



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

<< Φυτιατρική και Περιβάλλον >>

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Γενετικός χαρακτηρισμός και ευαισθησία σε διάφορες ομάδες
μυκητοκτόνων απομονώσεων του μύκητα *Zymoseptoria tritici* σε
σιταγρούς της Θεσσαλίας κατά το έτος 2020**

ΜΑΡΙΑ ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ

ΒΟΛΟΣ 2023

**Γενετικός χαρακτηρισμός και ευαισθησία σε διάφορες ομάδες μυκητοκτόνων
απομονώσεων του μύκητα *Zymoseptoria tritici* σε σιταγρούς της Θεσσαλίας κατά το
έτος 2020**

Μαρία Αθανασίου

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ευάγγελος Βέλλιος (Επιβλέπων Καθηγητής), Επίκουρος Καθηγητής, Φυτοπαθολογία-
Προηγμένη Διαγνωστική, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Νικόλαος Τσιρόπουλος (Μέλος), Καθηγητής, Χημεία, Ανάλυση και Προσδιορισμός Οργανικών
Ουσιών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Dr. Λιολιοπούλου Φεβρωνία (Μέλος ΕΔΠ, Φυτοπαθολογία)

Copyright © ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΜΑΡΙΑ

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος, All rights reserved.

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

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

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή διεξήχθη στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, υπό την επίβλεψη του Ευάγγελου Βέλλιου, Επίκουρου Καθηγητή Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το παρών θέμα, αλλά και για τις πολύτιμες υποδείξεις και την καθοδήγηση για την επιτυχή διεξαγωγή του πειράματος. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου, στην Dr. Φ. Λιολιοπούλου για πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη που μου πρόσφερε καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος στο εργαστήριο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Χημείας, Ανάλυσης και Προσδιορισμού Οργανικών Ουσιών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Νικόλαο Τσιρόπουλο για τη συμμετοχή τους στην τριμελή μου επιτροπή. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου και τους κοντινούς μου φίλους για την υλική και ψυχολογική υποστήριξη που επέδειξαν καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή αξιολογήθηκε η ευαισθησία του μύκητα *Zygomycetozoria tritici* σε διάφορες δραστικές ουσίες από διαφορετικές ομάδες μυκητοκτόνων που χρησιμοποιούνται όσες έχουν έγκριση για την καλλιέργεια από τους παραγωγούς για την αντιμετώπιση της ασθένειας σεπτορίας του σίτου που προκαλείται από το μύκητα. Η δειγματοληψία των προσβεβλημένων ιστών πραγματοποιήθηκε σε σιταγρούς της Θεσσαλίας την άνοιξη του 2020. Οι απομονώσεις του μύκητα ελήφθησαν από προσβεβλημένα φύλλα σιταριού και στην συνέχεια ο μύκητας καλλιεργήθηκε σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα. Οι δραστικές ουσίες carbedazim, boscalid, mefentrifluconazole, cyproconazole, spiroxamine, pyraclastrobin, cyprodinil, pyrimethalin και fludioxonil ελέγχθηκαν ως προς την επίδραση τους στην ανάπτυξη της αποικίας των απομονώσεων. Για τις δραστικές ουσίες carbendazim, boscalid και mefentrifluconazole εξετάστηκαν στις εξής συγκεντρώσεις: 3,33, 0,33, 0,03, 0,003 mg/L. Το cyproconazole και το spiroxamine εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 1, 0,1, 0,01, 0,001 mg/L. Τα μυκητοκτόνα cyprodinil, pyrimethalin και fludioxonil εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 10, 1, 0,1, 0,001 mg/L. Τέλος η δραστική ουσία pyraclastrobin εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 mg/L. Σε καμία από τις δραστικές ουσίες δεν παρατήθηκε ανάπτυξη ανθεκτικότητας του μύκητα σε εξαίρεση με την δραστική ουσία boscalid στην συγκέντρωση 3,33 mg/L που παρατηρήθηκε μικρή ανάπτυξη αποικίας κάποιων απομονώσεων σε αυτή την συγκέντρωση όμως χρήζει περαιτέρω έρευνας το αποτέλεσμα. Επίσης πραγματοποιήθηκε πείραμα για τον σχεδιασμό της καμπύλης ανάπτυξης του μύκητα. Για την παρακολούθηση του ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν τρεις μέθοδοι: μέτρηση του συνόλου των κυττάρων του μύκητα με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου, των ζώντων κυττάρων με διαδοχικές αραιώσεις και επίστρωση τους σε θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλία Petri (cfu/mL) και εκτίμηση του πληθυσμού μέσω της οπτικής απορρόφησης (OD). Όμως στις συνθήκες που πραγματοποιήθηκε το πείραμα δεν έγινε δυνατή η μέτρηση των πυκνιδιοσπορίων του μύκητα με την βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου. Όμως υπήρχε γραμμική συσχέτιση μόνο της απορρόφησης της ακτινοβολίας (OD) και του cfu/ml (σε μια εκ των τριών απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχεδιασμό της καμπύλης ανάπτυξης) για την εκτίμηση του ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα και την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης ανάπτυξής του. Συνεπώς προτείνεται νέα μέθοδο για την παραγωγή πυκνιδιοσπορίων του μύκητα αλλά και για τον ομοιόμορφο σχεδιασμό της καμπύλης ανάπτυξης συμπεριλαμβανομένων όλων των απομονώσεων του μύκητα.

Abstract

The following master thesis examines the sensitivity of the fungus *Zymoseptoria tritici* in different active ingredients from different groups of fungicides that are being used (which of them are approved for use in the wheat) by growers to manage it effectively. The sampling procedure was held in wheat grains in Thessalia in the spring of 2020. The isolates of the fungus were obtained from infected wheat leaves and then the fungus was cultivated in artificial nutrient substrates. The active ingredients carbendazim, boscalid, mefentrifluconazole, cyproconazole, spiroxamine, pyraclastrobin, cyprodinil, pyrimethalin and fludioxonil were tested for their effect on the colony growth of the isolates. The active ingredients carbendazim, boscalid and mefentrifluconazole were tested in the following concentrations: 3,33, 0,33, 0,03, 0,003 mg/L. cyproconazole and spiroxamine were tested in concentrations 1, 0,1, 0,01, 0,001mg/L. The fungicides cyprodinil, pyrimethalin and fludioxonil were tested in the concentrations 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001mg/L. Also, the active ingredient pyraclastrobin was tested in the concentrations 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001mg/L. In conclusion there was no detection of resistance in the isolations of the fungus except of the active ingredient boscalid. In the concentration of 3,33 mg/L boscalid observed a small growth of some isolates but the result needs further investigation. An experiment was also carried out to design the growth curve of the fungus. For the observation of the growth rate of the fungus three methods were used: measure of the total number of fungal cells using a hemacytometer, measure of living cells by successive dilutions and plating them on nutrient medium in plates Petri (cfu/ml) and estimation of the population of fungus by optical density (OD). But in the conditions in which the experiment was carried out, it was not possible to measure the pycnidiospores of the fungus with the hemacytometer. However, there was a linear correlation only of the optical density (OD) and cfu/ml (succeeded only by one sample from the three samples were used for experiment) only to estimate the growth rate of that fungus and create its growth curve. Consequently, it is necessary another method to be adopted for the production of the pycnidiospores and for the uniform creation of the growth curve by using all the samples.

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

Μαρία Αθανασίου

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

Ευάγγελος Βέλλιος
Επίκουρος Καθηγητής

Πίνακας Περιεχομένων

Πρόλογος.....	v
Περίληψη	vi
Abstract	vii
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Σεπτορίαση του σίτου	2
1.1.1 Εύρος Ξενιστών Παθογόνου	2
1.1.2. Συμπτώματα-Σημεία	3
1.1.3. Συστηματική κατάταξη.....	4
1.1.4. Περιγραφή πυκνιδιοσπορίων	4
1.1.5. Περιγραφή ασκοσπορίων	5
1.1.6. Κύκλος της ασθένειας	5
1.1.7. Επιδημιολογία.....	6
1.1.8. Αντιμετώπιση	7
1.1.9. Χημική αντιμετώπιση	8
1.2. Ανθεκτικότητα μυκήτων σε μυκητοκτόνα	11
1.2.1.Ανθεκτικότητα του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i> στα μυκητοκτόνα.....	13
1.3. Μέθοδοι μελέτης ανθεκτικότητας.....	16
1.4. Γενετική παραλλακτικότητα.....	17
1.4.1. Γενετική παραλλακτικότητα του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i>	17
1.4.2. Μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας.....	18
1.5. Μικροβιακή ανάπτυξη	19
1.5.1.Καμπύλη ανάπτυξης	19
1.6. Σκοπός μεταπτυχιακής διατριβής.....	22
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.1. Διαδικασία συλλογής και μεταφοράς των δειγμάτων στο εργαστήριο	24
2.2. Ανάπτυξη των απομονώσεων του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i> σε τεχνητό θρεπτικό υλικό	24
2.3. Ταυτοποίηση απομονώσεων του μύκητα από φύλλα σίτου με έντονα συμπτώματα σεπτορίασης	25
2.4. Μέθοδοι εκτίμησης του ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i>	25
2.5. Έλεγχος ανθεκτικότητας σε ομάδες μυκητοκτόνων <i>in vitro</i>	27
2.5.1. Βιοδοκιμή ανάπτυξης βλαστικού σωλήνα σε διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων	28

2.5.2. Βιοδοκιμή ανάπτυξης αποικίας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων.....	29
2.6. Στατιστική επεξεργασία	29
2.7. Μέτρηση αριθμού σπορίων ανά αποικία ύστερα από εφαρμογή μυκητοκτόνων	30
2.8. Απομόνωση DNA από απομονώσεις του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i>	31
2.9. Γενετική παραλλακτικότητα των απομονώσεων του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i>	33
2.10. Οριζόντια ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR.....	34
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
3.1. Μορφολογική ταυτοποίηση των απομονώσεων του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i>	36
3.2. Επίδραση ομάδων μυκητοκτόνων in vitro στην ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα.....	37
3.2.1. Pyraclastrobin (Strobilurins, QoIs)	37
3.3. Επίδραση ομάδων μυκητοκτόνων in vitro στην ανάπτυξη αποικίας	39
3.3.1 Pyraclastrobin (Strobilurins, QoIs)	39
3.3.2 Carbendazim (Βενζιμιδαζολικά).....	41
3.3.3 Boscalid (Καρβοξαμιδικά)	42
3.3.4. Mefentrifluconazole (Τριαζόλες)	44
3.3.5. Cyproconazole (Τριαζόλες)	46
3.3.6. Σπυροκεταλαμίνες (Spiroxamine).....	47
3.3.7. Pyrimethanil και Cyprodinil (Ανιλοπυριμιδίνες)	49
3.3.8.Fludioxinil (Φαινιλοπυρρόλες).....	51
3.4. Καμπύλης ανάπτυξης του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i>	54
3.5. Επίδραση διάφορων ομάδων μυκητοκτόνων στην παραγωγή πυκνιδιοσπορίων του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i>	55
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	57
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62

Πίνακας Γραφημάτων

Γράφημα 1 Επίδραση της δραστικής ουσίας pyraclastrobin στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών.....	39
Γράφημα 2 Επίδραση της δραστικής ουσίας carbendazim στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών.....	41
Γράφημα 3 Επίδραση της δραστικής ουσίας boscalid στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών.....	42
Γράφημα 4 Επίδραση της δραστικής ουσίας mefentrifluconazole στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε θρεπτικό υλικό PDA με μυκητοκτόνο μετά από επώαση 14 ημερών.....	44
Γράφημα 5 Επίδραση της δραστικής ουσίας cyproconazole στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών.....	46
Γράφημα 6 Επίδραση της δραστικής ουσίας spiroxamine στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών.....	48
Γράφημα 7 Επίδραση της δραστικής ουσίας pyrimethanil στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών.....	49
Γράφημα 8 Επίδραση της δραστικής ουσίας cyprodinil στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών.....	50
Γράφημα 9 Επίδραση της δραστικής ουσίας fludioxonil στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών.....	51
Γράφημα 10 Συσχέτιση μεταξύ του cfu/mL και της οπτικής απορρόφησης υγρής καλλιέργειας του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i>	54
Γράφημα 11 Επίδραση διαφορετικών δραστικών ουσιών (σε διαφορετικές συγκεντρώσεις) στην παραγωγή σπορίων/mL των απομονώσεων 42, 36 και 3 του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i>	56

Πίνακας Πινάκων

Πίνακας 1 Μυκητοκτόνα και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τις βιοδοκιμές ανθεκτικότητας.....	27
Πίνακας 2 Studentized Range Table.....	30
Πίνακας 3 Ανάπτυξη των απομονώσεων του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i> σε διαφορετικά θρεπτικά υλικά.....	30
Πίνακας 4 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για τη δραστική ουσία carbendazim.....	41
Πίνακας 5 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για τη δραστική ουσία boscalid.....	43
Πίνακας 6 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για την δραστική ουσία mefentrifluconazole.....	45
Πίνακας 7 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για τη δραστική ουσία cyproconazole.....	46
Πίνακας 8 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για τη δραστική ουσία spiroxamine.....	48
Πίνακας 9 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για τη δραστική ουσία pyrimethanil.....	49
Πίνακας 10 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για τη δραστική ουσία cyprodinil.....	50
Πίνακας 11 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για τη δραστική ουσία fludioxinil.....	51
Πίνακας 12 Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση ανάπτυξης αποικίας του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i>	53
Πίνακας 13 Επίδραση διαφορετικών δραστικών ουσιών στη παραγωγή αριθμού πυκνιδιοσπορίων /mL ανά απομόνωση.....	55

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1 Πυκνιδιοσπόρια του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i>	36
Εικόνα 2 Πολυμορφισμός απομονώσεων του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA.....	37
Εικόνα 3 Μη βλάστηση σπορίων του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i> στο μάρτυρα	38
Εικόνα 4 Μη βλάστηση σπορίων του μύκητα <i>Zymoseptoria tritici</i> στο μάρτυρα.....	38
Εικόνα 5 Επίδραση 0 ppm ,0,001ppm και 0,01 ppm pyraclastrobin στην ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων 37 (πάνω αριστερά), 2 (πάνω δεξιά) και 28 (κάτω) σε κάθε τρυβλίο (3 επαναλήψεις) του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε υλικό PDA με προσθήκη 100 mg/L SHAM μετά από επώαση 12 ημερών	40
Εικόνα 6 Επίδραση 0,01 ppm, 0,001ppm και 0 ppm pyraclastrobin στην ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων (σε κάθε τρυβλίο) 27 (πάνω αριστερά), 4 (πάνω δεξιά) και 35 (κάτω) σε κάθε τρυβλίο (3 επαναλήψεις) του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε υλικό PDA με προσθήκη 100 mg/L SHAM μετά από επώαση 12 ημερών	40
Εικόνα 7 Μυκηλιακή ανάπτυξη της απομόνωσης 4 σε 0,001 ppm pyraclastrobin του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε υλικό PDA με προσθήκη 100 mg/L/1 SHAM.....	40
Εικόνα 8 Επίδραση 3,33 ppm boscalid στην ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων 42 (πάνω), 3 (κάτω δεξιά) και 36 (κάτω αριστερά) σε κάθε τρυβλίο (3 επαναλήψεις) του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε υλικό PDA.....	43
Εικόνα 9 Ανάπτυξη των απομονώσεων 42 (πάνω), 3 (κάτω δεξιά) και 36 (κάτω αριστερά) σε 0 συγκέντρωση μυκητοκτόνου(μάρτυρες) σε κάθε τρυβλίο (3 επαναλήψεις) του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε υλικό PDA.....	43
Εικόνα 10 Επίδραση 0,003 ppm mefentrifluconazole στην ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων 42 (πάνω), 3 (κάτω δεξιά) και 36 (κάτω αριστερά) του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε υλικό PDA.....	45
Εικόνα 11 Επίδραση 0,01 ppm cyproconazole στην ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων 42 (πάνω), 3 (κάτω δεξιά) και 36 (κάτω αριστερά) σε κάθε τρυβλίο (3 επαναλήψεις) του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε υλικό PDA.....	47
Εικόνα 12 Επίδραση 1 ppm spiroxamine ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων 42 (πάνω), 3 (κάτω δεξιά) και 36 (κάτω αριστερά) σε κάθε τρυβλίο (3 επαναλήψεις) του μύκητα <i>Z. tritici</i> σε υλικό PDA.....	49

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Σεπτορίαση του σίτου

Το σιτάρι (*Triticum aestivum*) θεωρείται μια από τις πιο σημαντικές καλλιέργειες παγκοσμίως. Υπολογίζεται ότι συνεισφέρει περίπου στο 20% της παγκόσμιας πρόσληψης θερμίδων και αποτελεί σημαντική “πηγή” υδατανθράκων, πρωτεϊνών, φυτικών ινών και βιταμινών (Shewry and Hey, 2015).

Η καλλιέργεια του σίτου πλήττεται από σημαντικές ασθένειες όπως ο άνθρακας, η σκωρίαση, η ελμινθοσπορίαση, οι σήψεις ριζών κ.α. (Duveiller et al., 2012). Η συνεχής καλλιέργεια του χειμερινού σίτου σε συνδυασμό με την αλλαγή του κλίματος από θερμό και υγρό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μυκήτων που προκαλούν κηλιδώσεις στον σίτο. Ένας από τους σημαντικότερους είναι και ο μύκητας *Zymoseptoria tritici* (HGCA, 2010; HGCA, 2012; Dean et al., 2012; Fones and Gurr, 2015; Hýsek et al., 2017). Η προσβολή των ευαίσθητων ποικιλιών σιταριού από το παθογόνο μπορεί να προκαλέσει σημαντική απώλεια παραγωγής που μπορεί να φθάσει και πάνω από 50% (Eyal et al., 1987).

Ο μύκητας *Zymoseptoria tritici* είναι το παθογόνο αίτιο της ασθένειας της σεπτορίασης του σίτου. Το *Mycosphaerella graminicola* είναι το όνομα της τέλειας μορφής και συνώνυμο του μύκητα *Zymoseptoria tritici*, ενώ *Septoria tritici* το όνομα της ατελούς μορφής. Ο *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt συνδέθηκε για πρώτη φορά με την *Septoria tritici* το 1972 (Ponomarenko et al. 2011).

1.1.1 Εύρος Ξενιστών Παθογόνου

Ο μύκητας *Zymoseptoria tritici* προσβάλλει κυρίως το σιτάρι, όμως και άλλα είδη φυτών μπορεί να αποτελέσουν ξενιστές του μύκητα όπως η σίκαλη, η βρώμη, το κεχρί, το τριτικάλε και το κριθάρι (Fraaije et al. 1999). Σύμφωνα με τον Suffert et al. (2015) ο μύκητας απομονώθηκε από 26 διαφορετικά ζιζάνια από τις οικογένειες των αγρωστωδών και των ποοειδών εκ των οποίων 6 από αυτά ενδεχομένως να αποτελούν δευτερογενείς ξενιστές του (*Agrostis capillaris*, *Anisantha sterilis*, *Bromus hordeaceus subsp. hordeaceus*, *Festuca arundinacea*, *Poa annua* και *P. pratensi*).

Σε αυτά τα ζιζάνια μπορεί να διαχειμάσει το χειμώνα χωρίς όμως να τους προκαλέσει σοβαρή ζημία (Wiese, 1987). Κύριο χαρακτηριστικό του μύκητα αποτελεί η ικανότητα μεταλλαγής και προσαρμογής ανάλογα με τον ξενιστή του (Kellner et al. 2014).

1.1.2. Συμπτώματα-Σημεία

Τα συμπτώματα της σεπτορίασης διαφέρουν ανάλογα την ποικιλία, τις καλλιεργητικές πρακτικές και την περιοχή.

Τα αρχικά συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται ως μικρές χλωρωτικές κηλίδες στα φύλλα των φυταρίων το φθινόπωρο ή στα ανεπτυγμένα φύλλα την άνοιξη. Παρόλο που η ασθένεια μπορεί να προσβάλλει το φυτό σε οποιοδήποτε στάδιο ανάπτυξης του, οι αρχικές κηλίδες ξεκινούν ως μικρές κίτρινα στίγματα στα κατώτερα φύλλα που ακουμπούν στο έδαφος (Ponomarenko et al., 2011).

Καθώς τα φύλλα αναπτύσσονται, οι κηλίδες αποκτούν σκούρο καφέ χρώμα. Οι κηλίδες στα ώριμα φύλλα είναι συνήθως επιμήκεις, στενές και οριοθετούνται από τα νεύρα των φύλλων. Μπορεί όμως να αναπτυχθούν και άωρες κηλίδες ανώμαλου ή ελλειπτικού σχήματος, κυρίως στα φύλλα των φυταρίων ή στα φύλλα που μολύνθηκαν σε νεαρό στάδιο. Καθώς οι κηλίδες σε μετέπειτα στάδια ωριμάζουν, το κέντρο τους γίνεται λευκό-γκρι ή σταχτί με μικρά, καστανού σκούρου ή μαύρου χρώματος στίγματα. Τα στίγματα αυτά αποτελούν τις καρποφορίες του μύκητα δηλαδή τα πυκνίδια ή τα ψευδοθήκια. Ύστερα οι κηλίδες γίνονται νεκρωτικές. Τα πυκνίδια ή τα ψευδοθήκια του μύκητα αναπτύσσονται στις υποστομάτιες περιοχές του φύλλου (Ponomarenko et al., 2011). Τα πυκνίδια αναπτύσσονται κάτω από τα στόματα του μολυσμένου φύλλου και παραμένουν <<αγκιστρωμένα>> στην επιδερμίδα του φύλλου (Weber, 1922, reviewed in Hilu and Bever 1957; Shipton et al. 1971; Kema et al. 1996a). Τέλος ο μύκητας μπορεί να προσβάλλει και τον σπόρο προκαλώντας συρρίκνωση ή ρυτίδιασμα (Wiese, 1987).

1.1.3. Συστηματική κατάταξη

Η *Zymoseptoria tritici* μέχρι το 2011 ονομαζόταν *Septoria tritici*. Σύμφωνα με μοριακές φυλογενετικές μελέτες που διεξήχθησαν από τους Quaedvlieg et al.(2011) απεδείχθη ότι τα είδη του γένους *Zymoseptoria* πρέπει να διαχωριστούν από τα είδη του γένους *Septoria*. Η *Z. tritici* ανήκει στην κλάση *Dothideomycetes*, στην τάξη *Carpodiales* και στην οικογένεια *Mycosphaerellaceae* (EPPO Global Database,” 2022).

1.1.4. Περιγραφή πυκνιδιοσπορίων

Τα πυκνίδια εμφανίζονται ως μαύρα στίγματα πάνω στα νεκρά φύλλα αλλά μπορούν να αναπτυχθούν και στην καλαμιά του σίτου που παραμένει την καλοκαιρινή περίοδο στην επιφάνεια του εδάφους (Hilu and Bever, 1957; Suffert et al. 2011). Το μέγεθός τους ποικίλει από 60-200 μm και εξαρτάται από το στέλεχος του μύκητα, την ένταση της ασθένειας αλλά και το μέγεθος των στομάτων των φύλλων των διάφορων ποικιλιών σίτου (Eyal and Brown, 1975; F.r et al., 1985; Kema and Annone, 1991). Μέσα στα πυκνίδια παράγονται τα πικνιδιοσπόρια του μύκητα τα οποία είναι υαλώδη, εμφανίζουν από 3 έως 7 δυσδιάκριτα σέπτα, διαστάσεων 2,6 x 62,5 μm με νηματοειδή κωνικά άκρα (Bockus et al., 2010). Αυτά ονομάζονται και μακροπυκνιδιοσπόρια. Τα μακροκονιδιοσπόρια είναι ο πιο κοινός τύπος κυττάρων σε *in vitro* συνθήκες. Επίσης σε *in vitro* συνθήκες παράγονται και τα μικροπυκνιδιοσπόρια, τα οποία αναφέρονται και ως βλαστοσπόρια. Τα μικροπυκνιδιοσπόρια είναι μικρά, μονοκύτταρα με μέγεθος περίπου 1 μm πλάτος και 5-10μm μήκος. Αυτά τα κύτταρα σχηματίζονται είτε από τις υφές είτε από τα μακροπυκνιδιοσπόρια (Steinberg, 2015). Το παθογόνο επιβιώνει εκτός καλλιεργητικής περιόδου με την μορφή ασκοσπορίων, πυκνιδιοσπορίων, μυκηλίου και χλαμυδοσπορίων στα υπολείμματα της καλλιέργειας, στην καλαμιά αλλά και σε φυτά εθελοντές (Francisco et al., 2019).

Η βλάστηση των κονιδίων προκύπτει από πλευρικά ή ενδιάμεσα κύτταρα. Τα κονίδια εξέρχονται από τα πυκνίδια με την μορφή σπειραμάτων που συχνά έχουν χρώμα γαλακτώδες λευκό έως καφεκίτρινο. Σε κάθε καλλιεργητική περίοδο μπορούν να υπάρξουν πολλοί δευτερογενείς κύκλοι αναπαραγωγής κονιδίων (Ponamarenko et al. 2011).

