία, Λαμία, Στεφάνη Πρεβέζης, στην Θεσπρωτία, περιοχή Θεσσαλονίκης, Καβάλα και Χρυσούπολη Νέστου. 2) Ελμινθοσπορίωση. Παθογόνα αίτια είναι: i) *Helminthosporium* sp και ii) *Helminthosporium oryzae* (Miyaki & Hori). Έχει παρουσιασθεί στο Σταθμό Δοκιμών και Ελέγχου Σπόρων στο Χαλάνδρι, επίσης στην Καλαμάτα, στην Ηλεία, Πελοπόννησο, Μεσολόγγι και Παραμυθιά Ηπείρου. 3) Άλλες ασθένειες προκαλούμενες από τους μύκητες: *Fusarium moniliforme* Sheldon, σε σπόρους από Ιταλία, *Fusarium* sp., *Mycosphaerella oryzae* (Miyake), *Neovosia horrida* (Podwick & Khan) (συν. *Tilletia horrida*) στη Θεσσαλονίκη, *Phoma necatrix* (Thum) και *Pythium catenulatum* (Matthews), *Sclerotinia oryzae* που προκαλεί σήψη λαιμού, *Cercospora* sp.

B) Μη παρασιτικές ασθένειες: 1) "Straight head", παρουσιάστηκε στην Πελοπόννησο και 2) Ασφυξία ριζών που εμφανίστηκε στη Σκάλα Λακωνίας και το Μαραθώνα Αττικής (Δημητριάδης και Παναγόπουλος, 1979).

1.6 Σημασία του ρυζιού για την Ελλάδα

Το Ελληνικό κλίμα είναι αρκετά κατάλληλο για την καλλιέργεια του ρυζιού.

Σε σύγκριση με το σιτάρι, το ρύζι αποδίδει περισσότερο και επίσης δίνει προϊόν με υψηλότερη τιμή. Έχει όμως μεγάλες απαιτήσεις σε νερό, το οποίο δεν είναι πάντα διαθέσιμο και άλλωστε είναι τόσο πολύτιμο για τη χώρα. Απαιτεί πολλή εργασία και πολλές δαπάνες για την προετοιμασία των χωραφιών και την άρδευση. Συχνά, η ωρίμανση συμπίπτει με τις φθινοπωρινές βροχές, οπότε η καλλιέργεια υφίσταται ζημιά.

Συμβαίνει όμως το ρύζι, να μπορεί να καλλιεργηθεί σε χωράφια αλατούχα, όπου κανένα άλλο φυτό δεν μπορεί να ευδοκιμήσει. Μάλιστα, όταν τέτοια χωράφια καλλιεργηθούν με ρύζι μερικά χρόνια, αφαλατίζονται και γίνονται κατάλληλα και για άλλες καλλιέργειες. Σε αυτές τις περιπτώσεις, δε χωρά αμφιβολία πως το ρύζι επιβάλλεται να καλλιεργηθεί.

Οι αλατούχες εκτάσεις της χώρας μας οι οποίες μπορούν να αρδευτούν και να καλλιεργηθούν με ρύζι, υπολογίζονται σε 900.000στρ. (Φασούλας και Φωτιάδης, 1984).

2. Πυρικούλαρίωση. Ασθένεια του ρυζιού οφειλόμενη στο μύκητα *Pyricularia oryzae*

Ασθένειες ρυζιού, γενικά.

Οι ασθένειες είναι κύριοι παράγοντες μείωσης της παραγωγής σε περιοχές όπου αναπτύσσεται το φυτό.

Η σοβαρότερη ασθένεια του ρυζιού που προσβάλλει όλα τα μέρη του φυτού (εκτός ριζών) σε όλα τα στάδια, ιδιαίτερα σε όψιμες σπορές και γόνιμα εδάφη, είναι η πυρικούλαρίωση που οφείλεται στο μύκητα *Pyricularia oryzae*. Οι σχετικές με την ασθένεια πληροφορίες, δίνονται παρακάτω.

2.1 Ιστορία και κατανομή

Η πρώτη περιγραφή της ασθένειας - όπως αναφέρει ο Ου (1987) - έγινε στην Κίνα από τον Soong Ying-Shin, ο οποίος στο βιβλίο του "Χρησιμότητα των Φυσικών Πόρων" που δημοσιεύτηκε το 1637, περιέγραψε την καταστροφή των νεαρών φυτών ρυζιού από μια ασθένεια που τους έδινε όψη "ζεματισμένου" φυτού. Αρχικά υπήρχε η αντίληψη ότι το φαινόμενο οφείλονταν στη ζέστη, η οποία απορροφούνταν από το φυτό κατά τη διάρκεια της ξηρασίας και στη συνέχεια συσσωρεύονταν στους σπόρους όταν αυτοί αποθηκεύονταν χωρίς να ψυχθούν. Όταν ο σπόρος αυτός φυτευόταν σε αγρό ο οποίος είχε δεχθεί λίπανση και με την παρουσία ζεστού, υγρού, Ν.Α. ανέμου, εμφανιζόταν η ασθένεια. Αυτή η ζέστη ή ο πυρετός, που θεωρήθηκε ως το αίτιο της ασθένειας, ίσως να έδωσε το όνομα "rice blast", ασθένεια πυρετού του ρυζιού, στην ασθένεια.

Η ασθένεια αργότερα καταγράφηκε από πολλούς ερευνητές στην Ιαπωνία από το 1704 και μετά. Στην Ιταλία, ονομάστηκε "brusone" και η πρώτη αναφορά έγινε από τον Astolfi το 1828. Ο Metcalf το 1906, δήλωσε ότι η "rice blast" είχε προκαλέσει καταστροφή στη Νότια Καρολίνα το 1876 και τη θεώρησε ως την πιο σοβαρή από τις 8 καταγεγραμμένες ασθένειες στις Η.Π.Α. το 1907. Ίσως αυτός να ήταν ο πρώτος που την ονόμασε blast στην Αγγλική γλώσσα (Ου ,1987).

Η ασθένεια θεωρείται ότι υπάρχει πρακτικά, σε όλες τις περιοχές, όπου το ρύζι καλλιεργείται εμπορικά και σε μεγάλη κλίμακα, αλλά σε μερικές από αυτές δεν έχει

προκαλέσει μεγάλη καταστροφή. Η ικανότητα προσαρμογής της σε διάφορα περιβάλλοντα είναι αξιοσημείωτη.

Σύμφωνα με τον Ου (1987), ο παθογόνος οργανισμός πήρε το όνομά του το 1891 στην Ιταλία από τον Cavara και περιγράφηκε στην Ιαπωνία από το Shirai το 1896.

2.2 Συμπτώματα

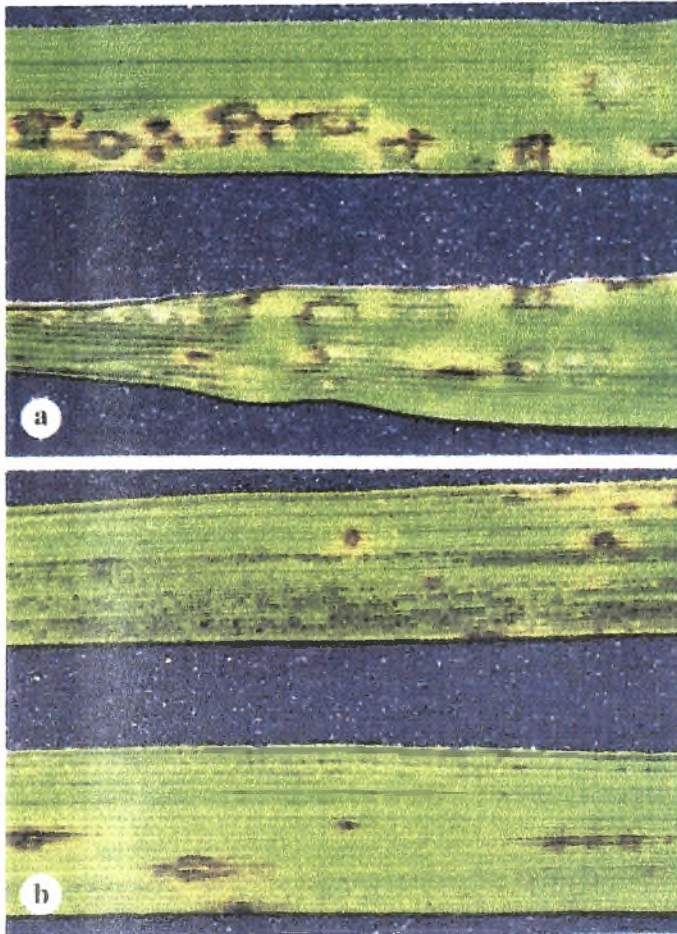
Τα κύρια συμπτώματα της ασθένειας είναι οι κηλίδες ή διαφόρου σχήματος (ωοειδείς, κυκλικοί, επιμήκεις, ακανόνιστοι) τοπικοί μεταχρωματισμοί ή νεκρώσεις στα φύλλα, στους κόμβους, σε διαφορετικά σημεία των σταχυδίων και των καρπών, αλλά σπάνια στον κολεό του φύλλου στη φύση.

Οι κηλίδες του φύλλου είναι τυπικά ελλειπτικές, με περισσότερο ή λιγότερο αιχμηρά άκρα. Το κέντρο των κηλίδων είναι συνήθως γκριζο σκοτεινό ή προς το λευκό και το περιθώριο, συνήθως καστανό ή κόκκινο-καστανό. Τόσο το σχήμα όσο και το χρώμα των κηλίδων, εξαρτώνται από την ηλικία τους, τις περιβαλλοντολογικές συνθήκες και την επιδεκτικότητα της καλλιεργούμενης ποικιλίας του ρυζιού. Οι κηλίδες αρχικά ξεκινούν ως μικρά, υδατώδη λευκά, γκριζο-κυανά σημεία. Στη συνέχεια μεγεθύνονται γρήγορα κάτω από συνθήκες υγρασίας στις ευαίσθητες ποικιλίες, ενώ άλλοτε παραμένουν γκριζα. Το μέγεθος των τοπικών μεταχρωματισμών ή νεκρώσεων, κυμαίνεται από 1-1,5 cm μήκος και 0,3-0,5 cm πλάτος και συνήθως περιβάλλονται από καστανό περιθώριο. Οι μικροί καστανοί μεταχρωματισμοί ονομάζονται χρόνιες κηλιδώσεις ενώ εκείνοι με γκριζο χρώμα, οι οποίοι μεγεθύνονται σημαντικά χαρακτηρίζονται ως οξείες κηλιδώσεις.

Όταν ο αριθμός των κηλίδων πάνω στα φύλλα αυξηθεί πολύ και αργότερα αυτές νεκρωθούν τότε ακολουθεί ξήρανση του κολεού του φύλλου. Τα νεαρά φυτά ή εκείνα που βρίσκονται στο στάδιο του αδερφώματος νεκρώνονται στο χωράφι. Όταν μολύνεται ένας κόμβος του στελέχους, τότε όλα τα μέρη του φυτού πάνω από το μολυσμένο αυτό σημείο, νεκρώνονται. Όταν προσβάλλεται η περιοχή κοντά στη βάση του σταχυδίου τότε δημιουργείται «σήψη λαιμού» και τα σταχύδια συχνά πέφτουν κάτω.

Τα συμπτώματα που κάθε φορά επικρατούν σε μια περιοχή, εξαρτώνται κυρίως από τους κλιματικούς παράγοντες. Οι διαφορές μεταξύ των συμπτωμάτων οφείλονται κυρίως στην υγρασία (Ου, 1987).

Συμπτώματα σε φύλλα ρυζιού από την πυρικοουλαρίωση φαίνονται στην Εικόνα 1



Εικόνα 1. Συμπτώματα σε α) ευαίσθητα και β) ανθεκτικά φυτά

(πηγή: Kurahashi and Potzen, 1998)

2.3 Παθογόνο αίτιο - Συνθήκες αναπτύξεως

Η ασθένεια οφείλεται στο μύκητα *P. oryzae*, που αποτελεί την ατελή μορφή του ασκομύκητα *Magnaporthe grisea*.

Κατάταξη ατελούς μορφής

Βασίλειο : Φυτικό
 Φύλο : Μύκητας
 Κλάση : Αδηλομύκητας
 Τάξη : Moniliales
 Οικογένεια : Moniliaceae
 Γένος : *Pyricularia*
 Είδος : *oryzae*

Κατάταξη τέλειας μορφής

Βασίλειο : Φυτικό
 Φύλο : Μύκητας
 Κλάση : Ασκομύκητας
 Υποκλάση : Ευασκομύκητας
 Γένος : *Magnaporthe*
 Είδος : *grisea*

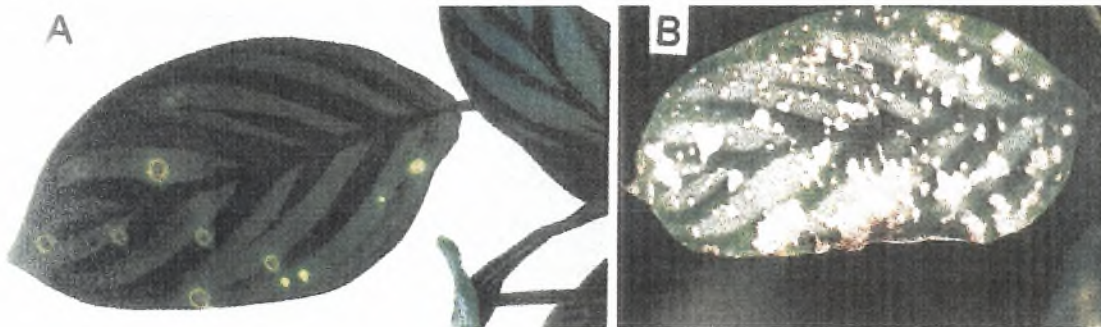
2.3.1 Ξενιστές

Ο μύκητας *P. oryzae* προσβάλλει ένα μεγάλο αριθμό φυτών, καλλιεργούμενων, αλλά και άγριων συγγενών ειδών τους. Το σύνολο των ξενιστών του όπως αναφέρονται από τον Ου (1987), παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Ξενιστές του μύκητα *Pyricularia oryzae* (Ου, 1987)

Ξενιστής	Κοινό όνομα	Οικογένεια	Αναφέρθηκε από τον / τους
<i>Oryza sativa</i>	Ρύζι	Gramineae	Soong Ying-shin (1637)
<i>Hordeum vulgare</i>	Κριθάρι	"-	Sawada (1917), Taiwan
<i>Triticum</i> sp.	Σιτάρι	"-	"-
<i>Zea mays</i>	Καλαμπόκι	"-	Andersen et al., (1947) Η.Π.Α.
<i>Digitaria sanguinalis</i>	Αιματόχορτο		Hori (1898), Ιαπωνία
<i>Festuca arundinacea</i>	Χλοοτάπητας		Narita et al., (1956)
<i>F. elatior</i>	"-		"-
<i>Lolium perenne</i>	Χλοοτάπητας		Narita et al., (1956)
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	"-		"-
<i>Zingiber officinale</i>	Κοινή πιπερόριζα	Zingiberaceae	Nisikado (1926)
<i>Z. mioga</i>	Άγρια πιπερόριζα	"-	"-
<i>Musa sapientum</i>	Μπανάνα	Musaceae	Stehle (1954), Hoette (1936), Wardlaw (1940), Meredith (1962)
<i>Cyperus rotundus</i>	Κύπερη	Cyperaceae	Letterell (1954)
<i>C. compressus</i>		"-	Thirumalachar et al., (1956)
<i>Arundo donax</i>	Μεγάλο καλάμι		Srinivasanand Vijayalakshmi (1957)
<i>Phragmites communis</i>	Κοινό καλάμι		Kuribayashi et al., (1956)
<i>Saccharum officinarum</i>	Ζαχαροκάλαμο		
<i>Cynodon dactylon</i>	Αγριάδα		
<i>Hystrix patula</i>			Sprague (1950)

Οι Pappas και Paplomatas (1998) ανέφεραν ότι ο μύκητας προσβάλλει καλλωπιστικά φυτά της οικογένειας Marantaceae και συγκεκριμένα τα είδη *Ctenanthe oppenheimiana* και *Ctenanthe setosa* "Greystar". Η ασθένεια είναι εξαιρετικά καταστρεπτική σε συνθήκες θερμοκηπίου. Τα συμπτώματα και στα δύο είδη είναι παρόμοια: αρχικά εμφανίζονται στα φύλλα μεμονωμένες κυκλικές έως ελαφρά ακανόνιστες κηλίδες, διαμέτρου 1-3 mm. Στο φως παρουσιάζουν λευκό νεκρωτικό κέντρο με καλοσχηματισμένη, στενή, υδαρή, καστανοκίτρινη άλω. Στα ώριμα φύλλα οι πρωταρχικές κηλίδες γίνονται λευκές και νεκρωτικές πριν αποκτήσουν διάμετρο 3-8 mm. Τα μετέπειτα συμπτώματα (μαρασμός, νεκρωτικές περιοχές) μοιάζουν με συμπτώματα φυτοτοξικότητας από λίπασμα ή χημικά μέσα. Τα συμπτώματα φαίνονται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2. Συμπτώματα ασθένειας από τον μύκητα *P. oryzae* σε *Ctenanthe oppenheimiana*

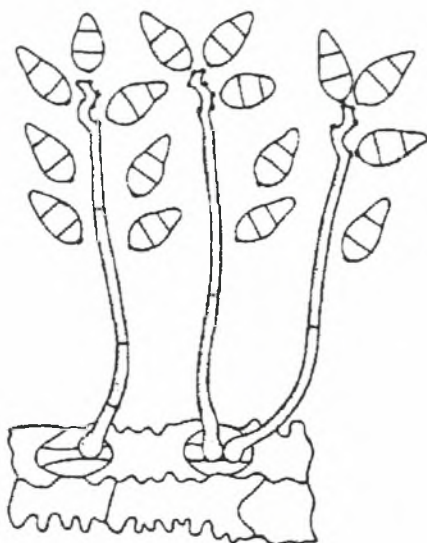
A) Αρχικές κηλίδες μόλυνσης B) Ωριμο φύλλο με εκτεταμένη νέκρωση

(Από: Pappas & Paplomatas, 1998).

2.3.2 Μορφολογία

Οι απομονώσεις που προσβάλλουν το ρύζι έχουν υφές λίγο λεπτές στη βάση, με όχι τόσο ξεκάθαρα ή χωρίς καθόλου διαφράγματα (septa), μήκους 60-120 μm, πλάτους 405 μm και χρώματος τεφρού. Οι κονιδιοφόροι παράγονται σε ομάδες από κάθε στομάτιο, σπάνια μεμονωμένοι, με 2-4 διαφράγματα. Ο κάθε κονιδιοφόρος φέρει 1-20 κονίδια, τα περισσότερα από τα οποία υπάρχουν στα άκρα νέων διακλαδώσεων. Τα κονίδια ποικίλουν σε μέγεθος και σχήμα. Συνήθως είναι στρογγυλεμένα στη βάση, στενά στην κορυφή με 2 ή 3 διαφράγματα κάποιες φορές συσφιγμένα στα σημεία των διαφραγμάτων, σχεδόν υαλώδη και χρώματος ανοιχτού λαδί, συνήθως διαστάσεων 19-23 x 7-9 μm με ένα μικρό εξάρτημα στη βάση τους, διαστάσεων 1,6-2,4 μm. Το μέγεθος των κονιδίων όπως αναφέρθηκε ποικίλει και εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος μεταξύ των απομονώσεων (Ου, 1987).

Τυπικός κονιδιοφόρος του μύκητα *P. oryzae* και κονίδια, φαίνονται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1. *Pyricularia oryzae*, κονίδια και κονιδιοφόροι x 500 (από Dr. M.B. Ellis).

(Πηγή: Ου, 1987)

Η μορφολογία της αποικίας ποικίλει σημαντικά μεταξύ των απομονώσεων και των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται. Το ποσό του εναέριου μυκηλίου ποικίλει από πολύ λίγο έως μία λεπτή βαμβακώδης μάζα, χρώματος λευκού ή κρεμ, ομοιόμορφο, ροζέ, γκριζο έως σκοτεινό λαδί.

Ο μύκητας θεωρείται ότι είναι ετερόθαλλος και για την εγγενή αναπαραγωγή του απαιτείται η συνύπαρξη αμοιτέρων των συζευκτικών τύπων, δηλαδή των Α και Β. Η παρουσία μόνο τύπων Α μεταξύ απομονώσεων ρυζιού, είναι ο λόγος αποτυχίας παραγωγής της τέλει μορφής, δηλαδή του ασκομύκητα. Κατά την τέλεια μορφή σχηματίζονται περιθήκια απλά ή σε ομάδες, μερικώς ή τελείως θαμμένα με μακρύ ράμφος προεξέχοντας από την επιφάνεια, χρώματος σκούρου καφέ ή μαύρου, με υαλώδες ράμφος, αργότερα γίνονται καστανωπά με διαστάσεις 90 (60-150) x 600 (100-1200) μm και με μεγάλο μήκος υπό μορφή κροσσών παραφύσεις που καλύπτουν εσωτερικά την οστίολη του περιθηκίου. Στα περιθήκια αναπτύσσονται κυλινδρικοί έως υποροπαλοειδείς ασκοί ενωμένοι στη βάση τους με λεπτά τοιχώματα και δακτύλιο γύρω από τον πόρο της κορυφής, μεγέθους 8,5 (7-10) x 70 (55-90) μm. Οι ασκοί απελευθερώνουν υαλώδη, ασκοσπόρια, με 3 διαφράγματα, λίγο ή καθόλου σύσφιξη σ'αυτά, συνήθως ελαφρώς κεκαμμένα, διαστάσεων 5 (4-7) x 21 (17-24) μm.

Η διαχείμαση του μύκητα, σε εύκρατες περιοχές, γίνεται υπό μορφή μυκηλίου ή κονιδίων σε προσβλημένα στελέχη, καλάμια και σπόρους, ίσως σε χειμερινά σιτηρά αλλά και ζιζάνια που αποτελούν ξενιστές. Τα διαχειμάζοντα κονίδια μολύνουν εύκολα το φυτό, ενώ για να παραχθούν κονίδια από το μυκήλιο, απαραίτητη είναι η παρουσία νερού.

Στον αγρό, η πιο συνήθης πηγή μόλυνσης είναι το στέλεχος του φυτού. Κάτω από ξηρές συνθήκες και σε θερμοκρασία δωματίου τα κονίδια επιζούν για περισσότερο από ένα χρόνο, ενώ το μυκήλιο για περίπου 3 χρόνια. Στις τροπικές περιοχές, η διαχείμαση δεν είναι απαραίτητη εξαιτίας της συνεχούς παραγωγής κονιδίων καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου. Ο μύκητας επιζεί σε προσβλημένα φυτά ρυζιού και άλλους ξενιστές σε οποιαδήποτε περίοδο του χρόνου (Ou, 1987).

Για την ολοκλήρωση του κύκλου της ασθένειας και την εξάπλωσή της από φυτό σε φυτό απαιτούνται οι ακόλουθες συνθήκες:

α) Παραγωγή σπορίων και μεταφορά. Τα κονίδια παράγονται πάνω στις κηλίδες των φυτών του ρυζιού, περίπου 6 ημέρες μετά τη μόλυνση. Το ποσοστό παραγωγής σπορίων αυξάνει με την αύξηση της σχετικής υγρασίας, ενώ αν αυτή είναι μικρότερη του 93% δεν παράγονται κονίδια. Όπως αναφέρει ο Ou (1987), μία τυπική κηλίδα είναι ικανή να παράγει 2000-6000 κονίδια ημερησίως για 14 ημέρες κάτω από συνθήκες εργαστηρίου. Περισσότερα από τα σπόρια παράγονται και ελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της νύκτας ειδικά μεταξύ 2 και 6 μ.μ. Ο Suzuki το 1970 υποστήριξε ότι η απελευθέρωση των σπορίων γίνεται με τον άνεμο και η απόσταση μεταφοράς είναι τόσο μεγαλύτερη, όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του ανέμου, ενώ η βροχή εμποδίζει τη διασπορά τους (Ou, 1987).