1.1.5. Περιγραφή ασκοσπορίων

Τα περιθήκια συναντώνται συνηθώς στην καλαμιά και τα ασκοσπόρια είναι δυκύτερα (Wiese, 1987). Τα ασκοσπόρια σχηματίζονται μέσα στα περιθήκια τα οποία έχουν διάμετρο 48-114μm και αναπτύσσονται μετά την εμφάνιση των πυκνιδίων στα μολυσμένα φύλλα (Wiese,1987; Kema et al., 1996a; Eriksen and Munk, 2003; reviewed in Suffert et al., 2011). Τα περιθήκια αναπτύσσονται εντός των κηλίδων και κάτω από την επιδερμίδα του ξενιστή. Κάθε ασκός έχει διαστάσεις περίπου 11-14 x 30-40 μm και περιέχει οκτώ ασκοσπόρια. Τα ασκοσπόρια είναι υαλώδη, ελλειπτικά με διαστάσεις 2,5-4 x 9-16 μm. Τα ασκοσπόρια απελευθερώνονται με δύναμη από τον ώριμο ασκό λόγω των διακυμάνσεων της σχετικής υγρασίας μετά από περιόδους υγρασίας και αποτελούν το πρωτογενές μόλυσμα το φθινόπωρο (Ponamarenko et al., 2011). Η ανάπτυξή τους εξαρτάται από την ύπαρξη και την επιτυχή σύζευξη των δύο αντίθετων συζευκτικών τύπων στο ξενιστή και συνεπώς από την ένταση της ασθένειας (Kema et al., 1996b, Cowger et al., 2002).

1.1.6. Κύκλος της ασθένειας

Οι μολύνσεις από τον μύκητα *Zymoseptoria tritici* ξεκινούν από την παρουσία των ασκοσπορίων ή πυκνιδιοσπορίων που παράγονται στα υπολείμματα της καλλιέργειας την προηγούμενη καλλιεργητική περίοδο. Οι πρωτογενείς μολύνσεις πραγματοποιούνται μετά την έκπτυξη το φθινόπωρο ή την άνοιξη από τα ασκοσπόρια (Ponamarenko et al. 2011). Μετά την προσγείωση των ασκοσπορίων ή των πυκνιδιοσπορίων στην φυλλική επιφάνεια σε συνθήκες υψηλής υγρασίας τόσο τα ασκοσπόρια όσο και τα πυκνιδιοσπόρια του μύκητα βλαστάνουν (Shaw, 1991). Η είσοδος του μύκητα από την φυλλική επιφάνεια πραγματοποιείται αποκλειστικά σχεδόν μόνο μέσω των στομάτων των φύλλων (Cohen and Eyal, 1993; Hilu and Bever, 1957; Kema et al., 1996d; Duncan and Howard, 2000; Eriksen, 2000). Μόλις εισέλθει στο φύλλο, ο μύκητας αναπτύσσεται μεταξύ των κυττάρων, αλλά δεν παράγει καμία «κατασκευή» διατροφής π.χ. μυζητήρες (Kema et al., 1996d). Αν και παρατηρείται αρκετή ποσότητα μυκηλίου στους ιστούς του μεσόφυλλου, δεν παρατηρούνται ορατά συμπτώματα την μόλυνσης σε αυτή την φάση της ασθένειας. Ο μύκητας *Zymoseptoria tritici* είναι ένα ημι-βιοτροφικό παράσιτο. Αυτό σημαίνει ότι στο στάδιο που περιγράφηκε παραπάνω ο μύκητας αποκομίζει θρεπτικά συστατικά από τα ζωντανά

κύτταρα χωρίς όμως να νεκρώνει τα κύτταρα (Ponamarenko et al., 2011). Ύστερα με την επικράτηση κατάλληλων συνθηκών θερμοκρασίας (20-25°C) και υγρασίας (υψηλή σχετική υγρασία) ο μύκητας μετατρέπεται σε νεκροτροφικός. Το μεσόφυλλο καταρρέει με αποτέλεσμα την εμφάνιση χλώρωσης και νέκρωσης του φύλλου. Η αλλαγή αυτή πραγματοποιείται περίπου 10 ημέρες μετά την μόλυνση (Kema et al., 1996d; Dancer et al., 1999). Η ταχύτητα με την οποία καταρρέει το μεσόφυλλο και το γεγονός ότι τα κύτταρα νεκρώνονται ταχύτατα χωρίς την παρουσία μυκηλίου, υποδηλώνει την ύπαρξη διαλυτών τοξικών ενώσεων στην αλληλεπίδραση του ξενιστή και του μύκητα (Kema et al., 1996d). Μέχρι σήμερα όμως δεν έχει αποδειχθεί η ύπαρξή τους. Ύστερα τα πυκνίδια αναπτύσσονται πάνω στις νεκρωτικές κηλίδες των φύλλων και με μεγάλης έντασης βροχή μεταφέρονται τα πυκνιδιοσπόρια στα ανώτερα φύλλα του ίδιου του φυτού ή σε κοντινά φυτά. Σύμφωνα με τους Francisco et al., (2019) από την βλάστηση των πυκνιδιοσπορίων μπορούν να σχηματιστούν και βλαστοσπόρια στην επιφάνεια των φύλλων του σίτου. Λόγω του μικρού τους μεγέθους αλλά και της συνεχής αύξηση τους κατά την διάρκεια του βιολογικού κύκλου του παθογόνου θεωρείται ότι αποτελούν το αίτιο για την ταχεία εξέλιξη της ασθένειας μετά την επικράτηση παρατεταμένων βροχών με διάρκεια αρκετών ημερών (Jones et al., 1974; Annone 1987).

Σύμφωνα με τους Francisco et al., (2019) γλαμιδοσπόρια(παράγονται και από τον μύκητα *Z. tritici* τόσο *in vitro* όσο και *in planta* και αποτελούν σημαντική πηγή μόλυσματος καθώς μπορούν να επιβιώσουν μεταξύ των καλλιεργητικών περιόδων και πιθανώς δημιουργούν μια “πηγή” μόλυσματος που παραμένει για αρκετά χρόνια στις περιοχές που καλλιεργείται σιτάρι. Τέλος μέσω των γλαμιδοσπορίων ο μύκητας μεταφέρεται σε μεγάλες αποστάσεις μέσω των μολυσμένου στάχυ ή σπόρου.

1.1.7. Επιδημιολογία

Οι πρωτογενείς μολύνσεις λόγω του μύκητα *Z. tritici* ξεκινούν τις περισσότερες φορές από τα αερομεταφερόμενα ασκοσπόρια τα οποία μπορούν να μεταφερθούν έως 100 km (Shaw and Royle, 1989a; McDonald et al., 1999). Συνεπώς 1m² ενός μολυσμένου φύλλου μπορεί να φιλοξενεί περίπου 70 διαφορετικά στελέχη του παθογόνου (Zhan et al., 2001).

Αντιθέτως τα πυκνιδιοσπόρια κατά κύριο λόγο είναι υπεύθυνα για τις δευτερογενείς μολύνσεις. Τα πυκνίδια παράγονται 14-40 ημέρες μετά την μόλυνση, αναλόγως των καιρικών συνθηκών και το είδος του ξενιστή (Pomokerento et al., 2011). Τόσο τα ασκοσπόρια όσο και τα πυκνιδιοσπόρια απελευθερώνονται υπό συνθήκες υψηλής υγρασίας, στην περίπτωση των ασκοσπορίων επιτυγχάνεται με την ύπαρξη ελεύθερου νερού στις αντίστοιχες επιφάνειες (Eyal, 1971; Sanderson και Hampton, 1978). Από τα ώριμα ψευδοθήκια απελευθερώνονται τα ασκοσπόρια καθ' όλη την διάρκεια του έτους αρχικά από τα μολυσμένα υπολείμματα της περασμένης καλλιεργητικής περιόδου αλλά και από τα φυτά εθελοντές και έπειτα στον κύριο ξενιστή (Sanderson και Hampton, 1978; Hunter et al., 1998; Zhan et al., 1998). Τα πυκνιδιοσπόρια μεταφέρονται με μεγάλης έντασης βροχές από την καλαμιά ή τα κατώτερα φύλλα του σίτου στα ανώτερα φύλλα της καλλιέργειας (κάθετη μεταφορά) ή τα κοντινά φύλλα (οριζόντια μεταφορά). Η οριζόντια μεταφορά των πυκνιδιοσπορίων επιτυγχάνεται και με την επαφή των παλαιών φύλλων και νέων φύλλων χωρίς να προηγηθεί μεγάλης έντασης βροχής (Royle et al., 1995). Έτσι η διάταξη της καλλιέργειας επιδρά σημαντικά στην εξέλιξη της ασθένειας κυρίως στην προσβολή των ανωτέρων φύλλων του σίτου, στα οποία προκαλεί την μεγαλύτερη ζημία (Lovell et al., 1997).

1.1.8. Αντιμετώπιση

Η εφαρμογή μυκητοκτόνων αποτελεί μέχρι στιγμής την κύρια στρατηγική αντιμετώπισης του παθογόνου. Στην Ευρώπη οι περισσότερες εφαρμογές μυκητοκτόνων στα σιτηρά είναι αποτελεσματικές έναντι της ασθένειας. Παρόλα αυτά το κύριο πρόβλημα της χημικής καταπολέμησης αποτελεί η εμφάνιση ανθεκτικότητας κάποιων απομονώσεων του μύκητα *Z. tritici* σε κάποια μυκητοκτόνα, οι οποίες γρήγορα επικράτησαν. Η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών έναντι του παθογόνου αποτελεί τον πιο οικονομικό τρόπο αντιμετώπισης. Όμως οι περισσότερες ανθεκτικές ποικιλίες δεν είναι πια αποτελεσματικές λόγω της εμφάνισης νέων μολυσματικών απομονώσεων του παθογόνου. Η εφαρμογή καλλιεργητικών πρακτικών (π.χ. ώψιμη σπορά, αμειψισπορά) και η βιολογική αντιμετώπιση του παθογόνου μπορούν να μειώσουν το ποσοστό και της σοβαρότητα της ασθένειας, όμως αυτές οι μέθοδοι δεν είναι τόσο αποτελεσματικές (Ballu, 2021).

1.1.9. Χημική αντιμετώπιση

Οι επιδημίες που προκαλούνται από την σεπτορίαση αντιμετωπίζονται κυρίως με την εφαρμογή μυκητοκτόνων. Στην Ευρώπη, το 70 % των μυκητοκτόνων των σιτηρών στοχεύει στην αντιμετώπιση του μύκητα *Z. tritici* (Fones and Gurr, 2015; Torriani et al., 2015). Συνήθως οι πρώτες εφαρμογές φυλλώματος πραγματοποιούνται στα φυσιολογικά στάδια GS31-32 (Ballu, 2021). Επιπλέον εφαρμογές αποσκοπούν στην προστασία των ανώτερων φύλλων δηλαδή από την εμφάνιση του φύλλου σημαίας έως και την εμφάνιση του λέπυρου (GS39-49) (Carmona et al., 2020).

Τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1970. Γρήγορα έγιναν δημοφιλή λόγω του ευρύ φάσματος φυτοπαθογόνων μυκήτων που αντιμετωπίζουν (ασκομύκητες και βασιδιομύκητες), της διασυστηματικής τους κίνησης στο φυτό αλλά και της υψηλής αποτελεσματικότητάς τους. Η ομάδα των μυκητοκτόνων αυτών παρεμποδίζει το σχηματισμό των μικροσωλινίσκων της μιτωτικής ατράκτου, την διαίρεση των κυττάρων και την μυκλιακή ανάπτυξη. Η προσκόληση της δραστικής ουσίας στην β-τουμπουλίνη έχει ως αποτέλεσμα αποτέλεσμα να μην πολυμερίζεται σε μικροσωλινίσκους της μιτωτικής ατράκτου (Μάρκογλου και Ζιώγας, 2010, Vela-Corcía et al., 2018, Olaya and Geddens, 2019). Το carbendazim χρησιμοποιούνταν ευρέως για την αντιμετώπιση της σεπτορίασης και το 2009 αποσύρθηκε.

Σήμερα, τα μυκητοκτόνα που είναι αποτελεσματικά για την αντιμετώπιση της ασθένειας στην Ευρώπη είναι αυτά που ανήκουν στη ομάδα των των παρεμποδιστών της απομεθυλίωσης του C-14(DMIs), των παρεμποδιστών της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος αλλά και ο συνδυασμός εξειδικευμένων μονοθεσιακών και πολυθεσιακών παρεμποδιστών (Birr et al., 2021).

Οι στρουμπιλουρίνες αποτελούν γεωργικά μυκητοκτόνα που παρεμποδίζουν την ροή ηλεκτρονίων στο επίπεδο του συμπλόκου των κυτοχρωμάτων bc1(σύμπλοκοIII) της αναπνευστικής αλυσίδας και πιο συγκεκριμένα στη θέση Qo (FRAC 2022;Μάρκογλου και Ζιώγας,2010). Οι Anke et al.,(1977)ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν τις αντιμυκητιακές ιδιότητες των μεταβολιτών του βασιδιομύκητα *Strobilurus tenacellus*. Στην ομάδα ανήκουν και άλλες φυσικές ενώσεις όπως οι oudemansins και οι myxothiazol που παράγονται από άλλους μύκητες. Αν και η χρήση των ίδιων των

φυσικών ενώσεων δεν είναι εφικτή στην πράξη λόγω ότι διασπώνται στο φώς και είναι πτητικές, η σύνθεση παρόμοιων ουσιών από εταιρείες γεωργικών φαρμάκων τις κατέστησε σε ευρέως φάσματος μυκητοκτόνα. Τα μυκητοκτόνα αυτής της ομάδας έχουν πολύ καλή προστατευτική και θεραπευτική δράση και παρεμποδίζουν την βλάστηση των σπορίων του μύκητα. Η ικανότητα τους να μεταφέρονται τόσο διασυστηματικά όσο και διαλεσματικά ποικίλει στα διάφορα μέλη της ομάδας (Μάρκογλου και Ζιώγας,2010).

Οι στρουμπιλουρίνες (πχ. trifloxystrobin, azoxystrobin, pyraclostrobin) ήταν πολύ αποτελεσματικές έναντι της σεπτορίας όταν πρωτοεισάχθηκαν στην αγορά στα μέσα του 1990 (Bartlett et al., 2002). Όμως γρήγορα ο μύκητας *Z.tritici* ανέπτυξε ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα αυτής της ομάδας στα μέσα του 2000 (Dehne and Deising, 2008).

Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης των στερολών (Sterol Biosynthesis Inhibitors) είναι μια σημαντική ομάδα διασυστηματικών μυκητοκτόνων που χρησιμοποιείται ευρύτατα για την καταπολέμηση πολλών ασθενειών. Η εργοστερόλη είναι η σημαντικότερη στερόλη των κυτταρικών μεμβρανών των ανώτερων μυκήτων όπως Αδηλομύκητες και Ασκομύκητες. Ανάλογα με το στάδιο της βιοσυνθετικής οδού των στερολών που παρεμποδίζουν μπορούν να υποδιαιρεθούν σε τέσσερις ομάδες. Στη πρώτη και πιο σημαντική ομάδα με σειρά σπουδαιότητας για την γεωργική πράξη ανήκουν οι παρεμποδιστές της απομεθυλίωσης του C-14 που αναφέρονται και ως DMIs. Ως αποτέλεσμα αυτής της παρεμπόδισης είναι η συσσώρευση πρόδρομων 14α-μεθυλιωμένων στερολών, οι οποίες όμως δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να δομήσουν τις μεμβράνες των μυκηλιακών μυκήτων. Σε αυτή την ομάδα ανήκουν τα τριαζολικά,τα ιμιδαζολικά,τα πιπεραζινικά,τα πυριδινικά και τα πυριμιδινικά μυκητοκτόνα (Μάρκογλου και Ζιώγας,2010). Τα DMIs χρησιμοποιούνται εκτεταμένα για την αντιμετώπιση της σεπτορίας από το 1980 (Curvers et al., 2014). Μια καινούργια δραστική ουσία με το όνομα mefentrifluconazole από την ομάδα των τριαζόλων εισάχθηκε στην Ευρωπαϊκή αγορά το 2020 με σκοπό την αντιμετώπιση των ασθενειών των σιτηρών (Jørgensen et al., 2021).

Σύμφωνα με τους Strobel et al., (2020)σε αντίθεση με τις “παλιές” αζόλες όπως οι δραστικές ουσίες tebuconazole, prothioconazole και epoxiconazole το mefentrifluconazole είναι πιο αποτελεσματικό για την αντιμετώπιση της σепτορίασης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η κεφαλή της τριαζόλης στηρίζεται σε μια ισοπροπανολική ομάδα, που την καθιστά πιο εύκαμπτη και ικανή να προσδένεται στο ενεργό κέντρο-στόχο του ενζύμου (CYP51 enzyme) ακόμα και αν έχει υποστεί κάποια μετάλλαξη

Τέλος μυκητοκτόνα διαφορετικής χημικής δομής με αυτής των SBIs μπορούν να παρεμποδίσουν την βιοσύνθεση της εργοστερόλης. Σε αυτά ανήκουν οι ενώσεις spiroxamine, fenhexamid στην ομάδα των σπιροκεταλαμίνων και των υδροξυανιλιδίων αντίστοιχα. Το spiroxamine διαθέτει διασυστηματική κίνηση και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1977. Χαρακτηρίζεται από προληπτική και θεραπευτική δράση έναντι του ωιδίου και του ρυγχοσπόριου των σιτηρών, *Pyrenophora teres* και *Septoria spp.* στα σιτηρά (Ζιώγας και Μαρκογλού, 2010).

Τα καρβοξαμινικά μυκητοκτόνα αποτελούν την τελευταία ομάδα μονοθεσιακών παρεμποδιστών τα οποία άρχισαν να χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της σепτορίασης στα τέλη του 2000 με την εμφάνιση του boscalid το 2003. Από το 2010 και έπειτα και άλλα μυκητοκτόνα της ίδιας ομάδας είναι επίσης διαθέσιμα στην αγορά (πχ. bixafen, fluxapyroxad) τα οποία χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την αντιμετώπιση της σепτορίασης (Rehfus et al., 2018; Yamashita and Fraaije, 2018). Τα μυκητοκτόνα αυτής της ομάδας στοχεύουν στην παρεμπόδιση του συμπλόκου II της μιτοχοδριακής αναπνευστικής αλυσίδας και τα οποία έχουν διασυστηματική και διελεσματική κίνηση ανάλογα με την δραστική ουσία (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2010; Sierotzki and Scalliet, 2013).

Σε αντίθεση, οι πολυθεσιακοί παρεμποδιστές όπως το chlorothalonil, folpet, pyrimethanil, fludioxonil δρουν έναντι αρκετών σημείων στόχων του μύκητα. Έτσι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας είναι σχεδόν απίθανη (Hobbelen et al., 2011; Oliver 2014). Όμως οι περισσότεροι πολυθεσιακοί παρεμποδιστές δεν διαθέτουν την ικανότητα διασυστηματικής κίνησης στο φυτό με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο ως προστατευτικά μυκητοκτόνα. Σε αντίθεση με τα μυκητοκτόνα των ομάδων

DIMs και τα SDHIs που δρουν και ως προστατευτικά αλλά και ως θεραπευτικά (Oliver and Hewitt, 2014; Heick et al., 2017).

Για την καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων υπάρχουν και κάποιες ενώσεις που επιδρούν στην αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου και ονομάζονται αντιπαθογονικά. Το αποτέλεσμα της επίδρασής τους εξαρτώνται είτε από α) της μείωσης της παθογόνου ικανότητας του παθογόνου β) αύξηση της ανθεκτικότητας του ξενιστή. Οι ενώσεις που μειώνουν την παθογόνο ικανότητα του παθογόνου μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες σε αυτές που α) παρεμποδίζουν το σχηματισμό ή την λειτουργικότητα της πλάκας προσκόλλησης β) παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση ή την δράση ενζύμων παθογένειας. Στην δεύτερη κατηγορία ανήκει και η χημική ομάδα των ανιλοπυριμιδών. Είναι μια ομάδα με ευρύ φάσμα μυκήτων στην οποία ανήκουν τα μυκητοκτόνα pyrimethanil και cyprodinil μεταξύ άλλων. Το cyprodinil έχει διασυστηματική κίνηση στο φυτό και αντιμετωπίζει αποτελεσματικά τον βοτρυτή, τα φουζικλαδία των μηλοειδών όπως και κάποια παθογόνα των σιτηρών όπως το μύκητα *Pyrenophora teres*, *Rhynchosporium secalis* κ.α. Το pyrimethanil χαρακτηρίζεται και αυτό από διασυστηματική δράση και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του βοτρυτή, της φαιάς σήψης των πυρηνοκάρπων και του φουζικλαδίου της μηλίας (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2010). Το pyrimethanil, το cyprodinil και το cyproconazole δεν έχουν έγκριση για την καλλιέργεια του σιταριού στην Ελλάδα σύμφωνα με το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.

Η δραστική ουσία fludioxonil ανήκει στην χημική ομάδα των φαινιλοπυρρολών που προκαλούν μη αναστρέψιμη βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες των μυκήτων. Είναι μη διασυστηματικό μυκητοκτόνο και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση μυκήτων φυλλώματος κυρίως του βοτρυτή, φαιά σήψη κ.α. (Μάρκογλου και Ζιώγας, 2010). Χρησιμοποιείται για την επένδυση σπόρου στα σιτηρά σύμφωνα με το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων

1.2. Ανθεκτικότητα μυκήτων σε μυκητοκτόνα

Το είδος αυτής της ανθεκτικότητας ορίζεται ως το φαινόμενο κατά το οποίο αργά ή γρήγορα οι πληθυσμοί του παθογόνου στόχου παύουν να είναι ικανοποιητικά ευαίσθητοι σε ένα μυκητοκτόνο (Brent, 1995).

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας οφείλεται στην επαναλαμβανόμενη χρήση του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου είτε στη χρήση ενός άλλου μυκητοκτόνου με ίδιο χημικό ή/και βιοχημικό τρόπο μηχανισμό δράσης (Brent,1995). Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας ενός πληθυσμού σε ένα μυκητοκτόνο εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως ο τρόπος δράσης και η χρήση του μυκητοκτόνου, η βιολογία και η επιδημιολογία του παθογόνου καθώς η αγρονομικές πρακτικές που εφαρμόζονται στο συγκεκριμένο χωράφι (Massi et al., 2021).

Υπάρχουν διάφορα είδη ανθεκτικότητας όπως η ποιοτική, η ποσοτική, η σταυρανθεκτικότητα, η αρνητική ανθεκτικότητα κ.α. Η ποιοτική ανθεκτικότητα χαρακτηρίζεται από ξαφνική και αισθητή μείωση της αποτελεσματικότητας του μυκητοκτόνου έναντι του παθογόνου στόχου, με αισθητή την παρουσία ευαίσθητων και ανθεκτικών πληθυσμών του παθογόνου. Εάν αναπτυχθεί αυτού του είδους η ανθεκτικότητα τείνει να είναι σταθερή. Εάν η χρήση του μυκητοκτόνου που προκάλεσε την ανθεκτικότητα σταματήσει ή χρησιμοποιείται λιγότερο, οι πληθυσμοί του παθογόνου θα παραμείνουν ανθεκτικοί για πολλά χρόνια (Brent, 1995).

Ανάπτυξη ανθεκτικότητας κάποιων παθογόνων στην ομάδα των στρομπιλουρίνων βασίζεται σε μόνο μια μεταλλαγή ενός αμινοξέος στο γονίδιο G143A του CYTB αποτελεί ένα παράδειγμα ποιοτικής ανθεκτικότητας (Gisi et al., 2002; Fraaije et al., 2002, 2005; Lesniak et al., 2011).

Σε αντίθεση στην περίπτωση των DMI μυκητοκτόνων η ανθεκτικότητα αναπτύσσεται σταδιακά. Σε αυτές τις περιπτώσεις τόσο η μείωση της αποτελεσματικότητας της δραστικής ουσίας έναντι του παθογόνου στόχου όσο και η μείωση της ευαισθησίας του πληθυσμού του παθογόνου είναι μερική και ποικίλει ως προς το βαθμό κάθε φορά. Αυτού του είδους η ανθεκτικότητα αναφέρεται ως ποσοτική ανθεκτικότητα και μπορεί οι ανθεκτικοί πληθυσμοί του παθογόνου-στόχου να γίνουν γρήγορα πιο ευαίσθητοι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες όπως περιορισμός της χρήσης του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου ή χρήση άλλων μυκητοκτόνων έναντι της συγκεκριμένης ασθένειας (Brent, 1995).

Αρκετοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας είναι γνωστοί. Οι πιο κύριοι είναι: η αλλαγή της της θέσης- στόχου της δραστικής ουσίας με αποτέλεσμα να μην είναι πια ευαίσθητο το

παθογόνο-στόχος στο μυκητοκτόνο, η αύξηση της παραγωγής της πρωτεΐνης στόχου, η ανάπτυξη ενός διαφορετικού μεταβολικού μονοπατιού το οποίο παρακάμπτει το στόχο της δραστικής ουσίας, ο μεταβολισμός του μυκητοκτόνου, η αποβολή ή αποκλεισμός του μυκητοκτόνου μέσω των εξαρτώμενων ATP-άσων πρωτεϊνών. Με διαφορά ο πιο κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι η βιοχημική αλλαγή της θέσης-στόχου του μυκητοκτόνου (Brent, 1995; Gullino et al., 2000).