β) Βλάστηση σπορίων και μόλυνση. Η μόλυνση ακολουθεί τη βλάστηση των κονιδίων και το σχηματισμό της πλάκας συγκράτησης (appressorium), την παραγωγή σωλήνων μόλυνσης και τη διείσδυση διαμέσου της επιδερμίδας. Η μόλυνση με υφή γίνεται δια μέσου των στομάτων.

Άριστη θερμοκρασία βλάστησης σπορίων είναι 26-28°C και για τη βλάστησή τους απαιτείται η παρουσία ελεύθερου νερού.

Η άριστη θερμοκρασία μόλυνσης συμπίπτει με αυτή της ανάπτυξης μυκηλίου, παραγωγής και βλάστησης σπορίων και σχηματισμού appressorium και είναι 28°C. Ο Anderson και οι συνεργάτες του το 1947, βρήκαν ότι η μέγιστη μόλυνση στα φυτά γίνεται σε θερμοκρασία 24-28°C και συνεχής διαβροχή με υψηλή σχετική υγρασία για 16-24h. Μόλυνση γίνεται πιο εύκολα στο σκοτάδι και καταστέλλεται κάτω από διάχυτο φως.

Ο Hashioka το 1965 υποστήριξε ότι ο χρόνος που απαιτείται για την εισβολή των κονιδίων στον ξενιστή εξαρτάται από τη θερμοκρασία και είναι 10h στους 32°C, 8h στους 28°C, 6h στους 26°C. Ο Hemmi και οι συνεργάτες του το 1936, βρήκαν ότι η περίοδος

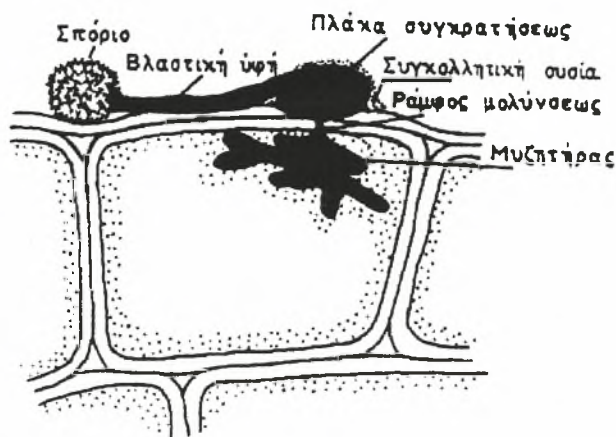
επάασης ποικίλει με τη θερμοκρασία και είναι 13-18ημ. στους 9-10⁰C, 7-9 ημ. στους 17-18⁰C, 5-6 ημ. στους 24-25⁰C και 4-5 ημ. στους 26-28⁰C

Η ανάπτυξη της ασθένειας, περιορίζεται στο σκοτάδι. Η εισβολή στους ξενιστές γίνεται κυρίως μέσω του *appressorium* (Ου, 1987).

2.3.3 Διαδικασία μόλυνσης

Διάφοροι τρόποι και διαδικασίες μόλυνσης απαντώνται στους μύκητες για την είσοδο στον ξενιστή συμπεριλαμβανομένης και της δημιουργίας ενός ειδικού μολυσματικού κυττάρου, του *appressorium*.

Μετά τη βλάστηση του σπορίου, το άκρο του βλαστικού σωλήνα (ή βλαστικής υφής) δίνει ένα πεπλατυσμένο σχηματισμό, που ονομάζεται πλάκα συγκρατήσεως ή *appressorium*. Ο ρόλος του οργάνου αυτού, δεν είναι απόλυτα γνωστός, αλλά γίνεται παραδεκτό ότι με το *appressorium* ο μύκητας προσκολλάται πάνω στον ξενιστή. Ακολουθώντας τον σχηματισμό του *appressorium*, ένα πυκνό στρώμα από συνδεδεμένα κατά μήκος υλικά και μελανίνη, εξαπλώνονται πάνω στο προϋπάρχων τοίχωμα του μυκηλιακού μη διαφοροποιημένου κυττάρου. Αυτό κρατιέται στη θέση του με προσκολλητικές ουσίες, που βρίσκονται στην επιδερμίδα του φυτού. Στην κάτω επιφάνεια του *appressorium*, αυτή που βρίσκεται σε επαφή με το φυτό, δημιουργείται μια λεπτή εκβλάστηση, το ράμφος εισόδου ή ράμφος μόλυνσεως. Το τοίχωμα του ράμφους είναι επιδεκτικό διατάσεως ενώ του *appressorium* όχι και έτσι όλη η οσμωτική πίεση του εσωτερικού ασκείται στην άκρη του ράμφους. Καθώς το *appressorium* δεν μπορεί να αποκολληθεί από την επιφάνεια του φυτού και να απομακρυνθεί, η λεπτή άκρη του ράμφους κατορθώνει να αυξηθεί περνώντας, προφανώς με το χαλάρωμα των μακρομορίων μέσα από την εφυμενίδα και το κυτταρικό τοίχωμα. Μετά το πέρασμα των στρωμάτων αυτών, η υφή αποκτά το κανονικό πάχος και είτε προχωρεί στα γειτονικά κύτταρα, είτε σχηματίζει μυζητήρα (Σχήμα 2), (Γεωργόπουλος, 1984).



Σχήμα 2. Διαγραμματική απεικόνιση της μόλυνσεως ενός επιδερμικού κυττάρου φύλλου από μύκητα, που τρέφεται με μυζητήρες.

(Πηγή: Γεωργόπουλος, 1984)

Κάτω από ευνοϊκές συνθήκες, η διείσδυση ολοκληρώνεται σε 12-24h. Πρόσφατα διαπιστώθηκε μια ισχυρή σχέση μεταξύ του βαθμού υδροφοβικότητας της επαπτόμενης επιφάνειας και του σχηματισμού του απρεσσορίου. Κάτω από πειραματικές συνθήκες, δεν παρατηρείται σχηματισμός απρεσσορίων σε καθαρές γυάλινες επιφάνειες (Dean et al, 1996). Είναι πιθανόν όμως, το κερί από τα επιθέματα που χρησιμοποιούνται σε μερικές μελέτες, να επιδράσουν στην υδροφοβικότητα της επιφάνειας ή να έχουν άμεση χημική επίδραση.

Πράγματι, πρόσφατες έρευνες στις οποίες εξετάστηκαν τα κηρώδη συστατικά της φυτικής επιδερμίδας, προσδιορίστηκαν συγκεκριμένες ενώσεις που επιδρούν στο σχηματισμό απρεσσορίου (Dean et al., 1996).

2.3.4 Βιοσύνθεση της μελανίνης

Το παθογόνο *P. oryzae* ανήκει στην ομάδα των μυκήτων που συνθέτουν μελανίνη. Πρόκειται για μια ουσία η οποία προσδίδει σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα στις αποικίες των ασκομυκήτων και ατελών μυκήτων που τη σχηματίζουν και είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του απρεσσορίου.

Σε πολλούς μύκητες, όπως και στον *P. oryzae*, το ράμφος μόλυνσης επιτυγχάνει με μηχανική πίεση το πέρασμα των κηρωδών στρωμάτων, ώστε να γίνει δυνατή η επαφή του

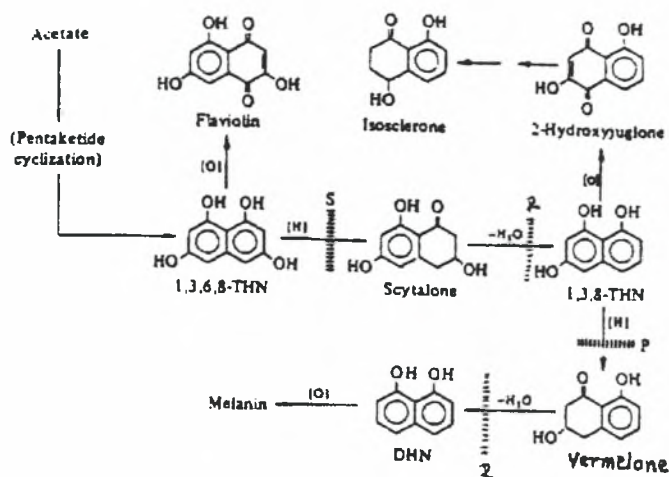
ενζύμου κουτινάση με την κουτίνη (ή υμενίνη) της εφουμενίδας. Για να επιτευχθεί όμως η απαιτούμενη πίεση στην άκρη του ράμφους μολύνσεως, πρέπει τα τοιχώματα του υπόλοιπου *apressorium* να είναι χονδρά και σκληρά ώστε να μην υποχωρούν στην οσμωτική πίεση. Η εναπόθεση μελανίνης είναι απαραίτητη για τη σκλήρυνση των τοιχωμάτων του *apressorium*.

Είναι χαρακτηριστικό ότι μόνο τα απρεσόρια που έχουν μελανίνη είναι ικανά να οδηγήσουν σε ικανοποιητική μόλυνση με μυκήλιο στην επιδερμίδα του φύλλου. Αυτή η σπουδαιότητα της μελανίνης για την παθογένεια του *P. oryzae*, κάνει τη βιοσύνθεσή της ένα ενδιαφέρον αντικείμενο για την έρευνα ουσιών που παρεμποδίζουν το σχηματισμό της (Kurahashi and Pontzen, 1998).

Η βιοσύνθεση της μελανίνης μελετήθηκε σε 26 είδη μυκήτων που ανήκουν σε 16 γένη, χρησιμοποιώντας τον παρεμποδιστή της μελανίνης *tricyclazole* [5-menthyl-1,2,4-triazolo (3,4b)-benzothiazole] και σε ενζυμικές αντιδράσεις σε μη ζώντα κυτταρικά συστήματα (*homogenates*).

Όλοι, εκτός από έναν, από τους 20 σκουρόχρωμους καστανούς και μαύρους ασκομύκητες και ατελείς μύκητες προφανώς κάνουν μελανίνη από 1,8-dihydroxynaphthalene. Οι μη κυτταρικοί ομοιογενοποιημένοι μύκητες (*homogenates*) μεταβολίζουν 2 ή 3 συστατικά μελανίνης (1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene, (+)-scytalone, 1,3,8-trihydroxynaphthalene ή *vermelone*) σε μεσολαβητές στη διαδικασία βιοσύνθεσης της μελανίνης συμπεριλαμβανομένου και του 1,8-dihydroxynaphthalene. Η διαδικασία διακόπτεται *in vivo* από το *tricyclazole* προκαλώντας αλλαγή στο χρώμα του μύκητα και συσσώρευση 2-hydroxyjuglone, *flaviolin* και άλλων προϊόντων μελανίνης.

Κατά τη διαδικασία βιοσύνθεσης της μελανίνης, τα 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalene, (1,3,6,8-THN), (+)-scytalone, 1,3,8-trihydroxynaphthalene (1,3,8-THN), (-)-*vermelone* και 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN), είναι ενδιάμεσα προϊόντα στη βιοσύνθεσή της και σχηματίζονται κατά τη διαδικασία βιοσύνθεσης του πεντακετιδίου (*pentaketide*). Οι *flaviolin* και 2-hydroxyjuglone (2-Hj) είναι κύρια προϊόντα της διαδικασίας και σχηματίζονται από αυτοοξειδωση των 1,3,6,8-THN και 1,3,8-THN, αντίστοιχα και η συσσώρευσή τους προσδίδει κόκκινο χρώμα στην καλλιέργεια (Wheeler, 1983). Η διαδικασία βιοσύνθεσης της μελανίνης φαίνεται στο σχήμα 3.



Σχήμα 3. Διαδικασία βιοσύνθεσης μελανίνης από πεντακετίδιο (Pentaketide) σε *V. dahlie*, *P. oryzae*, και *T. Basicola*. Πρωτογενείς (P) και δευτερογενείς (S) περιοχές παρεμπόδισης από το tricyclazole, όπως προτάθηκαν από τους Tokousbalides & Sisler (1979) και Woloshuk et al. (1980) σε *V.dahlie* και *P. oryzae* αντίστοιχα, ενώ R είναι οι περιοχές παρεμπόδισης από το carpropramid. 1,3,6,8-THN = 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene, 1,3,8-THN = 1,3,8-trihydroxynaphthalene, DHN = 1,8-dihydroxynaphthalene.

(Πηγή: Wheeler, 1983 & Kurahashi et al.,1997)

2.3.5 Προϊόντα μεταβολισμού

Οι Tamari και Kazi το 1954, απομόνωσαν δύο τοξίνες από σοβαρά προσβλημένους ιστούς φυτών ρυζιού. Η μια από αυτές ονομάστηκε α-πικολινικό οξύ, (M.T $C_6H_5NO_2$) και η άλλη πυρικουλαρίνη (M.T $C_{18}H_{14}N_2O_3$). Οι τοξίνες αυτές εμποδίζουν την ανάπτυξη των νεαρών φυτών του ρυζιού καθώς και τη βλάστηση των κονιδίων (Ου,1987).

Όταν ο μύκητας αναπτύσσεται σε συνθετικό υπόστρωμα, παράγει μεγάλη ποσότητα λιπαρών αμινοξέων όπως βαλίνη, σερίνη, αλανίνη και οξικά αμινοξέα όπως γλουταμινικό και ασπαρτικό οξύ. Ετεροκυκλικά, αρωματικά αμινοξέα και θειαμινικά οξέα παράγονται μόνο σε μικρές ποσότητες. Οι ποσότητες που παράγονται ποικίλουν με τις απομονώσεις. Ενώ ο οργανισμός απαιτεί βιταμίνες σε ποικίλα ποσά, παράγει θειαμίνη σε ποικίλες ποσότητες. Επίσης, παράγονται ριβοφλαβίνη, πανθοθενικό οξύ, φολικό οξύ και βιταμίνη Β-6 ενώ H_2S δεν παράχθηκε σε καμία απομόνωση.

Σε ότι αφορά τις μυκηλιακές πρωτεΐνες, απομονώθηκε πρωτεΐνάση, κελουλόζη και β-γλυκοσιδάση (Ου,1987).

2.4 Επιδημιολογία

Επιδημία ονομάζεται η γρήγορη αύξηση του ποσού της ασθένειας σε σχέση με το χρόνο.

Η ένταση της επιδημίας καθορίζεται κυρίως από την αφθονία των κονιδίων, την επίδραση των περιβαλλοντολογικών συνθηκών κατά τη διαδικασία της μόλυνσης και την ανθεκτικότητα των φυτών - ξενιστών. Αυτοί οι τρεις παράγοντες επηρεάζονται όχι μόνο από τις μετεωρολογικές συνθήκες αλλά από τις ποικιλίες και τη χρήση καλλιεργητικών συνθηκών, ώστε η ανάπτυξη της ασθένειας να γίνεται πολύπλοκη.

Αναπαραγωγή και διάδοση του μύκητα της πυρικούλαρίωσης είναι μεγαλύτερες σε υψηλή υγρασία και σχετικά χαμηλή θερμοκρασία (21-24⁰C) όπως ανέφεραν οι Kuribayashi et al., το 1952. Αν η θερμοκρασία είναι μεγαλύτερη των 31⁰C κατά τη διάρκεια του σταδίου αναπτύξεως, τα φυτά του ρυζιού γίνονται ανθεκτικά στην ασθένεια. Κατά τη διάρκεια μεγάλων περιόδων συνεφιασμένου και βροχερού καιρού, η ανάπτυξη και ανθεκτικότητα των φυτών ρυζιού ελαττώνονται. Ισχυροί άνεμοι, κατακλύσεις αγρών με ψυχρό νερό και ξηρασία μπορούν να μειώσουν την ανθεκτικότητα των φυτών και έτσι οδηγούν στην ανάπτυξη επιδημιών (Suzuki, 1975).

2.5 Απώλειες και οικονομική σημασία

Η πυρικούλαρίωση θεωρήθηκε ως η κυριότερη ασθένεια του ρυζιού εξαιτίας της ευρύτατης κατανομής της ανά την υφήλιο και της καταστρεπτικότητάς της κάτω από ευνοϊκές συνθήκες.

Όταν προσβάλλονται νεαρά φυτά ή φυτά στο στάδιο του αδελφώματος, συχνά νεκρώνονται τελείως. Η άφθονη μόλυνση των ταξιανθιών είναι επιζήμια για τη σοδειά του ρυζιού.

Κάποιες περιπτώσεις απωλειών έχουν αναφερθεί κατά καιρούς σε διάφορες περιοχές: Το 1960 στην Ιαπωνία υπολογίστηκαν απώλειες στη σοδειά σε 273.300 τόννους, που αντιπροσωπεύουν το 24,8% περίπου των συνολικών απωλειών εξαιτίας εντομολογικών προσβολών, άλλων ασθενειών, ζημιών από παγετούς, τυφώνες και πλημμύρες. Σε μια επιδημική χρονιά, το 1953, οι απώλειες ανήλθαν σε 800.000 τόννους. Κατά τη διάρκεια της περιόδου 1953 έως 1960, οι ετήσιες απώλειες κυμάνθηκαν από 1,4% έως 7,3% με μέσο όρο 2,98% της συνολικής σοδειάς, παρόλο που εφαρμόστηκε εκτενής χημική καταπολέμηση (Ου, 1987).

Αναφέρεται ότι όσο νωρίτερα γίνει η μόλυνση, τόσο μεγαλύτερη είναι η απώλεια. Μεγάλες απώλειες επίσης συμβαίνουν όταν μολυνθούν τα κύρια στελέχη των ταξιανθιών. Η προσβολή των φύλλων, είναι μικρότερης σημασίας από εκείνης των ταξιανθιών και προκαλεί εμπόδιο στην ανάπτυξη των φυτών, μείωση του αριθμού των ώριμων ταξιανθιών, μείωση του βάρους των κόκκων κ.λ.π. (Ου, 1987).

3. Καταπολέμηση

3.1 Γενικά

Στην Ιαπωνία κάθε χρόνο, οι ασθένειες του ρυζιού προκαλούν 1-7% απώλειες της παραγωγής ενώ οι απώλειες οφειλόμενες στο μύκητα *P. oryzae* είναι υψηλότερες απ' όλες τις άλλες και κυμαίνονται από 0,5-5,6% (Koizumi, 1998).

Η καταπολέμηση της πυρικούλαρίωσης αποτέλεσε αντικείμενο μελετών από τις αρχές του αιώνα και ακολούθησε την εξέλιξη της τεχνολογίας για την εύρεση αποτελεσματικότερων τρόπων αντιμετώπισης. Στην Ελλάδα η ασθένεια δεν αποτελεί σοβαρό πρόβλημα της καλλιέργειας του ρυζιού, λόγω της ικανοποιητικής αντιμετώπισής της με ανθεκτικές ποικιλίες, μειωμένες εισροές αζωτούχων λιπασμάτων, απολύμανση του σπόρου και αμειψισπορά, ωστόσο η καταπολέμησή της διεθνώς αποτελεί σοβαρό πρόβλημα και επικεντρώνεται κυρίως στη χρήση χημικών μέσων.

Η ιστορία και οι τρόποι καταπολέμησης της ασθένειας περιγράφονται αναλυτικά στις παραγράφους που ακολουθούν.

3.2 Τρόποι καταπολέμησης

Οι κυριότεροι τρόποι καταπολέμησης της πυρικούλαρίωσης που εφαρμόστηκαν, είναι η εφαρμογή κατάλληλων καλλιεργητικών μεθόδων, η χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών και η εφαρμογή χημικής καταπολέμησης τόσο με συμβατικά μυκητοκτόνα, όσο και με μυκητοκτόνα με ειδικό τρόπο δράσης, όπως οι στρουμπιλουρίνες.

3.2.1 Καλλιεργητικές πρακτικές

Ο χρόνος φύτευσης έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντικός παράγων στην ανάπτυξη της ασθένειας. Πρώιμες φυτεύσεις στην Ιαπωνία συχνά εμφανίζουν μικρότερο βαθμό προσβολής απ' ότι οι όψιμες. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι στις πρώιμες φυτεύσεις η θερμοκρασία του αέρα είναι πολύ χαμηλή στο στάδιο του αδελφώματος και πολύ υψηλή στο στάδιο του ξεσταχιάσματος για την ανάπτυξη της ασθένειας όπως προκύπτει από τις έρευνες του Hashioka και των Kuribayashi & Ichikawa που έγιναν το 1950 (Ου, 1987).

Ποικίλα είδη και ποσότητες λιπασμάτων επιδρούν στην ανάπτυξη της ασθένειας.

Συγκεκριμένα, τα αζωτούχα λιπάσματα έχουν μη καθορισμένη επίδραση και οι αγρότες συχνά έχουν απορρίψει τις προσθήκες αζωτούχων λιπασμάτων για να αποφύγουν σοβαρές εξάρσεις της ασθένειας. Δεν πρέπει να αγνοείται όμως, σύμφωνα με τον Kozaka (1965), ότι ο τύπος του εδάφους πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψη σε σχέση με τα είδη και τις ποσότητες των λιπασμάτων που προστίθενται (Ου, 1987).

Ο έλεγχος του αρδευτικού νερού έχει επίσης αποτελέσει μέσο μείωσης της ζημιάς από την ασθένεια. Στην Ιαπωνία, αν η θερμοκρασία του νερού άρδευσης είναι 20°C ή και χαμηλότερα, συνήθως παρατηρείται αύξηση στην παρουσία της ασθένειας. Ο χρόνος στον οποίο το αρδευτικό νερό στραγγίζει, επιδρά επίσης στην ανάπτυξη της ασθένειας. Ο έλεγχος του νερού άρδευσης αποτελεί μέρος ολοκληρωμένου ελέγχου της ασθένειας στην Κίνα.

Στην Ιαπωνία, μεταφύτευση των φυταρίων σε βάθος, έχει βρεθεί ότι καθυστερεί την ανάπτυξή τους, την ωρίμανση, μειώνει την παραγωγή και προκαλεί μεγαλύτερη μόλυνση από την ασθένεια. Η σοβαρότητά της συχνά αυξάνει και με την πυκνή φύτευση.

3.2.2 Ανθεκτικές ποικιλίες

3.2.2.1 Αντιδράσεις άμυνας του φυτού

Στις σχετικά ανθεκτικές ποικιλίες παρατηρείται ένας αριθμός αντιδράσεων άμυνας για να εμποδιστεί η εξάπλωση της πυρικούλαριώσης. Ο σπουδαιότερος ίσως μηχανισμός άμυνας των φυτών, είναι η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών αμέσως μετά τη μόλυνση, όπως περοξειδάσες, φαινολικές ουσίες και τοξικά γλυκοσίδια. Στην περίπτωση αυτή υπάγεται και η αντίδραση υπερευαισθησίας (hypersensitive reaction ή HR) που χαρακτηρίζεται από γρήγορο θάνατο μερικών κυττάρων του ξενιστή και συσσώρευση τοξικών ουσιών χαμηλού M.B., των φυτοαλεξινών, στον τόπο εισόδου του παθογόνου (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

3.2.2.2 Φύση της ανθεκτικότητας

Η αντιμετώπιση μίας ασθένειας με καλλιέργεια ποικιλιών που δεν προσβάλλονται σε βαθμό που να προκαλείται οικονομική ζημιά, φαίνεται αρχικά να αποτελεί τον ιδανικότερο τρόπο καταπολέμησης. Η δημιουργία όμως ανθεκτικών ποικιλιών, αφ' ενός μεν απαιτεί πολλή προσπάθεια, αφ' ετέρου δε, δίνει πολλές φορές μόνο πρόσκαιρα αποτελέσματα.

Η ανθεκτικότητα θα μπορούσε να περιγραφεί από άποψη λειτουργική και από άποψη γενετική. Από λειτουργική άποψη έχουμε εξειδικευμένη ανθεκτικότητα, όπου ο μηχανισμός αντοχής είναι αποτελεσματικός μόνον εναντίον ενός βιοτύπου ή εναντίον μικρού αριθμού βιοτύπων ή φυσιολογικών φυλών του παρασίτου και την γενική ανθεκτικότητα, όπου δεν υπάρχει εξειδίκευση και υπάρχει σχετική αντοχή σε όλους τους βιότυπους του παθογόνου (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

3.2.2.3 Προσδιορισμός της ενδοποικιλιακής ανθεκτικότητας

Ο υπολογισμός της ενδοποικιλιακής ανθεκτικότητας στην ασθένεια, σύμφωνα με τον Ου(1987), είναι πολύπλοκος εξαιτίας της εξαιρετικά μεγάλης ποικιλομορφίας του παθογόνου οργανισμού, τις διαφορές παθογόνου ικανότητας των φυλών στο χωράφι, σε περιοχή και χρόνο, διαφορές στο επίπεδο και τον τύπο της ανθεκτικότητας στις καλλιεργούμενες ποικιλίες ρυζιού και περιβαλλοντολογικούς παράγοντες που επιδρούν στην εκδήλωση της ανθεκτικότητας.

Για να επιτευχθεί μια πιο ακριβής προσέγγιση του βαθμού της ανθεκτικότητας ή της ευαισθησίας απ' ότι είναι πιθανόν να γίνει από παρατήρηση στο χωράφι και για το χειρισμό μεγάλου αριθμού καλλιεργούμενων ποικιλιών σε μικρό χρονικό διάστημα, ευνοϊκές και ομοιόμορφες περιβαλλοντολογικές συνθήκες πρέπει να προωθηθούν για τη βέλτιστη ανάπτυξη της ασθένειας. Πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τον ενδοποικιλιακό πειραματισμό στο χωράφι και την τεχνητή μόλυνση στο θερμοκήπιο. Επίσης, έχουν περιγραφεί πολλές κλίμακες για τη μέτρηση του βαθμού της ανθεκτικότητας και της ευαισθησίας. Η μέτρηση της ανθεκτικότητας, μπορεί να γίνει είτε σε πειράματα στο χωράφι είτε με τεχνητή μόλυνση στο θερμοκήπιο.

3.2.2.4 Κριτήρια και κλίμακες ανθεκτικότητας ή ευαισθησίας.

Οι ανθεκτικές ποικιλίες δεν εμφανίζουν συμπτώματα (τύπος 0) ή εμφανίζουν από μικροσκοπικά καστανά στίγματα (τύπος 1) έως μεγάλες καστανές κηλίδες διαμέτρου περίπου 1mm (τύπος 2).

Οι μέσης ανθεκτικότητας ποικιλίες εμφανίζουν περισσότερο ή λιγότερο κυκλικές περιορισμένες κηλίδες (lesions), διαμέτρου 2-3 mm, με γκρί κέντρο και καστανό περιθώριο (τύπος 3).

Οι ευαίσθητες ποικιλίες παράγουν ελλειπτικές κηλίδες, μήκους 1-2cm, με γκρί κέντρο και καστανό περιθώριο (τύπος 4) και στην περίπτωση των πολύ ευαίσθητων ποικιλιών, εμφανίζονται μεγάλες φαρδιές ελλειπτικές κηλίδες (τύπος 5). Τα καστανά περιθώρια αναπτύσσονται στα μετέπειτα στάδια ανάπτυξης των κηλίδων ή κάτω από λιγότερο ευνοϊκές συνθήκες. Κίτρινη άλως παρατηρείται κυρίως όταν τα φυτά παραμένουν στο σκοτάδι ή λαμβάνουν λιγιστό φως. Αυτοί οι τύποι των κηλίδων χρησιμοποιούνται ως κριτήρια για τον υπολογισμό της ενδοποικιλιακής αντίδρασης.

Βασισμένοι στον τύπο, το χρώμα και τον αριθμό των κηλίδων οι ερευνητές έχουν σχεδιάσει ποικίλες κλίμακες για τον προσδιορισμό των βαθμών ανθεκτικότητας ή των τύπων δράσης (Ου,1987).

3.2.2.5 Τεχνητή ανθεκτικότητα

Πολλές προσπάθειες έγιναν από εργαστήρια διαφορετικών χωρών με σκοπό την εισαγωγή ανθεκτικότητας στην ασθένεια με ακτινοβολία. Χρησιμοποιήθηκαν ακτίνες -X και ακτίνες -γ. Γενικά τα ακτινοβολημένα φυτά είχαν υψηλότερη ανθεκτικότητα από τους μάρτυρες, αλλά τελικά δεν επιτεύχθηκε υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας. Υπάρχουν και ορισμένες αναφορές για δημιουργία ανθεκτικότητας με χημικά μέσα.

Ακολουθώντας τις ανακαλύψεις τους ότι ο ψεκασμός με παράγωγα αμινοξέων επιδρά στον έλεγχο της ασθένειας, ο Arimoto και οι συνεργάτες του το 1976 ανέφεραν ότι η εμφάνιση σπόρων ρυζιού σε dodecyl DL-alaninate hydrochloride παρήγαγε φυτάρια ανθεκτικά στη μόλυνση, κυρίως όταν τα φυτάρια ήταν ηλικίας 20-30 ημερών (Ou, 1987).

3.2.2.6 Βελτίωση για ανθεκτικότητα

Η βελτίωση των ποικιλιών για ανθεκτικότητα αφορά την ενσωμάτωση νέων γόνων ανθεκτικότητας με κατάλληλες διασταυρώσεις στις επιθυμητές ποικιλίες. Πηγή γόνων ανθεκτικότητας μπορούν να αποτελέσουν οι πρόγονοι των καλλιεργούμενων ειδών ή οι πρωτόγονες ποικιλίες τους καθώς και οι πληθυσμοί άλλων φυτικών ειδών του ίδιου γένους ή διαφορετικών γενών, όταν βέβαια προκύπτουν γόνιμα υβρίδια ή υβρίδια που στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται αγενώς.

Οι προσπάθειες βελτίωσης που έλαβαν χώρα στην Ιαπωνία (έτος έναρξης 1927), ΗΠΑ (1959), Ινδία (1920, υβριδισμός 1927-28), Ταϊβάν και Ταϊλάνδη (1959), στηρίχθηκαν κυρίως σε διασταυρώσεις μεταξύ ποικιλιών είτε ντόπιων, είτε από εισαγωγή ξένων (Ou, 1987).

Μέχρι τώρα, μακράς διάρκειας ανθεκτικότητα, δεν επιτεύχθηκε. Κάποιες ποικιλίες χάνουν την ανθεκτικότητά τους μετά από μερικά χρόνια, ενώ άλλες γίνονται ευαίσθητες σε άλλες γεωγραφικές περιοχές. Το πρόβλημα εμφανίζεται εξαιτίας της ποικιλότητας της παθογένειας του μύκητα, παράγοντας που στο παρελθόν υποτιμήθηκε από τους ερευνητές.

Μεταφορά γόνων ανθεκτικότητας μπορεί τέλος να γίνει με μεθόδους μοριακής βιολογίας και γενετικής μηχανικής, επιτρέποντας τη μεταφορά και ενσωμάτωση γενετικού υλικού στο ρύζι από άλλους οργανισμούς.

Οπωσδήποτε, υπάρχει πιθανότητα ανθεκτικοί αλληλόμορφοι να προκύψουν σε ευαίσθητο φυτό και με μεταλλαγή, που αναγνωρίζεται συνήθως με συνθήκες, που ευνοούν την ασθένεια τόσο, ώστε όλα τα ευαίσθητα φυτά να καταστραφούν. Αν και είναι σπάνιο φαινόμενο, παρ' όλα αυτά μπορεί να συμβεί.

3.2.3 Χημική καταπολέμηση

3.2.3.1 Χημικά μέσα κατά της πυρικούλαρίωσης

Από τα πρώτα κιόλας χρόνια που εντοπίστηκε η ασθένεια στο ρύζι, άρχισαν και οι προσπάθειες των ερευνητών για τη χημική της καταπολέμηση. Τα προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εξέλιξη της ασθένειας είναι:

1) **Χαλκούχες ενώσεις.** Αποτελούν την πρώτη κατηγορία ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν εναντίον της πυρικούλαρίωσης. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το μίγμα Βορδιγαλείου πολτού και αργότερα ακολούθησαν άλλες ενώσεις. Όμως η χρήση τους περιορίστηκε εξαιτίας των μειονεκτημάτων που εμφανίζουν: α) είναι φυτοτοξικές για τα φυτά του ρυζιού και ενίοτε μειώνουν την απόδοση αντί να την αυξάνουν και β) κάτω από συνθήκες σοβαρών επιδημιών δεν μπορούν να ελέγξουν την ασθένεια.

2) **Ενώσεις Υδραργύρου.** Αρχικά βρέθηκε ότι τα οργανικά υδραργυρούχα ήταν αποτελεσματικά εναντίον της ασθένειας και δημιουργήθηκαν εμπορεύσιμα προϊόντα όπως τα: phenylmercuric acetate (PMA), phenylmercuric iodide, phenylmercuric p-toluenesulphonanilide και phenylmercuric fixtan.

Για 15 χρόνια από το 1950, οι οργανικές ενώσεις του υδραργύρου ήταν οι πιο εκτεταμένες στη χρήση για την αντιμετώπιση της πυρικούλαρίωσης στην Ιαπωνία και αλλού. Όμως η υψηλή τους τοξικότητα και η σοβαρή μόλυνση του περιβάλλοντος που προκαλούν, οδήγησαν στην απαγόρευση της χρήσης τους στην Ιαπωνία το 1968 και στην Ελλάδα το 1974.

3) **Αντιβιοτικά.** Είναι οργανικές ενώσεις, που παράγονται από μικροοργανισμούς και είναι τοξικές, σε χαμηλή συγκέντρωση, σε άλλους μικροοργανισμούς. Πολλές τέτοιες ενώσεις, αφού αναγνωρίστηκαν ως αντιβιοτικά, αργότερα παρασκευάστηκαν συνθετικά σε εμπορική κλίμακα.

Κατά κανόνα, είναι διασυστηματικά φάρμακα. Το πρώτο αντιβιοτικό που βρέθηκε ότι εμποδίζει την ανάπτυξη του *P. oryzae* σε φύλλα ρυζιού ήταν εκείνο που παράχθηκε από είδη του *Cephalothecium* και ονομάστηκε "Cephalothecin", όπως ανέφερε ο Yoshii το 1949 (Ου, 1987). Το 1955 αναπτύχθηκε και βρέθηκε να έχει εξαιρετικές ιδιότητες εναντίον της πυρικούλαρίωσης το αντιβιοτικό "Blasticidin-S". Το blasticidin-S (εμπορικό όνομα Bla-S, Blasticidin) παράγεται από τον *Streptomyces griseo - chromogenes*, τα είδη του οποίου παράγουν επίσης blasticidin-A. Ο τρόπος δράσης του, εντοπίζεται στην αναπνοή και το μεταβολισμό του *P. oryzae*.

Η ανάπτυξη και επιτυχημένη εφαρμογή του blasticidin-S, οδήγησε σε επιπλέον μελέτη των αντιβιοτικών και ένα ακόμη επιτυχές αποτέλεσμα, ήταν το kasugamycin (Ου, 1987).

Το kasugamycin παράγεται από τον *Streptomyces kasugaensis*. Δρα ως παρεμποδιστής της πρωτεϊνικής σύνθεσης στα ευκαρυωτικά (80S) και στα προκαρυωτικά ριβοσώματα, συνεπώς παρεμποδίζεται η πρωτεϊνική σύνθεση και στα κύτταρα των ανώτερων φυτών. Περιοριστικός παράγοντας για τη φυτοπαθολογική χρήση του, αποτελεί η φυτοτοξικότητα. Το εμπορικό του όνομα είναι Kasumin.

4) **Οργανοφωσφορικές ενώσεις.** Η κύρια δράση τους ως μυκητοκτόνα είναι η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των φωσφολιπιδίων της κυτοπλασματικής μεμβράνης. Συγκεκριμένα, παρεμποδίζουν το ένζυμο φωσφολιπιδική N-μεθυλο τρανσφεράση, που έχει σαν αποτέλεσμα να μην σχηματίζεται φωσφατιδυλοχολίνη, ένα κύριο συστατικό των μεμβρανών του *P. oryzae*.

Η παρεμπόδιση βιοσύνθεσης φωσφατιδυλοχολίνης, επιφέρει αλλαγές στη δομή και τις ημιπερατές ιδιότητες της μεμβράνης, που εξηγούν τη μυκητοτοξικότητα των ενώσεων αυτών.

Αξιόλογα μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής είναι το iprobenfos (IBP), το edifenphos και το isoprothiolate των οποίων τα εμπορικά ονόματα είναι "Kitazin P", "Hinosan" και "Fuzi one", αντίστοιχα (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

5) **Αντιπαθογονικά.** Στα τελευταία 10-20 χρόνια ανακαλύφθηκαν ενώσεις, που εμποδίζουν την ανάπτυξη μιας ασθένειας χωρίς να είναι άμεσα τοξικές στο παθογόνο ή σ' άλλους οργανισμούς. Δηλαδή επιτυγχάνουν καταπολέμηση των ασθενειών, είτε παρεμποδίζοντας λειτουργίες του παθογόνου που δεν είναι απαραίτητες για την επιβίωση και ανάπτυξή του (είναι όμως απαραίτητες για την παθογένεση), είτε αυξάνοντας την ανοχή του φυτού στο παθογόνο. Οι "αντιπαθογονικοί" παράγοντες δρουν είτε μειώνοντας την παθογόνο ικανότητα του παθογόνου, είτε αυξάνοντας την ανθεκτικότητα του ξενιστή.

Στην πρώτη περίπτωση ανήκουν οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης της μελανίνης (MBIs). Οι ενώσεις αυτές παρεμποδίζουν αναγωγικές αντιδράσεις της μεταβολικής οδού που οδηγεί στη βιοσύνθεση της μελανίνης, χωρίς να έχουν καμιά επίδραση στην ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα ή στην παραγωγή σπορίων. Εξειδικευμένοι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης μελανίνης εναντίον του *P. oryzae* είναι οι tricyclazole, pyroquilon και fthalide. Τα εμπορικά τους ονόματα είναι : "Beam", "Bin", "Blasicide", για το tricyclazole, "Fongoren" για το pyroquilon και "Rabcide" για το fthalide (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Το πιο πρόσφατο παράδειγμα των MBI ειδικά για την καταπολέμηση της πυρικουλαρίωσης αποτελεί το carpropamid (KTU 36136). Είναι το 2,2-dichloro-1-ethyl-3-methylcyclopropone carboxylic acid [1-(4-chloro-phenyl) ethyl] amide. Η εφαρμογή του γίνεται είτε με ψεκάσμο των φύλλων, είτε με τη μορφή κόκκων στα σπορεία (όπως και του tricyclazole για προστατευτική εφαρμογή), πριν τη μεταφύτευση. Σε συνθήκες *in vitro*, το carpropamid δεν παρουσιάζει μυκητοκτόνο δράση. Η επίδρασή του στη βλάστηση των

σπορίων, την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα και το σχηματισμό απρεσσορίου, είναι επίσης αμελητέα (Kurahashi et al., 1997).

Στην επίδραση της μελανίνης του απρεσσορίου συγκέντρωση 0.1ppm του carpropramid είναι αρκετή για το σχηματισμό υαλωδών απρεσσορίων που δεν μπορούν να διεισδύσουν ούτε σε τεχνητές μεμβράνες σελοφάν, αλλά ούτε και στην επιδερμίδα των φύλλων ρυζιού (Kurahashi et al., 1997).

Αυτή η ειδική ικανότητα των MBIs, δείχνει ότι το carpropramid εμποδίζει τη βιοσύνθεση της μελανίνης στα απρεσσορία αν και η χημική του δομή διαφέρει από τους υπόλοιπους παρεμποδιστές. Στη διαδικασία βιοσύνθεσης μελανίνης (Σχήμα 3) φαίνονται τα σημεία επίδρασης τόσο του tricyclazole όσο και του carpropramid. Το τελευταίο έχει και δεύτερο τρόπο δράσης. Αυξάνει την αντίσταση του φυτού, αυξάνοντας την "προκαλούμενη ξυλοποίηση με εναπόθεση λιγνίνης" και τη συσσώρευση των φυτοαλεξινών momilactone A και Sakuranefin που είναι βασικοί μέθοδοι αντίδρασης του φυτού στη μόλυνση.

Στη δεύτερη περίπτωση της αύξησης ανθεκτικότητας του ξενιστή, ανήκουν τα: probenazole και διχλωροπροπυλοκαρβοξυλικό οξύ (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Η πρώτη ένωση αν και παρεμποδίζει ελάχιστα την *in vitro* αύξηση του μύκητα ή τη βλάστηση των κονιδίων, έχει πολύ καλή αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση της ασθένειας.

Πιστεύεται ότι το probenazole - εμπορικό όνομα Oryzemat - επάγει την αναγνώριση μεταξύ ξενιστή και παθογόνου, που οδηγεί μέσα από διάφορες μεταβολικές αλλαγές, τόσο στην παραγωγή μυκητοκτόνων ενώσεων από το φυτό, όσο και στην εναπόθεση λιγνίνης γύρω από τις θέσεις εισόδου του παθογόνου.

Το διχλωροπροπυλοκαρβοξυλικό οξύ, σε αντίθεση με τους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης της μελανίνης (MBIs), δεν εμποδίζει το πέρασμα της επιδερμίδας από το μύκητα, αλλά επάγει τους μηχανισμούς άμυνας του φυτού μετά την είσοδο του παθογόνου και προκαλείται η αντίδραση υπερευαισθησίας. Η αντίδραση αυτή, φαίνεται ότι οφείλεται στη γρήγορη συσσώρευση φυτοαλεξινών στη θέση εισόδου του παρασίτου.

Εκτός από τα παραπάνω, το benomy1 (Benlate) βρέθηκε επίσης αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση της πυρικούλαρίωσης.

Ο τρόπος δράσης των ήδη 7 εγκεκριμένων μυκητοκτόνων στην Ιαπωνία εναντίον της πυρικούλαρίωσης, φαίνεται στους πίνακες 2 και 3.

Πίνακας 2: Μυκητοκτόνα για την αντιμετώπιση της πυρικοουλαρίωσης στην Ιαπωνία (Mogi, 1979).

Μυκητοκτόνο	Εφαρμογή	Τρόπος δράσης
Blasticidin S (αντιβιοτικό)	Επίταση ή ψεκασμός	Παρεμπόδιση βλάστησης σπορίων και μυκηλιακής ανάπτυξης
Kasugamycin (αντιβιοτικό)	Επίταση ή ψεκασμός	Παρεμπόδιση μυκηλιακής ανάπτυξης (πολύ χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά)
Kitazin P (IBP)	Επίταση, ψεκασμός, εμβάπτιση	Παρεμπόδιση βλάστησης σπορίων και μυκηλιακής ανάπτυξης
Hinosan (edifenphos)	Επίταση ή ψεκασμός	Παρεμπόδιση βλάστησης σπορίων και μυκηλιακής ανάπτυξης.
Rabside (fthalide)	Επίταση ή ψεκασμός	Παρεμπόδιση διείσδυσης (μεγάλη υπολειμματική δράση)
Oryzemate (probenazole)	Εμβάπτιση	Παρεμπόδιση διείσδυσης και μυκηλιακής ανάπτυξης. Σχηματισμός φυτοαλεξινών
Fuzi One (isoprothidane)	Εμβάπτιση Εφαρμογή σε φυτάρια	Παρεμπόδιση διείσδυσης και μυκηλιακής ανάπτυξης

(Πηγή : Ου, 1987)

Πίνακας 3: Τρόπος δράσης μυκητοκτόνων εναντίον της πυρικοουλαρίωσης στην Ιαπωνία (Mogi, 1979)

Μυκητοκτόνο	Προληπτική δράση		Παρεμποδιστική δράση		Υγρή αντοχή	Διασυστη- ματική δράση	Υπολειμμα- τική δράση
	Βλάστηση σπορίων	Διείσδυση	Ανάπτυξη κηλίδας	Εξάπλωση			
Blasticidin S	++	++	+++	+++	-	-	-
Kasugamycin	-	-	++++	+++	-	+++	++
Fthalide (Rabcide)	-	++++	-	+++	+	+	++++
Edifenphos (Hinosan)	++	++	+++	+++	+	+	+++
IBP (Kinosan P)	++	++	+++	+++	++	++++	+
Probenazole (Oryzemate)	-	++++	+++	+++	++	++++	+
Isoprothiolane (Fuzi One)	-	++++	+++	+++	++	++++	++

(Πηγή: Ου, 1987)

Όμως, όπως άλλοι μικροοργανισμοί, έτσι και ο *P. oryzae* αναπτύσσει ισχυρή ανθεκτικότητα στις χημικές ουσίες. Αναφέρθηκαν ανθεκτικότητες στο phenylmercuric acetate (PMA) από τον Yoshi και τους συνεργάτες του το 1958, καθώς και στο θειικό χαλκό, το βορικό οξύ και τον χλωριούχο υδράργυρο από τον Yamazaki και τους συνεργάτες του το 1964. Η συχνή χρήση των αντιβιοτικών οδήγησε σε μείωση της αποτελεσματικότητάς τους, όπως ειπώθηκε από τον Miura και τους συνεργάτες του το 1975 (Ou, 1987).

3.2.3.2 Χρήση μυκητοκτόνων με νέο εξειδικευμένο τρόπο δράσης

Το έντονο ενδιαφέρον του κοινού για θέματα όπως η τοξικότητα των χημικών προϊόντων στους ανθρώπους και το περιβάλλον καθώς και τα υπολείμματα των φαρμάκων στα τρόφιμα, οδήγησε τις έρευνες σε εντατικές προσπάθειες ανακάλυψης πιο “ήπιων” φυτοπροστατευτικών ουσιών. Η ανάγκη βελτιωμένων μυκητοκτόνων, υπάρχει και για την καταπολέμηση ασθενειών, που είτε ελέγχονται ελάχιστα με τα σημερινά προϊόντα, είτε τα παθογόνα τους έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε αυτά.

Τα ερευνητικά προγράμματα τα τελευταία χρόνια, επικεντρώθηκαν στην έρευνα για τη δημιουργία ουσιών με χαμηλή τοξικότητα σε θηλαστικά, χαμηλές εισροές στο περιβάλλον, χαμηλά υπολείμματα στο έδαφος, παράγοντες ισότιμης σημασίας για την έγκριση χρήσης της ουσίας, με το άλλοτε κυρίαρχο κριτήριο, το κόστος εφαρμογής. Έτσι η έρευνα παρουσίασε ένα ποικίλο εύρος χημικών δομών με πρωτότυπο τρόπο δράσης, προϊόντα που αναμένεται να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των ασθενειών μέσα στον 21^ο αιώνα.

♦ Ουσίες με έμμεσο τρόπο δράσης

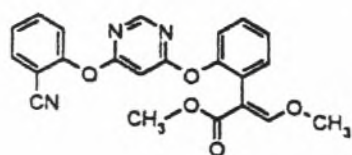
Νέες εξελίξεις στην έρευνα ενώσεων με έμμεσο τρόπο δράσης, οδήγησαν στην αξιοποίηση λειτουργικών παραγόντων του Σαλικιλικού οξέος. Μεταξύ αυτών είναι και το acibenzolar-S-methyl (CGA245704), (εμπορικό όνομα: "Bion") το οποίο χρησιμοποιήθηκε εναντίον των ωιδίων των δημητριακών αλλά και για την αντιμετώπιση της πυρικούλαρίωσης του ρυζιού. Η δράση του διαφέρει από εκείνη των άλλων εμπορεύσιμων μυκητοκτόνων και το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του είναι η ικανότητα να προστατεύει τα φυτά από μολύνσεις μυκήτων και βακτηρίων. Δεν έχει άμεση επίδραση στα παθογόνα και πρέπει να εφαρμόζεται πριν την εμφάνιση της ασθένειας (Gullino, 1998).