1.2.1. Ανθεκτικότητα του μύκητα *Zymoseptoria tritici* στα μυκητοκτόνα

Οι διαφορετικές ομάδες μυκητοκτόνων διαφέρουν ως προς το βαθμό μείωσης της αποτελεσματικότητάς τους έναντι των ανθεκτικών παθογόνων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ως κληρονομούμενο ρίσκο ανθεκτικότητας του μυκητοκτόνου (fungicide risk).

Επίσης υπάρχουν διαφορές και μεταξύ των παθογόνων ως προς την τάση τους να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα. Αυτή η διαφορά μπορεί να οριστεί το επίκτητο ρίσκο των παθογόνων ή αλλιώς ως ρίσκο ανάπτυξης ανθεκτικότητας που σχετίζεται με το παθογόνου (pathogen risk). Έχουν παρατηρηθεί μεγάλες διαφορές ως προς το ρίσκο του παθογόνου μεταξύ κάποιων κλάσεων, γενών και ειδών φυτοπαθογόνων. Ο μύκητας *Z. tritici* σύμφωνα με τον πίνακα της FRAC ταξινομείται ως μεσαίου ρίσκου παθογόνου. Σε αντιστοιχία με την ομάδα μυκητοκτόνων που εφαρμόζεται κάθε φορά (fungicide risk) έναντι του παθογόνου δημιουργείται ένα συνδυαστικό ρίσκο ως προς το επίπεδο της ανθεκτικότητας που μπορεί να αναπτυχθεί (Brent, 2007).

Επιπλέον η ανάπτυξη ανθεκτικότητας της *Z. tritici* σε αρκετές ομάδες μυκητοκτόνων οφείλεται στο μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων του και στην ολοκλήρωση της εγγενούς της αναπαραγωγής πάνω από μια φορά σε μια καλλιεργητική περίοδο (Zhan and McDonald 2004; Brunner et al., 2008).

Αρχικά τα μυκητοκτόνα της ομάδας των βενζιμιδαζολικών θεωρούνται μια ομάδα με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών αφού είναι υπεύθυνα για κληρονομικές γενετικές αλλοιώσεις χωρίς να επηρεάζεται η προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας είναι αποτέλεσμα σημειακών μεταλλάξεων του

γονιδίου της πρωτεΐνης β-τουμπουλίνη που εκφράζεται στο στάδιο σχηματισμού των μικροσωλινίσκων (FRAC,2023).

Ένας ενδιαφέρον τρόπος για να αντιμετωπιστεί η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στις βενζιμιδαζόλες είναι η ανάμιξη της δραστικής ουσίας carbendazim με τη δραστική ουσία diethofencarb (της ομάδας των φαινυλοκαρβαμιδικών) για την αντιμετώπιση του μύκητα *Botrytis spp.* στο αμπέλι και σε άλλες καλλιέργειες. Το diethofencarb απέδειξε ότι έχει αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα με τις υπόλοιπες δραστικές ουσίες των βενζιμιδαζολών. Έτσι αντιμετωπίζονται μόνο τα ανθεκτικά στελέχη στις βενζιμιδαζόλες και όχι τα ευαίσθητα (Brent, 1995).

Η ομάδα των στρομπιλουρινών(pyraclostrobin) αντιμετώπισε αρκετά αποτελεσματικά την σεπτορίαση όταν εφαρμόστηκαν στα μέσα του 1990 (Bartlett et al., 2002) ,όμως στις αρχές του 2000 ο μύκητας *Z.tritici* ανέπτυξε ανθεκτικότητα στην συγκεκριμένη ομάδα μυκητοκτόνων (Lucas και Fraaije, 2008).

Η ανθεκτικότητα του μύκητα *Z.tritici* οφείλεται στην αλλαγή του γονιδίου στόχο των μυκητοκτόνων στο μιτοχονδριακό κυτόχρωμα b. Συνεπώς η αντικατάσταση της αλανίνης από την γλυκίνη στην θέση 143 του γονιδίου δημιουργε πλήρης ανθεκτικότητα του μύκητα *Z. tritici* σε αυτή την ομάδα μυκητοκτόνων σε όλη την Ευρώπη από τα μέσα της δεύτερης δεκαετίας του 2000 (2012-2016) (Gisi et al., 2002). Ένας δεύτερος μηχανισμός ανθεκτικότητας έναντι αυτής της ομάδας μυκητοκτόνων είναι η ενεργοποίηση μια εναλλακτικής αναπνοής του μύκητα μέσω του ενζύμου εναλλακτική οξειδάση (alternative oxidase, AOX). Με την ενεργοποίηση αυτού του ενζύμου λαμβάνει μέρος η εναλλακτική αναπνοή του παθογόνου χωρίς να παρεμβάλλονται τα σύπλοκα III και IV της κυτοχρωμικής οδού (Ζιωγας και Μάρκογλου, 2010). Σύμφωνα με πειράματα των Avila-Adame&Koller (2003) στο φυτοπαθογόνο μύκητα *Magnaporthe grisea* διαπιστώθηκε ότι η αποτελεσματικότητα των στρομπιλουρινών ήταν αυξημένη σε περιόδους αυξημένης μεταβολικής δραστηριότητα όπως η βλάστηση των σπορίων του παθογόνου και ότι η πρόσδεση τους στη θέση στόχο ήταν επαρκής για την καθολική αναστολή της ανάπτυξης του παθογόνου ακόμα και αν έχει ενεργοποιηθεί η εναλλακτική οξειδάση.

Σύμφωνα με τους Miguez et al., (2004) κάποιες μετρίως ανθεκτικές απομονώσεις του μύκητα *Z.tritici* με υψηλή δραστηριότητα της εναλλακτικής οξειδάσης παρατηρήθηκαν σε καλλιέργειες σίτου που είχαν εφαρμοστεί μυκητοκτόνα της ομάδας των στρουμπιλουρινών.

Σύμφωνα με τους Avilla-Adame and Köller (2002); Wood and Hollomon (2003) σε πειράματα στις ίδιες απομονώσεις που μελετήθηκαν από τους Miguez et al., (2004) συμπεράναν ότι η αυξημένη αυτή δραστηριότητα της οξειδάσης βοήθησε το παθογόνο να “επιβιώσει” έναντι των στρουμπιλουρινών με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν ύστερα πιο ισχυροί μηχανισμοί ανθεκτικότητας έναντι της ομάδας αυτής όπως η μεταλλαγή της θέσης- στόχου των μυκητοκτόνων

Σε πειράματα ανθεκτικότητας στις στρουμπιλουρίες διαπιστώθηκε ή ανασταλτική δράση του σαλικυλ-υδροξαμικού οξέος (SHAM) έναντι της εναλλακτικής οξειδάσης. Έτσι αναστέλλοντας την δράση της AOX εφόσον επιβεβαιωθεί η ανθεκτικότητα στις στρουμπιλουρίες οφείλεται μόνο στη μετάλλαξη του γονιδίου του κυτοχρώματος b (Avila-Adame & Köller 2002, 2003).

Ανθεκτικότητα του μύκητα *Z.tritici* έχει παρατηρηθεί και στην ομάδα των DMIs (cyproconazole, mefentrifluconazole και spiroxamine) μυκητοκτόνων μπορεί να οφείλεται α) σε μετάλλαξη ή συνδυασμό μεταλλάξεων του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την ομαλή λειτουργία του ενζύμου cytochrome *P450*, οικογένεια 51 (CYP51) με αποτέλεσμα να δημιουργούνται αλλαγές στα αμινοξέα του ενζύμου CYP51 β) υπερέκφραση του γονιδίου στόχου CYP51 γ) μείωση της εισροής των DMIs στο κύτταρο με την υπερέκφραση των MgMfs1 μεβρανικών μεταφορών (Leroux and Walker, 2011; Cools et al., 2012; Cools and Fraaije, 2013; Omrane et al., 2015; Omrane et al., 2017; Maë et al., 2020). Παρόλα αυτά η ανάπτυξη αυτού του είδους ανθεκτικότητας παραγεται με αργό ρυθμό και η ομάδα αυτών των μυκητοκτόνων είναι ακόμη αποτελεσματική έναντι του παθογόνου παρόλο την ύπαρξη ανθεκτικών αλληλομόρφων στους πληθυσμούς (Garnault et al., 2019). Αυτό οφείλεται ενδεχομένως στο γεγονός ότι κάθε αλληλόμορφος προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι συγκεκριμένων μυκητοκτόνων της ομάδας αυτής (ημιτελής διασταυρωτή ανθεκτικότητα) (Fraaije et al., 2007; Leroux et al., 2007).

Σε παγκόσμια κλίμακα, η εφαρμογή μυκητοκτόνων και κυρίως των DMIs μυκητοκτόνων έχει ως αποτέλεσμα την “εξέλιξη” του μύκητα *Z.tritici*, τόσο μέσω της δημιουργίας de novo μεταλλαγών όσο και μέσω γονιδιακής ροής (Hartmann et al., 2020).

Τα μυκητοκτόνα που ανήκουν στην ομάδα των SDHIs (boscalid) ήταν η τελευταία ομάδα μονοθεσιακών μυκητοκτόνων που εισάχθηκαν στην αγορά για την αντιμετώπιση της ασθένειας στα τέλη του 2000 (Sierotzki and Scalliet, 2013). Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αυτή την ομάδα μυκητοκτόνων δημιουργήθηκε από μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες πρόσδεσης του συνένζυμου Q γνωστό και ως ουμπικινόνη (Fraaije et al., 2012; Scalliet et al., 2012; Dooley et al., 2016). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα δημιουργία διαφορετικών επιπέδων ανθεκτικότητας και διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των μυκητοκτόνων αυτής της ομάδας (Fraaije et al., 2012; Scalliet et al., 2012). Τέλος σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η κύρια μετάλλαξη που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αυτή την ομάδα δεν παρατηρείται πολύ συχνά καθώς επιδρά αρνητικά στην επιβίωση του παθογόνου (Scalliet et al., 2012).

1.3. Μέθοδοι μελέτης ανθεκτικότητας

Οι μέθοδοι ανίχνευσης ανθεκτικών στελεχών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε βιοδοκιμές και μοριακές δοκιμές *in vitro*. Οι βιοδοκιμές *in vitro* πρέπει να εκτελούνται για ένα μεγάλο αριθμό απομονώσεων του παθογόνου με σκοπό τον καθορισμό της ανθεκτικότητας ή της ευαισθησίας τους πριν την διεξαγωγή συμπερασμάτων της παρούσας κατάστασης ανθεκτικότητας στον αγρό. Αυτό επιτυγχάνεται μετρώντας την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου ή/και της βλάστησης των σπορίων σε τρυβλία Petri ή πλάκες μικροτιλοδότησης που περιέχουν το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και τις υπό εξέταση συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου (Beckerman, 2013).

Τα τελευταία χρόνια αυτού του είδους οι βιοδοκιμές γίνονται σε πλάκες μικροτιλοδότησης (Brent, 1995). Η μείωση της ευαισθησίας του μύκητα στη συγκεκριμένη δραστική ουσία παρατηρείται ανεξάρτητα από την αναγνώριση του μηχανισμού ανθεκτικότητας. Οι μέθοδοι για την μελέτη της ανθεκτικότητας επιβάλλεται να χαρακτηρίζονται από αξιοπιστία και απλότητα. Επίσης θα πρέπει να είναι φθηνές, αποτελεσματικές σε σύντομο χρονικό διάστημα και αποτελέσματα τους να ανταποκρίνονται στην εικόνα ανθεκτικότητας που παρατηρείται στον αγρό (Brent,

2007). Όπως αναφέρθηκε με την χρήση της πλάκας μικροτιτλοδότησης (microtiter test) μπορούμε να εξετάσουμε ταυτόχρονα την ανθεκτικότητα ή την ευαισθησία μυκήτων σε διαφορετικές δραστικές ουσίες.

1.4. Γενετική παραλλακτικότητα

Ως γενετική παραλλακτικότητα μπορεί να οριστεί η διαφορά γενοτύπου μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού σε μια ή περισσότερες θέσεις σε σύγκριση με τα υπόλοιπα άτομα του πληθυσμού. Η ύπαρξη γενετικής παραλλακτικότητας είναι απαραίτητη για την εξέλιξη μέσω της φυσικής επιλογής (Ewens, 2013). Ως “πηγές” γενετικής παραλλακτικότητας των μυκήτων είναι οι εξής:

1. Σημειακή μετάλλαξη νουκλεοτιδίου και ανασυνδιασμός
2. Προσθήκη ή απώλεια ενός γονιδίου
3. Επέκταση οικογένειας γονιδίων
4. Οριζόντια μεταφορά γονιδίων μέσω ανταλλαγής πρωτεϊνών
5. Ανευπλοειδία
6. Εν δυνάμει μη ουσιώδη χρωμοσώματα :ένα διαφορετικό είδος αντιπλοειδίας
7. Απώλεια ετεροζυγωτίας μέσω γενετικού ανασυνδιασμού ή γονιδιακής μετατροπής
8. Αναδιατάξεις του γονιδιώματος
9. Τροποποιήσεις του γονιδιώματος
10. Μικιτοιοί: επηρεάζουν την παθογένεια των μυκήτων

1.4.1. Γενετική παραλλακτικότητα του μύκητα *Zymoseptoria tritici*

Ένας διαφορετικός τύπος ανευπλοειδίας έχει παρατηρηθεί στους συμβιωτικούς Ασκομύκητες (Taylor et al., 2017). Σε αντίθεση με την κανονική ανευπλοειδία, τα παραπάνω επουσιώδη χρωμοσώματα είναι διαφορετικά από αυτά πυρινικού γονιδιώματος και συνήθως αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό των γρήγορα αναπτυσσόμενων γονιδιωμάτων (Camacho et al., 2000). Το γονιδίωμα του μύκητα *Zymoseptoria tritici* συγκρινόμενο με άλλα γονιδιώματα διαφόρων φυτοπαθογόνων έχει διαπιστωθεί ότι περιέχει πολύ λίγα γονίδια που εκφράζουν ένζυμα που διασπών το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή, κάτι που παρατηρείται στους ενδοφυτικούς μη παθογόνους μικροοργανισμούς παρά στους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς (Goodwin et al., 2011).

Ο μύκητας *Zymoseptoria tritici* διαθέτει 21 χρωμοσώματα, από τα οποία τα δεκατρία είναι σημαντικά για την εξέλιξη του μύκητα ενώ τα οκτώ είναι επουσιώδη (αυτά είναι είτε πολυάριθμα και βοηθητικά, η απώλεια τους δεν επιδρά αρνητικά στην εξέλιξη και προσαρμοστικότητα του μύκητα (Croll και McDonald, 2012). Τα επουσιώδη χρωμοσώματα εμπεριέχουν μεγαλύτερο ποσοστό επαναλαμβανόμενων στοιχείων σε σύγκριση με τα πυρινικά χρωμοσώματα (Dhillon et al., 2014). Η ικανότητα του μύκητα να “απαλλάσσεται” από 8 και περισσότερα χρωμοσώματα επιταχύνει την απώλεια των πυρινικών χρωμοσωμάτων που κωδικοποιούν τις θέσεις-στόχους των μυκητοκτόνων (Torriani et al., 2009; Cools και Fraaije, 2013), αλλάζει την σχέση παθογόνου-ξενιστή ή να “νικά” τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή έναντι του παθογόνου (Mundt et al., 1999, 2002; Rudd et al., 2015). Οι παραπάνω διαπιστώσεις είναι υποθετικές και χρήζουν περαιτέρω έρευνας.

Σύμφωνα με τους Sebei και Harrabi (2008) για την υιοθέτηση ή τον σχεδιασμό τεχνικών καταπολέμησης ενός φυτοπαθογόνου, η κατανόηση της γενετικής του ποικιλομορφίας ή/και της δομής του πληθυσμού του είναι ύψιστης σημασίας. Οι πληθυσμοί του παθογόνου που έχουν αναπτύξει υψηλά επίπεδα γενετικής παραλλακτικότητας είναι πιο πιθανό να προσαρμοστούν στις ανθεκτικές ποικιλίες σιταριού σε σύγκριση με πληθυσμούς με μικρότερη γενετική παραλλακτικότητα (McDonald, 1995).

1.4.2. Μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας

Μέχρι σήμερα διαφορετικοί μοριακοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας του μύκητα *Z. tritici* σε διάφορα μέρη του κόσμου. Μοριακοί δείκτες όπως στην περίπτωση του τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD-random amplified polymorphic DNA) έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορα είδη μυκήτων με σκοπό την μελέτη της γενετικής τους παραλλακτικότητας (Pollastro et al., 2000) αλλά και για την γενετική συσχέτιση των ανθεκτικών φαινοτύπων του μύκητα *Botrytis cinerea* σε διάφορες ομάδες μυκητοκτόνων (Paplomatas et al., 2004).

Σε αντίθεση με την απλή PCR στη μέθοδο του τυχαίου ενισχυμένου πολυμορφικού DNA δεν απαιτείται να γνωρίζουμε από πριν την αλληλουχία DNA του οργανισμού στόχου: οι δεκαμερές εκκινητές που χρησιμοποιούνται θα πολλαπλασιάσουν ή όχι την αλληλουχία του DNA, σύμφωνα με τις θέσεις του DNA που αυτοί υβριδίζουν (Erllich.,

1989). Επίσης δεν παράγεται κάποιο προϊόν εάν οι εκκινητές υβριδίσουν σε μεγάλη μεταξύ τους απόσταση. Συμπερασματικά, αν υπάρξει μια μετάλλαξη σε κομμάτι του DNA που πριν ήταν συμπληρωματικό στον εκκινητή, δεν θα παραχθεί προϊόν στην PCR (Williams et al., 1990). Έτσι τα κύρια πλεονέκτηματα αυτής της τεχνικής είναι η ταχύτητα και η απλότητά της αλλά και η ικανότητά της να διακρίνει ακόμα και διαφορετικά στελέχη του ίδιου παθογόνου (Banerjee et al., 2012).

1.5. Μικροβιακή ανάπτυξη

Οι μικροοργανισμοί για να αναπτυχθούν απαιτούν πρόσβαση σε πηγές ενέργειας και σε διάφορες άλλες ενώσεις για την δόμηση των κυττάρων τους όπως ο άνθρακας, το υδρογόνο, το οξυγόνο, το αζώτου κ.α. (Maier and Pepper, 2015)

1.5.1. Καμπύλη ανάπτυξης

Ένας τρόπος παρακολούθησης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι η κατασκευή της καμπύλης ανάπτυξης τους. Στον κατακόρυφο άξονα αναπαριστάται ο αριθμός των κυττάρων σε λογαριθμική μορφή ενώ στον οριζόντιο άξονα ο χρόνος ή η απορρόφηση (OD). Οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται σε υγρό θρεπτικό μέσο με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα κλειστό σύστημα που δεν πραγματοποιείται εκ νέου προσθήκη θρεπτικού μέσου. Συνεπώς τα προϊόντα μεταβολισμού αυξάνονται και η συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων ελαττώνεται και τα κύτταρα οδηγούνται στην φάση θανάτου. Η πρότυπη καμπύλη ανάπτυξης αποτελείται από τέσσερα διακριτά τμήματα: την φάση προσαρμογής, την φάση εκθετικής ανάπτυξης, την φάση στασιμότητας και την φάση θανάτου (Alsuhaime et al., 2013). Κατά την φάση προσαρμογής δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού των κυττάρων καθώς οι μικροοργανισμοί προστίθενται σε νέο θρεπτικό μέσο και χρειάζονται κάποιο χρονικό διάστημα προσαρμογής. Το διάστημα αυτό εξαρτάται από την θερμοκρασία του θρεπτικού υλικού, από τον αρχικό όγκο του εμβολίου, την φάση που βρίσκεται η καλλιέργεια εμβολιασμού κτλ. Στη συνέχεια ακολουθεί η εκθετική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας με μέγιστο και σταθερό ρυθμό για τα δεδομένα της καλλιέργειας. Στην καμπύλη ανάπτυξης η εκθετική φάση χαρακτηρίζεται από ομαλή μορφή χωρίς την παρατήρηση απότομης βηματικής ανάπτυξης. Μετά την περάτωση της εκθετικής φάσης η καμπύλη ανάπτυξης παίρνει οριζόντια μορφή. Κατά την διάρκεια της φάσης στασιμότητας παρατηρείται ισορροπία μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης και θανάτου των κυττάρων. Τέλος η καλλιέργεια

οδηγείται στην φάση θανάτου όπου ο θάνατος των κυττάρων ακολουθεί λογαριθμική πορεία. Ο θάνατος των κυττάρων οφείλεται στη συσσώρευση των προϊόντων μεταβολισμού της καλλιέργειας που συνήθως είναι <<τοξικά>> για την ανάπτυξη της αλλά και στην μείωση των θρεπτικών συστατικών (Maier and Pepper, 2015).

1.5.1.1 Παρακολούθηση της μικροβιακής ανάπτυξης μέσω πειραμάτων

A) Μέτρηση μικροβιακών αποικιών με την μέθοδο των δεκαδικών αραιώσεων και επίστρωση σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Αποτελεί μια απλή μέθοδο για την μέτρηση της ανάπτυξης των μυκήτων και των βακτηρίων που στοχεύει στον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων ή άλλων αναπαραγωγικών μονάδων (colony forming units-cfu) μέσω μέτρησης των αποικιών ανά mL ή gr του δείγματος. Αυτό επιτυγχάνεται με την προετοιμασία δεκαδικών αραιώσεων του αρχικού δείγματος και ύστερα με επίστρωση συγκεκριμένης ποσότητας από κάθε αραιώση σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα μετρώνται ο αριθμός των αποικιών στα αντίστοιχα τρυβλία και υπολογίζεται με συγκεκριμένους μαθηματικούς τύπους το cfu/mL ή gr του αρχικού δείγματος (Arana et al., 2013).

B) Μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων της καλλιέργειας με την χρήση αιματοκυτταρομέτρου

Με αυτή την μέθοδο γίνεται απευθείας μέτρηση των κυττάρων της καλλιέργειας ύστερα από φόρτωση μιας συγκεκριμένης ποσότητας απο την υγρή καλλιέργεια στις περιοχές μέτρησης του αιματοκυτταρομέτρου. Το αιματοκυτταρόμετρο είναι ένα γυάλινο πλακίδιο με δυο διακριτά τμήματα μέτρησης γνωστού εμβαδού. Συνεπώς σε κάθε τμήμα μετράται απευθείας ο αριθμός των υπαρχόντων κυττάρων σε συγκεκριμένο όγκο με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου και υπολογίζεται ο αριθμός κυττάρων ανά mL (“Cell counting Neubauer chamber - Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting - Oscar Bastidas,” n.d., Arana et al., 2013).

1.5.1.1.1. Η απορρόφηση ακτινοβολίας ως μέθοδος μέτρησης μικροοργανισμών

Αποτελεί μια απλή και κλασική μέθοδος ποσοτικοποίησης των μικροοργανισμών. Βασίζεται στην μέτρηση της απορρόφησης ενός μικροβιακού αιωρήματος(σε συγκεκριμένο μήκος κύματος) και τη συσχέτιση αυτού του αριθμού σε αριθμό κυττάρων ή cfu/ml (Arana et al., 2013). Θεωρείται ότι συγκέντρωση των κυττάρων στο αιώρημα είναι ανάλογη της ποσότητας της απορροφούμενης ακτινοβολίας (Κωνσταντίνου Α.; <https://biologylab.eap.gr>, accessed.09.02.23)

1.6. Σκοπός μεταπτυχιακής διατριβής

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η μελέτη του γενετικού χαρακτηρισμού και της ευαισθησίας σε διάφορες ομάδες μυκητοκτόνων απομονώσεων του μύκητα *Zymoseptoria tritici* στην Θεσσαλία κατά το έτος 2020. Έτσι αξιολογήθηκε η επίδραση διάφορων ομάδων μυκητοκτόνων στην ανάπτυξη της αποικίας του μύκητα ύστερα από 14 ημέρες επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA στους 25⁰C σε συνθήκες κόστους. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε και με τον υπολογισμό της ελάχιστης παρεμποδιστικής συγκέντρωσης (*MIC*) της ανάπτυξης μυκηλίου. Τέλος μελετήθηκε και η γενετική ποικιλομορφία των απομονώσεων του μύκητα *Zymoseptoria tritici* με την χρήση της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης (PCR) , χρησιμοποιώντας RAPDs εκκινητές.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Διαδικασία συλλογής και μεταφοράς των δειγμάτων στο εργαστήριο

Η διαδικασία για την συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε τους μήνες Απρίλιο και Μάιο του χρονολογικού έτους 2020 από τον κύριο Βέλλιο. Τα φύλλα σίτου που επιλέχθηκαν είχαν έντονες κηλίδες καστανού χρώματος και ευκόλως διακρινόμενα πυκνίδια. Συλλέχθηκαν 41 δείγματα συνολικά από αγρούς της Θεσσαλίας που είχαν εφαρμοστεί χημικές επεμβάσεις για την αντιμετώπιση της ασθένειας.