Επεμβάσεις με acibenzolar-S-methyl, diclocyment (S2900) και NNF-9425 έχει βρεθεί ότι είναι αποτελεσματικές εναντίον της πυρικούλαρίωσης, παρ' όλα αυτά, τα παραπάνω μυκητοκτόνα ανήκουν στην ομάδα αυτών που αναμένουν έγκριση για εγγραφή (Koizumi, 1998).

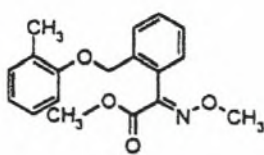
♦ Προϊόντα "φυσικής" προέλευσης

Ουσίες που περιέχονται φυσικά σε μύκητες, βακτήρια και ανώτερα φυτά, αποτελούν σημαντικές πηγές μορίων με αντιμυκητικές ικανότητες. Αυτές μπορεί είτε να αναπτυχθούν ως προϊόντα *per se*, είτε να αποτελέσουν σημείο έναρξης για τη σύνθεση άλλων ενώσεων. Τα πρώτα κύρια προϊόντα μικροβιακής προέλευσης που έγιναν εμπορεύσιμα, ήταν τα αντιβιοτικά (blasticidin-S, kasugamycin και validamycin A, εναντίον της πυρικούλαριώσης).

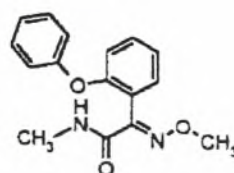
Η στρομπιλουρίνη A (Strobilurin A) αποτελεί φυσικό προϊόν του Βασιδιομύκητα *Strobilurus tenacellus* και αποτελεί μέλος της ομάδας των στρομπιλουρινών. Ο τρόπος δράσης των φυσικών στρομπιλουρινών είναι η παρεμπόδιση της μιτοχονδριακής αναπνοής στους μύκητες που αποτελεί γι' αυτούς ζωτικής σημασίας διαδικασία. Η στρομπιλουρίνη A είναι ενεργή *in vitro* εναντίον ενός μεγάλου εύρους φυτοπαθογόνων μυκήτων μεταξύ των οποίων και ο *P.oryzae*, αλλά είναι φωτοχημικά ασταθής και έχει υψηλή πτητικότητα. Τα προβλήματα αυτά των φυσικών στρομπιλουρινών ξεπεράστηκαν με την ανάπτυξη προγραμμάτων που στηρίχθηκαν στη δημιουργία παραγώγων στρομπιλουρινών, δηλ. παραγώγων δευτερογενών μεταβολιτών από μύκητες όπως οι *S. tenacellus* και *Oudemansiella mucida* και χαρακτηρίζονται από ικανοποιητική σταθερότητα στο φως, χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά, κατάλληλη μετακίνηση μέσα στο φυτό και καλή προστασία του προϊόντος στο οποίο εφαρμόζονται. Οι πρώτες συνθετικές στρομπιλουρίνες που ανακοινώθηκαν και εγκρίθηκαν το 1996 είναι οι: azoxystrobin (ICIA 5504), kresoxim-methyl (BAS 490F) και metominostrobin (SSF-126), οι συντακτικοί τύποι των οποίων, φαίνονται παρακάτω:



azoxystrobin



kresoxim-methyl



SSF 126

(πηγή : Knight et al., 1997).

Τρόπος δράσης τους είναι η παρεμπόδιση της μιτοχονδριακής αναπνοής με διακοπή της μεταφοράς ηλεκτρονίων (e^-) μεταξύ κυτοχρώματος b και κυτοχρώματος c_1 . Δεν έχει διαπιστωθεί διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ στρομπιλουρινών και ήδη χρησιμοποιούμενων μυκητοκτόνων. Αυτή η ομάδα ενώσεων είναι αξιοσημείωτη για το ευρύ φάσμα δράσης της εναντίον παθογόνων που ανήκουν στους Ασκομύκητες, Βασιδιομύκητες,

Δευτερομύκητες και Ωομύκητες σε δημητριακά, ρύζι, φρούτα, άμπελο, λαχανικά και αυτοφυή αγροστώδη.

Μεμονωμένα βιοκινητικά χαρακτηριστικά των στρομπιλουρινών, όπως η παραλαβή από το φυτό, η μεταφορά και ο μεταβολισμός, εξηγούν τις διαφορές στην εκλεκτικότητα συγκεκριμένων παθογόνων. Έτσι, το *kresoxim-methyl* δεν είναι πολύ αποτελεσματικό σε παθογόνα που ζουν στο εσωτερικό των φυτών και αυτό οφείλεται στον ταχύ μεταβολισμό του προϊόντος μέσα στα φύλλα. Το προϊόν έχει δράση φάσης ατμού και είναι πολύ δραστικό εναντίον παθογόνων που ζουν πάνω στη φυτική επιφάνεια όπως το *Erysiphe graminis*. Σε αντίθεση το *azoxystrobin*, κινείται διασυστηματικά στο ξύλο και έχει καλύτερα αποτελέσματα στον έλεγχο των παθογόνων που βρίσκονται στο εσωτερικό των φυτικών ιστών, όπως τα *Puccinia spp.* και *Stagonospora nodorum*. Το *metominostrobin* - έχει αναφερθεί ότι παρέχει εξαιρετική προφύλαξη και αντιμετώπιση της πυρικούλαρίωσης - χαρακτηρίζεται από αργή απελευθέρωση και έχει κοκκώδη σύσταση (Jorgensen, 1998).

Συγκρινόμενα με τα ήδη χρησιμοποιούμενα μυκητοκτόνα, οι στρομπιλουρίνες έχουν παρουσιάσει δυναμικότητα στην αύξηση της σοδειάς για αρκετές ασθένειες και καλλιέργειες.

Επιπλέον αύξηση της παραγωγής κατά 5-10% είναι συνήθης σε καλλιέργειες κυρίως δημητριακών, συγκριτικά με την εφαρμογή των παραδοσιακών (EBI) μυκητοκτόνων. Τα πλεονεκτήματα των φυτών στα οποία έχουν εφαρμοστεί στρομπιλουρίνες, οφείλονται κυρίως στην παρεμπόδιση διασποράς των σπορίων των παθογόνων που προκαλεί ενεργειακές απώλειες. Εκτός από τη μυκητοκτόνο δράση τους όμως, οι στρομπιλουρίνες προκαλούν και άλλες φυσιολογικές και αναπτυξιακές αλλαγές. Έχει ειπωθεί ότι αυτές οφείλονται στην παρεμπόδιση βιοσύνθεσης αιθυλενίου, αύξηση ενδογενών κυτοκινονών και μείωση του CO₂ (Jorgensen, 1998).

Ο διαφορετικός τρόπος δράσης των συνθετικών στρομπιλουρινών, βοηθά την αντιμετώπιση μυκήτων που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε άλλες κύριες ομάδες μυκητοκτόνων: παρεμποδιστές απομεθυλίωσης θέσης 14(DMIs), φαινυλαμίνες, δικαρβοξιμιδικά και βενζιμιδαζολικά.

Η μείωση της ανάπτυξης ανθεκτικότητας των μυκήτων, διατηρώντας τον έλεγχο της ασθένειας στα καλύτερα επίπεδα, είναι μια πρόκληση για την βιομηχανία. Οι στρομπιλουρίνες ανήκουν σε διαφορετική ομάδα διασταυρωτής ανθεκτικότητας με όλα τα άλλα διαθέσιμα μυκητοκτόνα και διάφορες στρατηγικές έχουν σχεδιαστεί, ώστε να ελαχιστοποιούν τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Οι προτάσεις της βιομηχανίας Zeneca, βασίζονται σε προγράμματα αποτελούμενα από 2 εφαρμογές *azoxystrobin* σε εναλλαγή με μυκητοκτόνα από διαφορετικές ομάδες.

Οι προτάσεις της FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) για καλλιέργειες που λαμβάνουν πάνω από 3 εφαρμογές μυκητοκτόνων είναι:

- 1) Οι στρομπιλουρίνες πρέπει να χρησιμοποιούνται, όπου είναι δυνατόν, προληπτικά
- 2) Οι στρομπιλουρίνες πρέπει να είναι προσαρμοσμένες στις προτεινόμενες δόσεις των παρασκευαστών
- 3) Οι στρομπιλουρίνες δεν πρέπει να αποτελούν ποσοστό υψηλότερο από 30-50% του συνολικού αριθμού των εφαρμογών των μυκητοκτόνων που γίνονται σε μια καλλιέργεια και σε μια εποχή
- 4) Οι στρομπιλουρίνες πρέπει να χρησιμοποιούνται σε τεμάχια καλλιεργειών με 1-3 διαδοχικές εφαρμογές
- 5) Τεμάχια όπου εφαρμόζονται 2-3 στρομπιλουρίνες, θα πρέπει να διαχωρίζονται με το ελάχιστο των 2 εφαρμογών από μυκητοκτόνο διαφορετικής ομάδας διασταυρωτής ανθεκτικότητας
- 6) Για πολυετή φυτά ή φυτά με μεγάλη διάρκεια ανάπτυξης (π.χ. κολοκυνθοειδή), πρέπει να συνεχίζονται εναλλακτικά προγράμματα ψεκασμών μεταξύ εποχών καλλιέργειας.

Ο ρόλος των στρομπιλουρινών αναμένεται να είναι σημαντικός στην χημική καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών στο μέλλον (Dacol et al., 1998).



♦ Φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες ορισμένων στρομπιλουρινών

A) Azoxystrobin

Πρόκειται για μυκητοκτόνο ευρέως φάσματος με νέο βιοχημικό τρόπο δράσης. Ανήκει στην οικογένεια των συνθετικών στρομπιλουρινών. Αποτελεί συνθετικό παράγωγο φυσικών μεταβολιτών μυκήτων που ανήκουν στην ομάδα των strobilurins και oudemansins και την υπο-ομάδα β-methoxyacrylate.

Το azoxystrobin αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Godwin et al., το 1992 και παρουσιάστηκε από την βιομηχανία αγροχημικών Zeneca, που αποτελεί και τον παρασκευαστή του. Τα χαρακτηριστικά του είναι τα ακόλουθα:

Κοινό όνομα: Azoxystrobin

Όνομα κατά IUPAC: methyl (E)-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy) pyrimidin-4-yloxy] phenyl}-3-methoxyacrylate

Κωδικός: ICIA 5504

Εμπορικά ονόματα: "Amistar" (Zeneca), "Heritage" (USA, Japan), "Quadris" (Zeneca)

Είναι διαλυτό στο νερό (6mg / lt 201⁰C), μέτρια διαλυτό στη μεθανόλη και την ακετόνη και υψηλά διαλυτό στην αιθυλ-ακετόνη και το διχλωρομεθάνιο. Χαρακτηρίζεται από

σταθερότητα στη θέρμανση, την οξείδωση και τα μέσα αλκαλίωσης, ενώ είναι ελαφρώς ασταθές στο φως.

Εκτός από τα υψηλά επίπεδα μυκητοκτόνου δράσης και την εξαιρετική ικανότητα εξάπλωσης, αρκετά είναι τα χαρακτηριστικά που το κάνουν κατάλληλο για χρήση σε οπωρώνες. Έχει χαμηλή τοξικότητα (από στόματος για αρσενικό και θηλυκό ποντίκι $LD_{50} > 5000$ mg/kg, από στόματος στα πουλιά $LD_{50} > 2000$ mg/kg b.w, ακίνδυνο για οργανισμούς μη-στόχους σε συνθήκες αγρού και σε ποσότητες που εφαρμόζονται στον αγρό). Παρουσιάζει καλό περιβαλλοντικό "προφίλ", χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα εφαρμογών (διασπάται γρήγορα στο έδαφος) και αντιπροσωπεύει μια νέα προοπτική για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα.

Το azoxystrobin έχει σύνθεση "εμπνευσμένη" από τις στρομπιλουρίνες, που είναι ομάδα φυσικών αντι-μυκητικών προϊόντων και έχει εμφανίσει εκπληκτικό φάσμα δράσης στον έλεγχο των ασθενειών σε ποικίλο εύρος δικοτυλήδων φυτών. Επίσης, παρουσιάζει ριζική θεραπευτική δραστηριότητα, προστατευτικές και διαφυλλικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται για εφαρμογές φυλλώματος σε σπόρους, έδαφος ή νερό. Κύριες μορφές τυποποίησης είναι οι SC και WG (λευκοί κρύσταλλοι).

Το εύρος δράσης του έχει προσδιορισθεί από εφαρμογές σε αγρούς εναντίον ενός μεγάλου φάσματος, οικονομικά σημαντικών παθογόνων. Η αξία του διαπιστώθηκε όχι μόνο από την ποικιλία των δικοτυλήδων φυτών που ευνοήθηκαν από τις εφαρμογές του ICIA-5504, αλλά και από το εύρος των παθογόνων που ελέγχει σε μονοκοτυλήδονα φυτά.

Τρόπος δράσης: Το azoxystrobin εμποδίζει τη βλάστηση των σπορίων, την ανάπτυξη του μυκηλίου και παρουσιάζει ιδιότητες που εμποδίζουν την παραγωγή σπορίων. Ο τρόπος δράσης του, είναι η παρεμπόδιση της μιτοχονδριακής αναπνοής, διακόπτοντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ κυτοχρώματος b και κυτοχρώματος G.

Αρχικά αναφέρθηκε ότι η μυκητοκτόνος ιδιότητα των φυσικών προϊόντων strobilurins A,B, oudemasin A και myxothiazol, όλα παράγωγα του b-methoxyacrylic acid, προέρχεται από την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τη μιτοχονδριακή αναπνοή σύμφωνα με τους Becker et al.,(1981). Πραγματικά,όπως αναφέρουν οι Mansfield and Wiggins(1990), μετά από έρευνες, αποδείχτηκε ότι αυτά τα φυσικά προϊόντα αδρανοποιούν μια συγκεκριμένη λειτουργία του κυτοχρώματος b (Godwin et al.,1992).

Δείγματα από oudemansin A και myxothiazol (Godwin et al.,1992) εξετάστηκαν από το ICI το 1982 και έδειξαν μυκητοκτόνες ιδιότητες *in vivo*. Αντίθετα η strobilurin A δεν έδειξε μυκητοκτόνο δράση *in vivo* στο θερμοκήπιο, όμως ήταν δραστική στην ανάπτυξη μυκηλίου σε θρεπτικό υπόστρωμα (agar) στο σκοτάδι και παρουσίασε ισχυρή παρεμπόδιση μιτοχονδριακής αναπνοής *in vitro*. Τα πειράματα έδειξαν ότι η έλλειψη μυκητοκτόνου

δράσεως της strobilurin A, προέρχεται από τη φωτοχημική αστάθεια και τη σχετικά υψηλή της πτητικότητα. Στη συνέχεια λοιπόν σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν παράγωγα στρομπιλουρίνης στα οποία διατηρήθηκαν τα δομικά χαρακτηριστικά που είναι υπεύθυνα για τη μυκητοκτόνο ικανότητα, ενώ τροποποιήθηκαν τα αντίστοιχα της φωτοχημικής αστάθειας και πτητικότητας όπως ανέφεραν οι Beaufement et al. το 1991, σύμφωνα με τους Godwin et al., (1992). Κατά τη διάρκεια εκτεταμένου προγράμματος χημικής σύνθεσης, επιτεύχθηκε η δημιουργία σχέσης μεταξύ δομής και μυκητοκτόνου ικανότητας για τους β-methoxyacylates και αυτό οδήγησε στο σχεδιασμό του ICIA 5504 (Godwin et al., 1992).

Εφαρμογές - χρήσεις: Η διεξαγωγή πειραμάτων κυρίως σε συνθήκες *in vivo* τόσο στον αγρό όσο και σε συνθήκες θερμοκηπίου, είχαν ως αποτέλεσμα τον προσδιορισμό των παθογόνων εναντίον των οποίων το azoxystrobin είναι αποτελεσματικό. Ελέγχει παθογόνους μύκητες που ανήκουν στους Ασκομύκητες, Βασιδιομύκητες, Δευτερομύκητες και Ωομύκητες, σε δόσεις εφαρμογών που κυμαίνονται μεταξύ 100 και 375 gr δ.ο./ha. Παραδείγματα αυτών, είναι τα:

Ωίδιο (*Erysiphe graminis*), σκωρίαση (*Puccinia* spp) και σεπτορίωση (*Septoria tritici*) σε δημητριακά, πυρικούλαρίωση (*Pyricularia oryzae*) και σήψη ριζών (*Rhizoctonia solani*) στο ρύζι, περονόσπορο (*Plasmopara viticola*) και ωίδιο (*Uncinula necator*) στο αμπέλι, φουζικλάδιο (*Venturia inaequalis*), αλτερναρίωση (*Alternaria mali*) και ωίδιο (*Podosphaera leucotricha*) στα μήλα, ωίδιο (*Shaerotheca fuliginea*) και περονόσπορο (*Pseudoperonospora cubensis*) στα κολοκυνθοειδή, περονόσπορο (*Phytophthora infenstans*) και αλτερναρίωση (*Alternaria solani*) σε πατάτα και τομάτα, φαιά σήψη (*Monilia* spp), *Venturia carporhila* και *Cladosporium carporhilum* στη ροδακινιά, σήψεις ριζών (*Pythium* spp και *Rhizoctonia solani*) στο χλοοτάπητα, αλτερναρίωση (*Alternaria* spp) στο καρότο, σκωρίαση (*Puccinia asparagi* και *Puccinia allii*) σε σπαράγγι και σκόρδο αντίστοιχα, τεφρά σήψη (*Botrytis cinerea*) σε φράουλα (Anonymous, 1998).

Το azoxystrobin έχει παρουσιάσει υψηλά επίπεδα ελέγχου των ασθενειών κατά τη διάρκεια Ευρωπαϊκών πειραμάτων σε εύρος φρούτων και λαχανικών. Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν μετά από πρόγραμμα 7-10 ημερών και σε εφαρμοζόμενες δόσεις των 200-250 gr δ.ο./ha. Εκπληκτική βελτίωση της σοδειάς, της ποιότητας και του ποσοστού εμπορεύσιμου προϊόντος έχει επιτευχθεί. Η είσοδος του azoxystrobin αποτέλεσε καθοριστικό βήμα για την προστασία λαχανοκομικών (horticultural) προϊόντων. Τα πειράματα σε συνθήκες αγρού έδειξαν ότι όταν το azoxystrobin χρησιμοποιείται σε εναλλαγή με μυκητοκτόνα που έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης, παρέχει εξαιρετικό έλεγχο της ασθένειας.

Παρουσίασε ικανοποιητικό έλεγχο της πυρικούλαρίωσης (τόσο σε φύλλα όσο και στάχεις), όταν εφαρμόστηκε σε αγρούς στην Ιαπωνία και απευθείας με τη μορφή κόκκων στο νερό με το οποίο κατακλύζεται το φυτό, αλλά και με τη μορφή ψεκασμού.

B) Kresoxim - methyl.

Αποτελεί το δεύτερο μυκητοκτόνο της ομάδας των στρομπιλουρινών που οδηγήθηκε στο εμπόριο και παρουσιάζει εξαιρετικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της πυρικούλαρίωσης στο ρύζι, όπως και το azoxystrobin.

Ανακαλύφθηκε από την BASF AG το 1983, αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Ammermann et al., (1992), μπήκε στην παραγωγή το 1995 και παρουσιάστηκε το 1996. Παρασκευαστής του αποτελεί η BASF. Τα χαρακτηριστικά του είναι τα ακόλουθα:

Κοινό όνομα: Kresoxim-methyl

Όνομα κατά IUPAC: methyl (E)-2-methoxyimino-[2-(o-tolyloxymenthyl)acetate; methyl (E)-methoxyimino [a-(o-tolyloxy)-o-toly] acetate

Κωδικός: BAS 490F

Εμπορικά ονόματα: "Allegro" (μίγμα BASF), "Mentor" (μίγμα BASF), "Stroby" (BASF, Nissan).

Είναι δυνατόν να εφαρμοστεί με τη μορφή μιγμάτων όπως: kresoxim-methyl+fenpropimorph, BAS 480F, BAS 480F+fenpropimorph. Κύριες μορφές τυποποίησης είναι οι: SC, SE, WG και χαρακτηρίζεται από λευκούς, μέτρια αρωματικούς κρυστάλλους.

Είναι διαλυτό στο νερό (2 mg/lit, 201⁰C), δεν υδρολύεται σε 24 h (PH 7, 201⁰C). Είναι προϊόν ασφαλές για τους χρήστες αλλά και το περιβάλλον. Μέχρι σήμερα δεν έχουν παρατηρηθεί δυσμενείς τοξικές επιδράσεις. Παρ' ότι είναι τοξικό σε υδρόβια είδη, πειράματα έκθεσής του και οικολογικές μελέτες, έδειξαν ότι δεν υπάρχει κίνδυνος μόνιμης βλάβης σε υδρόβιους οργανισμούς, όταν βέβαια χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις συνιστώμενες οδηγίες (οξεία τοξικότητα από στόματος για ποντίκια LD₅₀>5000 mg/kg, δεν είναι ερεθιστικό στο δέρμα και τα μάτια των κουνελιών, δεν προκαλεί τερατογενέσεις, για τα πουλιά LD₅₀ (14ημ.)>2150 mg/kg). (Αποδεκτή ημερήσια λήψη για τον άνθρωπο (ADI) = 0,4mg/kg b.w.). Αναφορικά με το περιβαλλοντικό του προφίλ για θερμόαιμα ζώα όπως το ποντίκι, το kresoxim-methyl διασπάται γρήγορα, τα υπολείμματά του σε δημητριακά και φρούτα είναι μικρότερα από 0,05 mg/kg και σε σταφύλια και λαχανικά έχουν μικρότερη τιμή από 1 mg/kg. Στο έδαφος, ο χρόνος που απαιτείται για τη διάσπαση του 90% της ουσίας (DT₉₀) σε πειράματα εργαστηρίου, είναι λιγότερος από 3 ημέρες με κύριο μεταβολίτη το αντίστοιχο οξύ, ενώ ο χρόνος ημιζωής στο νερό (DT₅₀) είναι 34 ημ. (PH 7), 7 ώρες (PH 9).

Πρόκειται για πολύ δραστική ουσία εναντίον ενός ευρέως φάσματος οικονομικά σημαντικών φυτοπαθογόνων μυκήτων. Έχει εξαιρετική προστατευτική, θεραπευτική και ριζική θεραπευτική δραστηριότητα, ενώ προσφέρει μακράς διάρκειας έλεγχο της ασθένειας για την οποία εφαρμόζεται. Οι ιδιότητες αυτές αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης στο εργαστήριο, στο θερμοκήπιο και σε πειράματα στον αγρό, χρησιμοποιώντας μύκητες-στόχους όπως οι: *Venturia inaequalis*, *Erysiphe graminis* fsp *tritici*, *Puccinia recondita*, με ψεκασμό.

Είναι μυκητοκτόνο με αξιοσημείωτη δράση *in vitro*, με νέο τρόπο δράσης, είναι αδύναμο αλλά έχει μετρήσιμη μυκητοκτόνο δράση σε πειράματα θερμοκηπίου και η απλότητα της δομής του πείθει ώστε να αποτελέσει στο μέλλον το νέο οδηγό μυκητοκτόνων ουσιών.

Τρόπος δράσης: Έχει παρόμοιο τρόπο δράσης με τον azoxystrobin, εμποδίζει τη μιτοχονδριακή αναπνοή, δεσμεύοντας την περίσσεια του κυτοχρώματος c. Επιλεκτικά προκαλεί ενζυμική αποεστεροποίηση μέσα στα φυτά, λειτουργεί παρεμποδίζοντας την εξάπλωση των μολυσμάτων.

Εφαρμογές - γρήσεις: Έχει εξαιρετική ικανότητα ελέγχου ασθενειών προκαλούμενες από Ασκομύκητες, Βασιδιομύκητες, Δευτερομύκητες και Ωομύκητες, σε πολλά φυτά. Έχει ήδη προταθεί σχέδιο εφαρμογής εναντίον των *Venturia*, *Uncinula*, *Erysiphe*, *Alternaria*, με ψεκασμούς. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλα μυκητοκτόνα.

Ειδικοί πειραματικοί χειρισμοί έδειξαν ότι εφαρμογές 31mg/lit του BAS 490F, ελέγχουν απολύτως το φουζικλάδιο στα μήλα (*Venturia inaequalis*) ενώ δεν παρουσίασε διασυστηματική δράση εναντίον του *P. oryzae* στο ρύζι. Επίσης δεν έχει πολύ καλή αποτελεσματικότητα εναντίον του περονοσπόρου στην άμπελο (*Plasmopara viticola*), όπου κάποιες φορές στα νέα φύλλα παρουσιάζεται ελαφρά φυτοτοξικότητα σε εφαρμογές μεγαλύτερες των 200 gr δ.ο./ha (Ammermann et al., 1992).

Ελέγχει επίσης το ωίδιο σε μήλα, σταφύλια, κολοκυνθοειδή, τεύτλα, το ωίδιο σε δημητριακά (σε συνδυασμό όμως με το fenpropimorph) την πυρικούλαρίωση στο ρύζι. Ικανοποιητικά αντιμετωπίστηκαν τα ακόλουθα παθογόνα: *Podosphaera leucotricha*, *Uncinula necator*, *Erysiphe graminis*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Puccinia recondita* σε σιτάρι, *Pyrenophorateres* και *Rynchosporium Secalis* σε κριθάρι, *Erysiphe betae* & *Cercospora Beticola* σε τεύτλα, *Pyricularia oryzae* σε ρύζι, *Alternaria solani*, *Phytophthora infenstans* σε πατάτα, *Sphaerotheca fuliginea* σε κολοκυνθοειδή (Anonymous, 1998).

Γ) SSF - 126 (658)

Είναι το τρίτο κατά σειρά μυκητοκτόνο της ομάδας των στρομπιλουρινών, το οποίο χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της πυρικούλαρίωσης στο ρύζι, σε 1,5-1,8 kg/ha και

εφαρμόζεται πριν ή κατά την έξαρση εμφάνισης των συμπτωμάτων. Οι τύποι εφαρμογής είναι GR (κοκκώδες) και W.P. (βρέξιμη σκόνη), με μορφή λευκών κρυστάλλων. Είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προστατευτική και θεραπευτική δράση. Παρασκευαστής: Shionogi .

Τα χαρακτηριστικά του είναι:

Κοινό όνομα: metominostrobin (προτεινόμενο από BSI), fenominostrobin (προτεινόμενο BSI)

Όνομα κατά IUPAC: (E)-2-methoxyimino-N-methyl-2-(2-phenoxyphenyl)acetamide

Κωδικός: SSF - 126

Εμπορικά ονόματα: “Oribright” (Shionogi)

Η σύνθεσή του είναι καθαρότητας πάνω από 97%. Είναι διαλυτό στο νερό 0,128 gr/lit (20°C), σε διχλωρομεθάνιο 1380, χλωροφόρμιο 1280 και διμεθυλ-σουλφοξείδιο 940 (όλα gr/lit, 25°C).

Είναι σταθερό στη θέρμανση και την οξείδωση καθώς και σε μέσα αλκαλικά, ενώ είναι ελαφρά ασταθές στο φως. Έχει οξεία τοξικότητα LD₅₀ για αρσενικά ποντίκια 776 mg/kg, ενώ για θηλυκά 708 mg/kg, δεν είναι ερεθιστικό για το δέρμα. Τα ψάρια σκοτώνονται σε 22,5 mg/lit ενώ για τις μέλισσες έχει LD₅₀ >50000 από στόματος, με επαφή LD₅₀ >100.000ppm. Χρόνος ημιζωής στο έδαφος DT₅₀=339-346 ημέρες.

Τρόπος δράσης: Παρεμποδίζει τη μεταφορά ηλεκτρονίων στην αναπνοή και δρα εμποδίζοντας τη διαδικασία μεταξύ κυτοχρώματος b και κυτοχρώματος G.

Εφαρμογές - χρήσεις: Όπως αναφέρθηκε, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της πυρικούλαρίωσης του ρυζιού που προκαλείται από το μύκητα *P. oryzae* και εμφανίζει ικανοποιητικά αποτελέσματα (Anonymous, 1998).

ΜΕΡΟΣ Β΄
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πειραματική εργασία μελετήθηκε η βιολογική δράση μυκητοκτόνων της ομάδας των στρομπιλουρινών, των azoxystrobin και kresoxim-methyl, επί τριών απομονώσεων του *P. oryzae* δύο από φυτά κτενάνθης (Ct.4 & Ct.6) και μίας από φυτά ρυζιού (R.9).

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων και των δύο μυκητοκτόνων στην ανάπτυξη του μυκηλίου. Αυτό έγινε μετρώντας τη διάμετρο (mm) της αποικίας της κάθε απομόνωσης για 7 συνεχόμενες ημέρες με επώαση στους 25°C στο σκοτάδι (από τις 25/3/99 που έγινε η μεταφύτευση από παλιότερες αποικίες έως τις 31/3/99). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,005, 0,01, 0,1 και 1μg/ml για το azoxystrobin και 0,005, 0,01, 0,1, 1, 10, και 100μg/ml για το kresoxim-methyl.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υψηλότερη συγκέντρωση του azoxystrobin (1μg/ml) ήταν ικανή να περιορίσει σημαντικά την ανάπτυξη του μυκηλίου των Ct.4 και Ct.6 και περισσότερο από 50% της R.9 ενώ για την επίτευξη παρόμοιων ποσοστών απαιτήθηκε εκατονταπλάσια συγκέντρωση του kresoxim-methyl (100μg/ml) και για τις τρεις απομονώσεις.

Η μελέτη που ακολούθησε αφορά την επίδραση των δυο αυτών μυκητοκτόνων στη βλάστηση των σπορίων και το σχηματισμό του appressorium. Στο γυαλί τα κονίδια του μύκητα βρέθηκε να παράγουν βλαστικούς σωλήνες μέσα σε 3h αλλά χωρίς να σχηματίζουν απρεσσόριο, ενώ πάνω σε "teflon", παράγουν βλαστικούς σωλήνες, που καταλήγουν στο σχηματισμό appressorium.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βλάστηση των σπορίων των απομονώσεων Ct.4 και Ct.6 περιοριζόνταν στο ελάχιστο από τις μέγιστες συγκεντρώσεις (10μg/ml) και των δύο μυκητοκτόνων γεγονός που δεν ισχύει για την απομόνωση R.9 η οποία συνέχισε να βλαστάνει. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων (10μg/ml) είναι αυτές που δεν επιτρέπουν το σχηματισμό του appressorium σε όλες τις απομονώσεις εκτός από το kresoxim-methyl που δεν καταφέρνει να περιορίσει τελείως το σχηματισμό του appressorium της R.9 αλλά παρόλ' αυτά το συγκρατεί κάτω από το 50%.

Όσο για την παραγωγή σπορίων της κάθε απομόνωσης ανά cm² αποικίας, που αποτέλεσε το τρίτο αντικείμενο της μελέτης, διαπιστώθηκε ότι οι απομονώσεις Ct.4 και Ct.6 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες ακόμη και στις μικρές συγκεντρώσεις και των δύο μυκητοκτόνων (0,01μg/ml) ενώ απαιτούνται μέγιστες συγκεντρώσεις (1μg/ml του azoxystrobin και 100μg/ml του kresoxim-methyl) για να μειωθεί η παραγωγή σπορίων της R.9 κάτω από

10000 σπόρια/cm² αποικίας. Σημειώνεται ότι και εδώ χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συγκεντρώσεις με εκείνες της μελέτης ανάπτυξης του μυκηλίου.

Τέλος η προσπάθεια προσδιορισμού των συγκεντρώσεων που παρεμποδίζουν κατά 50% τη βλάστηση των σπορίων αλλά και την ανάπτυξη του μυκηλίου, (τιμές ED₅₀), οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι τιμές του kresoxim-methyl είναι μεγαλύτερες από εκείνες του azoxystrobin.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η δράση τόσο του azoxystrobin όσο και του kresoxim-methyl, εναντίον πλήθους φυτοπαθογόνων μυκήτων, μελετήθηκαν από πολλούς ερευνητές. Σχετικά με τη δράση τους εναντίον του *P. oryzae* έχουν δημοσιευθεί έρευνες που αφορούν την αντιμετώπιση της πυρικούλαρίωσης στον αγρό.

Σύμφωνα με τους Godwin et al (1992) το azoxystrobin (κωδικός: ICIA 5504) παρουσιάζει προστατευτική, θεραπευτική και διασυστηματική δράση εναντίον ενός μεγάλου εύρους οικονομικά σημαντικών παθογόνων μεταξύ των οποίων και του *P. oryzae*. Μάλιστα υποστηρίχθηκε ότι έχει την ικανότητα να ελέγχει στελέχη μυκήτων που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε παρεμποδιστές απομεθυλίωσης στη θέση 14(DMIS), φαινυλαμίδια, δικαρβοξιμιδικά ή βενζιμιδαζολικά προσφέροντας πολύτιμη βοήθεια στην αντιμετώπιση των παθογόνων. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, οι επεμβάσεις στον αγρό με azoxystrobin με τη μορφή κόκκων ή με ψεκασμό, περιορίζουν σημαντικά την πυρικούλαρίωση ακόμη και 37 ημέρες μετά την εφαρμογή.

Τον ίδιο χρόνο οι Ammerman et al (1992) υποστήριξαν τον εξαιρετικό έλεγχο του kresoxim-methyl (κωδικός: BAS 490F) εναντίον ωιδίων στην άμπελο, τη μηλιά, τα κολοκυνθοειδή, το φουζικλάδιο στη μηλιά και την πυρικούλαρίωση στο ρύζι. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι παρέχει ικανοποιητικό έλεγχο με ψεκασμό του φυλλώματος στον αγρό αφού πετυχαίνει πλήρη έλεγχο της ασθένειας ακόμη και 72 ώρες μετά τη μόλυνση, ενώ εξίσου αποτελεσματικό είναι και σε εφαρμογές *in vitro*. Ωστόσο η διαβροχή φυτών ρυζιού που καλλιεργείται υδροπονικά δεν έδωσε ενδείξεις για διασυστηματική δράση εναντίον του *P. oryzae*.

Λίγο αργότερα (1994) οι Heaney & Knight των αγροχημικών Zeneca υποστήριξαν τον έλεγχο του ωιδίου των κολοκυνθοειδών, διαφόρων παθογόνων της αραχίδας και τον εξαιρετικό έλεγχο του πρώιμου και του όψιμου περονόσπορου στην τομάτα, με τη χρήση του azoxystrobin. Το μυκητοκτόνο παρουσίασε εξαιρετική διασυστηματική δράση προστατεύοντας ακόμη και φύλλα που κατά τον ψεκασμό δεν είχαν ακόμη εκπτυχθεί. Ψεκασμός φυλλώματος με azoxystrobin έδωσε ισότιμα ή υψηλότερα επίπεδα καταπολέμησης από εκείνα των ήδη εν χρήσει εμπορικών σκευασμάτων. Επιπλέον το azoxystrobin ήταν αποτελεσματικό εναντίον μεγαλύτερου εύρους ασθενειών από οποιοδήποτε άλλο διασυστηματικό ή μη μυκητοκτόνο.

Οι δοκιμές των Dacol et al (1998) επιβεβαίωσαν το ευρύ φάσμα του azoxystrobin εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων. Εξαιρετικός έλεγχος των ωιδίων σε τομάτα, φράουλα και του περonosπόρου σε κολοκυνθοειδή επιτεύχθηκε τόσο στον αγρό όσο και στο θερμοκήπιο. Το azoxystrobin πέτυχε υψηλό ποσοστό ελέγχου (>90%) των παραπάνω ασθeneιών.

Σκοπός του πειραματικού μέρους της μελέτης είναι να βρεθεί η επίδραση των azoxystrobin και kresoxim-methyl στην ανάπτυξη του μυκηλίου του *P. oryzae*, στη βλάστηση των σπορίων και το σχηματισμό του appressorium κατά τη διαδικασία μόλυνσης. Επίσης επιδιώκεται η μελέτη της επίδρασης των μυκητοκτόνων στην παραγωγή των σπορίων του μύκητα καθώς και τον προσδιορισμό των τιμών ED₅₀ τόσο για τη βλάστηση όσο και την ανάπτυξη του μυκηλίου.

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των μυκητοκτόνων που επιδρούν αρνητικά στην ανάπτυξη του μύκητα καθώς και των συνθηκών κάτω από τις οποίες τα μυκητοκτόνα είναι αποτελεσματικά θα βοηθήσουν στην αντιμετώπιση της ασθένειας. Με τον τρόπο αυτό θα βελτιωθεί η καλλιέργεια του ρυζιού αλλά και της κτενάνθης που όπως αποδείχθηκε πρόσφατα, αντιμετωπίζει προβλήματα με τη μορφή επιδημίας σε συνθήκες θερμοκηπίου.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1) Θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης μυκηλίου

- PDA

Χρησιμοποιήθηκε το τυποποιημένο υλικό PDA (Potato dextrose agar) της εταιρείας MERCK (PH: $5,6 \pm 0,2$ στους 25°C). Η διαδικασία παρασκευής του θρεπτικού υποστρώματος, ήταν η ακόλουθη: Ζυγίστηκαν 39 gr του υλικού (σκόνη) και διαλύθηκαν σε 1lt απεσταγμένου νερού. Θερμάνθηκε ως το σημείο βρασμού, αναδεύοντας συνεχώς. Στη συνέχεια το υλικό τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες ή δοκιμαστικούς σωλήνες και τοποθετήθηκαν στον αυτόματο κλίβανο για αποστείρωση στους 120°C για 15min.

- Υλικό που προέρχεται από εκγύλισμα κόκκων ρυζιού

Πρόκειται για υλικό που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο και χρησιμοποιήθηκε για τον ίδιο σκοπό όπως και το προηγούμενο. Χρησιμοποιήθηκαν 32gr αναποφλοιώτο ρύζι. Προστέθηκαν 100 ml νερού και πολτοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή. Στη συνέχεια στο ομογενοποιημένο μείγμα προστέθηκε 1lt απεσταγμένου νερό μαζί με agar. Θερμάνθηκε ως το σημείο βρασμού, αναδεύοντας συνεχώς και αποστειρώθηκε στον κλίβανο ακολουθώντας τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω.

2) Υλικά εμπλουτισμένα με αντιβιοτικά

- Chloramphenicol

Πρόκειται για αντιβιοτικό και χρησιμοποιήθηκε για να προστατευθούν οι καλλιέργειες του μύκητα από την ανάπτυξη βακτηρίων. Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία παρασκευής: Ζυγίστηκαν 50mgr chloramphenicol σε ζυγό ακριβείας. Διαλύθηκαν σε 5cm^3 αλκοόλης και στη συνέχεια προστέθηκαν σε 1lt υλικού PDA λίγο πριν την αποστείρωση.

3) Υλικά εμπλουτισμένα με μυκητοκτόνα

- Χρησιμοποιήθηκαν τα σκευάσματα Stroby και Ortiva

Πρόκειται για μυκητοκτόνα της ομάδας των στρομπιλουρινών των οποίων η δράση κατά του *P. oryzae* μελετήθηκε στην παρούσα εργασία.

- Stroby 50 WG (kresoxim - methyl 50 a.i %) της εταιρείας AgrEvo.
- Ortiva (azoxystrobin 25 a.i %) της εταιρείας Zeneca

4) Απομονώσεις του παθογόνου μύκητα

Χρησιμοποιήθηκαν 3 απομονώσεις του *P. oryzae*, οι: R.9, Ct.4 και Ct.6. Η R.9 απομονώθηκε από ασθενή φυτά ρυζιού, ενώ οι Ct.4 και Ct.6 από ασθενή φυτά της *Ctenanthe orrenheimiana*.

Πρόκειται για απομονώσεις που διατηρούνταν επί υλικού PDA στη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και παραχωρήθηκαν για τις ανάγκες της εργασίας.

5) Διαλύτης μυκητοκτόνων DMSO

Πρόκειται για το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία παραγωγής των βασικών διαλυμάτων των δύο μυκητοκτόνων.

Dimethyl sulfoxide (DMSO) Art 802912 Zur synthese C_2H_6SO , $M=78,13$ g/mol, 1lt = 1,10 kg (της εταιρείας Merck - Schuchardt).

6) Διαδικασία παρασκευής βασικών διαλυμάτων

Έγινε διάλυμα 25ml, συγκεντρώσεως 1000 ppm (=1000μg/ml =1000mg/lt) και για τα δύο μυκητοκτόνα.

α) Από το σκεύασμα Strobry (kresoxim-methyl 50 δ.ο%) ζυγίστηκαν με ζυγό ακριβείας 50mg (0,025gr δρ. ουσίας), το οποίο ήταν σε μορφή σκόνης. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε ογκομετρικό φιαλίδιο των 25ml και συμπληρώθηκε ως τη γραμμή του φιαλιδίου με το διαλύτη, dimethyl sulfoxide.

β) Από το σκεύασμα Ortiva (azoxystrobin 25 δ.ο. %) ζυγίστηκε ποσότητα σκευάσματος 100 mg (0,025 g δραστικής ουσίας) σε ζυγό ακριβείας, τοποθετήθηκε σε ογκομετρικό φιαλίδιο των 25 ml και συμπληρώθηκε ως τη γραμμή με το διαλύτη.

Από τα βασικά διαλύματα συγκεντρώσεως 1000 ppm, έγιναν οι κάτωθι υποσυγκεντρώσεις :
100ppm:

Από το βασικό διάλυμα των 1000ppm του kresoxim-menthyl με τη βοήθεια πιπέτας του 1ml, πάρθηκε 1ml και τοποθετήθηκε σε ογκομετρικό φιαλίδιο των 10cm³, το οποίο συμπληρώθηκε ως τη γραμμή με 9ml του διαλύτη, dimethyl sulfoxide. Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε και για το azoxystrobin.

10ppm:

Από το βασικό διάλυμα των 100ppm του kresoxim-menthyl με τη βοήθεια πιπέτας του 1ml, πάρθηκε 1ml και τοποθετήθηκε σε ογκομετρικό φιαλίδιο των 10cm³, το οποίο

συμπληρώθηκε ως τη γραμμή με 9ml του διαλύτη, dimethyl sulfoxide. Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε και για το azoxystrobin.

1ppm:

Από το βασικό διάλυμα των 10ppm του kresoxim-methyl με τη βοήθεια πιπέτας του 1ml, πάρθηκε 1ml και τοποθετήθηκε σε ογκομετρικό φιαλίδιο των 10cm³, το οποίο συμπληρώθηκε ως τη γραμμή με 9ml του διαλύτη, dimethyl sulfoxide. Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε και για το azoxystrobin.

- Σημειώνεται ότι όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία παρασκευής των βασικών διαλυμάτων, όπως φιαλίδια για το ζύγισμα των ουσιών, σπάτουλες, χωνιά, πιπέτες, πριν και μετά τη χρήση τους, ξεπλύθηκαν 3 φορές με ακετόνη.
- Η επιλογή του διαλύτη έγινε βάσει της βιβλιογραφίας, στην οποία αναφέρεται ότι καλός διαλύτης του SSF - 126(658), ενός άλλου παραγώγου στρουμπλουρίνης, είναι ο dimethyl sulfoxide 940 (Anonymus, 1998).

4.1 ΠΕΙΡΑΜΑ I: "Επίδραση μυκητοκτόνων στην ανάπτυξη του μυκηλίου"

Υλικά: Χρησιμοποιήθηκαν φιαλίδια ζυγίσματος, σπάτουλες, χωνιά, πιπέτες, ογκομετρικά φιαλίδια των 10 cm³, τριβλία Petri, θρεπτικό υλικό PDA, chloramphenicol, κωνικές φιάλες των 200 ml, μυκητοκτόνα azoxystrobin και kresoxim-methyl, φελλοτρυπητής διαμέτρου 5mm, λαβίδες .

Μέθοδος: Μετά από προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο με σκοπό την επιλογή των κατάλληλων συγκεντρώσεων, εκείνες που τελικά δοκιμάστηκαν ήταν οι: 0,005, 0,01, 0,1, 1, 10 και 100 mg/l για το kresoxim-methyl και οι: 0,005, 0,01, 0,1 και 1 mg/l για το azoxystrobin.

- Συγκέντρωση 0.005 ppm.

Από το βασικό διάλυμα του 1 ppm, με τη βοήθεια πιπέτας, πάρθηκε 1ml διαλύματος και προστέθηκε σε 200ml ρευστού υλικού PDA που είχε αποστειρωθεί (η διαδικασία έγινε κάτω από ασηπτικές συνθήκες).

- Συγκέντρωση 0.01 ppm.

Από το βασικό διάλυμα του 1 ppm, με τη βοήθεια πιπέτας, ελήφθησαν 2 ml διαλύματος και προστέθηκαν σε 200 ml υλικό PDA.

- Συγκέντρωση 0,1 ppm.

Από το βασικό διάλυμα των 10 ppm , με τη βοήθεια πιπέτας, ελήφθησαν 2ml διαλύματος και προστέθηκαν σε 200 ml ρευστού υλικού PDA.

- Συγκέντρωση 1 ppm.

Από το βασικό διάλυμα των 100 ppm, με τη βοήθεια πιπέτας, ελήφθησαν 2 ml διαλύματος και προστέθηκαν σε 200 ml PDA.

- Συγκέντρωση 10 ppm.

Από το βασικό διάλυμα 1000 ppm, με τη βοήθεια πιπέτας, ελήφθησαν 2 ml διαλύματος και προστέθηκαν σε 200 ml PDA.

- Συγκέντρωση 100 ppm.

Ζυγίστηκαν 40 mg του σκευάσματος (kresoxim-methyl,50%) στο ζυγό ακριβείας και προστέθηκαν σε 200 ml υλικού PDA, αφού πρώτα προστέθηκαν 2 ml διαλύτη, DMSO.

Η διαδικασία πραγματοποίησης του πειράματος, ήταν η ακόλουθη:

Αρχικά, παρασκευάστηκε το υλικό PDA όπως περιγράφηκε (έγιναν 2000 ml) και αμέσως μετά προστέθηκαν 100mg του αντιβιοτικού chloramphenicol. Το υλικό μοιράστηκε σε κωνικές φιάλες των 200 ml και αποστειρώθηκε. Αργότερα και όταν το υλικό είχε την κατάλληλη θερμοκρασία, κάτω από ασηπτικές συνθήκες, προστέθηκαν σε κάθε φιάλη οι αντίστοιχες ποσότητες των μυκητοκτόνων που υπολογίστηκαν προηγουμένως.

(Χρησιμοποιήθηκαν τόσες φιάλες, όσες και οι μελετώμενες συγκεντρώσεις, μια για κάθε συγκέντρωση). Ο μάρτυρας περιείχε 200 ml υλικού-chloramphenicol και 2 ml διαλύτη DMSO (διαλύτης< 1%). Το περιεχόμενο της κάθε φιάλης, μοιράστηκε ομοιόμορφα σε 9 τριβλία (για την κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν 3 απομονώσεις x 3 επαναλήψεις = 9), αφού ανακινήθηκε ελαφρά με προσοχή ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες στην επιφάνεια του υλικού στα τριβλία. Το κάθε τριβλίο περιείχε περίπου 22 ml υλικού. Μετά από 2 ημέρες, οπότε και εξατμίστηκαν οι υδατμοί που υπήρχαν μέσα στα τριβλία, έγιναν μολύνσεις μεταφέροντας δίσκους μυκηλιακών υφών ($\delta = 5$ mm) από την περιφέρεια αποικιών 14 ημερών που είχαν αναπτυχθεί στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 25°C.

Η μεταφορά των δίσκων έγινε κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Οι υποκαλλιέργειες επωάστηκαν στους 25°C στο σκοτάδι για 7 ημέρες και καθημερινά λαμβάνονταν μετρήσεις της διαμέτρου ανάπτυξης της αποικίας.