Μετά την μεταφορά δειγμάτων στο εργαστήριο, στα φύλλα στα οποία είχαν σχηματιστεί σπειράματα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar(200 gr πατάτα,1gr άγαρ και 16,5 gr γλυκόζη) (PDA) . Μετά από επώαση στους 25°C για 4 ημέρες και αφού υπήρξε επαρκή ανάπτυξη μυκηλίου με την χρήση βακτηριολογικής βελόνης υπό ασηπτικές συνθήκες μεταφέρθηκαν οι αποικίες σε δοκιμαστικό σωλήνα με θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar (PDA) (Fox ,R. T. V., 1993). Τα φύλλα που δεν είχαν εμφανίσει σπειράματα τοποθετήθηκαν σε αυτοσχέδιους υγρούς θαλάμους για 24 ώρες με σκοπό να το σχηματισμό συσσωματών πυκνιδιοσπορίων από τα πυκνίδια. Η διαδικασία ήταν η εξής: Η κηλίδα με τα ευδιάκριτα πυκνίδια αφού πρώτα αφαιρέθηκε από το φύλλο με την βοήθεια νυστεριού υπό ασηπτικές συνθήκες μεταφέρθηκε και στερεώθηκε με κολλητική ταινία πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε η αντικειμενοφόρος εντός υγρού θαλάμου με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες έμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 24-52 ώρες μέχρι να πραγματοποιηθεί η παραγωγή σπειραμάτων. Έπειτα με την χρήση βακτηριολογικής βελόνης τα σπειράματα μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υλικό PDA και επώαστηκε στους 25°C. Τέλος μόλις αναπτύχθηκε επαρκώς η αποικία μέρος αυτής μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα με θρεπτικό υλικό PDA.

2.2. Ανάπτυξη των απομονώσεων του μύκητα *Zymoseptoria tritici* σε τεχνητό θρεπτικό υλικό

Μετά την εμφάνιση των σπειραμάτων στα φύλλα που παρέμειναν στους υγρούς θαλάμους αλλά και αυτών που ήδη είχαν σχηματιστεί κατά την δειγματοληψία, τα σπειράματα μεταφέρθηκαν με την χρήση βακτηριολογικής βελόνης σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Malt Sucrose Agar(4 gr yeast extract, 4 gr malt extract, 4 gr sucrose και 16 gr agar)(YMSA).Υστερα μεταφέρθηκαν σε επωαστικό

θάλαμο στους 20°C υπο σκοτάδι και παρέμειναν μέχρι να αναπτυχθούν μικρο και μακροπυκνιδιοσπορίων του μύκητα. Έπειτα τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4°C.

Με την βοήθεια βακτηριολογικής βελόνης υπό ασηπτικές συνθήκες μεταφέρθηκε μέρος της αποικίας που είχε αναπτυχθεί σε δοκιμαστικούς σωλήνες με YMSA θρεπτικό υπόστρωμα σε δοκιμαστικούς σωλήνες με PDA θρεπτικό υπόστρωμα. Οι σωλήνες μετά μεταφέρθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25°C σε συνθήκες σκότους όπου θεωρείται σύμφωνα με την Ανθούλη (2017) η καλύτερη θερμοκρασία για την παραγωγή πυκνιδιοσπορίων του μύκητα. Σε αυτές τις συνθήκες παρέμειναν 27 έως 35 ημέρες μέχρι την εμφάνιση πυκνιδιοσπορίων για την χρήση τους στις βιοδοκιμές ανθεκτικότητας.

2.3. Ταυτοποίηση απομονώσεων του μύκητα από φύλλα σίτου με έντονα συμπτώματα σεπτορίας

Για την ταυτοποίηση όλων των απομονώσεων του μύκητα πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση πυκνιδιοσπορίων ηλικίας 25-30 ημερών, τα οποία είχαν παραχθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA στους 25°C σε συνθήκες σκότους. Η παρατήρηση των σπορίων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια σύνθετου οπτικού Nikon Laborhot-2 EFD3 μικροσκοπίου και η φωτογράφησή τους με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή με μεγέθυνση 200X.

2.4. Μέθοδοι εκτίμησης του ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα *Zymoseptoria tritici*

Κάποιες απομονώσεις του μύκητα επιλέχθηκαν με σκοπό να μελετηθεί ο ρυθμός ανάπτυξης τους και να σχεδιαστεί βάση αυτής η καμπύλη ανάπτυξης του μύκητα. Για την παρακολούθηση του ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν τρεις μέθοδοι: μέτρηση του συνόλου των πυκνιδιοσπορίων του μύκητα με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου, των ζώντων κυττάρων με διαδοχικές αραιώσεις και επίστρωση τους σε θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλία Petri (cfu/ml) και εκτίμηση του πληθυσμού μέσω της οπτικής απορρόφηση (OD).

Αρχικά γυάλινα μπουκαλάκια τύπου McCartney χωρητικότητας 28 mL που περιείχαν 10ml υγρό θρεπτικό υλικό YMS (4 gr Yeast extract, 4 gr Malt extract, 4 gr Sucrose) εμβολιάστηκαν με τη βοήθεια βακτηριολογικής βελόνης με τμήμα αποικίας του μύκητα που είχε αναπτυχθεί σε δοκιμαστικό σωλήνα με θρεπτικό υπόστρωμα YMSA και είχε αποθηκευτεί στο ψυγείο στους 4°C. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε θάλαμο επώασης

με περιστρεφόμενη βάση στις 600 στροφές ανά λεπτό στους 20°C. Για κάθε απομόνωση εμβολιάζονταν 4 διαφορετικά φιαλίδια τύπου McCartney χωρητικότητας 28 mL που το κάθε ένα χειρίζονταν σε διαφορετικές μέρες. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές απομονώσεις με κωδικό όνομα 5, 15 και 37 για το συγκεκριμένο πείραμα. Έτσι σε διαστήματα 1, 4, 6, 19 και 24 ημερών από τον εμβολιασμό της κάθε καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε μέτρηση ταυτόχρονα του συνόλου των κυττάρων του μύκητα με τη βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου, των ζώντων κυττάρων με διαδοχικές αραιώσεις και επίστρωση τους σε θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλία Petri (cfu/mL) και εκτίμηση του πληθυσμού μέσω της οπτικής απορρόφησης (OD).

Για την εκτίμηση του ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα μέσω της οπτικής απορρόφησης μεταφέρονταν 450 μ L από την αρχική καλλιέργεια σε κυβέτα φασματοφωτόμετρου (Uvikon Spectrophotometer 922, Kontron instruments) και πραγματοποιούνταν μέτρηση στα 600nm και 660nm.

Για την μέτρηση των αποικιών ανά mL υγρής καλλιέργειας πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις μεταφέροντας 100 μ L από την αρχική καλλιέργεια σε φιαλίδια τύπου erpendorf χωρητικότητας 2,5 mL. Οι αραιώσεις έγιναν με δις-απεσταγμένο νερό και πραγματοποιήθηκαν μέχρι και 10 αραιώσεις/απομόνωση. Από την αρχική καλλιέργεια έως και την 9^η αραιώση έγινε επίστρωση (plating) 100 μ L από κάθε αραιώση σε τρυβλίο Petri με YMSA θρεπτικό υλικό. Για κάθε αραιώση πραγματοποιήθηκε επίστρωση 3 τρυβλίων. Έστερα τα τρυβλία μεταφέρθηκαν για επώαση σε επωαστικό θάλαμο υπό συνθήκες σκότους στους 20°C. Μετά από 4-5 ημέρες έγινε η καταμέτρηση των αποικιών σε cfu/mL.

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων του μύκητα έγινε και με τη χρήση αιματοκυτταρομέτρου (Neubauer, Rhône-Poulenc). Από γυάλινα μπουκαλάκια τύπου McCartney χωρητικότητας 28 mL που περιείχαν 10mL υγρής καλλιέργειας του μύκητα που επώαστηκαν σε θάλαμα επώασης με περιστρεφόμενη βάση στις 600 στροφές ανά λεπτό στους 20°C, μεταφέρθηκαν 120 μ L με την βοήθεια μηχανικής πιπέτας στο αιματοκυτταρομέτρο (Neubauer, Rhône-Poulenc) σε χρονικά διαστήματα 1, 4, 6, 19 και 24 ημερών επώασης της κάθε αποικίας. Με την βοήθεια του οπτικού μικροσκοπίου υπολογίστηκε ο αριθμός των κυττάρων ανά mL της αρχικής καλλιέργειας.

2.5. Έλεγχος ανθεκτικότητας σε ομάδες μυκητοκτόνων *in vitro*

Για τις δοκιμές ανθεκτικότητας στις διάφορες ομάδες μυκητοκτόνων οι δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν, το όνομα του εμπορικού σκευάσματος καθώς και οι συγκεντρώσεις απεικονίζονται στο Πίνακα 1. Όλα τα μυκητοκτόνα διαλύθηκαν σε δις απεσταγμένο νερό. Για τις δοκιμές με την δραστική ουσία pyraclostrobin της ομάδας των στρομπιλουρινών πραγματοποιήθηκαν έγινε προσθήκη 100 mg/L σαλικυλδροξαμικού οξέος (SHAM) . Στο θρεπτικό υπόστρωμα η τελική συγκέντρωση του SHAM δεν ξεπέρασε 1% του τελικού όγκου .

Οι δραστικές ουσίες pyraclostrobin, boscalid, mefentrifluconazole, fludioxinil, cyproconazole και spiroxamine που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εγκεκριμένες από Υπουργείο Γεωργίας και Αγροτικού Περιβάλλοντος για την χρήση τους στο χειμερινό σιτάρι και γίνονται επεμβάσεις με αυτά από τους παραγωγούς ενώ οι carbendazim, pyrimethanil και cyprodinil όχι.

Πίνακας 1 Μυκητοκτόνα και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τις βιοδοκιμές ανθεκτικότητας

Δραστική ουσία	Εμπορικό σκεύασμα	Συγκεντρώσεις (ppm)
<u>Qols</u> ¹ pyraclostrobin	Comet 20 EC, Basf	0-0,001-0,01
Βενζιμιδαζολικά carbendazim	50 WG	00,0003-0,003-0,03-0,33- 3,33
Καρβοξαμιδικά boscalid	Cantus 50 WG, Basf	0-0,0003-0,003-0,03-0,33- 3,33
Τριαζόλες mefentrifluconazole	Revyona,7.5% SC, BASF	0,0003-0,003-0,03-0,33-3,33
Τριαζόλες cyproconazole	Atemi 10WG, Syngenta	0-0,001-0,01-0,1-1
Σπυροκεταλαμίνες spiroxamine	Prosper 500 EC, Bayer	0-0,001-0,01-0,1-1
Ανιλοπυριμιδίνες Pyrimethanil	Scala 40 SC, Bayer	0-0,001-0,01-0,1-1-10
Ανιλοπυριμιδίνες Cyprodinil	Chorus 50 WG, Syngenta	0-0,001-0,01-0,1-1-10
Φαινιλοπυρρόλες Fludioxinil	Geoxe 50 WG, Syngenta	0-0,001-0,01-0,1-1-10

¹Στα μυκητοκτόνα της ομάδας των στρουμπιλουρίνων οι δοκιμές έγιναν με προσθήκη 100 mg/L σαλικυλδροξαμικού οξέος (SHAM)

2.5.1. Βιοδοκιμή ανάπτυξης βλαστιτικού σωλήνα σε διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων

Για τη παραγωγή μολύσματος χρησιμοποιήθηκαν οι απομονώσεις του μύκητα 4, 27 και 35 που ήταν ηλικίας 35 ημερών οι οποίες είχαν αναπτυχθεί σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA) σε επωαστικό θάλαμο υπό σκότος σε θερμοκρασία 25°C. Για την παρασκευή υδατικού αιωρήματος σπορίων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Υπό ασηπτικές συνθήκες αποστήρωσης στο δοκιμαστικό σωλήνα με την αποικία του μύκητα προστέθηκαν 7 mL δις-απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια με τη χρήση βακτηριολογικού κρίκου καταστρέφονταν τα πυκνίδια του μύκητα με σκοπό να απελευθερωθούν τα πυκνιδιοσπόρια στο νερό. Αν δεν παρατηρούνταν αύξηση θολερότητας του υδατικού διαλύματος (μικρή συγκέντρωση πυκνιδιοσπορίων) το αιώρημα μεταφερόταν σε ένα δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα όπου επαναλαμβανόταν η ίδια διαδικασία με την ίδια απομόνωση, με σκοπό να αυξηθεί η πυκνότητα των πυκνιδιοσπορίων. Στη συνέχεια το αιώρημα περνούσε από διπλή στρώση τουλπανίου τοποθετημένου επάνω σε χονί που κατέληγε σε φιαλίδιο τύπου McCartney χωρητικότητας 28 mL, ώστε να κατακρατηθούν τα θραύσματα μυκηλίου (Pappas, 1997). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πυκνιδιοσπορίων έγινε με την χρήση του αιματοκυττόμετρου (Neubauer, Rhône-Poulenc). Η τελική συγκέντρωση των πυκνιδιοσπορίων ρυθμιζόταν σε $1,5 \times 10^5$ - $8,5 \times 10^5$ σπόρια/mL.

Κάθε τρυβλίο επιστρώθηκε με θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar (PDA) μετά από προσθήκη κατάλληλης ποσότητας μυκητοκτόνου όπως αναφέρεται και στον Πίνακα 1 (σελίδα 27). Στη συνέχεια με την βοήθεια μηχανικής πιπέτας τοποθετήθηκε μια σταγόνα (20 μ L) σε σημασμένη θέση στο τρυβλίο. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν 3 σταγόνες (οι 3 απομονώσεις που δοκιμάστηκαν). Τα τρυβλία που περιείχαν μόνο PDA χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Για κάθε συγκέντρωση μυκητοκτόνου πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Με την χρήση ενός μαρκαδόρου κάθε τρυβλίο χωρίζονταν σε τρεις ζώνες που στη κορυφή της κάθε μιας τοποθετούνταν το αιώρημα σπορίων. Ύστερα το τρυβλίο τοποθετούνταν σε θέση με ελαφρά κλίση με σκοπό το αιώρημα να κυλίσει κατά μήκος των ζωνών. Τα τρυβλία παρέμειναν στον θάλαμο

νηματικής ροής περίπου 20 λεπτά για να στεγνώσουν και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο στους 25°C. Μετά από 36 ώρες από τον εμβολιασμό τα τρυβλία εξετάστηκαν στο σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο Nikon Labophot-2 EFD3μεγέθυνση στο οποίο ήταν εγκατεστημένη η ψηφιακή κάμερα Motic 10 Mp. Έτσι έγινε παρατήρηση της ανάπτυξης ή όχι του βλαστικού σωλήνα των σπορίων και φωτογραφήθηκαν στην αντίστοιχη χρονική στιγμή

2.5.2. Βιοδοκιμή ανάπτυξης αποικίας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων

Χρησιμοποιήθηκαν οι απομονώσεις 3, 4, 27, 35, 36 και 42 για τη βιοδοκιμή ανάπτυξης αποικίας. Το αιώρημα σπορίων παρελήφθη με την ίδια τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την βιοδοκιμή της βλάστησης σπορίων (Pappas, 1997). Κάθε τρυβλίο είχε επιστρωθεί με θρεπτικό υλικό PDA και την ανάλογη ποσότητα μυκητοκτονού όπως αναφέρεται στον Πίνακα 1. Σε κάθε τρυβλίο σημάνθηκαν οι τρεις θέσεις που θα εναποτίθενται οι σταγόνες στις 3 κορυφές ενός ισοσκελούς τριγώνου. Κάθε σταγόνα αιωρήματος (20μL) αντιπροσωπεύει και μια διαφορετική απομόνωση. Για κάθε συγκέντρωση μυκητοκτόνου πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις σε κάθε συγκέντρωση. Τα τρυβλία παρέμειναν στο θάλαμο νηματικής ροής περίπου 20 λεπτά για να στεγνώσουν και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο στους 25°C.

Μετά από επώαση 12 ημερών μετρήθηκαν οι διαστάσεις της αποικίας, οι δύο κάθετες διάμετροι με τη βοήθεια χάρακα. Έτσι καταγράφηκε η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση που αναστέλλει την ανάπτυξη της αποικίας (MIC) των απομονώσεων του μύκητα *Zymoseptoria tritici*.

2.6. Στατιστική επεξεργασία

Στο λογισμικό MS Excel υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι των διαμέτρων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ANOVA και στη συνέχεια εφόσον διαπιστώθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις διαστάσεις των αποικιών έγινε ανάλυση σύμφωνα με το τεστ Tukey HSD. Για την πραγματοποίηση του τεστ υπολογίστηκε το $q = \text{Difference} / \text{Standard Error}$, όπου Difference είναι η απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων της διαμέτρου της αποικίας του μύκητα ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα

(Standard Error). Ύστερα συγκρίνουμε το q με το q critical (Το q critical προκύπτει από τους βαθμούς ελευθερίας). Το q προκύπτει από Studentized Range q Table (Πίνακας 2) Σύμφωνα με τον Πίνακα 2 το q critical το βρίσκουμε από την αντιστοιχία του df με k (αριθμός εξαταζόμενων συγκεντρώσεων/μυκητοκτόνο). Αν το $q > q$ critical τότε οι διαφορετικές συγκεντρώσεις διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

Πίνακας 2 Studentized Range Table

df \ k -->	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	17.969	26.976	32.819	37.082	40.408	43.119	45.397	47.357	49.071	50.592	51.957	53.194	54.323	55.361	56.320	57.212	58.044	58.824	59.558
2	6.085	8.331	9.798	10.881	11.734	12.435	13.027	13.539	13.988	14.389	14.749	15.076	15.375	15.650	15.905	16.143	16.365	16.573	16.769
3	4.501	5.910	6.825	7.502	8.037	8.478	8.852	9.177	9.462	9.717	9.946	10.155	10.346	10.522	10.686	10.838	10.980	11.114	11.240
4	3.926	5.040	5.757	6.287	6.706	7.053	7.347	7.602	7.826	8.027	8.208	8.373	8.524	8.664	8.793	8.914	9.027	9.133	9.233
5	3.635	4.602	5.218	5.673	6.033	6.330	6.582	6.801	6.995	7.167	7.323	7.466	7.596	7.716	7.828	7.932	8.030	8.122	8.208
6	3.460	4.339	4.896	5.305	5.628	5.895	6.122	6.319	6.493	6.649	6.789	6.917	7.034	7.143	7.244	7.338	7.426	7.508	7.586
7	3.344	4.165	4.681	5.060	5.359	5.606	5.815	5.997	6.158	6.302	6.431	6.550	6.658	6.759	6.852	6.939	7.020	7.097	7.169
8	3.261	4.041	4.529	4.886	5.167	5.399	5.596	5.767	5.918	6.053	6.175	6.287	6.389	6.483	6.571	6.653	6.729	6.801	6.869
9	3.199	3.948	4.415	4.755	5.024	5.244	5.432	5.595	5.738	5.867	5.983	6.089	6.186	6.276	6.359	6.437	6.510	6.579	6.643
10	3.151	3.877	4.327	4.654	4.912	5.124	5.304	5.460	5.598	5.722	5.833	5.935	6.028	6.114	6.194	6.269	6.339	6.405	6.467
11	3.113	3.820	4.256	4.574	4.823	5.028	5.202	5.353	5.486	5.605	5.713	5.811	5.901	5.984	6.062	6.134	6.202	6.265	6.325
12	3.081	3.773	4.199	4.508	4.750	4.950	5.119	5.265	5.395	5.510	5.615	5.710	5.797	5.878	5.953	6.023	6.089	6.151	6.209
13	3.055	3.734	4.151	4.453	4.690	4.884	5.049	5.192	5.318	5.431	5.533	5.625	5.711	5.789	5.862	5.931	5.995	6.055	6.112
14	3.033	3.701	4.111	4.407	4.639	4.829	4.990	5.130	5.253	5.364	5.463	5.554	5.637	5.714	5.785	5.852	5.915	5.973	6.029
15	3.014	3.673	4.076	4.367	4.595	4.782	4.940	5.077	5.198	5.308	5.403	5.492	5.574	5.649	5.719	5.785	5.846	5.904	5.958
16	2.998	3.649	4.046	4.333	4.557	4.741	4.896	5.031	5.150	5.256	5.352	5.439	5.519	5.593	5.662	5.726	5.786	5.843	5.896
17	2.984	3.628	4.020	4.303	4.524	4.705	4.858	4.991	5.108	5.212	5.306	5.392	5.471	5.544	5.612	5.675	5.734	5.790	5.842
18	2.971	3.609	3.997	4.276	4.494	4.673	4.824	4.955	5.071	5.173	5.266	5.351	5.429	5.501	5.567	5.629	5.688	5.743	5.794
19	2.960	3.593	3.977	4.253	4.468	4.645	4.794	4.924	5.037	5.139	5.231	5.314	5.391	5.462	5.528	5.589	5.647	5.701	5.752
20	2.950	3.578	3.958	4.232	4.445	4.620	4.768	4.895	5.008	5.108	5.199	5.282	5.357	5.427	5.492	5.553	5.610	5.663	5.714
21	2.941	3.565	3.942	4.213	4.424	4.597	4.743	4.870	4.981	5.081	5.170	5.252	5.327	5.396	5.460	5.520	5.576	5.629	5.679
22	2.933	3.553	3.927	4.196	4.405	4.577	4.722	4.847	4.957	5.056	5.144	5.225	5.299	5.368	5.431	5.491	5.546	5.599	5.648
23	2.926	3.542	3.914	4.180	4.388	4.558	4.702	4.826	4.935	5.032	5.121	5.201	5.274	5.342	5.405	5.464	5.519	5.571	5.620
24	2.919	3.532	3.901	4.166	4.373	4.541	4.684	4.807	4.915	5.012	5.099	5.179	5.251	5.319	5.381	5.439	5.494	5.545	5.594
25	2.913	3.523	3.890	4.153	4.358	4.526	4.667	4.789	4.897	4.993	5.079	5.158	5.230	5.297	5.359	5.417	5.471	5.522	5.570

2.7. Μέτρηση αριθμού спорίων ανά αποικία ύστερα από εφαρμογή μυκητοκτόνων

Για όλα τα μυκητοκτόνα εκτός του pyga

clastrobin πραγματοποιήθηκε μέτρηση των спорίων από κάθε απομόνωση ύστερα από 30 ημέρες μετά το πείραμα βιοδοκιμής για την μέτρηση διαστάσεων της κάθε αποικίας. Από κάθε συγκέντρωση επιλέχθηκε ένα τρυβλίο για να εκτιμηθεί ο αριθμός των спорίων/ml για κάθε απομόνωση. Για την παραλαβή των спорίων αρχικά αφαιρέθηκε την αποικία υπό ασηπτικές με την βοήθεια νυστεριού και την τοποθετήθηκε μέσα σε ένα bigger. Έπειτα προστέθηκαν 5-10 ml απεσταγμένο-απιονισμένο νερό και με την χρήση βακτηριολογικού κρίκου έσπασαν τα πυκνίδια του μύκητα και ελευθερώθηκαν τα πυκνιδιοσπόρια στο νερό. Στη συνέχεια το νερό διαπέρασε διπλή στρώσης τουλπάνι το οποίο είναι τοποθετημένο σε κατάλληλο μεγέθους πλαστικό χωνάκι με σκοπό να κατακρατηθούν θραύσματα μυκηλίου και θρεπτικού υλικού και να παραμείνει μόνο το νερό με τα σπόρια σε γυάλινο μπουκαλάκι. Η ποσότητα νερού που έμεινε μετριόνταν με την βοήθεια ογκομετρικού σωλήνα. Τέλος η μέτρηση της συγκέντρωσης των спорίων έγινε με την χρήση του αιματοκυττόμετρου (Neubauer, Rhône-Poulenc).

2.8. Απομόνωση DNA από απομονώσεις του μύκητα *Zymoseptoria tritici*

Επιλέχθηκαν οι απομονώσεις 1, 2, 3, 4, 7, 9, 11, 12, 15, 25, 28, 30, 33, 35, 37 και 39 για μοριακό χαρακτηρισμό. Για το μοριακό χαρακτηρισμό προηγήθηκε ανάπτυξη των απομονώσεων του μύκητα σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα (για επιλογή του καταλύτερου) σύμφωνα με τον Πίνακα 3. Τελικά δεν υποήρξε κάποια διαφορά σύμφωνα και με τα αποτελέσματα της καθάρτητας του DNA.

Πίνακας 3 Ανάπτυξη των απομονώσεων του μύκητα *Zymoseptoria tritici* σε διαφορετικά θρεπτικά υλικά

Απομονώσεις	Θρεπτικό Υλικό- Συνθήκες Επώασης
28, 15	YMS: επώαση με περιστρεφόμενη βάση στις 600 στροφές ανά λεπτό στους 20°C για χρονικό διάστημα 26 και 15 ημερών
7, 9, 11, 12	YMSA: επώαση στους 20°C για χρονικό διάστημα 14 έως 16 ημέρες
1, 2, 3, 4, 15, 25, 30, 33, 35, 37, 39	PDA : επώαση 25°C για 14 με 19 ημέρες.