4.2 ΠΕΙΡΑΜΑ II: "Επίδραση μυκητοκτόνων στη βλάστηση σπορίων"

Υλικά: Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό ρυζιού, κεκαμένη γυάλινη ράβδος, χωνιά, μουσελίνα, δοκιμαστικοί σωλήνες, αποστειρωμένες και απλές πιπέτες των 1ml και 2ml, συσκευή ανάδευσης, αιματοκυτόμετρο, μετρητής σπορίων χεριού, φιαλίδια ζυγίσματος, ογκομετρικά φιαλίδια των 10 cm³, σπάτουλες, αντικειμενοφόροι πλάκες, λεπτές ταινίες teflon, θάλαμοι υγρής επώασης, azoxystrobin και kresoxim-methyl.

Μέθοδος: Αρχικά ετοιμάστηκε το αιώρημα των σπορίων των τριών απομονώσεων (Ct.4, Ct.6 και R.9). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες των Ct.4, Ct.6 και R.9 που είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα ρυζιού και διατηρήθηκαν για 5 ημέρες στο σκοτάδι στους 25°C στη συνέχεια για 6 ημέρες σε "black light" (200-400nm) και μετά πάλι για 2 ημέρες στο σκοτάδι στους 25°C.

Στη συνέχεια, σε κάθε τριβλίο προστέθηκαν 10cm³ αποστειρωμένου νερού και τρίφτηκε ελαφρά η επιφάνεια της καλλιέργειας με την κεκαμένη γυάλινη ράβδο, ώστε να αποκολληθούν τα σπόρια. Το αιώρημα των σπορίων έπειτα από διήθηση δια μέσου διπλού στρώματος μουσελίνας για την απομάκρυνση τυχόν θραυσμάτων μυκηλίου μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα.

Μετά από ανακίνηση μερικών δευτερολέπτων, με τη βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας, πάρθηκε μικρή ποσότητα του μολύσματος και μετρήθηκε στο αιματοκυτόμετρο (x10000) ο αριθμός των σπορίων που υπήρχαν σε κάθε cm³ του υδάτινου αιωρήματος και έγινε τελική προσαρμογή της συγκεντρώσεως με προσθήκη ανάλογης ποσότητας νερού ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 10000 σπόρια / cm³ περίπου.

Τα αποτελέσματα της μέτρησης για την κάθε απομόνωση ήταν τα ακόλουθα:

α) **Ct.4**

Βρέθηκαν 60.000 σπόρια / cm³ διαλύματος. Λόγω της μεγάλης του πυκνότητας, έγινε αραιώση του διαλύματος στα 10.000 σπόρια / cm³. Με αναλογία μόλυσμα / H₂O ίση με 1/4, δημιουργήθηκαν 5 ml διαλύματος, συγκεντρώσεως 10000 σπόρια / cm³.

β) **Ct.6**

Βρέθηκαν 100.000 σπόρια / cm³ διαλύματος. Μετά από αραιώση και αναλογία 0,5ml μολύσματος προς 4,5ml H₂O, έγιναν 5ml διαλύματος.



γ) **R.9**

Βρέθηκαν 15.000 σπόρια / cm³ διαλύματος. Μετά από αραιώση και αναλογία 3,5ml μολύσματος προς 1,5ml H₂O, έγιναν 5ml διαλύματος.

Στα αιωρήματα σπορίων συγκέντρωσης 10000 σπόρια / cm³ προσετέθησαν ανάλογες ποσότητες μυκητοκτόνου διαλύματος ώστε να παρασκευαστούν τελικές συγκεντρώσεις 0,01, 0,1, 1 και 10 mg/lit κατά τον ακόλουθο τρόπο:

- Συγκέντρωση 0.01 ppm(=0.01 mg/lit).

Από το βασικό διάλυμα συγκεντρώσεως 1ppm, με τη βοήθεια πιπέτας, ελήφθησαν 0,1ml και προστέθηκαν σε 10ml αιωρήματος σπορίων.

- Συγκέντρωση 0,1 ppm.

Από το βασικό διάλυμα συγκεντρώσεως 10ppm, με τη βοήθεια πιπέτας, ελήφθησαν 0,1ml και προστέθηκαν σε 10ml αιωρήματος σπορίων.

- Συγκέντρωση 1ppm.

Από το βασικό διάλυμα συγκεντρώσεως 100ppm, με τη βοήθεια πιπέτας, ελήφθησαν 0,1ml και προστέθηκαν σε 10ml αιωρήματος σπορίων.

- Συγκέντρωση 10ppm.

Από το βασικό διάλυμα συγκεντρώσεως 1000ppm, με τη βοήθεια πιπέτας, ελήφθησαν 0,1ml και προστέθηκαν σε 10ml αιωρήματος σπορίων.

Από το περιεχόμενο του κάθε δοκιμαστικού σωλήνα που δημιουργήθηκαν προηγουμένως, με τη βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας, ελήφθησαν 4 σταγόνες και τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες στις οποίες είχαν απλωθεί προσεκτικά εξαιρετικά λεπτές ταινίες teflon, ώστε να εξασφαλίζεται η διαύγεια του υλικού. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 12 αντικειμενοφόροι για το azoxystrobin, 12 για το kresoxim-methyl (μια για κάθε μελετούμενη συγκέντρωση φαρμάκου σε κάθε απομόνωση, δηλ. 3 απομονώσεις x 4 συγκεντρώσεις = 12) και 6 για το μάρτυρα (3 απομονώσεις x 2 = 6). Οι αντικειμενοφόροι τοποθετήθηκαν σε αυτοσχέδιους υγρούς θαλάμους με συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας και επώαστηκαν σε χώρο θερμοκρασίας 22,5⁰C για περίπου 20h.

4.3 ΠΕΙΡΑΜΑ ΙΙΙ : "Επίδραση μυκητοκτόνων επί της παραγωγής σπορίων"

Υλικά: Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα υλικά: κεκαμένη γυάλινη ράβδος, χωνιά, μουσελίνα, πιπέτες, μηχανήμα ανακίνησης, δοκιμαστικοί σωλήνες, αιματοκυτόμετρο,

μετρητής σπορίων χεριού, οι καλλιέργειες των 3 απομονώσεων σε υλικό PDA που δημιουργήθηκαν στο ΠΕΙΡΑΜΑ II, επιτραπέζια φυγόκεντρος, θάλαμος "black light".

Μέθοδος: Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος II, διαχωρίστηκαν οι παρακάτω καλλιέργειες στις συγκεντρώσεις των φαρμάκων (azoxystrobin και kresoxim-methyl) που παρουσίασαν ανάπτυξη του μυκηλίου.

Απομόνωση Ct.6	Απομόνωση Ct.4	Απομόνωση R.9
Μάρτυρας	Μάρτυρας	Μάρτυρας
Azoxystrobin 0,01 ppm	Azoxystrobin 0,005 ppm	Azoxystrobin 0,005 ppm
Kresoxim-methyl 0,005 ppm	Azoxystrobin 0,01 ppm	Azoxystrobin 0,01 ppm
Kresoxim-methyl 0,01 ppm	Kresoxim-methyl 0,005 ppm	Azoxystrobin 0,1 ppm
	Kresoxim-methyl 0,01 ppm	Azoxystrobin 1 ppm
		Kresoxim-methyl 0,005 ppm
		Kresoxim-methyl 0,01 ppm
		Kresoxim-methyl 0,1 ppm
		Kresoxim-methyl 1 ppm
		Kresoxim-methyl 10 ppm
		Kresoxim-methyl 100 ppm

Οι καλλιέργειες αυτές επωάστηκαν για 13 ημέρες στους 25⁰C στο σκοτάδι, στη συνέχεια και για 3 ημέρες εκτέθησαν για 12 h ημερησίως σε ακτινοβολία μήκους κύματος 200-400nm ("black light"), ώστε να ευνοηθεί η παραγωγή σπορίων από το μύκητα. Ο αριθμός των σχηματισθέντων σπορίων ανά cm² επιφάνειας καλλιέργειας υπολογίστηκε ως εξής: Σε κάθε τριβλίο, προσθέτονταν 10 cm³ νερού και τρίβονταν ελαφρά η επιφάνεια της καλλιέργειας με τη γυάλινη κεκαμένη ράβδο, ώστε να αποκολληθούν τα σπόρια. Το αιώρημα σπορειών έπειτα από διήθηση δια μέσου διπλού στρώματος μουσελίνας για την απομάκρυνση των θραυσμάτων μυκηλίου, μεταφέρονταν σε ειδικούς σωλήνες 10cm³ και συμπυκνώνονταν με φυγοκέντρηση για 10 min στις 3.000/min στροφές. Αμέσως μετά, από κάθε σωλήνα απομακρύνονταν τα υπερκείμενα 9 cm³ νερού με τη βοήθεια πιπέτας και ο αριθμός των σπορίων μετρώνταν στο εναπομείναν 1 cm³ του αιωρήματος ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε στο πείραμα II.

Γνωρίζοντας το εμβαδό της αποικίας (π² όπου r, η ακτίνα της κυκλικής αποικίας) και τον συνολικό αριθμό των σπορίων σ' αυτή υπολογίστηκε ο αριθμός των σπορίων/ cm² αποικίας.

4.4 ΠΕΙΡΑΜΑ IV : "Υπολογισμός των τιμών ED₅₀ των μυκητοκτόνων azoxystrobin και kresoxim-methyl για την ανάπτυξη του μυκηλίου και τη βλάστηση των σπορίων."

α. Ανάπτυξη μυκηλίου

Υπολογίστηκε το ποσοστό μέσης παρεμπόδισης της ημερήσιας ανάπτυξης του μυκηλίου (εκφρασμένο ως ποσοστό % του μάρτυρα) με μέτρηση της διαμέτρου (σε mm) της κάθε αποικίας που αναπτύχθηκε επί θρεπτικού υλικού PDA σε τριβλία Petri εμπλουτισμένου με διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου για διάστημα 7 ημερών επώασης στους 25⁰ C στο σκοτάδι. Σε κάθε συγκέντρωση μυκητοκτόνου έγιναν τρεις επαναλήψεις. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κοινές και για τα δύο μυκητοκτόνα (0,001, 0,01, 1 και 10μg/ml). Για κάθε περίπτωση υπολογίστηκε με τη βοήθεια πινάκων ο λογάριθμος (log) της συγκέντρωσης μυκητοκτόνου και οι τιμές "probit" των αντιστοιχών ποσοστών παρεμπόδισης ανάπτυξης του μυκηλίου. Οι τιμές ED₅₀ υπολογίστηκαν για κάθε απομόνωση και κάθε μυκητοκτόνο δια παραθέσεως σε σύστημα αξόνων XY των λογαριθμικών τιμών των συγκεντρώσεων μυκητοκτόνων (X) έναντι των τιμών "probit" (Y). Η νοητή ευθεία που διερχόταν από τα σημεία τομής των τιμών βοήθησε στο να βρεθεί ο λογάριθμος που αντιστοιχεί στην τιμή 5 probit και να υπολογιστεί η συγκέντρωση μυκητοκτόνου που αποτελεί την τιμή ED₅₀ για την αντίστοιχη απομόνωση.

β. Βλάστηση σπορίων

Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, και αφού υπολογίστηκε το ποσοστό παρεμπόδισης (εκφρασμένο ως ποσοστό % του μάρτυρα) της βλάστησης των σπορίων μετά από επώαση 20 ωρών στο σκοτάδι, βρέθηκαν οι αντίστοιχες τιμές ED₅₀ των μυκητοκτόνων που αφορά τη βλάστηση των σπορίων.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Επίδραση στη ανάπτυξη του μυκηλίου

Τα αποτελέσματα εξήχθησαν μετά από 7 ημέρες ανάπτυξης του μυκηλίου σε θάλαμο 25°C στο σκοτάδι, μετρώντας καθημερινά την διάμετρο (mm) της αποικίας, και λαμβάνοντας υπόψη το μέσο όρο 3 επαναλήψεων.

Απλή παρατήρηση των αποικιών έδειξε ότι μόνο η απομόνωση του μύκητα R.9 από φυτά ρυζιού, χαρακτηρίζεται από σκούρο ως μαύρο χρώμα αποικίας εξαιτίας του σχηματισμού μελανίνης.

Η μελέτη των αποτελεσμάτων που αφορούν την ανάπτυξη του μυκηλίου των 3 απομονώσεων του *P. oryzae* (Ct.4, Ct.6, R.9) στις διάφορες συγκεντρώσεις του azoxystrobin και του kresoxim-methyl, έδειξαν ότι καμία από τις μέγιστες συγκεντρώσεις των δύο μυκητοκτόνων δεν ήταν ικανή να σταματήσει τελείως την ανάπτυξη της R.9. Η πιο ευαίσθητη των απομονώσεων και στα δύο μυκητοκτόνα ήταν η Ct.4 ενώ το μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης παρουσίασε η R.9 (τόσο στο μάρτυρα όσο και στις συγκεντρώσεις των δύο φαρμάκων). Σε όλες τις περιπτώσεις η αποτελεσματικότητα του kresoxim-methyl ήταν σαφώς μικρότερη από εκείνη του azoxystrobin. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν τα ακόλουθα:

Στο μάρτυρα οι αποικίες άρχισαν να αναπτύσσονται σχεδόν ταυτόχρονα και για τις τρεις απομονώσεις, όμως ο ρυθμός ανάπτυξης της R.9 και της Ct.4 ήταν μεγαλύτερος από της Ct.6. Επίσης έπειτα από 7 ημέρες ανάπτυξης η R.9 παρουσίασε τη μεγαλύτερη διάμετρο αποικίας (238 mm) σε σχέση με την αντίστοιχη της Ct.4 (234 mm) και της Ct.6 (177 mm).

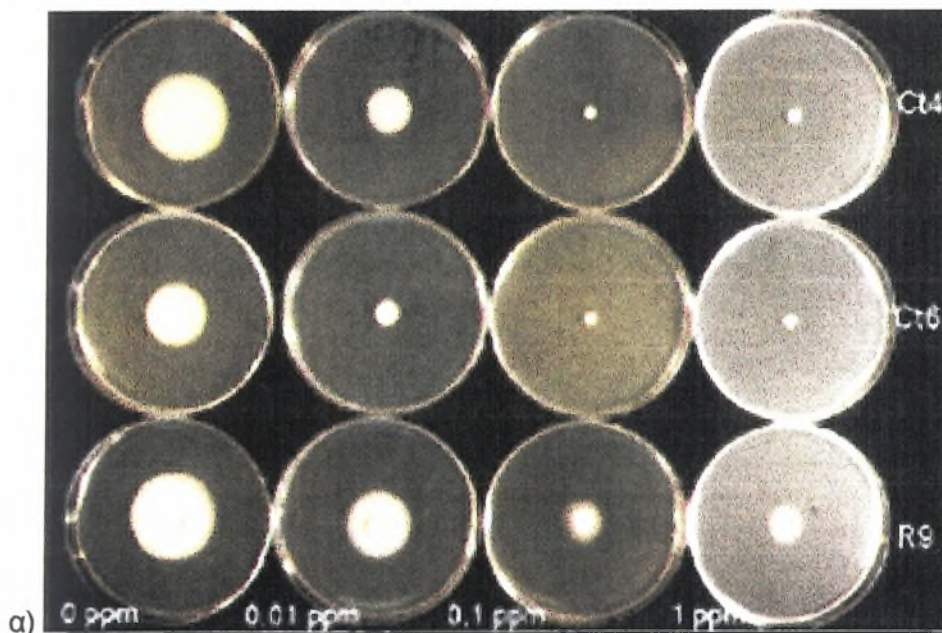
Η συγκέντρωση 0,1 µg/ml του azoxystrobin, ήταν η χαμηλότερη συγκέντρωση που παρεμπόδισε πλήρως την ανάπτυξη του μυκηλίου των απομονώσεων Ct.4 και Ct.6 ενώ η ανάπτυξη της R.9 συνεχίστηκε ακόμη και στην υψηλότερη συγκέντρωση του azoxystrobin (1µg/ml), (Πίνακας 4).

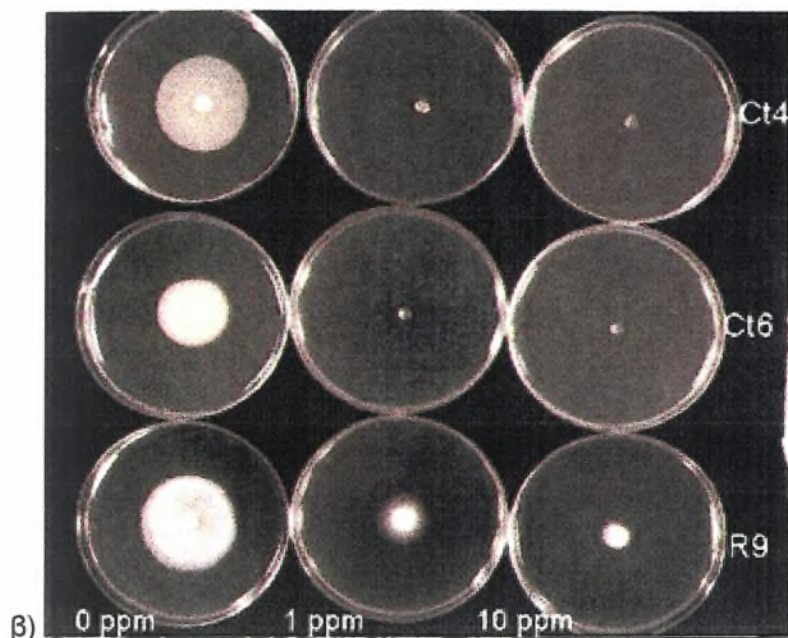
ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Ελάχιστη συγκέντρωση azoxystrobin και kresoxim-methyl για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου 3 απομονώσεων του *Pyricularia oryzae*

Απομόνωση	Μυκητοκτόνα (µg/ml)	
	Azoxystrobin	Kresoxim-methyl
Ct.4	0,1	1
Ct.6	0,1	1
R.9	>10	>100

Στην Εικόνα 3α φαίνεται η διαφορά ανάπτυξης του μυκηλίου του μάρτυρα σε σχέση με τις συγκεντρώσεις 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/ml}$ του azoxystrobin. Φαίνεται καθαρά ότι η ανάπτυξη των Ct.4 και Ct.6 σταμάτησε στη συγκέντρωση 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ενώ αντίθετα της R9 συνέχισε να αναπτύσσεται ακόμη και πέρα από τα 10 $\mu\text{g/ml}$ (Εικόνα 3β).

Οι απομονώσεις Ct.4 και Ct.6 παρουσίασαν μια μικρή καθυστέρηση στην έναρξη ανάπτυξης κατά μία ημέρα, στη συγκέντρωση 0,01 $\mu\text{g/ml}$ του azoxystrobin. Ανάλογη καθυστέρηση παρουσίασε η R.9 στις συγκεντρώσεις 0,1 και 1 $\mu\text{g/ml}$. Ακόμη, ενώ η συγκέντρωση 0,01 $\mu\text{g/ml}$ ήταν εκείνη που παρεμπόδισε κατά 50% την ανάπτυξη του μυκηλίου της Ct.6 και λίγο μεγαλύτερη για την Ct.4 (ED_{50} 0,012 $\mu\text{g/ml}$ και 0,019 $\mu\text{g/ml}$, αντίστοιχα), αυτή η παρεμπόδιση για την R.9 επιτεύχθηκε σε συγκέντρωση 0,3 $\mu\text{g/ml}$ (Πίνακας 5).





Εικόνα 3. Ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων Ct.4, Ct.6 και R.9 του *P. oryzae* α) στο μάρτυρα (0 ppm) και στις συγκεντρώσεις 0,01, 0,1 και 1ppm του azoxystrobin και β) στο μάρτυρα (0 ppm) και στις συγκεντρώσεις 1 και 10 ppm του azoxystrobin.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5 : Συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων που προκαλούν κατά 50% περιορισμό ανάπτυξης μυκηλίου και παρεμπόδισης βλάστησης των σπορίων (ED_{50}) στις 3 απομονώσεις του *Pyricularia oryzae* (Ct4, Ct6, R9).

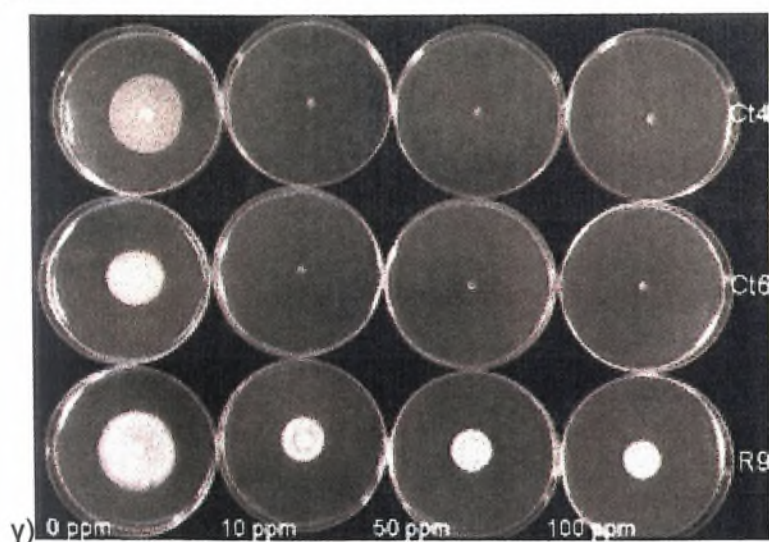
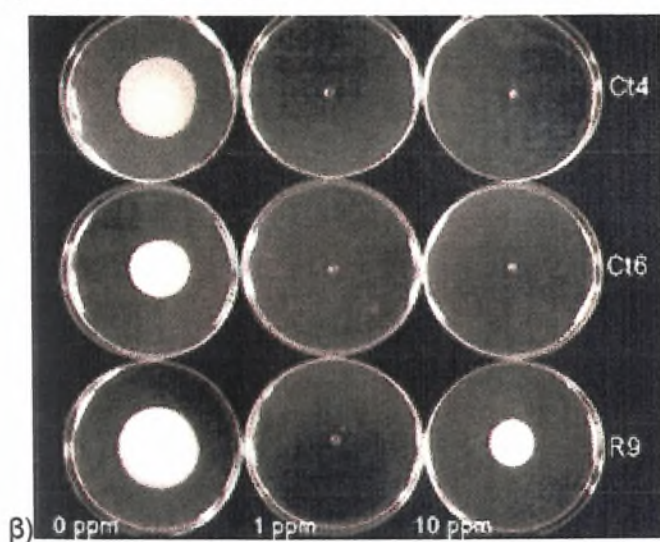
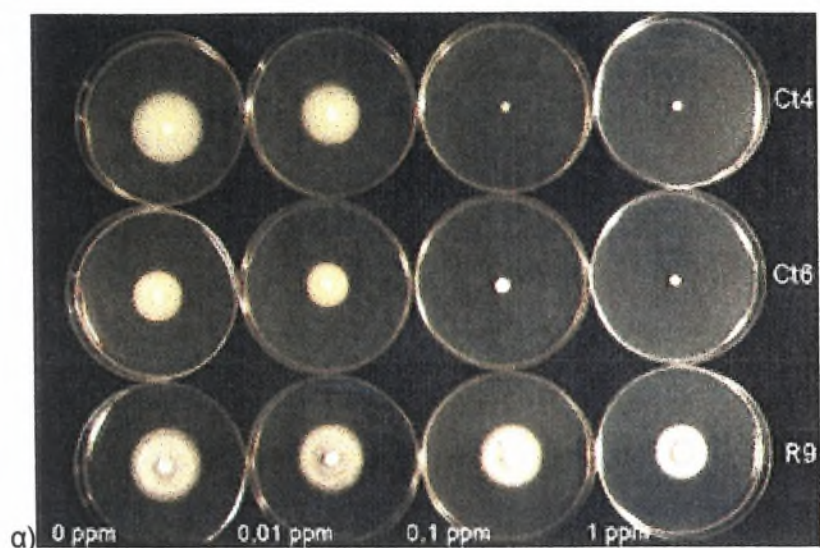
Απομόνωση	Μυκητοκτόνα (μg/ml)			
	Azoxystrobin		Kresoxim-methyl	
	ED_{50} ανάπτυξης μυκηλίου	ED_{50} βλάστησης σπορίων	ED_{50} ανάπτυξης μυκηλίου	ED_{50} βλάστησης σπορίων
Ct.4	0,019	0,006	0,035	0,06
Ct.6	0,012	0,035	0,035	0,025
R.9	0,31	>10	39,81	>10

Στην περίπτωση του kresoxim-methyl, απαιτήθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για τον περιορισμό της ανάπτυξης του μυκηλίου σε όλες τις απομονώσεις αν και η ευαισθησία της Ct.4 ήταν μεγαλύτερη από των άλλων δύο. Η R.9, συνέχισε να αναπτύσσεται ακόμη και στην μέγιστη συγκέντρωση (100μg/ml), εκατονταπλάσια της αντίστοιχης μέγιστης του azoxystrobin). Η επίδραση των συγκεντρώσεων του kresoxim-methyl στην ανάπτυξη του μυκηλίου των απομονώσεων φαίνεται στην Εικόνα 4.

Η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία σταματά η ανάπτυξη του μυκηλίου τόσο για την Ct.4 όσο και για την Ct.6 είναι τα 0,1μg/ml, ενώ για την R.9 μεγαλύτερη των 100μg/ml

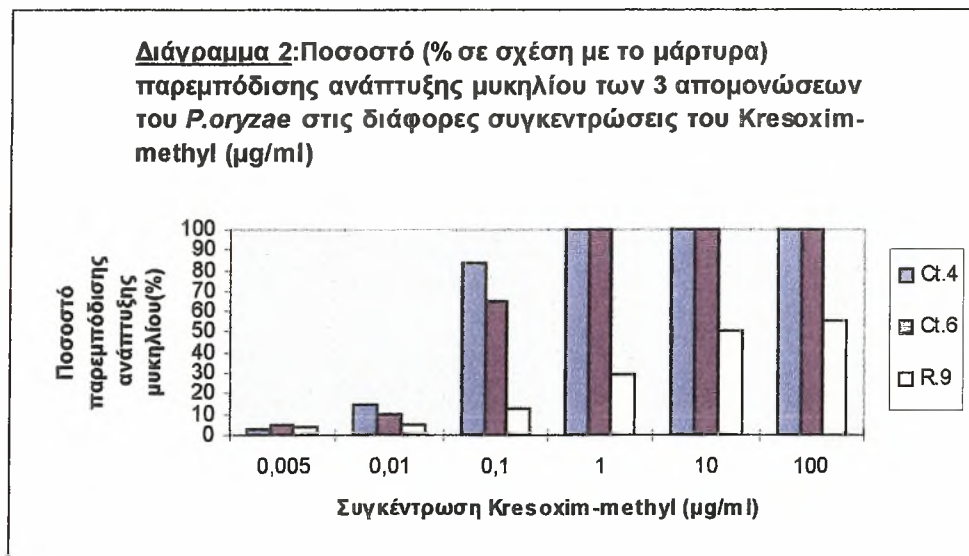
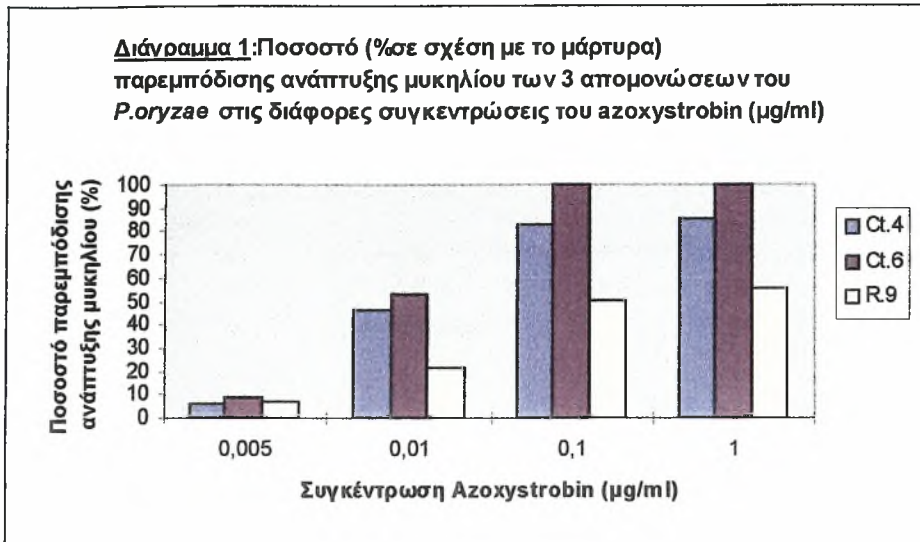
(Πίνακας 4). Παρεμπόδιση 50% της ανάπτυξης για τις απομονώσεις Ct.4 και Ct.6 παρουσιάστηκε στη συγκέντρωση 0,03 μg/ml αλλά για την R.9 ήταν 39,81 μg/ml (Πίνακας 5). Η μέγιστη συγκέντρωση του Kresoxim-methyl (100 μg/ml) παρεμπόδισε μόνο κατά 54,87% την ανάπτυξη της R.9.

Φαίνεται λοιπόν ότι η απομόνωση R.9 είναι πιο ανθεκτική από τις άλλες δύο τόσο στις συγκεντρώσεις του azoxystrobin, που όμως καταφέρνουν να ελέγξουν την ανάπτυξή της (οι μεγαλύτερες από αυτές), όσο και στις συγκεντρώσεις του kresoxim-methyl, που καταφέρνουν απλώς να την περιορίσουν.



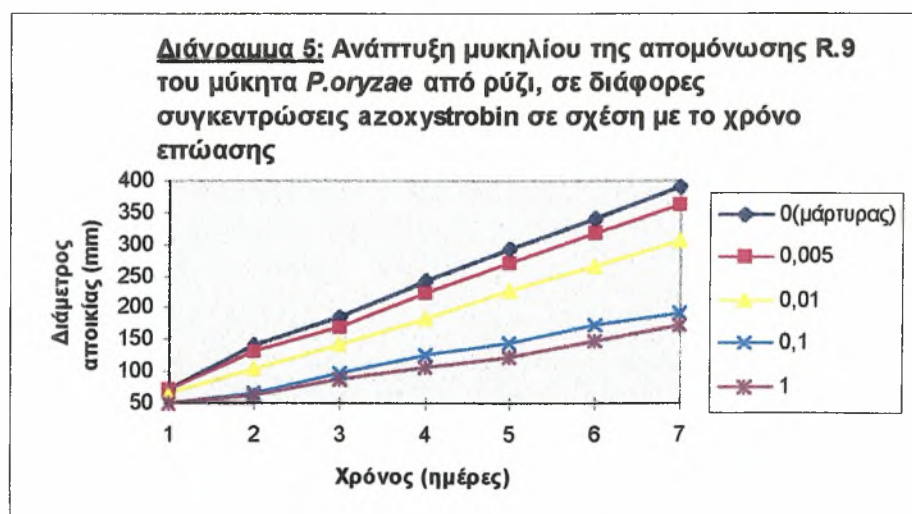
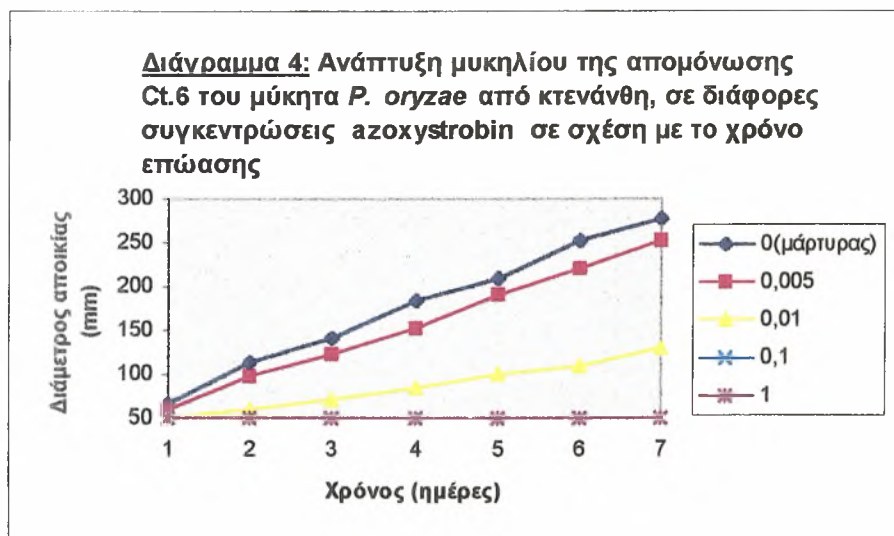
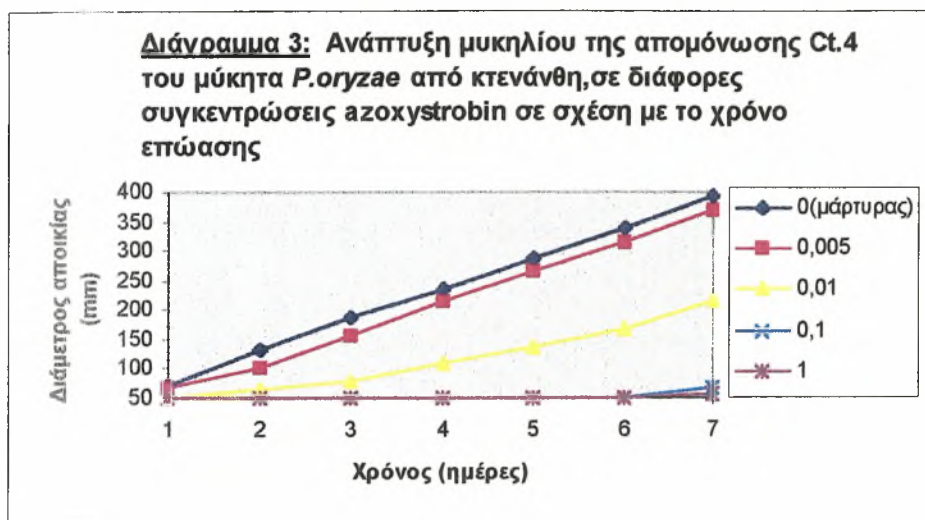
Εικόνα 4. Ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων Ct.4, Ct.6 και R.9 του *P.oryzae* στο μάρτυρα (0 ppm) και σε συγκεντρώσεις του kresoxim-methyl α) 0,01, 0,1, 1ppm β) 1 και 10 ppm και γ) 10, 50 και 100 ppm.

Το % ποσοστό παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μυκηλίου και για τις τρεις απομονώσεις από την εφαρμογή των azoxystrobin και kresoxim-methyl φαίνονται στα Διαγράμματα 1 και 2 αντίστοιχα.

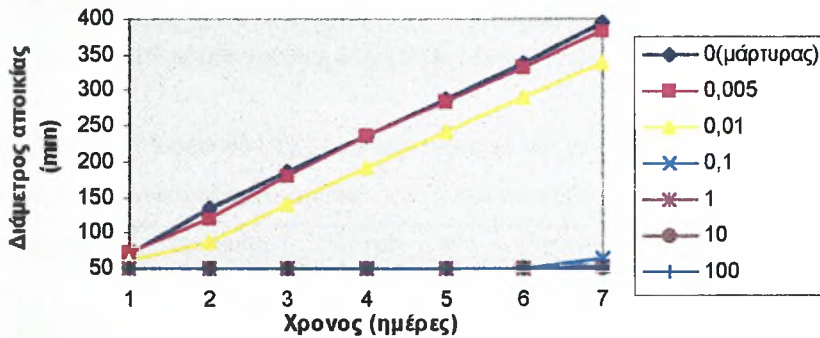


Απλή παρατήρηση των τριβλίων στα οποία αναπτύχθηκαν οι αποικίες, έδειξε ότι η απομόνωση R.9, στο μάρτυρα, στις συγκεντρώσεις 0,005, 0,01, 1μg/ml του kresoxim-methyl και στην 0,01μg/ml του azoxystrobin, σχημάτισε μελανίνη αποδίδοντας στην πάνω επιφάνεια της αποικίας χαρακτηριστικό σκούρο έως μαύρο χρώμα πράγμα που δεν συνέβη στις αποικίες των Ct.4 και Ct.6.

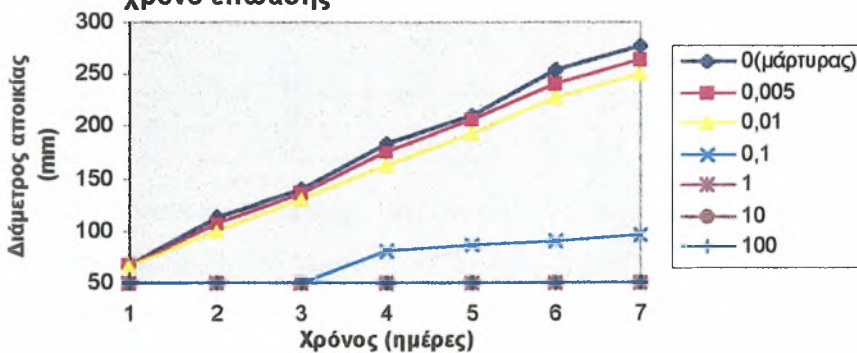
Οι διαφορές στη διάμετρο του μυκηλίου των τριών απομονώσεων τόσο στο μάρτυρα όσο και στα δύο μυκητοκτόνα φαίνονται στα Διαγράμματα 3-8.



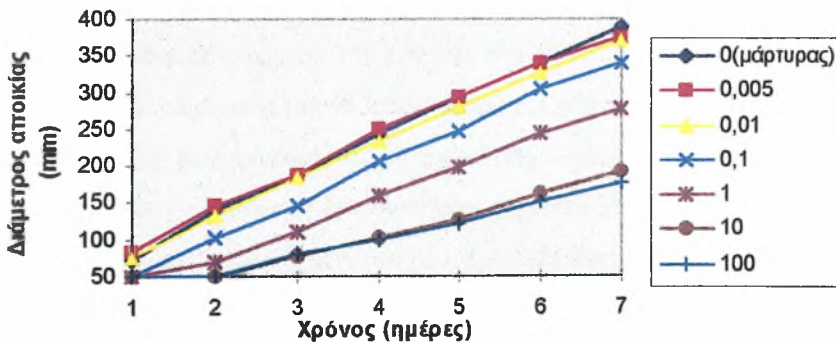
Διάγραμμα 6: Ανάπτυξη μυκηλίου της απομόνωσης Ct.4 του μύκητα *P.oryzae* από κτενάνθη, σε διάφορες συγκεντρώσεις kresoxim-methyl σε σχέση με το χρόνο επώασης



Διάγραμμα 7: Ανάπτυξη μυκηλίου της απομόνωσης Ct.6 του μύκητα *P.oryzae* από κτενάνθη, σε διάφορες συγκεντρώσεις kresoxim-methyl σε σχέση με το χρόνο επώασης



Διάγραμμα 8: Ανάπτυξη μυκηλίου της απομόνωσης R.9 του μύκητα *P.oryzae* από ρύζι, σε διάφορες συγκεντρώσεις kresoxim-methyl σε σχέση με το χρόνο επώασης



5.2 Επίδραση στη βλάστηση σποριών

Οι μετρήσεις ελήφθησαν μετά από επώαση 20 ωρών στο σκοτάδι και θερμοκρασία δωματίου με 3 επαναλήψεις για την κάθε περίπτωση.

Το ποσοστό % των σποριών της κάθε απομόνωσης που βλάστησαν καθώς και εκείνων που σχημάτισαν appressorium φαίνονται στους Πίνακες 6 και 7 αντίστοιχα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Ποσοστό (%) βλαστησάντων σποριών τριών απομονώσεων του *Pyricularia oryzae* σε διάφορες συγκεντρώσεις azoxystrobin και kresoxim-methyl.

Απομόνωση	Μάρτυρας	Συγκέντρωση Azoxystrobin(μg/ml)				Συγκέντρωση Kresoxim-methyl(μg/ml)			
		0,01	0,1	1	10	0,01	0,1	1	10
Ct.4	95	33	16	57	1	77	43	50	1
Ct.6	98	1	38	30	0	17	12	24	2
R.9	92	68	70	53	60	68	76	75	56

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Ποσοστό (%) σποριών που σχημάτισαν appressorium επί του συνόλου των βλαστησάντων σποριών τριών απομονώσεων του *Pyricularia oryzae* σε διάφορες συγκεντρώσεις azoxystrobin και kresoxim-methyl.

Απομόνωση	Μάρτυρας	Συγκέντρωση Azoxystrobin(μg/ml)				Συγκέντρωση Kresoxim-methyl(μg/ml)			
		0,01	0,1	1	10	0,01	0,1	1	10
Ct.4	82	20	0	40	0	56	10	8	0
Ct.6	88	0	4	2	0	18	21	32	0
R.9	13	26	18	22	0	32	52	47	22

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, αν και η απομόνωση R.9 παρουσίασε το χαμηλότερο ποσοστό βλαστήσεως σποριών (92%) στην περίπτωση του μάρτυρα, κανένα όμως από τα μυκητοκτόνα δεν κατάφερε να μειώσει το ποσοστό αυτό κάτω από 50%. Η υψηλότερη συγκέντρωση του azoxystrobin (10 μg/ml), παρεμπόδισε πλήρως τη βλάστηση των σποριών τόσο της Ct.4 όσο και της Ct.6 (που παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό βλαστήσεως στο μάρτυρα). Η υψηλότερη συγκέντρωση του λιγότερο αποτελεσματικού kresoxim-methyl (10 μg/ml) περιόρισε σε ικανοποιητικό βαθμό τη βλάστηση των σποριών των Ct.4 και Ct.6 (τα ποσοστά βλαστήσεως ήταν: 1 και 2% αντίστοιχα). Ακόμη και η χαμηλότερη συγκέντρωση του azoxystrobin (0,01 μg/ml) ήταν αποτελεσματική κυρίως επί της Ct.6 αφού τα σπόρια που βλάστησαν αποτέλεσαν το 1% (έναντι του 98% του μάρτυρα). Παρόλα αυτά και τα δύο μυκητοκτόνα παρουσίασαν το φαινόμενο να αυξάνει το ποσοστό βλαστήσεως των σποριών σε υψηλότερη συγκέντρωση (π.χ 1 μg/ml) σε σχέση με την χαμηλότερη (π.χ 0,1 μg/ml) δηλ. φαίνεται ότι η χαμηλότερη συγκέντρωση ήταν πιο αποτελεσματική από την υψηλότερη.

Ακόμη και στο σχηματισμό του appressorium το χαμηλότερο ποσοστό παρουσίασε η R.9 (13%) με εμφανή διαφορά από εκείνου των Ct.4 και Ct.6 (82 και 88%, αντίστοιχα). Η επέμβαση τόσο με azoxystrobin αλλά πολύ περισσότερο με Kresoxim-methyl, αύξησαν το

ποσοστό σχηματισμού appressorium της R.9 ως προς το μάρτυρα, εκτός από τη συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/ml}$ του azoxystrobin που παρεμπόδισε τελείως το σχηματισμό. Το ίδιο έγινε και στις απομονώσεις Ct.4 και Ct.6 όπου οι μέγιστες συγκεντρώσεις και των δύο μυκητοκτόνων, απέτρεψαν το σχηματισμό appressorium. Οι συγκεντρώσεις του azoxystrobin σε γενικές γραμμές, διατήρησαν σε χαμηλά ποσοστά το σχηματισμό appressorium των Ct.4 και Ct.6 ενώ η Ct.6 εμφανίστηκε πολύ πιο ευαίσθητη σ' αυτές απ' ότι η Ct.4. Πάντως και εδώ αυξήθηκε το ποσοστό σχηματισμού appressorium σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (π.χ 1 $\mu\text{g/ml}$) σε σχέση με χαμηλότερες (π.χ 0,01 $\mu\text{g/ml}$) και στα δύο μυκητοκτόνα.

Λεπτομερέστερη μικροσκοπική παρατήρηση των κονιδίων και των βλαστικών σωλήνων τους, μετά από 20 ώρες επώασης σε σκοτεινούς υγρούς θαλάμους έδειξε ότι :

- Στο μάρτυρα και των τριών απομονώσεων τα κονίδια συνήθως βλάσταναν από το κορυφαίο κύτταρό τους με μήκος βλαστικού σωλήνα 25-40 μ και όταν σχηματιζόταν appressorium η διάμετρος του ήταν περί τα 10 μ . Στην περίπτωση που δεν σχηματιζόταν appressorium, το μήκος της βλαστικής υφής ήταν περίπου 75 μ .
- Στη συγκέντρωση 0,01 $\mu\text{g/ml}$ του azoxystrobin τα κονίδια της απομόνωσης R.9 βλάστησαν με σωλήνα μήκους 50-75 μ κατά κανόνα χωρίς appressorium. Στην συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$ τα σπόρια εξακολούθησαν να βλαστάνουν με μήκος βλαστικού σωλήνα 30-70 μ , ελλείπει appressorium (Εικόνα 5), ενώ ακόμη και στη συγκέντρωση 10 $\mu\text{g/ml}$, συνεχίστηκε η βλάστηση των σπορίων με αισθητά μειωμένο μήκος βλαστικού σωλήνα (10 μ) και συνήθως χωρίς appressorium. Τα σπόρια της απομόνωσης Ct.6 στην 0,01 $\mu\text{g/ml}$ δεν βλάστησαν (Εικόνα 6). Αντίθετα στην 0,1 $\mu\text{g/ml}$ βλάστησαν με μικρό βλαστικό σωλήνα μήκους 10 μ χωρίς σχηματισμό appressorium.
- Στη συγκέντρωση 0,01 $\mu\text{g/ml}$ του kresoxim-methyl τα σπόρια της απομόνωσης R.9 βλάστησαν με υφή μήκους 75 μ χωρίς να σχηματίσουν appressorium, ενώ στην 1 $\mu\text{g/ml}$ παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωση του μήκους της βλαστικής υφής σε 10-20 μ . Στη συγκέντρωση 0,01 $\mu\text{g/ml}$ η απομόνωση Ct.6 παρουσίασε βλάστηση από το κορυφαίο κύτταρο του σπορίου με μήκος βλαστικού σωλήνα μικρότερου των 5 μ και σπανίως σχηματισμό appressorium. Ενώ η Ct.4 παρουσίασε βλάστηση από το κορυφαίο κύτταρο με μικρό βλαστικό σωλήνα και appressorium (Εικόνα 7). Στη συγκέντρωση 0,1 $\mu\text{g/ml}$ συνήθως δεν παρατηρήθηκε βλάστηση των σπορίων της Ct.6, ενώ τα σπόρια της Ct.4 βλάστησαν χωρίς appressorium (Εικόνα 8). Τέλος στην 1 $\mu\text{g/ml}$, η Ct.6 παρουσίασε βλάστηση από το κορυφαίο κύτταρο με σχηματισμό απρεσσορίου (Εικόνα 9).



Εικόνα 5. Βλάστηση κονιδίων της απομόνωσης R.9 με βλαστικό σωλήνα μήκους 30-70μ, ελλείψει appressorium, στη συγκέντρωση 1μg/ml του azoxystrobin.



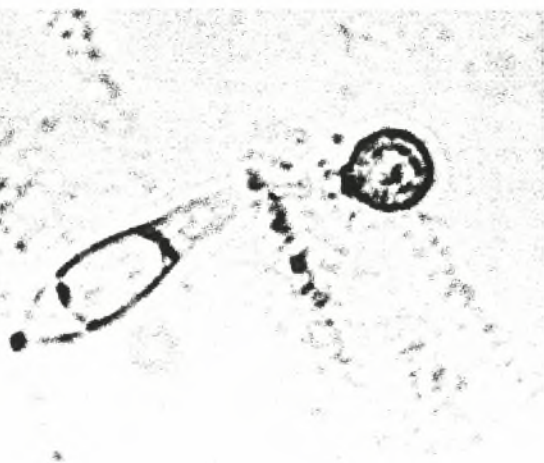
Εικόνα 6. Μη βλαστημένα σπόρια της απομόνωσης Ct.6 στη συγκέντρωση 0,01μg/ml του azoxystrobin.