Ο καθαρισμός του DNA βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Doyle and Doyle (1991) . Από την υγρή καλλιέργεια μεταφέρθηκαν 800μL φιαλίδια τύπου Eppendorf χωρητικότητας 2 mL (ή 1,5 mL) σε σωλινίσκους φυγοκέντρωσης και έγινε φυγοκέντρωση σε 10.000 rpm για 5 λεπτά αφού πρώτα είχαν ζυγιστεί οι άδειοι σωλινίσκοι. Μετά την φυγοκέντρωση αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό και ζυγίστηκαν 100 mg μυκηλίου περίπου. Στη περίπτωση που καλλιέργεια του μύκητα πραγματοποιήθηκε σε στερεό θρεπτικό υλικό η παραλαβή του μυκηλίου έγινε ως εξής: υπό στείρες προσυέθηκαν 5 mL αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό στον μικροσωληνίσκο με την καλλιέργεια. Ύστερα με την βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου αφαιρέθηκε ποσότητα μυκηλίου και τοποθετήθηκε σε ειδικούς σωλινίσκους φυγοκέντρωσης, που και σε αυτή τη περίπτωση ζυγίστηκε περίπου στα 100mg. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείθηκε στα 10.000 rpm για 5 λεπτά, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και κρατήθηκε το ίζημα.

Ύστερα με την βοήθεια μεταλλικής λαβίδας τοποθετήθηκε φιαλίδιο Eppendorf σε δοχείο με υγρό άζωτο και με την βοήθεια ενός μικρού ροπάλου (όπου το φιαλίδιο παίρνει το ρόλο μικρού ιγδίου) ομογενοποιούμε το μυκήλιο. Έπειτα προστέθηκαν σε

φιαλίδιο 300 μL προθερμασμένου στους 60 $^{\circ}\text{C}$ διαλύματος εξαγωγής 1 mL διαλύματος εξαγωγής (CTAB-60 mL απιονισμένο νερό, 2 g hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), 28 mL NaCl 5M, 4 mL διαλύματος Disodium Ethylenediaminetetraacetate, 2H₂O (EDTA) 0,5M και Ph=8, 5 mL Tris HCl(pH=8) 2M, 0,2 mL 2-mercaptoethanol). Έπειτα ανακινήθηκε ελαφρά το Eppendorf και προστέθηκαν 50mg PVPP (polyvinylpyrrolidone). Στη συνέχεια θερμάνθηκε το δείγμα στους 60 $^{\circ}\text{C}$ για 25 λεπτά. Ακολούθως προστέθηκαν 150 μL φαινόλης και 150 μL χλωροφόρμιου στο δείγμα, ανακινήθηκε για 1 λεπτό μέχρι να δημιουργηθεί γάλακτωμα και ύστερα φυγοκεντρίθηκε σε 13,000 rpm /λεπτό για 5 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης μεταφέρθηκαν τα 300 μL της υπερκείμενης φάσης σε μικροσωλινίσκο φυγοκέντρωσης και προστίθενται 150 μL NaCl (5 M) και ανακινείται ελαφρά.

Μετά προστέθηκαν 600 μL 95% παγωμένης αιθανόλης (-20 $^{\circ}\text{C}$) ,ανακινούμε καλά και αφήνουμε το μείγμα να μείνει στη κατάψυξη στους -20 $^{\circ}\text{C}$ για 1 ώρα. Μετά το πέρας της μια ώρας γίνεται φυγοκέντρωση με 13.000 rpm/λεπτό για 10 λεπτά. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και κρατάμε το ίζημα. Στη συνέχεια προσθέτουμε 400 μL αιθανόλης 100% και φυγοκεντρούμε το δείγμα για 5 λεπτά σε 13.000 rpm/λεπτό. Μετά τη φυγοκέντρωση αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και αφέθηκε να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη αφήνοντας το καπάκι του σωλινίσκου ανοιχτό. Έπειτα προστέθηκαν 100 μL απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού, ανακινείται το δείγμα, προστέθηκαν 1 μL RNAase A (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και θερμάνθηκε το δείγμα στους 37 $^{\circ}\text{C}$ για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της μισής ώρας προστέθηκαν 50 μL φαινόλης και 50 μL χλωροφόρμιο, ανακινήθηκε το δείγμα για 1 λεπτό μέχρι να δημιουργηθεί γάλακτωμα και μετά φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 13.000 rpm/λεπτό. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης μεταφέρθηκαν 100 μL υπερκειμένου σε ειδικό σωλινίσκο φυγοκέντρωσης και επαναλήφθηκε άλλη μια φορά η διαδικασία. Στη συνέχεια προστέθηκαν 1/10 μL NaAc συγκέντρωσης 3M με pH:5,5 και 2,5V παγωμένης αιθανόλης 100% καθαρότητας (-20 $^{\circ}\text{C}$) και ανακινήθηκε καλά το δείγμα. Τοποθετήθηκε το δείγμα στην κατάψυξη στους -20 $^{\circ}\text{C}$ για 1 με 1^{1/2} ώρα. Αφού περάσει το προαπαιτούμενο διάστημα φυγοκεντρήθηκε το δείγμα στις 13.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά και στο τέλος κρατήθηκε το ίζημα. Στο ίζημα προστέθηκαν 400 μL παγωμένης αιθανόλης (-20 $^{\circ}\text{C}$) 70% καθαρότητας και φυγοντρήθηκαν για 5 λεπτά σε 13.000 rpm/λεπτό. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης κρατήθηκε και πάλι το ίζημα και προστέθηκε και πάλι 400 μL παγωμένης αιθανόλης (-20 $^{\circ}\text{C}$) 100%

καθαρότητας και φυγοκεντρήθηκε το δείγμα με τις ίδιες παραμέτρους. Στο τέλος της διαδικασίας αφέθηκε το Eppendorf ανοιχτό με σκοπό να εξατμιστεί η αιθανόλη. Αφού εξατμίστηκε όλη η ποσότητα της αιθανόλης προστέθηκαν 50-100 μL υπερκάθαρου νερού ανάλογα με την ποσότητα του δείγματος και αποθηκεύτηκαν τα δείγματα μέχρι να τα χρησιμοποιηθούν στην κατάψυξη στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Αφού πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή του DNA όλων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε αραίωση των δειγμάτων 1/20 με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας υπερκάθαρου νερού. Στη συνέχεια με την βοήθεια του φασματοφωτόμετρου (Uvikon Spectrophotometer 922, Kontron instruments) πραγματοποιήθηκε μέτρηση στα 260 nm, 280 nm και 230 nm των δειγμάτων με σκοπό να εξετασθεί η καθαρότητα και η ποσότητα του DNA. Η καθαρότητα προκύπτει από το λόγο των δύο πρώτων απορροφήσεων που πρέπει να είναι μεταξύ 1,8 έως 2,0 ενώ η ποσότητα του DNA προκύπτει από την τιμή στα 260 nm πολλαπλασιαζόμενη επί 1000.

2.9. Γενετική παραλλακτικότητα των απομονώσεων του μύκητα *Zymoseptoria tritici*

Για την μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν 11 απομονώσεις με τους εξής κωδικούς :

Χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής RAPDs:

1. U10 (50-ACCTCGGCAC-30)-primer 5

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνίσκους ειδικούς για PCR. Κάθε δείγμα είχε τελικό όγκο 25 μL και αποτελούνταν από 12,5 μL Taq 2X Master Mix (NEB- 1X Master Mix Composition: 10mM Tris-HCl, 50mM KCl₂, 0,2mM dNTPs, 5% Glycerol, 0,08% IGEPAC CA-630, 0,05% Tween 20, 25 units/mL Taq DNA polymerase) , 10,5 μL υπερκάθαρο νερό, 1 μL εκκινητή και 2 μL DNA(προέρχεται από την διαδικασία DNA extraction)

Οι συγκέντρωση των εκκινητών σε κάθε δείγμα ήταν 0,3 μM ενώ η συγκέντρωση του DNA 50-100 ng. Ο κύκλος της PCR αποτελούνταν από 43 θερμοκρασιακούς κύκλους και 13 βήματα. Οι ειδικοί μικροσωληνίσκοι τοποθετήθηκαν σε ειδική συσκευή για την πραγματοποίηση της αντίδρασης τον θερμοκυκλοποιητή (Master Cycler Gradient Eppendorf) σε αρχική θερμοκρασία 80 $^{\circ}\text{C}$. Έπειτα ακολούθησε 1 κύκλος στους 94 $^{\circ}\text{C}$

για 2 λεπτά και για τα επόμενα 30 sec η θερμοκρασία παρέμεινε στους 94°C με σκοπό των διαχωρισμό των δύο κλώνων του DNA μετά η θερμοκρασία μειώθηκε στους 36°C για να ενωθούν οι εκκινητές με τις αλυσίδες του DNA και μετά ξανά ανέβηκε στους 68°C για 120 sec για την επέκταση των εκκινητών στις αρχικές αλυσίδες. Αυτό επαναλήφθηκε δύο φορές. Έπειτα ακολούθησαν 20 κύκλοι με τις το εξής θερμοκρασιακό και χρονικό προφίλ: 94°C για 20 sec (σε κάθε κύκλο ο χρόνος αυξανόταν κατά 1 sec) , 36°C για 15 sec, 45°C για 15sec και 68°C για 90 sec. Μετά διεξάχθηκαν 19 κύκλοι με θερμοκρασίες 94°C για 20 sec (σε κάθε κύκλο ο χρόνος αυξανόταν κατά 1 sec) , 36°C για 15 sec, 45°C για 15 sec και 68°C για 120 κλάσματα του δευτερολέπτου(σε κάθε κύκλο ο χρόνος αυξάνεται 3 sec). Τέλος για ένα κύκλο τα δείγματα έμειναν για 10 λεπτά στους 68°C και μόλις η θερμοκρασία έπεσε στους 10°C παρέμειναν στο κυκλοποιητή για 10 sec και ύστερα τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη στους -20°C.

2.10. Οριζόντια ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Μετά την ολοκλήρωση της PCR πραγματοποιήθηκε οριζόντια ηλεκτροφόρηση. Για την οριζόντια ηλεκτροφόρηση αρχικά αναμείχθηκαν 5 μ L του κάθε δείγματος με 3 μ L ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης τμήματος (loading buffer A186 Takara-50% Glycerol, 0,9% SDS, 0,05% Bromophenol Blue). Μετά την ανάμειξη κάθε δείγμα τοποθετείται σε βοθρίο αγαράζης 1,5 % σε TBE (10,8gr Tris, Boric Acid 5,5gr, EDTA 0,93gr για 1 λίτρο. Σε ένα από τα ακριανά βοθρία φορτώθηκαν και 5 μ L ladder δείκτη μοριακού βάρους DNA 1kb (NEB, New England Biolabs) . Σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE τοποθετήθηκε η πήκτη αγαρόζης. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και η διήρκεσε 20 λεπτά σε σταθερή τάση 120V. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πήκτη αφαιρέθηκε από το ρυθμιστικό διάλυμα και τοποθετήθηκε σε μικρό δοχείο με κάποιο μέρος του ρυθμιστικού διαλύματος. Έπειτα προστέθηκαν 15 μ L βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma-Aldrich) και το gel παρέμεινε για 15 λεπτά για χρώση. Στη συνέχεια ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό το gel και το τοποθετήθηκε σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (360nm) με σκοπό να γίνουν ορατές οι ζώνες των δειγμάτων της PCR και του ladder. Σε σύγκριση με το μέγεθος του ladder έγινε και η εκτίμηση του μεγέθους και των προϊόντων της PCR.

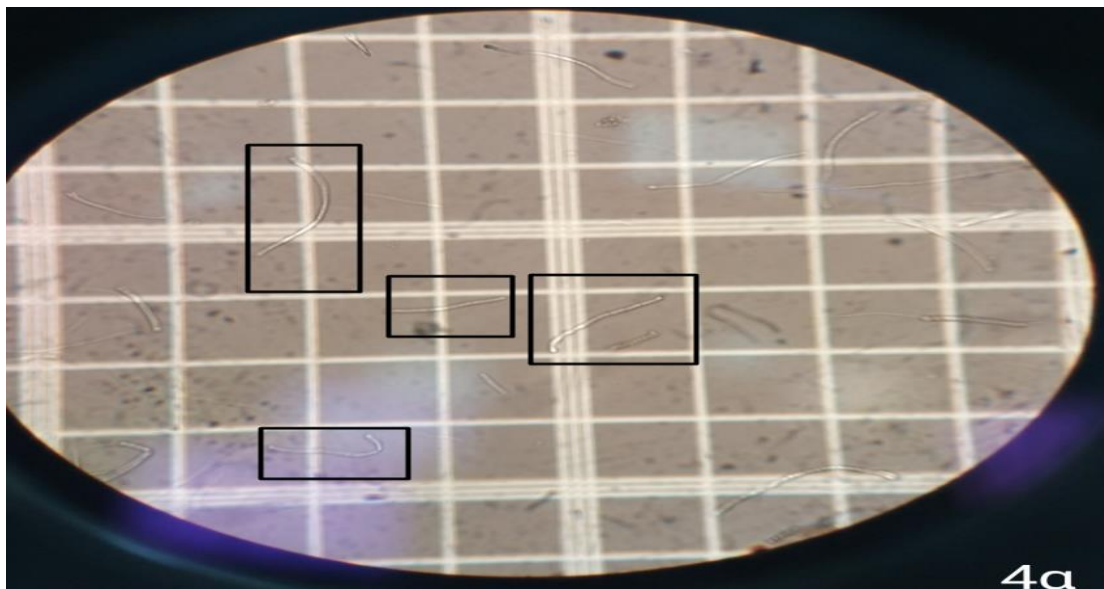
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μορφολογική ταυτοποίηση των απομονώσεων του μύκητα *Zymoseptoria tritici*

Η ταυτοποίηση του μύκητα *Zymoseptoria tritici* πραγματοποιήθηκε με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των σπορίων του με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου. Σύμφωνα με Morais et al., (2015) οι διαστάσεις των σπορίων πρέπει να κυμαίνονται από 20 έως 98 μm X 1,4 έως 3,8 μm όπου και επιβεβαιώθηκε ύστερα από μέτρηση όλων των σπορίων των απομονώσεων του μύκητα που συλλέχθηκαν από την χειμερινή καλλιεργητική περίοδο 2020.

Τα σπόρια διέθεταν 2 έως 4 σέπτα, είχαν σκωληκόμορφο σχήμα και νηματωδής μορφή (πολύ λεπτά σε μήκος) (Εικόνα1). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι απομονώσεις εμφάνισαν έντονο πολυμορφισμό ως προς την ανάπτυξή τους στο ίδιο θρεπτικό και υπό τις ίδιες συνθήκες ανάπτυξης Εικόνα 2.

Η παραγωγή των πυκνιδιοσπορίων παρατηρήθηκε σε διάστημα 27 και 30 ημερών μετά τον εμβολιασμό των δοκιμαστικών σωλήνων σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA.



Εικόνα 2 Πυκνιδιοσπόρια του μύκητα *Zymoseptoria tritici*

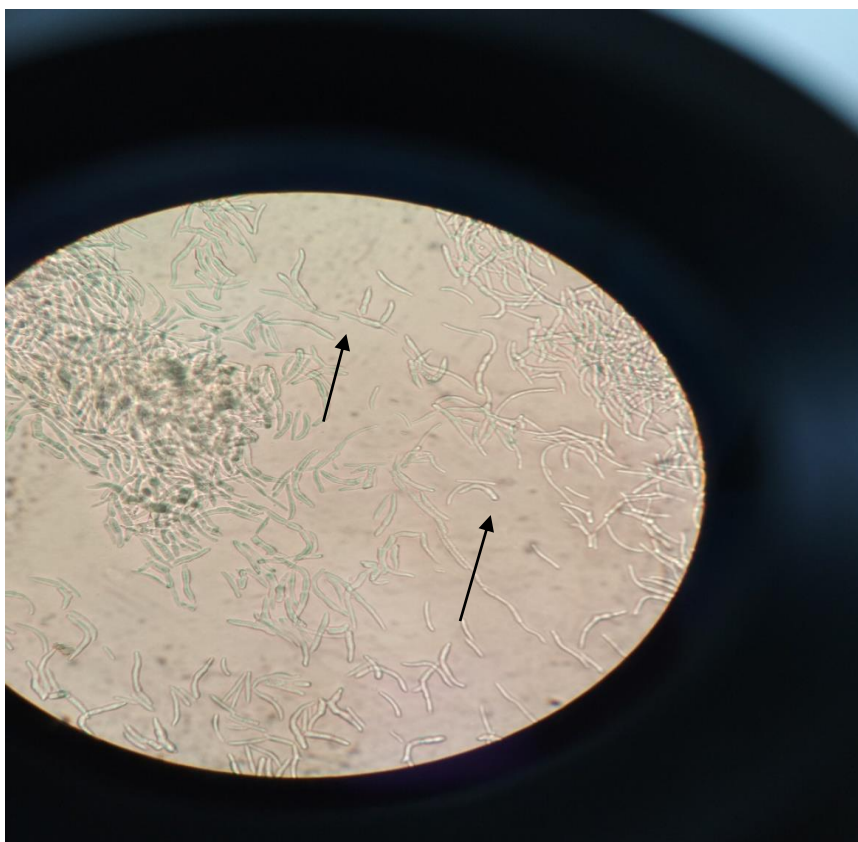


Εικόνα 2 Πολυμορφισμός απομονώσεων του μύκητα *Zymoseptoria tritici* σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA

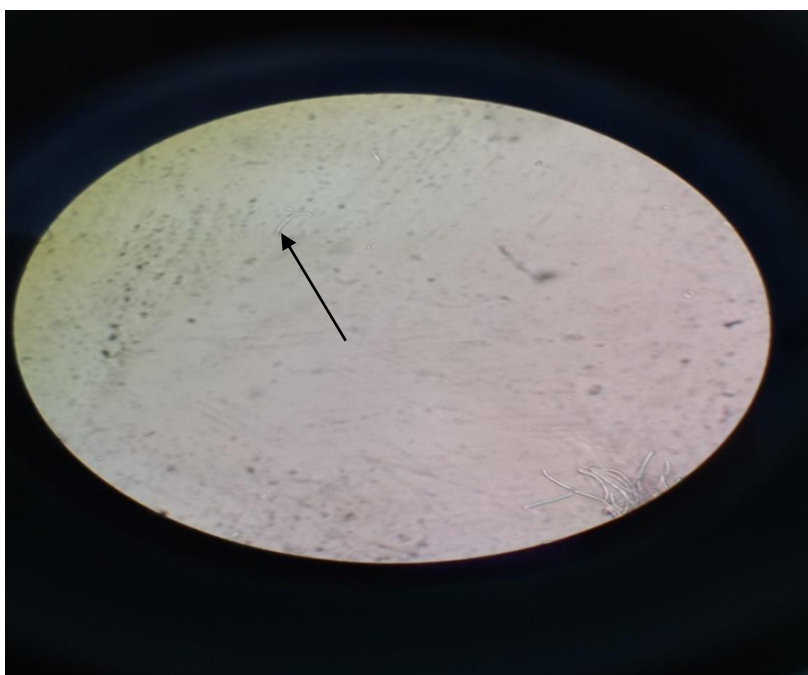
3.2. Επίδραση ομάδων μυκητοκτόνων *in vitro* στην ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα

3.2.1. Pyraclastrobin (Strobilurins, QoIs)

Για την επίδραση του pyraclastrobin στην ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα του μύκητα *Zymoseptoria tritici* ελέγχθηκαν 3 απομονώσεις του μύκητα (κωδικό όνομα 4, 27, 35). Ύστερα από 36h υπό συνθήκες σκότους στους 25⁰C σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA δεν παρατηρήθηκε βλάστηση των σπορίων του μύκητα και ανάπτυξη του τυπικού βλαστικού σωλήνα στο μάρτυρα. Έτσι δεν πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα για την επίδραση άλλων ομάδων μυκητοκτόνων στην ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα του μύκητα (Εικόνα 3 και Εικόνα 4).



Εικόνα 3 Μη βλάστηση σπορίων του μύκητα *Zymoseptoria tritici* στο μάρτυρα



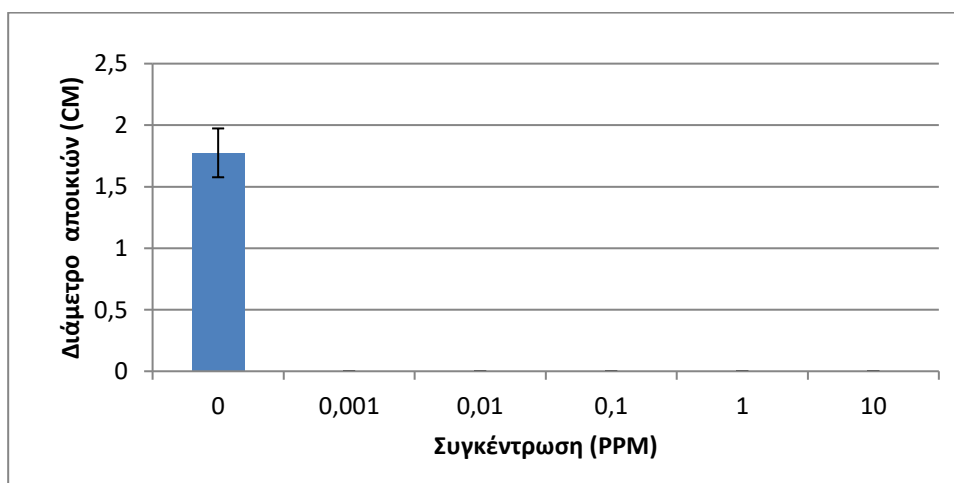
Εικόνα 4 Μη βλάστηση σπορίων του μύκητα *Zymoseptoria tritici* στο μάρτυρα

3.3. Επίδραση ομάδων μυκητοκτόνων in vitro στην ανάπτυξη αποικίας

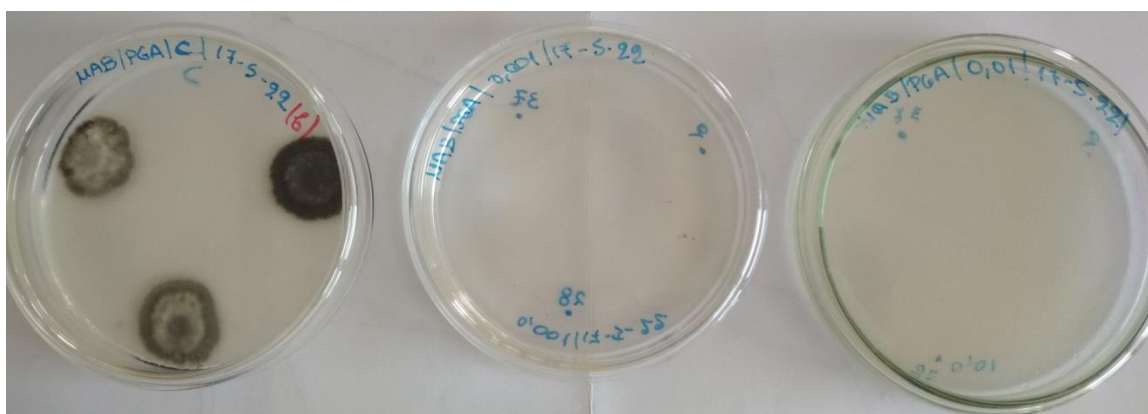
Για την επίδραση διάφορων ομάδων μυκητοκτόνων στην ανάπτυξη της αποικίας του μύκητα *Zymoseptoria tritici* ελέγχθηκαν 6 ή 3 απομονώσεις του μύκητα. Για την ομάδα των στρομπιλουρίνων ελέγχθησαν οι απομονώσεις με κωδικό όνομα 4,27,35,2,37,28 ενώ για τις υπόλοιπες ομάδες μυκητοκτόνων οι απομονώσεις με κωδικό όνομα 42 (Α) , 3 (Β) , 36 (Γ). Στον Πίνακα 10 (σελίδα 53) δίνεται η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση για κάθε μυκητοκτόνο.

3.3.1 Pyraclastrobin (Strobilurins, Qols)

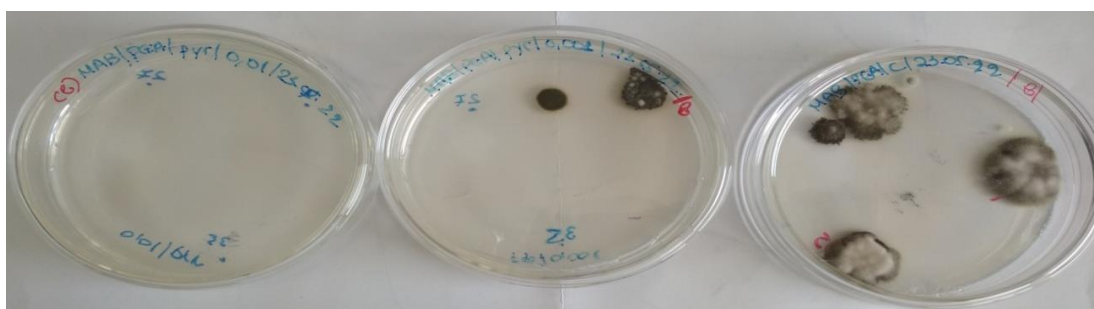
Η ομάδα των στρομπιλουρίνων αποδείχθηκε η πιο αποτελεσματική όσο αναφορά την παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα *Zymoseptoria tritici* σε σύγκριση με όλες τις ομάδες μυκητοκτόνων. Όπως παρατηρούμε και από το Γράφημα 1 η συγκέντρωση **0.001 ppm** με την προσθήκη **100 mg /L SHAM** παρεμποδίζει την ανάπτυξη και των πέντε απομονώσεων του μύκητα εκτός της απομόνωσης 4 (Εικόνα 5 και Εικόνα 6). Για την απομόνωση 4 παρατηρήθηκε μυκηλιακή ανάπτυξη της στις 14 μέρες όμως δεν ήταν επαρκή για το σχηματισμό και μέτρηση της διαμέτρου της. Έτσι απεικονίζεται στην Εικόνα 7 στις 22 μέρες μετά την εφαρμογή του μυκητοκτόνου όπου μπορεί να γίνει αντιληπτή η διαφορά ανάπτυξης σε σχέση με τις δύο άλλες απομονώσεις. Συμπερασματικά η συγκέντρωση **0.001 ppm** με την προσθήκη **100 mg /L SHAM** ορίστηκε ως η ελαχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση για την ομάδα των στρομπιλουρίνων.



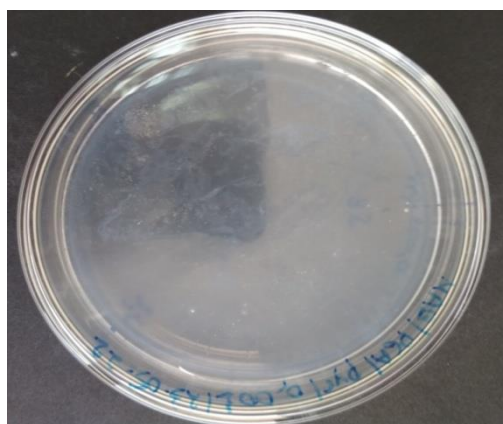
Γράφημα 1 Επίδραση της δραστικής ουσίας pyraclastrobin στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα *Z. tritici* σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών



Εικόνα 5 Επίδραση 0 ppm ,0,001ppm και 0,01 ppm pyraclastrobin στην ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων 37 (πάνω αριστερά), 2 (πάνω δεξιά) και 28 (κάτω) σε κάθε τρυβλίο (3 επαναλήψεις) του μύκητα *Z. tritici* σε υλικό PDA με προσθήκη 100 mg/L SHAM μετά από επώαση 12 ημερών



Εικόνα 6 Επίδραση 0,01 ppm, 0,001ppm και 0 ppm pyraclastrobin στην ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων (σε κάθε τρυβλίο) 27 (πάνω αριστερά), 4 (πάνω δεξιά) και 35 (κάτω) σε κάθε τρυβλίο (3 επαναλήψεις) του μύκητα *Z. tritici* σε υλικό PDA με προσθήκη 100 mg/L SHAM μετά από επώαση 12 ημερών

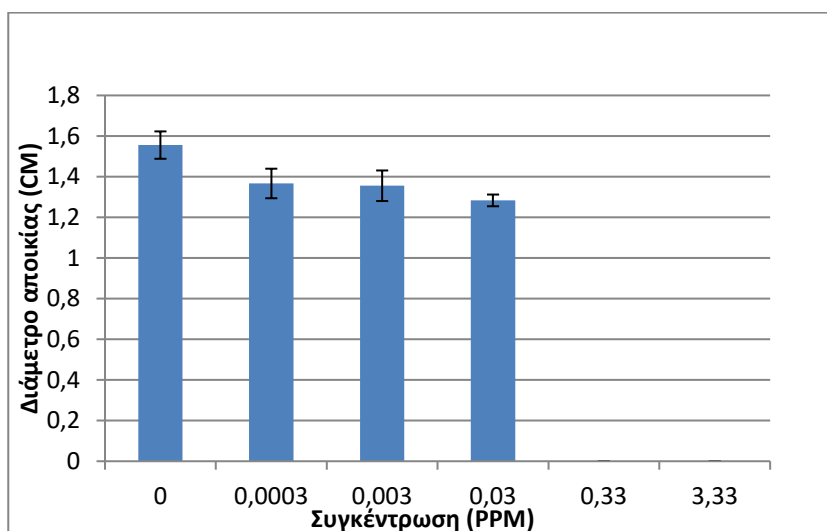


Εικόνα 7 Μυκηλιακή ανάπτυξη της απομόνωσης 4 σε 0,001 ppm pyraclastrobin του μύκητα *Z. tritici* σε υλικό PDA με προσθήκη 100 mg/L SHAM μετά από επώαση 22 ημερών

3.3.2 Carbendazim (Βενζιμιδαζολικά)

Το μυκητοκτόνο αυτό παρεμπόδισε πλήρως την ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα στην συγκέντρωση των 0,33ppm όπως φαίνεται και από το Γράφημα 2.

Στην μηδενική συγκέντρωση οι αποικίες του μύκητα ανέπτυξαν μέγιστη τιμή διαμέτρου 1,55cm ενώ στις συγκεντρώσεις 0,0003ppm, 0,003ppm, 0,03ppm καταγράφηκαν οι εξής διαμέτροι 1,36 cm, 1,35 cm και 1,28cm αντίστοιχα. Συμπερασματικά η συγκέντρωση **0,33ppm** ορίστηκε ως η ελαχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την ομάδα των βενζιμιδαζολικών.



Γράφημα 2 Επίδραση της δραστικής ουσίας carbendazim στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα *Z. tritici* σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών

Πίνακας 4 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για την δραστική ουσία carbendazim

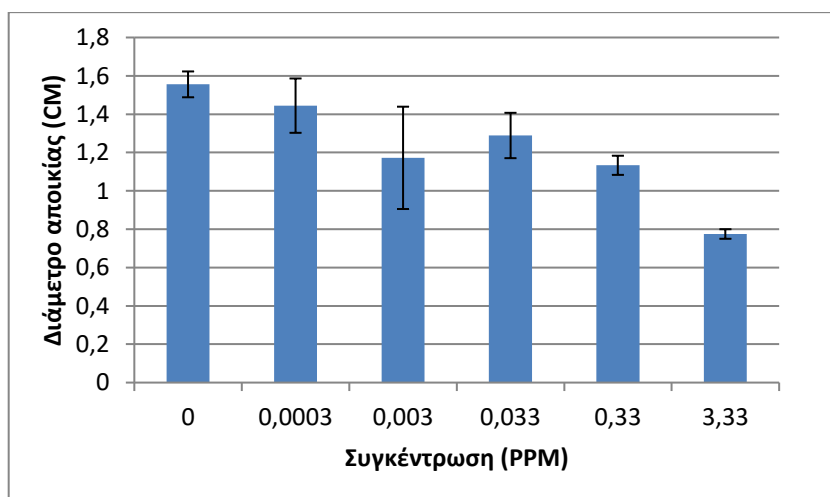
q	0,00	0,0003	0,003	0,03	0,33	3,33
0	0,00	6,28	6,65	9,05	51,70	51,70
0,0003	6,28	0,00	0,37	2,77	45,42	45,42
0,003	6,65	0,37	0,00	2,40	45,05	45,05
0,03	9,05	2,77	2,40	0,00	42,65	0,00
0,33	51,70	45,42	45,05	42,65	0,00	0,00
3,33	51,70	45,42	45,05	42,65	0,00	0,00

Από τα αποτελέσματα της Tukey-Ανονα στον Πίνακα 4 μόνο το q της μηδενικής συγκέντρωσης με των υπολοίπων συγκεντρώσεων παρουσίασαν στατιστική διαφορά καθώς και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις **0,33ppm** και **0,03ppm** αντίστοιχα με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις με την ίδια στατιστική διαφορά Πίνακας 1.

3.3.3 Boscalid (Καρβοξαμιδικά)

Το μυκητοκτόνο αυτό δεν κατάφερε να παρεμποδίσει πλήρως την ανάπτυξη της αποικίας του μύκητα στην συγκέντρωση των **3,33ppm** για τις απομονώσεις 42 και 36 και στα τρία τρυβλία εφαρμογής σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Εικόνα 8 και Εικόνα 9 αντίστοιχα). Επειδή όμως η ανάπτυξη της αποικίας δεν ήταν μετρίσιμη (δηλαδή σε είχε σχηματιστεί κατάλληλη διάμετρο αποικίας για να μετρηθεί με τη βοήθεια του χάρακα) καταγράφηκε ως μηδενική στην στατιστική ανάλυση. Η απομόνωση 3 παρουσίασε μυκηλιακή ανάπτυξη στα 3,33ppm σε ένα εκ των τριών τρυβλίων της εφαρμογής το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο μη ισόποσο καταμερισμό του μυκητοκτόνου στο τρυβλίο Εικόνα 6.

Σύμφωνα με το Γράφημα 3 στις συγκεντρώσεις 0,0003ppm, 0,003ppm, 0,03ppm και 0,33 ppm καταγράφηκαν οι εξής μεγιστες τιμές διαμέτρων των αποικιών: 1,44 cm, 1,17 cm, 1,28 cm, 1,13 cm. Συμπερασματικά η συγκέντρωση **3,33ppm** ορίστηκε ως η ελαχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την ομάδα των καρβοξαμιδικών.



Γράφημα 3 Επίδραση της δραστικής ουσίας boscalid στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα *Z. tritici* σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών

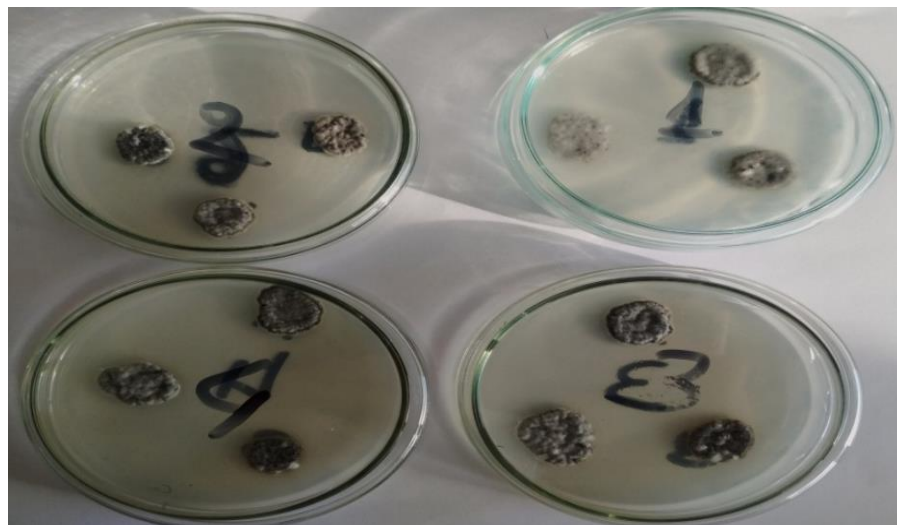
Πίνακας 5 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για τη δραστική ουσία boscalid

q	0	0,0003	0,003	0,03	0,33	3,33
0	0,00	1,40	4,84	3,37	5,33	9,85
0,0003	1,40	0,00	3,44	1,96	3,93	8,45
0,003	4,84	3,44	0,00	1,47	0,49	5,01
0,03	3,37	1,96	1,47	0,00	1,96	6,49
0,33	5,33	3,93	0,49	1,96	0,00	4,52
3,33	9,85	8,45	5,01	6,49	24,09	0,00

Σύμφωνα με τον Πίνακα 5 οι συγκεντρώσεις 0,003 ppm, 0,33 ppm και 3,33 ppm διαφέρουν σημαντικά στατιστικά σε σχέση με τον μάρτυρα που φαίνεται και στον Γράφημα. Τέλος σύμφωνα με το Πίνακα 5 μόνο η διαφορά της συγκέντρωσης 3,33 ppm διαφέρει σημαντικά στατιστικά με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις



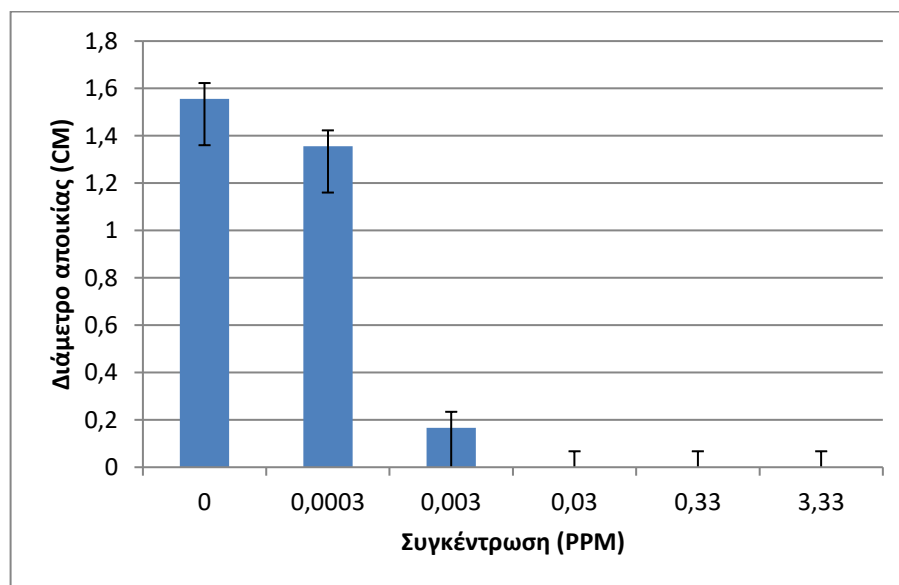
Εικόνα 8 Επίδραση 3,33 ppm boscalid στην ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων 42 (πάνω), 3 (κάτω δεξιά) και 36 (κάτω αριστερά) σε κάθε τρυβλίο (3 επαναλήψεις) του μύκητα *Z. tritici* σε υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών



Εικόνα 9 Ανάπτυξη των απομονώσεων 42 (πάνω), 3 (κάτω δεξιά) σε κάθε τρυβλίο (3 επαναλήψεις) και 36 (κάτω αριστερά) σε 0 συγκέντρωση μυκητοκτόνου (μάρτυρες) του μύκητα *Z. tritici* σε υλικό PDA

3.3.4. Mefentrifluconazole (Τριαζόλες)

Από τα μυκητοκτόνα αυτής της ομάδας των τριαζολών το mefentrifluconazole αποδείχθηκε το πιο αποτελεσματικό για την παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα καθώς παρεμπόδισε την ανάπτυξη των απομονώσεων σε συγκέντρωση **0,003 ppm** σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Εικόνα 10 και 9 αντίστοιχα). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι απομονώσεις 3 και 42 παρουσίασαν μυκηλιακή ανάπτυξη σε αυτή την συγκέντρωση δεν ήταν όμως μετρίσιμη για αυτό και καταγράφηκαν ως μηδενικές στην στατιστική ανάλυση Εικόνα 8, σε ένα από τα τρυβλία δεν παρατηρείται μυκηλιακή ανάπτυξη της απομόνωσης 42 μιας και δεν ήταν επαρκής η ποσότητα σπορίων που είχε μείνει. Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η απομόνωση 36 σε ένα από τα τρία τρυβλία ανέπτυξε μετρίσιμη μυκηλιακή ανάπτυξη όπως φαίνεται και στον μέσο όρων της ανάπτυξης των αποικιών στο Γράφημα 4 αλλά δεν λαμβάνετε υπό όψιν αφού μπορεί να αποδοθεί στο μη καλό καταμερισμό του μυκητοκτόνου στο τρυβλίο. Σύμφωνα με το Γράφημα 4 στην μηδενική συγκέντρωση καταγράφηκε διάμετρο με μέγιστη τιμή 1,55 cm ενώ στην συγκέντρωση των 0,003 ppm 1,16cm αντίστοιχα Συμπερασματικά η συγκέντρωση **0,003 ppm** ορίστηκε ως η ελαχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) για την δραστική ουσία mefentrifluconazole.

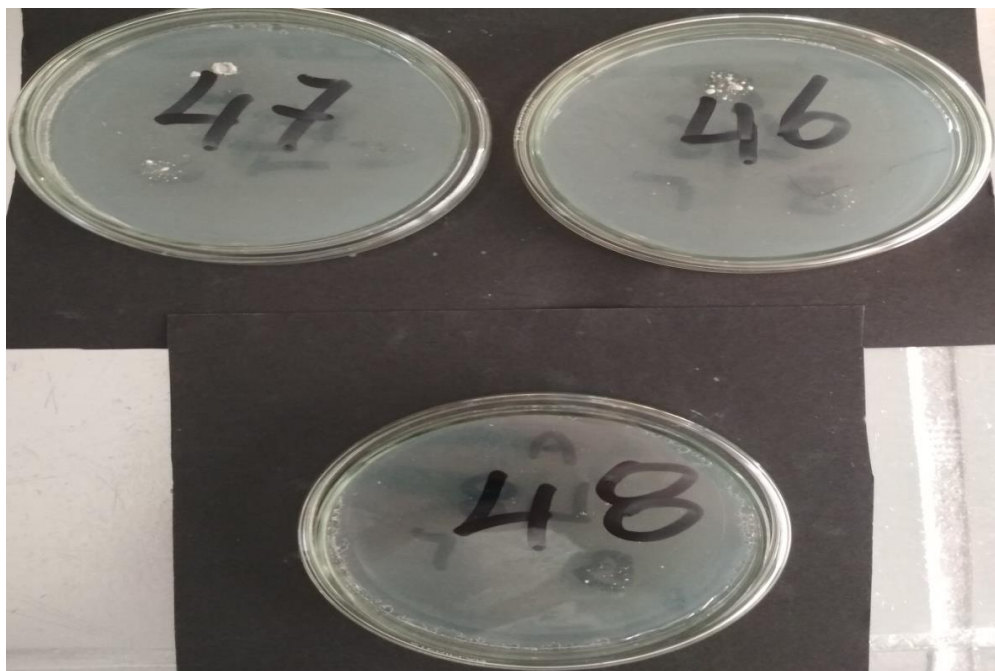


Γράφημα 4 Επίδραση της δραστικής ουσίας mefentrifluconazole στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα *Z. tritici* σε θρεπτικό υλικό PDA με μυκητοκτόνο μετά από επώαση 14 ημερών

Πίνακας 6 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για την δραστική ουσία mefentrifluconazole

q	0	0,0003	0,003	0,03	0,33	3,33
0	0,00	2,39	16,60	18,59	18,59	18,59
0,0003	2,39	0,00	14,21	16,20	16,20	16,20
0,003	16,60	14,21	0,00	1,99	1,99	1,99
0,03	18,59	16,20	1,99	0,00	0,00	0,00
0,33	18,59	16,20	1,99	0,00	0,00	0,00
3,33	18,59	16,20	1,99	0,00	0,00	0,00

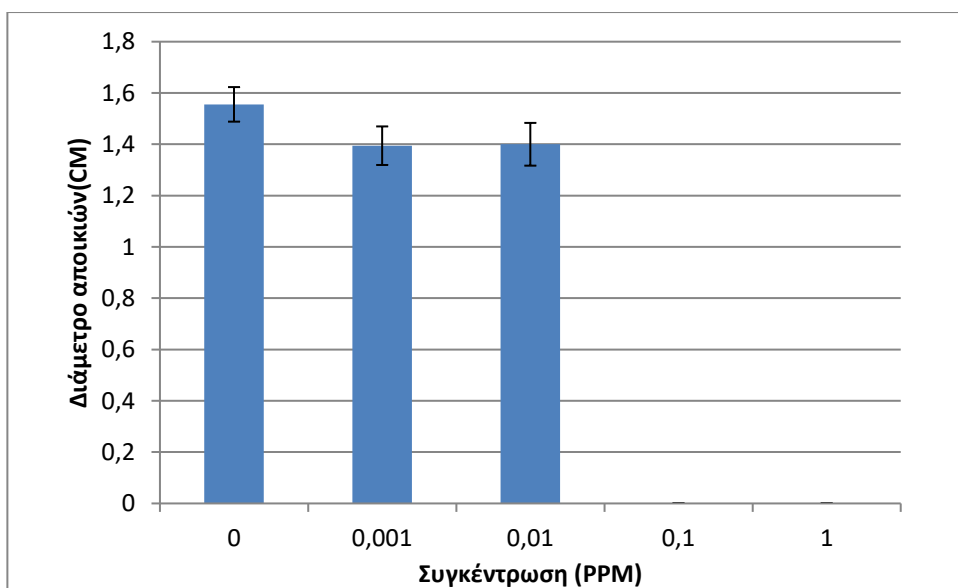
Σύμφωνα με τον Πίνακα 6 όλες οι συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου εκτός από τα **0,0003 ppm** διαφέρουν στατιστικά σε σχέση με τον μάρτυρα(0ppm).Επίσης όλες οι οι συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου εκτός της μηδενικής διαφέρουν σημαντικά στατιστικά σε σχέση με τα **0,0003 ppm**.Τέλος οι συγκεντρώσεις **0,003 ppm, 0,03 ppm, 0,33 ppm, 3,33 ppm** διαφέρουν σημαντικά στατιστικά με την συγκέντρωση **0,0003 ppm** με την ίδια τιμή ενώ η συγκέντρωση **0,003 ppm** διαφέρει σημαντικά στατιστικά σε σχέση με τις άλλες δύο αλλά με μικρότερη τιμή λόγω της μετρίσιμης διαμέτρου της απομόνωσης 36



Εικόνα 10 Επίδραση 0,0033 ppm mefentrifluconazole στην ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων 42 (πάνω), 3 (κάτω δεξιά) και 36 (κάτω αριστερά) σε κάθε τρυβλίο (3 επαναλήψεις) του μύκητα *Z. tritici* σε υλικό PDA

3.3.5. Cyproconazole (Τριαζόλες)

Το δεύτερο μυκητοκτόνο που εξετάστηκε για την ομάδα των τριαζολών ήταν το Cyproconazole. Η συγκέντρωση **0,1 ppm** παρεμπόδισε πλήρως την μυκηλιακή ανάπτυξη της απομόνωσης 42 με εξαίρεση ένα τρυβλίο εκ των τριών που αποδίδεται στο μη καλό καταμερισμό του μυκητοκτόνου στο τρυβλίο ενώ για τις απομονώσεις 3 και 36 παρατηρήθηκε μυκηλιακή ανάπτυξη στην συγκέντρωση αυτή αλλά δεν ήταν μετρίσιμη όπως φαίνεται και στην Εικόνα 11. Έτσι θεωρείται μηδενική για την στατιστική ανάλυση. Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 5 στις συγκεντρώσεις 0,001ppm και 0,01ppm καταγράφηκε ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα με μέγιστη διάμετρο 1,39 cm και 1,4 cm αντίστοιχα. Συμπερασματικά η συγκέντρωση **0,1ppm** θεωρείται και η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση για την ανάπτυξη μυκηλιακής αποικίας για το μυκητοκτόνο αυτό.