Εικόνα 7. Βλάστηση κονιδίου της απομόνωσης Ct.4 από το κορυφαίο κύτταρο με μικρού μήκους βλαστικό σωλήνα και appressorium, στη συγκέντρωση 0,01μg/ml του kresoxim-methyl.



Εικόνα 8. Βλάστηση κονιδίου της απομόνωσης Ct.4 χωρίς appressorium, στη συγκέντρωση 0,1μg/ml του kresoxim-methyl.



Εικόνα 9. Βλάστηση κονιδίου της απομόνωσης Ct.6 από το κορυφαίο κύτταρο με σχηματισμό appressorium στη συγκέντρωση 1μg/ml του kresoxim-methyl.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5 οι συγκεντρώσεις του azoxystrobin που παρεμποδίζουν κατά 50% τη βλάστηση των σπορίων (ED_{50}) είναι για την απομόνωση Ct.4: 0,006 $\mu\text{g/ml}$, για την Ct.6: 0,035 $\mu\text{g/ml}$ ενώ για την R.9 ξεπερνά τα 10 $\mu\text{g/ml}$. Οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις του kresoxim-methyl είναι: 0,06 $\mu\text{g/ml}$ για την Ct.4, 0,0025 $\mu\text{g/ml}$ για την Ct.6 και πάνω από 10 $\mu\text{g/ml}$ για την R.9.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η απομόνωση από ρύζι (R.9) είναι εκείνη που έχει το μικρότερο σχετικά ποσοστό βλαστικότητας των σπορίων σε σύγκριση με τις άλλες δύο απομονώσεις του μύκητα από κτενάνθη (Ct.4&Ct.6). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι τα σπόρια της R.9 τείνουν να βλαστάνουν χωρίς σχηματισμό appressorium. Αντίθετα τα σπόρια της απομόνωσης Ct.6 έχουν το υψηλότερο ποσοστό βλαστήσεως και σχηματισμού appressorium στο μάρτυρα αλλά είναι περισσότερο ευαίσθητα και στα δύο μυκητοκτόνα.

Το azoxystrobin σε γενικές γραμμές εμφανίζεται πιο αποτελεσματικό από το kresoxim-methyl τόσο στη παρεμπόδιση της βλάστησης των σπορίων όσο και στο σχηματισμό του appressorium.

5.3 Επίδραση στην παραγωγή σπορίων

Η μελέτη της επίδρασης των μυκητοκτόνων στη παραγωγή σπορίων έγινε με υπολογισμό του αριθμού σχηματισθέντων σπορίων ανά cm^2 αποικίας για κάθε απομόνωση σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις azoxystrobin και kresoxim-methyl που δεν παρεμπόδιζαν πλήρως την ανάπτυξη του μυκηλίου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8 : Αριθμός σπορίων / cm^2 αποικίας 3 απομονώσεων του *Pyricularia oryzae* σε υποστρώματα διαφόρων συγκεντρώσεων azoxystrobin και kresoxim-methyl.

Απομόνωση	Μάρτυρας	Συγκέντρωση Azoxystrobin($\mu\text{g/ml}$)				Συγκέντρωση Kresoxim-methyl($\mu\text{g/ml}$)					
		0,005	0,01	0,1	1	0,005	0,01	0,1	1	10	100
Ct.4	19383	644	12786	-	-	5651	4186	-	-	-	-
Ct.6	757	597	933	-	-	398	408	-	-	-	-
R.9	352	176	*	209	*	176	176	361	180	185	*

- : Δεν σημειώθηκε ανάπτυξη αποικίας

* : Ο αριθμός των σπορίων / cm^3 αιωρήματος είναι μικρότερος από τον ελάχιστο αριθμό σπορίων που ήταν δυνατόν να μετρηθούν (αριθμός σπορίων/ $\text{cm}^3 < 10.000$)

Η Ct.4 ήταν η απομόνωση που είχε τον χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης μυκηλίου, παράγαγε τα περισσότερα σπόρια/cm² αποικίας (19383 σπόρια/cm² αποικίας) και με εξαιρετικά μεγάλη διαφορά από τις άλλες δύο (757σπόρια/cm² αποικίας για την Ct.6 και 325 σπόρια/cm² αποικίας για την R.9). Ήταν όμως και η πιο ευαίσθητη απομόνωση στις συγκεντρώσεις του azoxystrobin αλλά και του kresoxim-methyl. Η χαμηλότερη συγκέντρωση του azoxystrobin (0,005 μg/ml) ήταν εκείνη που περιόρισε σε μεγαλύτερο βαθμό την παραγωγή σπορίων της Ct.4. Όσο για την απομόνωση R.9, αυτή παράγαγε το μικρότερο αριθμό σπορίων αλλά ήταν η πιο ανθεκτική στις περισσότερες συγκεντρώσεις και των δύο μυκητοκτόνων εκτός από την 0,01μg/ml, 1μg/ml του azoxystrobin και την 100μg/ml του kresoxim-methyl. Ακόμη φαίνεται ότι το azoxystrobin δρά πιο αποτελεσματικό επί όλων των απομονώσεων αφού απαιτούνται εκατονταπλάσιες συγκεντρώσεις του kresoxim-methyl για να εξασφαλίσουν τα ίδια ποσοστά παρεμπόδισης με εκείνα του azoxystrobin.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πρόβλημα δημιουργίας ανθεκτικότητας φυτοπαρασίτων σε φυτοφάρμακα και η συνεχής πίεση του κοινού για χρήση ουσιών που να είναι όσο το δυνατόν λιγότερο τοξικές και με λιγότερα υπολείμματα στα τρόφιμα, οδήγησαν στη δημιουργία ουσιών με νέο τρόπο δράσης, όπως είναι οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης μελανίνης (MBI's). Το πιο πρόσφατο παράδειγμα δημιουργίας ουσιών φιλικών προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον είναι εκείνες που προέρχονται από μύκητες και βακτήρια, όπως οι στρομπιλουρίνες που αποτελούν παράγωγα φυσικού προϊόντος του Βασιδιομύκητα *Strobilurus tenacellus*. Η εξαιρετικά αποτελεσματική αλλά και θεραπευτική δράση δύο από αυτών εντοπίστηκε πρόσφατα (1992) και χρειάστηκαν τέσσερα χρόνια ερευνών για να δοθεί έγκριση κυκλοφορίας τους (1996), (Godwin et al., 1992, Ammermann et al., 1992).

Το 1996, οι Brunelli et al., υποστήριξαν ότι τόσο το azoxystrobin όσο και το kresoxim-methyl έλεγξαν ικανοποιητικά το ωίδιο της αμπέλου στην Ιταλία όταν προστέθηκαν προληπτικά σε 10 και 25gr δ.ο./ 100lt. Και τα δύο είχαν ικανοποιητική δράση και σε ορισμένες περιπτώσεις καλύτερη από των συμβατικών (EBI) μυκητοκτόνων. Το kresoxim-methyl είχε καλύτερη δραστηριότητα από το azoxystrobin. Αντίθετα τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η δράση του azoxystrobin κατά του *P. oryzae in vitro* υπερτερεί τόσο στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου και της βλάστησης των σπορίων όσο και στο σχηματισμό του appressorium. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και οι Bertelsen & Smedegaard-Peterson (1998) για τη βλάστηση των σπορίων και τη μυκηλιακή ανάπτυξη σαπροφυτικών μυκήτων. Ακόμη και σε πειράματα αγρού το azoxystrobin ("Amistar") ήταν εκείνο που παρουσίασε τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σαπροφύτων πάνω στα φύλλα ενώ και για τα δύο φάρμακα οι αποδόσεις ήταν σημαντικά υψηλότερες απ'ότι του μάρτυρα. Εξαιρετικά μειωμένος υπήρξε και ο αριθμός των ωοσπορίων που παρήχθησαν από τον *Plasmopara viticola* στην άμπελο μετά από εφαρμογή του azoxystrobin που βρέθηκε ότι μειώνει το ποσοστό διαχείμασης του μύκητα συνεπώς και των πρώιμων μολύνσεων, επιδρώντας στο σχηματισμό σποριαγγείου και τη βλάστηση (Vercesi et al., 1998).

Οι Παναγιωτάρου-Πέτσικου και οι συνεργάτες της (1998), επιβεβαίωσαν την ικανοποιητική προληπτική και θεραπευτική δράση του azoxystrobin και του kresoxim-

methyl κατά του ωιδίου των κολοκυνθοειδών. Φάνηκε να παρεμποδίζουν τη βλάστηση των κονιδίων κατά 50% σε σχέση με το μάρτυρα, να δημιουργούν κονίδια με μειωμένου μήκους βλαστικές υφές και να περιορίζουν το σχηματισμό μυζητήρων κατά την προληπτική εφαρμογή (50 µg/ml, 24 ώρες πριν τη μόλυνση), ενώ σε θεραπευτικές εφαρμογές (4 ημέρες μετά τη μόλυνση) παρεμποδίζουν την παραγωγή σπορίων του μύκητα. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης που για τη βλάστηση των σπορίων του *P. oryzae* έδειξαν ότι η εφαρμογή και των δύο είναι αποτελεσματική εναντίον απομονώσεων από φυτά κτενάνθης (Ct.4,Ct.6) ενώ η απομόνωση από φυτά ρυζιού (R.9) εμφανίζεται πιο ανθεκτική. Σημειώνεται ότι σ'αυτή την απομόνωση και τις συγκεντρώσεις 10 µg/ml του azoxystrobin και 0,01 µg/ml του kresoxim-methyl παρατηρήθηκε βλάστηση κονιδίων με μικρό βλαστικό σωλήνα.

Η διαφορετική αντίδραση των απομονώσεων στις ίδιες συγκεντρώσεις των φαρμάκων πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχει διαφοροποίηση των απομονώσεων από φυτά κτενάνθης και φυτά ρυζιού όπως διαπιστώθηκε από τη μελέτη φυλογενετικής τους σχέσης με τη χρήση μοριακών δεικτών. Και οι δύο δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν διαφοροποιούν σε δύο ξεχωριστές ομάδες τις απομονώσεις του μύκητα από τον κάθε ξενιστή και διαπιστώθηκε ποικιλομορφία ακόμη και μέσα σε κάθε ομάδα (Παπλωματάς και Παππάς, 1998).

Σχετικά με την παρεμπόδιση σχηματισμού appressorium, η αποτελεσματικότητα των δύο μυκητοκτόνων και ιδιαίτερα του azoxystrobin βρέθηκε ικανοποιητική. Η δράση αυτή των στρομπιλουρινών παρέχει ελπίδες για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της ασθένειας στο ρύζι και την κτενάνθη αφού το appressorium αποτελεί βασικό μηχανισμό μόλυνσης των φυτών. Η διαφοροποίηση των απομονώσεων του *P. oryzae* ως προς την ευαισθησία τους στις στρομπιλουρίνες παρέχει και διαφορετικές πιθανότητες καταπολέμησης σε διάφορους ξενιστές. Έτσι στην περίπτωση προσβολής της κτενάνθης με απομονώσεις που προέρχονται από φυτά κτενάνθης, φαίνεται ότι υπάρχει τρόπος ελέγχου της ασθένειας με τη χρήση στρομπιλουρινών στις οποίες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες. Στην περίπτωση του ρυζιού η καταπολέμηση της ασθένειας αναμένεται λιγότερο ικανοποιητική λόγω της μικρότερης ευαισθησίας των απομονώσεων του παθογόνου από ρύζι.

Τη μεγαλύτερη παραγωγή σπορίων είχε η ευαίσθητη και στα δύο μυκητοκτόνα απομόνωση από κτενάνθη, Ct.4. Πάντως το γεγονός ότι η απομόνωση από ρύζι, R.9, παράγει σπόρια, έστω και σε μικρό αριθμό, ακόμη και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις τόσο του azoxystrobin όσο και του kresoxim-methyl δημιουργεί υποψίες για την πιθανή δημιουργία και επιβίωση ανθεκτικών ως προς αυτά τα μυκητοκτόνα στελεχών του μύκητα. Το μεγαλύτερο πρόβλημα θα δημιουργηθεί από την εμφάνιση μιας φυλής του παθογόνου που θα συνδυάζει τον υψηλό ρυθμό ανάπτυξης και τη μειωμένη ευαισθησία της R.9, το

υψηλό ποσοστό βλαστήσεως των σπορίων και του σχηματισμού appressorium της Ct.6 και την υψηλή παραγωγή σπορίων της Ct.4. Για την αποφυγή του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας δεν πρέπει να υποτιμάται ότι η συνεχής και από τα πρώτα στάδια ανάπτυξης της ασθένειας χρήση των ιδιαίτερα αποτελεσματικών αυτών μυκητοκτόνων, μπορεί πολύ γρήγορα να οδηγήσει στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου. Γι'αυτό συνιστάται η εφαρμογή του azoxystrobin στον αγρό να γίνεται σε εναλλαγή με τη χρήση μυκητοκτόνων με διαφορετικό τρόπο δράσης (Dacol et al., 1998).

Αξιόλογο σημείο προσοχής αποτελεί το μη αναμενόμενο φαινόμενο μειωμένης αποτελεσματικότητας για μερικές απομονώσεις των μεγαλύτερων συγκεντρώσεων του azoxystrobin ή του kresoxim-methyl. Συγκεκριμένα, η βλάστηση των σπορίων της Ct.4 ενώ στη συγκέντρωση 0,1 μg/ml του azoxystrobin εμφανίζει ποσοστό 16%, στην υψηλότερη συγκέντρωση 1 μg/ml έχει ποσοστό βλάστησης 57%. Επίσης ο σχηματισμός appressorium της Ct.4, παρεμποδίζονταν τελείως (100%) στη συγκέντρωση 0,1 μg/ml του azoxystrobin ενώ στην 1 μg/ml το 41% των σπορίων σχημάτισαν appressorium. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στην παραγωγή σπορίων της R.9 όπου στη συγκέντρωση 0,01 μg/ml του kresoxim-methyl έχει 176 σπόρια / cm², ενώ στην 0,1 μg/ml παράγει 361 σπόρια/cm² αποικίας. Τα αποτελέσματα αυτά δεν συμβαδίζουν με την αναμενόμενη μείωση της βλάστησης των σπορίων, της παραγωγής των σπορίων και του ποσοστού σχηματισμού appressorium όταν αυξάνεται η εφαρμοζόμενη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου. Η εξήγηση του φαινομένου είναι δύσκολη και απαιτεί προσοχή. Μια πρώτη και ίσως πιο πιθανή εξήγηση είναι ότι οφείλεται στο μικρό αριθμό δειγμάτων που εξετάστηκαν ή ότι απλώς πρόκειται για πειραματικό σφάλμα, όμως η επανάληψή του σε διάφορες απομονώσεις και συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων, δημιουργεί εύλογες υποψίες ότι κάτι άλλο συμβαίνει. Με ιδιαίτερη επιφύλαξη και τονίζοντας την ανάγκη περαιτέρω βαθύτερης και εντατικότερης έρευνας, μπορεί να υποθεί ότι τα δύο αυτά μυκητοκτόνα έχουν παρόμοιο τρόπο μυκητοτοξικής δράσης με εκείνου των διθειοκαρβαμιδικών (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Ακόμη και στην περίπτωση που η εφαρμογή των στρομπιλουρινών δεν περιορίζει σε ικανοποιητικό επίπεδο τη βλάστηση των σπορίων των απομονώσεων -παράγοντα σημαντικό για τη παθογένεια της ασθένειας- τα αποτελέσματα που αφορούν το ποσοστό σχηματισμού appressorium και την παραγωγή σπορίων δείχνουν ότι ο έλεγχος της ασθένειας είναι δυνατόν να επιτευχθεί σε επίπεδο αγρού αφού παρεμποδίζονται απαραίτητοι για τη μόλυνση μηχανισμοί (σχηματισμός appressorium). Σ' αυτόν τον τομέα μπορούν να συμβάλλουν αποτελεσματικά εκτός από τις στρομπιλουρίνες και οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης μελανίνης παρεμποδίζοντας έμμεσα το σχηματισμό λειτουργικού appressorium.

Η εφαρμογή του azoxystrobin και του kresoxim-methyl σε καλλιέργεια κριθαριού, αυξάνει διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού με αποτέλεσμα όπως φαίνεται τα φυτά να διευκολύνονται στην προσπάθεια προσαρμογής τους στο περιβάλλον γεγονός που τις περισσότερες φορές οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης πάνω από 5-10% (Habermeyer et al., 1998). Η διαπίστωση αυτή δίνει ένα ακόμη πλεονέκτημα στην εφαρμογή των μυκητοκτόνων στον αγρό ώστε να μπορεί να ειπωθεί βάσει και των προηγούμενων διαπιστώσεων ότι η ανακάλυψη των στρομπιλουρινών αποτέλεσε σημαντικό βήμα για την ικανοποιητική, για όλους τους ενδιαφερόμενους φορείς (καλλιεργητές, καταναλωτές κ.α), αντιμετώπιση τόσο της πυρικούλαρίωσης στο ρύζι όσο και ποικίλων άλλων οικονομικά σημαντικών ασθενειών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ammermann E, Lorenz G, Schelberger K, Wenteroth B, Sauter H, Rentzea C, 1992. BAS 490F-A broad-spectrum fungicide with a new mode of action. *Proc. Brighton Crop. Prot. Conf. Pests Dis* 1, 403-410.
2. Anonymous, 1998. *The Electronic Pesticide Manual*, UK: BCPC Publications.
3. Bertelsen JR and Smedegaard-Petersen V, 1998. Effect of the strobilurin fungicide Azoxystrobin on leaf saprophytes, host physiology and yield of wheat crops. *7th International Congress of plant pathology*, 9-16 August 1998, Edinburgh, Scotlant. no. 5.6.1 (Abstract)
4. Brunelli A, Minuto G, Monciero M, Gullino ML, 1996. Efficacy of strobilurin derivatives against grape powdery mildew in Northern Italy. *Proc. Brighton Crop. Prot. Conf. Pests Dis* 41, 137-142.
5. Γαλανοπούλου-Σενδουκά Στέλλα, 1997. *Ειδική Γεωργία Ι*. Πανεπιστημιακές σημειώσεις. Βόλος.
6. Γεωργόπουλος ΣΓ, 1984. *Βασικές Γνώσεις Φυτοπαθολογίας*. Αθήνα.
7. Γεωργόπουλος ΣΓ και Ζιώγας ΒΝ, 1992. *Αρχές και Μέθοδοι Καταπολέμησης των Ασθενειών των Φυτών*. Β.Ν Ζιώγας, Αθήνα.
8. Dacol L, Gibbard M, Hodson OM and Knight S, 1998. Azoxystrobin: development on horticultural crops in Europe. *Proc. Brighton Crop. Prot. Conf. Pests Dis* 9, 843-848.
9. Dean RA, Blackmon BP, Brooks JC, Gilbert RD, Liu S, Mitchell TK, Shieh M-T and Zhu H, 1996. Cell surface communication in appressorium development by *Magnaporthe grisea*. In: *Molecular Aspects of Pathogenicity and Resistance: Requirement of Signal Transduction* (Mills, Kunoh, Keen and Mayama Eds). APS press, St. Paul, Minnesota.
10. Δημητριάδης Σ, Παναγόπουλος Χ, Στάθης Π, 1979. *Παρατηρηθείσαι εις την Ελλάδα Ασθένειαι των Καλλιεργούμενων Φυτών*, Κηφισιά, Αθήνα: Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο.
11. Godwin JR, Anthony VM, Clough JM, Godfrey CRA, 1992. ICIA 5504: A novel, broad spectrum, systemic β -methoxyacrylate fungicide. *Proc. Brighton Crop. Prot. Conf. Pests Dis* 1, 435-442.
12. Gold RE, Leinhos GM, 1995. Fungicidal effects of BAS 490F on the development and fine structure of plant pathogenic fungi. *Pestic.Sci.* 43, 250-253.
13. Gullino ML, 1998. Uses and challenges with novel fungicides for plant disease control. *7th International Congress of plant pathology*, 9-16 August 1998, Edinburgh, Scotlant. no. 5.6.1S(Abstract).
14. Habermeyer G, Gerhard M and Zinkernagel V, 1998. The impact of strobilourins on the plant physiology of wheat. *7th International Congress of plant pathology*, 9-16 August 1998, Edinburgh, Scotlant. no.5.6.3. (Abstract).
15. Hamer E John, Howard G Richard, Chumley G Forrest, Valent Barbara, 1987. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science* 239, 288-290.

16. Heaney SP, Knight SC, 1994. ICIA5504: A novel broad-spectrum systemic fungicide for use on fruit, nut and horticultural crops. *Proc. Brighton Crop. Prot. Conf. Pests Dis* **2**, 509-516.
17. Jorgensen Nistrup Lise, 1998. Use attributes of strobilurin analogs for disease control. *7th International Congress of plant pathology*, 9-16 August 1998, Edinburgh, Scotlant. no. 5.6.2S. (Absrtact)
18. Knight SC, Anthony VM, Brady AM, Greenland AJ, Heaney SP, Murray DC, Powell KA, Schulz MA, Spinks CA, Worthington PA and Youle D, 1997. Rationale and perspectives on development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 349-366.
19. Koizumi S, 1998. New fungicide use on rice in Japan *7th International Congress of Plant Pathology*, 9-16 August 1998, Edinburgh, Scotlant. no.5.6.3S. (Absrtact)
20. Kurahashi Y and Potzen P, 1998. Carpropamid: a new melanin biosynthesis inhibitor. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*. AG publishers, **51**.
21. Ou SH, 1987. *Rice Diseases*. International Mycological Institute. 2nd edn. Los Banos, Laguna, Philippines. C.A.B International publishers.
22. Παναγιωτάρου-Πέτσικου Ν, Καλαμαράκη Α, Καλογεροπούλου Ε, 1998. Διερεύνηση της επίδρασης των Azoxystrobin και Kresoxim-methyl σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του μύκητα *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht.) Pollacci. *9^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο*, 20-22 Οκτωβρίου 1998, Αθήνα, σελ. 134.
23. Pappas AC and Paplomatas EJ, 1998. Pyricularia leaf spot: A new disease of ornamental plants of the family *Marantaceae*. *Plant disease* **82**, 465-469.
24. Παπλωματάς ΕΙ και Παππάς ΑΧ, 1998. Διαφοροποίηση απομονώσεων του μύκητα *Pyricularia oryzae* από φυτά κτενάνθης και ρυζιού με τη χρήση μοριακών δεικτών. *9^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο*, 20-22 Οκτωβρίου 1998, Αθήνα, σελ. 104.
25. Σφήκας ΑΓ, 1984. *Ειδική Γεωργία Ι*. Έκδοση Τρίτη, Θεσσαλονίκη.
26. Suzuki H. 1975. Meteorological factors in the epidemiology of rice blast. *Annu. Rev. Phytopathol.* **13**, 239-256.
27. Thieron M, Pontzen R and Kurahashi Y, 1998,3. Carpropamid: a rice fungicide with two modes of action. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer*. AG publishers, **51**.
28. Verceci A, Vavassori A, Faoro F and Bisiach M, 1998. Effect of Azoxystrobin on the oospores of *Plasmopara viticola* *7th International Congress of Plant Pathology*, 9-16 August 1998, Edinburgh, Scotlant. no. 5.5.12. (Absrtact).
29. Wheeler HM, 1983. Comparisons of fungal melanin biosynthesis in Ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **81**, 29-36.
30. Φασούλας ΑΚ και Φωτιάδης ΝΑ, 1984. *Αρχές της Επιστήμης των Καλλιεργούμενων Φυτών*. Θεσσαλονίκη.