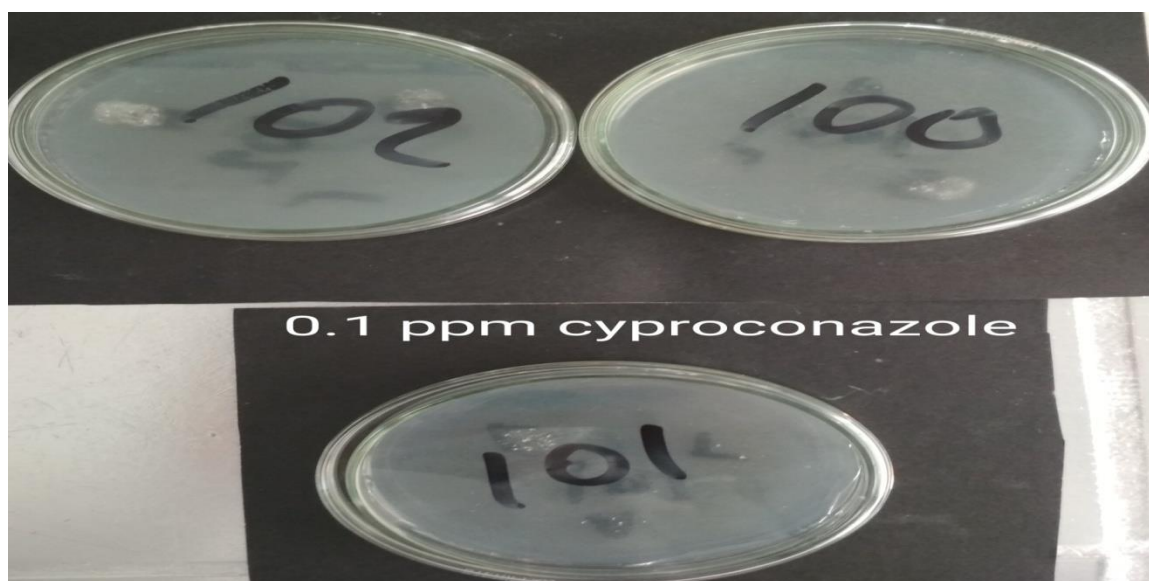


Γράφημα 5 Επίδραση της δραστικής ουσίας cyproconazole στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα *Z. tritici* σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών

Πίνακας 7 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για την δραστική ουσία cyproconazole

q	0	0,001	0,01	0,1	1
0	0	4,767571	4,603172	46,03172	46,03172
0,001	4,767571	0	0,164399	41,26415	41,26415
0,01	4,603172	0,164399	0	41,42854	41,42854
0,1	46,03172	41,26415	41,42854	0	0
1	46,03172	41,26415	41,42854	0	0

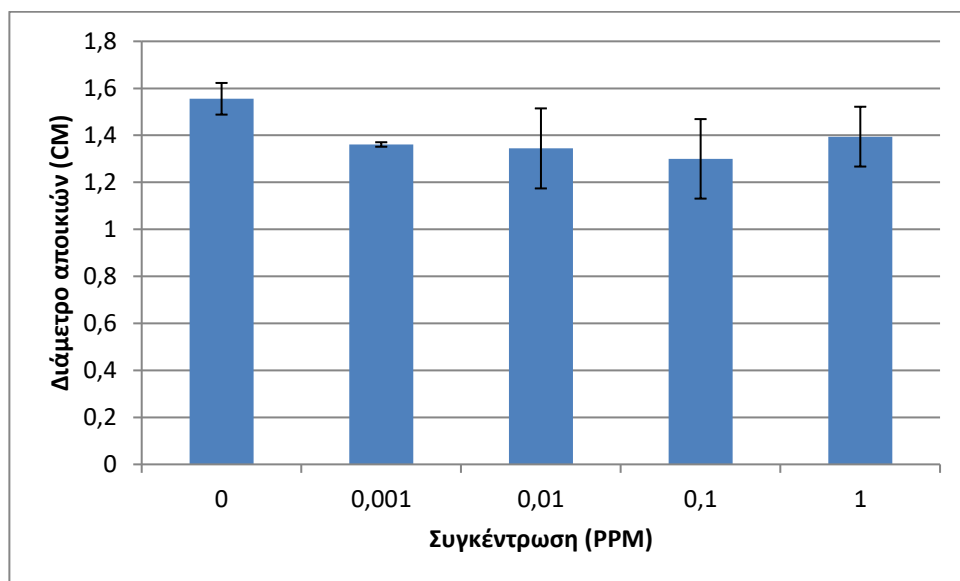
Σύμφωνα με τον Πίνακα 7 όλα τα q των συγκεντρώσεων με τον μάρτυρα διαφέρουν σημαντικά στατιστικώς με αυτά των συγκεντρώσεων του 0,1ppm και 1ppm να έχουν την ίδια τιμή. Επίσης τα q των συγκεντρώσεων 0,001ppm και 0,01ppm δεν διαφέρει σημαντικά στατιστικώς κάτι που φαίνεται και στο Γράφημα 5. Τέλος τα q των συγκεντρώσεων 0,1ppm και 1ppm με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις 0,001ppm και 0,01ppm διαφέρουν σημαντικά στατιστικώς.



Εικόνα 11 Επίδραση 0,01 ppm cyproconazole στην ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων 42 (πάνω), 3 (κάτω δεξιά) και 36 (κάτω αριστερά) σε κάθε τρυβλίο (3 επαναλήψεις) του μύκητα *Z. tritici* σε υλικό PDA

3.3.6. Σπιροκεταλαμίνες (Spirooxamine)

Για την ομάδα των μυκητοκτόνων αυτών χρησιμοποιήθηκε η δραστική ουσία spiroxamine όπου στην συγκέντρωση του 1ppm παρατηρήθηκε μετρίσιμη μυκηλιακή ανάπτυξη (Εικόνα 12). Σύμφωνα με το Γράφημα 6 οι διάμετροι των αποικίας του μύκητα στις συγκεντρώσεις 0,001ppm, 0,01ppm, 0,1ppm και 1ppm δεν διέφερε σημαντικά σε σχέση με την μηδενική συγκέντρωση (μάρτυρας) αφού καταγράφηκαν οι εξής διάμετροι: 1,36 cm, 1,34 cm, 1,3 cm και 1,39 cm αντίστοιχα.

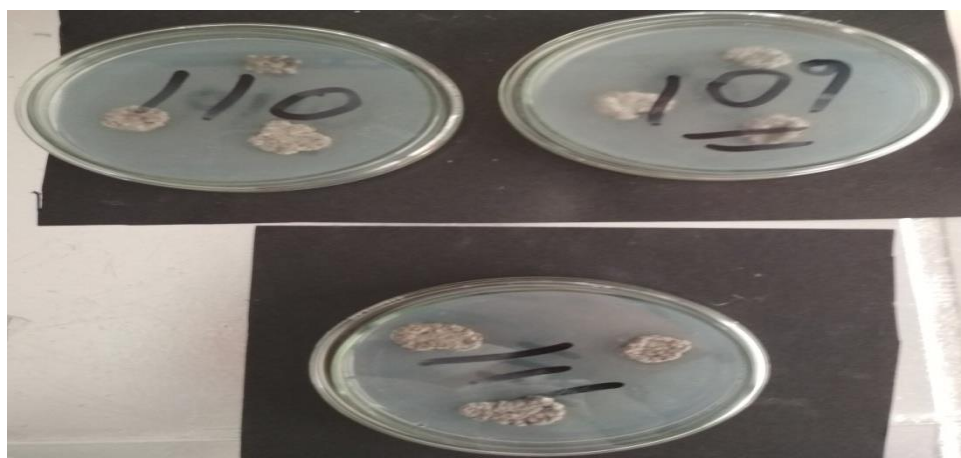


Γράφημα 6 Επίδραση της δραστικής ουσίας spiroxamine στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα *Z. tritici* σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών

Πίνακας 8 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για τη δραστική ουσία spiroxamine

q	0	0,001	0,01	0,1	1
0	0,00	2,69	2,92	3,53	2,23
0,001	2,69	0,00	0,23	0,85	0,46
0,01	2,92	0,23	0,00	0,61	0,69
0,1	3,53	0,85	0,61	0,00	1,31
1	2,23	0,46	0,69	1,31	0,00

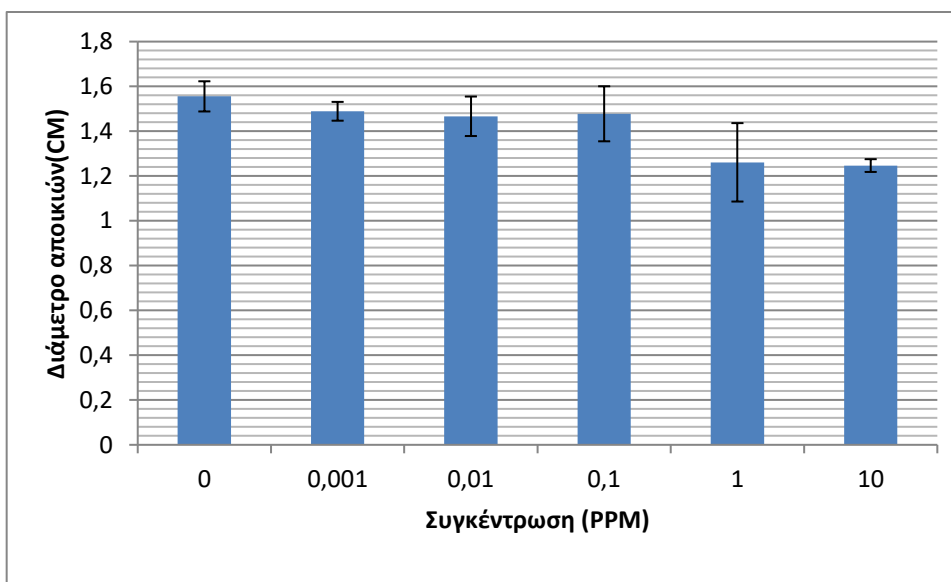
Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 8 κανένα q των μεταχειρίσεων δεν διαφέρει σημαντικά στατιστικά.



Εικόνα 12 Επίδραση 1 ppm spiroxamine ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων 42 (πάνω), 3 (κάτω δεξιά) και 36 (κάτω αριστερά) σε κάθε τρυβλίο (3 επαναλήψεις) του μύκητα *Z. tritici* σε υλικό PDA

3.3.7. Pyrimethanil και Cyprodinil (Ανιλοπυριμιδίνες)

Από την ομάδα των ανιλοπυριμιδινών χρησιμοποιήθηκαν οι δραστικές ουσίες pyrimethanil και cyprodinil. Στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των 10 ppm παρατηρήθηκε κανονική ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα. Για το μυκητοκτόνο pyrimethanil όπως φαίνεται και στο Γράφημα 7 όλες οι συγκεντρώσεις δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους αλλά και με τον μάρτυρα με εξαίρεση την συγκέντρωση 1 ppm και 10 ppm όπου καταγράφεται και η μικρότερη διάμετρο αποικίας 1,26 cm και 1,25 cm αντίστοιχα.



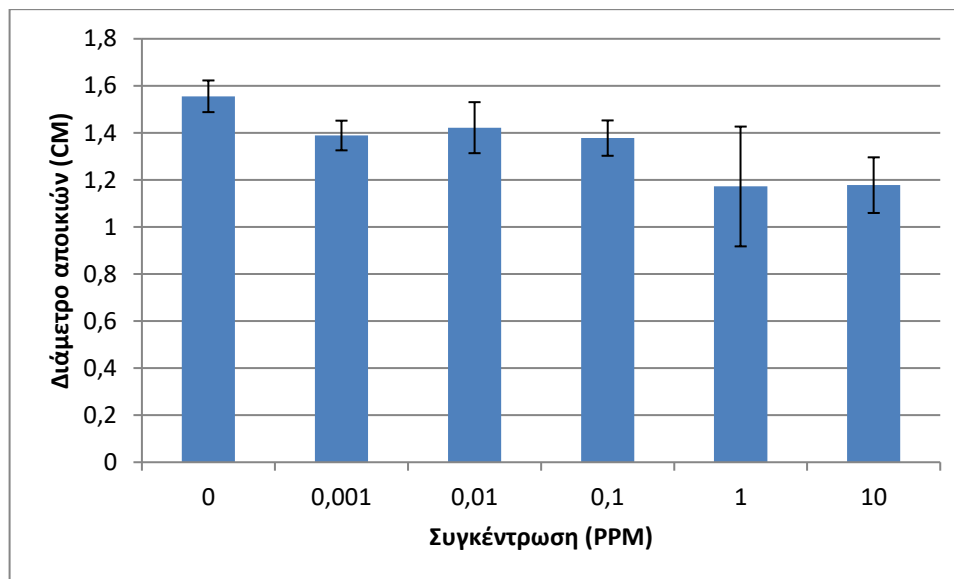
Γράφημα 7 Επίδραση της δραστικής ουσίας pyrimethanil στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα *Z. tritici* σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών

Πίνακας 9 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για την δραστική ουσία pyrimethanil

q	0,00	0,001	0,01	0,10	1	10
0	0,00	1,19	1,59	1,39	5,27	5,53
0,001	1,19	0,00	0,40	0,20	4,08	4,34
0,01	1,59	0,40	0,00	0,20	3,68	3,94
0,10	1,39	0,20	0,20	0,00	3,88	4,14
1	5,27	4,08	3,68	3,88	0,00	0,26
10	5,53	4,34	3,94	4,14	0,26	0,00

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 9 μόνο τα q των συγκεντρώσεων 1ppm και 10 ppm διαφέρουν στατιστικώς με τον μάρτυρα

Η δραστική ουσία cyprodinil στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των 10 ppm παρεμπόδισε ελάχιστα την μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα με μέγιστη διάμετρο αποικίας 1,17cm και 1.55cm στο μάρτυρα (Γράφημα 7). Στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις η διάμετρο της αποικίας κυμαίνεται από 1,37cm-1,42cm.



Γράφημα 8 Επίδραση της δραστικής ουσίας cyprodinil στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα *Z. tritici* σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών

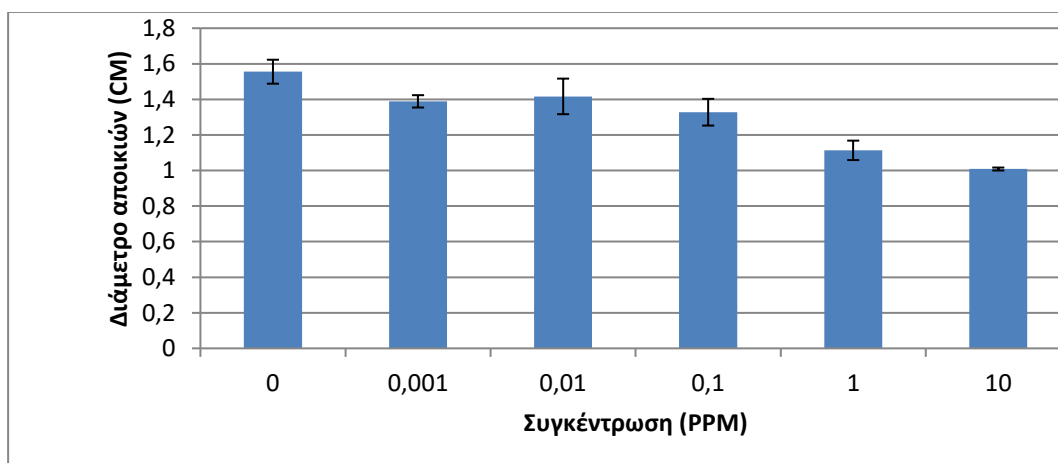
Πίνακας 10 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για τη δραστική ουσία cyprodinil

q	0,00	0,001	0,01	0,1	1	10
0,00	0,00	2,19	1,75	2,33	5,03	4,95
0,001	2,19	0,00	0,44	0,15	2,84	2,77
0,01	1,75	0,44	0,00	0,58	3,28	3,20
0,1	2,33	0,15	0,58	0,00	2,69	2,62
1	5,03	2,84	3,28	2,69	0,00	0,07
10	4,95	2,77	3,20	2,62	0,07	0,00

Σύμφωνα με τον Πίνακα 10 μόνο τα q των συγκεντρώσεων 1ppm και 10ppm διέφεραν σημαντικά στατιστικώς με τον μάρτυρα.

3.3.8. Fludioxinil (Φαινιλοπυρρόλες)

Από την ομάδα των φαινιλοπυρρολών χρησιμοποιήθηκε η δραστική ουσία fludioxinil που στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των 10 ppm δεν κατάφερε να παρεμποδίσει πλήρως την ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα όπως φαίνεται και στο Γράφημα 9. Όμως σε αυτή την συγκέντρωση καταγράφηκε η μικρότερη διάμετρο αποικίας 1 cm. Στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις οι μέγιστες διαμέτροι των αποικίας κυμαίνονταν από 1,11cm έως 1,41cm με την μηδενική στα 1,55 cm.



Γράφημα 9 Επίδραση της δραστικής ουσίας fludioxinil στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα *Z. tritici* σε θρεπτικό υλικό PDA μετά από επώαση 14 ημερών

Πίνακας 11 Απόλυτη τιμή της διαφοράς των μέσων όρων των μεταχειρίσεων ανά δύο δια το τυπικό σφάλμα για τη δραστική ουσία fludioxinil

q	0	0,001	0,01	0,10	1	10
0,00	0,00	4,92	4,10	6,73	13,07	16,17
0,001	4,92	0,00	0,82	1,81	8,14	11,24
0,01	4,10	0,82	0,00	2,63	8,96	12,07
0,10	6,73	1,81	2,63	0,00	6,34	9,44
1	13,07	8,14	8,96	6,34	0,00	3,10
10	16,17	11,24	12,07	9,44	3,10	0,00

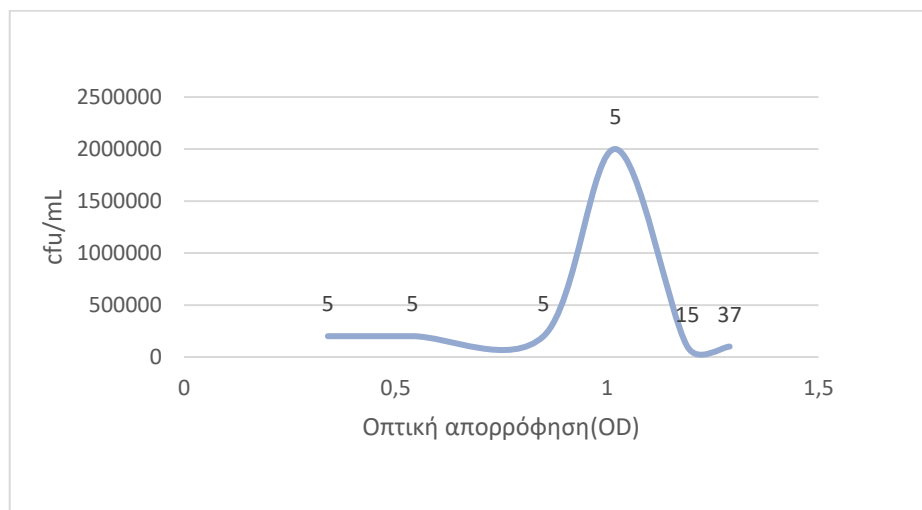
Σύμφωνα με τον Πίνακα 11 τα q όλων των συγκεντρώσεων με το μάρτυρα διαφέρουν σημαντικά στατιστικώς, με αυτά των συγκεντρώσεων 1 ppm και 10 ppm να χαρακτηρίζονται από τις μεγαλύτερες τιμές. Επίσης τα q των συγκεντρώσεων 1ppm και 10 ppm με τις συγκεντρώσεις 0,001 ppm, 0,01 ppm και 0,1 ppm διαφέρουν σημαντικά στατιστικώς.

Πίνακας 12 Ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση ανάπτυξης αποικίας του μύκητα *Zyloseptoria tritici*

Qols¹ pyraclostrobin	0,001ppm Απομόνωση 4:βλάστηση σπορίων όχι όμως επαρκή ανάπτυξη μυκηλίου
Βενζιμιδαζολικά carbedazim	0,33ppm
Καρβοξαμιδικά boscalid	3,33ppm Βλάστηση σπορίων της απομόνωσης 42 και 36 όχι όμως επαρκή για την ανάπτυξη μυκηλίου
Τριαζόλες mefentrifluconazole	0,003ppm Βλάστηση σπορίων της απομόνωσης 36 και 3, όχι όμως επαρκή για την ανάπτυξη μυκηλίου
Τριαζόλες cyproconazole	0,1ppm Βλάστηση σπορίων της απομόνωσης 3 και 36 όχι όμως επαρκή για την ανάπτυξη μυκηλίου
Σπироκεταλαμίνες spiroxamine	>1ppm Κανονική ανάπτυξη στο 1ppm
Ανιλοπυριμιδίνες Pyrimethanil	10 ppm Καμία επίδραση του μυκητοκτόνου στην ανάπτυξη των απομονώσεων, κανονική ανάπτυξη μυκηλίου
Ανιλοπυριμιδίνες Cyprodinil	Καμία επίδραση του μυκητοκτόνου στην ανάπτυξη των απομονώσεων, κανονική ανάπτυξη μυκηλίου
Φαινιλοπυρρόλες Fludioxinil	10 ppm Μικρή επίδραση του μυκητοκτόνου στην ανάπτυξη των απομονώσεων

3.4. Καμπύλης ανάπτυξης του μύκητα *Zymoseptoria tritici*

Ο σχεδιασμός της καμπύλης ανάπτυξης του μύκητα *Zymoseptoria tritici* έγινε με την βοήθεια τριών μεθόδων εκτίμησης του μικροβιακού πληθυσμού. Η χρήση του αιματοκυταρρομέτρου ως μέθοδο εκτίμησης του μικροβιακού πληθυσμού του μύκητα δεν ενδείκνυται για τις δεδομένες συνθήκες πειραματισμού αφού παρατηρήθηκε ταυτόχρονα ανάπτυξη μυκηλίου και πυκνιδιοσπορίων του μύκητα. Έτσι η εκτίμηση της μικροβιακής ανάπτυξης έγινε μόνο με την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης(OD) και του cfu/ml των δειγμάτων για την απομόνωση 5 και 15 και 37. Μόνο για την απομόνωση 5 παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ της οπτικής απορρόφησης (OD) και cfu/ml όπως φαίνεται και στο Γράφημα 10 (σε διάστημα 4 και 6 ημερών μετά τον εμβολιασμό της καλλιέργειας). Σε κάθε κουκίδα στο Γράφημα 10 αναγράφεται ο αριθμός της απομόνωσης. Για τις απομονώσεις με κωδικό όνομα 15 και 37 πραγματοποιήθηκε μία μέτρηση της OD και του cfu/mL μόνο στις 19 μέρες μετά τον εμβολισμό της καλλιέργειας. Αν και η τιμή της οπτικής πυκνότητας και των δύο απομονώσεων ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτές της απομόνωσης 5 καταγράφηκαν μόνο 10^5 cfu/mL.

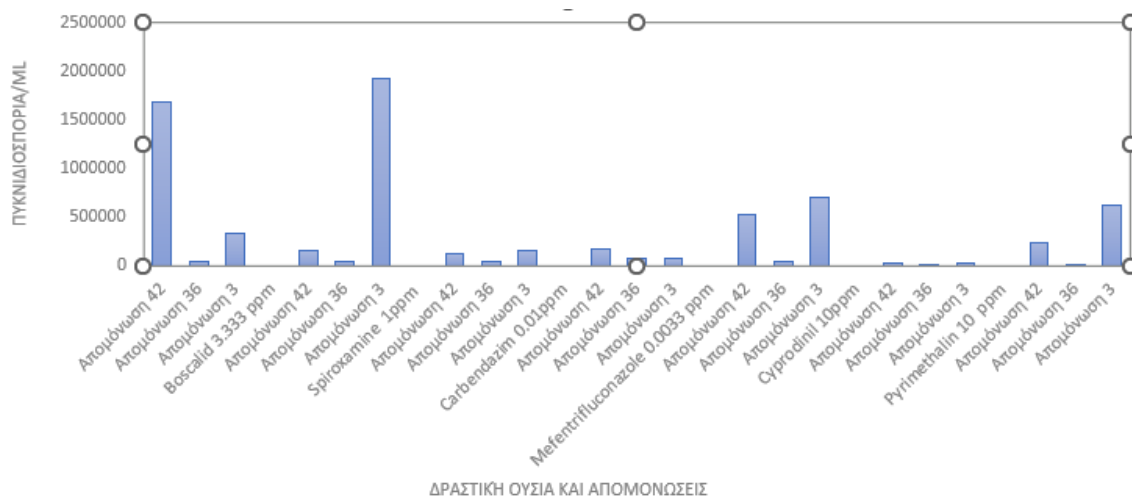


Γράφημα 10 Συσχέτιση μεταξύ του cfu/mL και της οπτικής απορρόφησης υγρής καλλιέργειας του μύκητα *Zymoseptoria tritici*

3.5. Επίδραση διάφορων ομάδων μυκητοκτόνων στην παραγωγή πυκνιδιοσπορίων του μύκητα *Zymoseptoria tritici*

Πίνακας 13 Επίδραση διαφορετικών δραστικών ουσιών στη παραγωγή αριθμού σπόριων /mL ανά απομόνωση

Μάρτυρας/0ppm	Αριθμός πυκνιδιοσπορίων/mL
Απομόνωση 42	1,68*10 ⁶
Απομόνωση 36	4*10 ⁴
Απομόνωση 3	3,4*10 ⁵
Boscalid 3.33 ppm	
Απομόνωση 42	1,55*10 ⁵
Απομόνωση 36	5*10 ⁴
Απομόνωση 3	1,92*10 ⁶
Spiroxamine 1ppm	
Απομόνωση 42	1,2*10 ⁵
Απομόνωση 36	4,5*10 ⁴
Απομόνωση 3	1,5*10 ⁵
Carbendazim 0.01ppm	
Απομόνωση 42	1,75*10 ⁵
Απομόνωση 36	8,5*10 ⁴
Απομόνωση 3	8,5*10 ⁴
Mefentrifluconazole 0.003 ppm	
Απομόνωση 42	5,3*10 ⁵
Απομόνωση 36	5*10 ⁴
Απομόνωση 3	7,1*10 ⁵
Cyprodinil 10ppm	
Απομόνωση 42	3,5*10 ⁴
Απομόνωση 36	1*10 ⁴
Απομόνωση 3	3,1*10 ⁴
Pyrimethalin 10 ppm	
Απομόνωση 42	2,35*10 ⁵
Απομόνωση 36	1,5*10 ⁴
Απομόνωση 3	6,5*10 ⁵



Γράφημα 11 Επίδραση διαφορετικών δραστικών ουσιών (σε διαφορετικές συγκεντρώσεις) στην παραγωγή σπορίων/mL των απομονώσεων 42, 36 και 3 του μύκητα *Zymoseptoria tritici*

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 13 αλλά και το Γράφημα 10 παρατηρείται εμφανή μείωση στην παραγωγή πυκνιδιοσπορίων / mL υπό την επίδραση της δραστικής ουσίας boscalid στα 3,33 ppm για την απομόνωση 42, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στην απομόνωση 36 σε σχέση με τον μάρτυρα που απεικονίζεται στο Γράφημα 10 στον οριζόντιο άξονα στις πρώτες τρεις μπάρες από την αριστερή πλευρά. Αντιθέτως καταγράφηκε αύξηση του αριθμού πυκνιδιοσπορίων υπό την επίδραση της δραστικής ουσίας boscalid για την απομόνωση 3 σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Όσο αναφορά την επίδραση της δραστικής ουσίας spiroxamine στην συγκέντρωση των 1 ppm μείωσε τον αριθμό πυκνιδιοσπορίων /mL των απομονώσεων 42 και 3, με μεγαλύτερη μείωση στην απομόνωση 42. Δεν είχε κάποια επίδραση στην παραγωγή πυκνιδιοσπορίων της απομόνωσης 36 σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η δραστική ουσία carbendazim μείωσε τον αριθμό πυκνιδιοσπορίων/ mL στην συγκέντρωση 0,01 ppm των απομονώσεων 42, 3 και 36. Η δραστική ουσία mefentrifluconazole στη συγκέντρωση 0,003 ppm μείωσε τον αριθμό πυκνιδιοσπορίων/mL της απομόνωσης 42, αύξησε τον αριθμό πυκνιδιοσπορίων/mL των απομονώσεων 3 και 36. Η δραστική ουσία cyprodinil στα 10 ppm μείωσε τον αριθμό πυκνιδιοσπορίων/mL και των τριών απομονώσεων. Τέλος η δραστική ουσία pyrimethanil στα 10 ppm μείωσε τον αριθμό πυκνιδιοσπορίων/mL των απομονώσεων 42 και 36, ενώ αύξησε τον αριθμό πυκνιδιοσπορίων/mL της απομόνωσης 3 σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η σεπτορίαση θεωρείται μια από τις πιο σημαντικές ασθένειες φυλλώματος του σίτου (O'Driscoll et al., 2014). Κυρίως στις περιοχές της Ευρώπης με μεσογειακό κλίμα η ασθένεια αυτή ευθύνεται για την μεγαλύτερη απώλεια παραγωγής στην καλλιέργεια του σίτου (Jørgensen et al., 2014; Fones and Gurr, 2015). Στην Ευρώπη το 70 % των μυκητοκτόνων που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια του σίτου χρησιμοποιούνται με την αντιμετώπιση του μύκητα *Zymoseptoria tritici* (Fones and Gurr, 2015).

Η απομόνωση του μύκητα *Zymoseptoria tritici* πραγματοποιήθηκε από φύλλα σιταριού και μετά αναπτύχθηκε σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η απομόνωση του μύκητα πραγματοποιήθηκε από φύλλα σιταριού και όχι από μέρος της ταξιανθίας του σίτου.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εξετάστηκε η ευαισθησία του μύκητα *Zymoseptoria tritici* στις συγκεκριμένες δραστικές ουσίες carbendazim, boscalid, mefentrifluconazole, cyproconazole, spiroxamine, pyraclastrobin, cyprodinil, pyramethalin και fludioxonil από επτά ομάδες μυκητοκτόνων. Για τις δραστικές ουσίες carbendazim, boscalid και mefentrifluconazole εξετάστηκαν στις εξής συγκεντρώσεις: 3,33, 0,33, 0,03, 0,003 mg/L.

Το cyproconazole και το spiroxamine εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 1, 0,1, 0,01, 0,001mg/L. Τα μυκητοκτόνα cyprodinil, pyrimethalin και fludioxonil εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 mg/L. Τέλος η δραστική ουσία pyraclastrobin εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 mg/L.

Όλα οι δραστικές ουσίες εκτός από το carbendazim, cyprodinil, cyproconazole, pyrimethalin και fludioxonil είναι εγκεκριμένα από το υπουργείο αγροτικής ανάπτυξης και τροφίμων για την εφαρμογή τους στην καλλιέργεια σιταριού στον αγρό. Το επίπεδο ευαισθησίας του μύκητα στα διάφορα μυκητοκτόνα εξετάστηκε με την μέτρηση των διαστάσεων της αποικίας του μύκητα σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA στις διάφορες συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων.

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας του μύκητα *Z. tritici* στην ομάδα των στρουμπιλουρινών οφείλεται στην μεταλλαγή του γονιδίου G143A του μιτοχονδιακού κυτοχρωματος b (Fernández-Ortuño et al., 2010; Lucas et al., 2015). Θετική διασταυρωτή ανθεκτικότητα έχει καταγραφεί μεταξύ όλων των μυκητοκτόνων που ανήκουν σε αυτή την ομάδα και φέρουν αυτή την μεταλλαγή (με εξαίρεση την δραστική ουσία metyltetraprole (Torriani et al., 2009; Suemoto et al., 2019). Ήδη

από τα μέσα του 2000 παρατηρήθηκαν οι πρώτες ανθεκτικές απομονώσεις στις στρουμπιλουρίες (Lucas and Fraaije, 2008). Τώρα η ομάδα αυτή των μυκητοκτόνων δεν θεωρείται αποτελεσματική για την αντιμετώπιση της ασθένειας στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες (Birr et al., 2021).

Σύμφωνα με τους Roohparvar et al., (2008) η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) ανθεκτικών απομονώσεων του μύκητα *Z. tritici* στη δραστική ουσία trifloxystrobin(που ανήκει και αυτή στην ομάδα των στουμπιλουρίνων) ήταν μεγαλύτερη των 5 mg/L σε T= 18°C για 8 ημέρες. Συνεπώς οι απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη διατριβή χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητες αφού το MIC τους ορίστηκε στα 0.001 mg/L. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι παρατηρήθηκε μυκηλιακή ανάπτυξη όχι όμως μετρίσιμη στην συγκέντρωση 0.001mg/L. Αυτό το αποτέλεσμα πιθανόν οφείλεται στην υπερέκφραση των MgMfs1 μεταφορών οι οποίοι παρεμποδίζουν την συσσώρευση της δραστικής ουσίας στην μεμβράνη του κυττάρου και να παρατηρούνται διάφορα επίπεδα ανεκτικότητας του μύκητα στην συγκεκριμένη ομάδα μυκητοκτόνων (Roohparvar et al., 2008).

Τα μυκητοκτόνα που παρεμποδίζουν την βιοσύνθεση της εργοστερόλης και κυρίως αυτά που ανήκουν στην ομάδα των τριαζολικών (tebuconazole, prothioconazole, epoxiconazole και των ιμαδαζολικών (prochloraz) χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση της σεπτορίας του σίτου από το 1980, μάλιστα από τα μέσα του 2000 και μετά αποτελούν την κύρια ομάδα αντιμετώπισης της ασθένειας μετά την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του μύκητα στις στρουμπιλουρίνες (Fraaije et al., 2007; Curvers et al., 2014). Από το 2000 και μετά έχει παρατηρηθεί γενική μείωση της ευαισθησίας του μύκητα σε αυτή στην ομάδα μυκητοκτόνων (τριαζολών) λόγω της εξάπλωσης λιγότερο ευαίσθητων στελεχών στις περισσότερες χώρες της Ευρώπης (Ηνωμένο Βασίλειο, Ιρλανδία, Γαλλία) (Fraaije et al., 2007; Stammler και Semar, 2011; Jørgensen et al., 2021). Συνεπώς να απαιτούνται μεγαλύτερες δόσεις για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της ασθένειας (Blake et al., 2018; Heick et al., 2020).

Παρόλα αυτά αυτή η ομάδα μυκητοκτόνων μπορεί να αντιμετωπίσει αποτελεσματικά το παθογόνο είτε μόνο με την εφαρμογή τους σε υψηλότερες δόσεις είτε ως μέρος μείγματος με κάποιο μυκητοκτόνο της ομάδας SDHIs ή κάποιου πολυθεσιακού μυκητοκτόνου με σκοπό την καθυστέρηση ανάπτυξης ανθεκτικότητας και σε αυτή την ομάδα μυκητοκτόνων (Fraaije et al., 2012; Heick et al., 2015; Heick et al., 2017; Jørgensen et al., 2021). Σύμφωνα με την Παντούλα (2018) οι απομονώσεις 42 και 36 θεωρούνται ευαίσθητες στο cyproconazole αφού η MIC τους καταγράφηκε στα 0.1mg/L ενώ η απομόνωση 3 ως μετρίως ανθεκτική με MIC στα 1mg/L. Όμως

είναι σημαντικό να αναφερθεί πως απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση ως προς τον χαρακτηρισμό αυτών των απομονώσεων με μοριακές τεχνικές.

Το 2020 εισήχθη μια καινούργια δραστική ουσία το mefentrifluconazole το οποίο ανήκει και αυτό στην ομάδα των τριαζολικών (Jørgensen et al., 2021). Σύμφωνα με τους Klink et al., (2021) τα επίπεδα ευαισθησίας παρέμειναν υψηλά σε σχέση με αυτά των “παλιών” τριαζολών (tebuconazole, protriconazole) τα οποία έχουν μειωθεί σε διάστημα από το 1999 έως το 2020 στην Βόρεια Γερμανία. Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η δραστική ουσία δεν εμφάνισε διασταυρωτή ανθεκτικότητα με τις άλλες δύο τριαζόλες. Έτσι και από τα δικά μας δεδομένα το mefentrifluconazole παρεμπόδισε πλήρως την ανάπτυξη της αποικίας των απομονώσεων 42 και 36 σε συγκέντρωση 0,00331mg/L. Συμπερασματικά η εισαγωγή αυτής της νέας δραστικής ουσίας μπορεί να αποτελέσει λύση στην διαρκώς μείωση της ευαισθησίας του μύκητα έναντι των τριαζολικών.

Η δραστική ουσία spiroxamine αν και ανήκει στη ομάδα των μυκητοκτόνων με δράση έναντι της βιοσύνθεσης της εργαστερόλης δεν παρεμπόδισε την ανάπτυξη της αποικίας σε συγκέντρωση 1mg/L και μάλιστα η διάμετρος των αποικιών δεν διέφερε σημαντικά από εκείνη του μάρτυρα. Συνεπώς χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση οι λόγοι μη δράσης του μυκητοκτόνου έναντι του μύκητα καθώς δεν υπάρχει σχετική αναφορά του σε αντίστοιχη βιβλιογραφία.

Τα μυκητοκτόνα της ομάδας των καρβοξαμιδικών έχουν αναπτύξει μικρό ποσοστό ανθεκτικών στελεχών στη Ευρώπη αν και σχεδόν κάθε χρόνο καινούργιες μεταλλαγές σχετίζονται με την μείωση των επιπέδων ευαισθησίας του παθογόνου σε αυτά (Rehfus et al., 2018, Hagerty et al., 2020). Σύμφωνα με την Παντούλα (2018) η απομόνωση 3 του πειράματος μας θεωρείται ευαίσθητη καθώς παρεμποδίστηκε πλήρως η ανάπτυξη της στα 0,33mg/L της δραστικής ουσίας. Οι άλλες δυο απομονώσεις που δεν παρεμποδίστηκε πλήρως η ανάπτυξη αποικίας αλλά και δεν υπήρχε και μετρίσιμο αποτέλεσμα στα 3,33 mg/L μπορούν να θεωρηθούν χαμηλά ανθεκτικές. Συνεπώς απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση ως προς τον χαρακτηρισμό αυτών των απομονώσεων τόσο με μοριακές τεχνικές όσο και με την εφαρμογή της αντίστοιχης δόσης στον αγρό αφού πολλές φορές τα αποτελέσματα των δοκιμών ανθεκτικότητας στο εργαστήριο δεν συμπίπτουν με την αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου σε συνθήκες αγρού. Αυτό συμβαίνει λόγω των διαφόρων αστάθμητων παραγόντων που επικρατούν στον αγρό όπως ο χρόνος εφαρμογής του μυκητοκτόνου, οι καιρικές συνθήκες κ.α. που μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων (Stammler et al., 2008).

Τέλος οι δραστικές ουσίες pyrimethanil, cyprodinil και fluudioxinil δεν παρεμπόδισαν την ανάπτυξη την αποικίας του μύκητα ακόμη και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τους, όμως δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν έτσι και αλλιώς στην καλλιέργεια του σιταριού μιας και δεν έχουν έγκριση από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.

Στα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής ως προς τη μελέτη του επιπέδων ευαισθησίας του μύκητα *Zymoseptoria tritici* δεν παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα σε κάποια δραστική ουσία, εκτός τον χαρακτηρισμό ως μετρίως ανθεκτικές δύο απομονώσεων στην δραστική ουσία boscalid στα 3,33 mg/L που κρίνεται περεταίρω διερεύνησης με την βοήθεια μοριακών τεχνικών. Συνεπώς τα αποτελέσματα για τα υπόλοιπα μυκητοκτόνα τουλάχιστον σε αυτά που υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές είναι σε πλήρη συμφωνία με την FRAC, που για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε μια δραστική ουσία απαιτούνται από 2 έως 10 χρόνια συστηματικής χρήσης της. Τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή εφαρμόζονται στην περιοχή της Θεσσαλίας όποια έχουν έγκριση από το 2014 και η πείραμα διεξήχθη 6 χρόνια μετά.

Όσο αναφορά τον σχεδιασμό της καμπύλης ανάπτυξης του μύκητα υπήρξε γραμμική συσχέτιση του αριθμού των αποικιών ανα mL και της οπτικής απορρόφησης μόνο για την απομόνωση 5. Για τις απομονώσεις 15 και 37 σε μεγαλύτερες τιμές οπτικής απορρόφησης σε σύγκριση με αυτές της απομόνωσης 5 ο αριθμός των αποικιών ανα mL ήταν σαφώς πιο μικρός. Κάτι που μπορεί να αποδοθεί στον μη εμβολιασμό της καλλιέργειας με συγκεκριμένη συγκέντρωση σπορίων. Επίσης στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες αναπτύχθηκε μεγάλος αριθμός υφών έκτος από την παραγωγή πυκνιδιοσπορίων με αποτέλεσμα να μην μπορεί να πραγματοποιηθεί μέτρηση των πυκνιδιοσπορίων και συνεπώς σχεδιασμός της καμπύλης ανάπτυξης του μύκητα με την χρήση αιματοκυτταρομέτρου και γενικά μια ομοιορφία των υγρών καλλιεργειών.

Σύμφωνα με Ballu (2021) υγρή καλλιέργεια του μύκητα με αρχική συγκέντρωση κυττάρων (η οποία είχε αναπτυχθεί στις ίδιες συνθήκες που αναφέρονται παρακάτω) 4,105 sp./mL (σωματίδια/mL) σε 25mL θρεπτικό υλικό YPB (Yeast extract Peptone Dextrose, Broth Traditional Formulation with Peptone powder from USBiological που περιέχει 20 g/L δεξτρόζη, 20 g/L πεπτόνη και 10g/L εκχύλισμα μαγιάς) σε περιστρεφόμενο δίσκο σε θερμοκρασία 18°C, 70 % υγρασία, 150 στροφές το λεπτό επετεύχθη ανάπτυξη πυκνιδιοσπορίων του μύκητα και όχι υφών. Με τη βοήθεια του φασματοφωτομέτρου και του μετρητή σωματιδίων υπήρξε γραμμική

συσχέτιση μεταξύ των μετρήσεων της οπτικής πυκνότητας (OD) και της συγκέντρωσης των σπορίων σε διάστημα 7 ημερών από τον πρώτο εμβολιασμό της καλλιέργειας για όλες τις απομονώσεις. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι σε αυτές τις συνθήκες υπήρξε και θετική συσχέτιση συγκέντρωσης σπορίων και χρόνου που πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός της καμπύλης ανάπτυξης. Συμπερασματικά προτείνεται η υιοθέτηση των παραπάνω συνθηκών για τον καλύτερο σχεδιασμό της καμπύλης ανάπτυξης του μύκητα σε μελλοντικά πειράματα.

Τέλος είναι σημαντικό να διερευνηθεί η επίδραση των δραστικών ουσιών carbendazim, boscalid, mefentrifluconale, cyproconazole, spiroxamine, cyprodinil, pyramethalin και fludioxonil στην αύξηση ή την μείωση παραγωγής πυκνιδιοσπορίων του μύκητα και σε επίπεδο δραστικής ουσίας όσο και σε επίπεδο απομονώσης μίας και δεν υπάρχει αντίστοιχη βιβλιογραφία με αντίστοιχο πείραμα.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία

- Alsuhaim, H., Vojisavljevic, V., Pirogova, E., 2013. Effects of Non-thermal Microwave Exposures on the Proliferation Rate of *Saccharomyces Cerevisiae* Yeast, in: IFMBE Proceedings. pp. 48–51. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29305-4_14
- Annone, J. In In: Conferencia regional sobre la septoriosis del trigo (eds Kohli, M. M. & van Beuningen, L. T.) 80–87 (Mexico:CIMMYT, Montevideo, 1987).
- Arana, I., Orruño, M., Barcina, I., 2013. How to solve practical aspects of microbiology 10. Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, University of Basque Country, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), OCW 2013, pages 1-17
- Avila-Adame, C., Köller, W., 2002. Disruption of the Alternative Oxidase Gene in *Magnaporthe grisea* and Its Impact on Host Infection. *MPMI* 15, 493–500. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.5.493>
- Avila-Adame, C., Köller, W., 2003. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. *Curr Genet* 42, 332–338. <https://doi.org/10.1007/s00294-002-0356-1>
- Ballu, A., 2021. Évaluation des stratégies de gestion des résistances aux fongicides par une approche d'évolution expérimentale: le cas de *Zymoseptoria tritici*, agent causal de la septoriose. Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay
- Banerjee, S., Dutta, S., Mondal, A., Mandal, N., Bhattacharya, S., 2012. Characterization of molecular variability in *Rhizoctonia solani* isolates from different agro-ecological zones by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology* 11, 9543–9548. <https://doi.org/10.4314/ajb.v11i40>
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B., 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58, 649–662. <https://doi.org/10.1002/ps.520>
- Beckerman JL, 2013. Detection of fungicide resistance. In: Nita M, ed. *Fungicides - Showcases of integrated plant disease management from around the world*. InTech, doi: 10.5772/55981
- Birr, T., Hasler, M., Verreet, J.-A., Klink, H., 2021. Temporal Changes in Sensitivity of *Zymoseptoria tritici* Field Populations to Different Fungicidal Modes of Action. *Agriculture* 11, 269. <https://doi.org/10.3390/agriculture11030269>

- Blake, J.J., Gosling, P., Fraaije, B.A., Burnett, F.J., Knight, S.M., Kildea, S., Paveley, N.D., 2018. Changes in field dose-response curves for demethylation inhibitor (DMI) and quinone outside inhibitor (QoI) fungicides against *Zymoseptoria tritici*, related to laboratory sensitivity phenotyping and genotyping assays. *Pest Manag Sci* 74, 302–313. <https://doi.org/10.1002/ps.4725>
- Brent, K.J., 1995. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? FRAC Monograph. GIFAP, Brussels [Online] <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=c43af796fd7ec07ad70efc39263519ad2ad9837f> (accessed 01 February 2023)
- Brent, K.J., n.d. 2007. Fungicide resistance: the assessment of risk. Fungicide resistance 28, FRAC Monograph [Online] <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-2.pdf> (accessed 01 February 2023)
- Bockus, W.W., R.L. Bowden, R.M. Hunger, W.L. Morrill, T.D. Murray and R.W. Smiley, 2010 *Compendium of Wheat Diseases and Pests*, 3rd ed., American Phytopathological Society, St. Paul, MN, Pp43-44.
- Brunner, P.C., Stefanato, F.L., McDonald, B.A., 2008. Evolution of the CYP51 gene in *Mycosphaerella graminicola*: evidence for intragenic recombination and selective replacement. *Molecular Plant Pathology* 9, 305–316. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00464.x>
- Camacho, J.P., Sharbel, T.F., Beukeboom, L.W., 2000. B-chromosome evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 163–178.
- Carmona, M., Sautua, F., Pérez-Hernández, O., Reis, E.M., 2020. Role of Fungicide Applications on the Integrated Management of Wheat Stripe Rust. *Front Plant Sci* 11, 733. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00733>
- Cell counting Neubauer chamber - Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting - Oscar Bastidas [WWW Document], n.d. . StuDocu. URL <https://www.studocu.com/ph/document/ateneo-de-manila-university/human-resources-management/cell-counting-neubauer-chamber/9847554> (accessed 7.11.22).
- Chen, C., Wang, J., Luo, Q., Yuan, S., Zhou, M., 2007. Characterization and fitness of carbendazim-resistant strains of *Fusarium graminearum* (Wheat Scab). *Pest management science* 63, 1201–7. <https://doi.org/10.1002/ps.1449>
- Cohen, L., Eyal, Z., 1993. The histology of processes associated with the infection of resistant and susceptible wheat cultivars with *Septoria tritici*. *Plant Pathology* 42, 737–743. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01560.x>

- Cools, H.J., Bayon, C., Atkins, S., Lucas, J.A., Fraaije, B.A., 2012. Overexpression of the sterol 14 α -demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest Management Science* 68, 1034–1040. <https://doi.org/10.1002/ps.3263>
- Cools, H.J., Fraaije, B.A., 2013. Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Management Science* 69, 150–155. <https://doi.org/10.1002/ps.3348>
- Cowger, C., McDonald, B.A., Mundt, C.C., 2002. Frequency of Sexual Reproduction by *Mycosphaerella graminicola* on Partially Resistant Wheat Cultivars. *Phytopathology* 92, 1175–1181. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.11.1175>
- Croll, D., McDonald, B.A., 2012. The Accessory Genome as a Cradle for Adaptive Evolution in Pathogens. *PLOS Pathogens* 8, e1002608. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002608>
- Curvers, K., Pycke, B., Kyndt, T., Haesaert, G., Gheysen, G., 2014. Sensitivity towards DMI fungicides and haplotypic diversity of their CYP51 target in the *Mycosphaerella graminicola* population of Flanders. *J Plant Dis Prot* 121, 156–163. <https://doi.org/10.1007/BF03356504>
- Dancer, J., Daniels, A., Cooley, N. and Foster, S. 1999. *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* as model pathogens for fungicide discovery. In: *Septoria on cereals: a study of pathosystems* (Lucas, J.A., Bowyer, P. and Anderson, H.M., eds). CABI, Wallingford, UK, pp. 316–331.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathology* 13, 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Dehne, H.-W., Deising, H. (Eds.), 2008. *Modern fungicides and antifungal compounds V: proceedings of the 15th International Reinhardsbrunn Symposium, May 06-10, 2007 ; Friedrichroda, Germany, Spectrum Phytomedizin. Presented at the International Reinhardsbrunn Symposium, DPG, Braunschweig*
- Delp, C. J., & Dekker, J. 1985. Fungicide resistance: definitions and use of terms. *EPPO Bulletin*, 15: 333-335.
- Dhillon, B., Gill, N., Hamelin, R.C., Goodwin, S.B., 2014. The landscape of transposable elements in the finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *BMC Genomics* 15, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1132>

- Dooley, H., Shaw, M.W., Spink, J., Kildea, S., 2016. Effect of azole fungicide mixtures, alternations and dose on azole sensitivity in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology* 65, 124–136. <https://doi.org/10.1111/ppa.12395>
- Doyle, J., 1991. DNA Protocols for Plants, in: Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B., Young, J.P.W. (Eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 283–293. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
- Duveiller, E., Singh, P.K., Mezzalama, M., Singh, R., Dababat, A., 2012. *Wheat Diseases and Pests: A Guide for Field Identification* (2nd Edition).
- EPPO Global Database [WWW Document], n.d. URL *Zymoseptoria tritici* (SEPTTR)[Overview] <https://gd.eppo.int/taxon/SEPTTR> (accessed 7.11.22)
- Eriksen, L. 2000. The influence of sexual reproduction on the structure of populations of *Mycosphaerella graminicola* in relation to durability of resistance. PhD Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.
- Eriksen, L., Munk, L., 2003. The Occurrence of *Mycosphaerella graminicola* and its Anamorph *Septoria tritici* in Winter Wheat during the Growing Season. *European Journal of Plant Pathology* 109, 253–259. <https://doi.org/10.1023/A:1022851502770>
- HENRY A. ERLICH (Editor) 1989, *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. X + 246 S. New York-Tokyo-Melbourne-Hong Kong 1989. McMillan Publishers (Stockton Press). ISBN: 0-333-48948-9. *J Basic Microbiology* 30, 736–736. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620301009>
- Ewens, W.J., 2013. Genetic Variation, in: Maloy, S., Hughes, K. (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (Second Edition). Academic Press, San Diego, pp. 290–291. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00631-8>
- Eyal, Z., M.B. Brown., 1976. A quantitative method for estimating density of *septoria tritici* pycnidia on wheat leaves. *Phytopathology*; U.S.A.; DA. 1976; Vol. 66; NO 1; pp. 11-14; Bibl. 18Ref.
- Eyal, Z., International Maize and Wheat Improvement Center (Eds.), 1987. *The Septoria diseases of wheat: concepts and methods of disease management*. CIMMYT, Mexico, D.F.
- Eyal, Z., 2011. The kinetics of pycnospor liberation in *Septoria tritici*. *Canadian Journal of Botany* 49, 1095–1099. <https://doi.org/10.1139/b71-157>

- Fernández-Ortuño, D., Tores, J., Vicente, A., Pérez-García, A., 2010. The QoI Fungicides, the Rise and Fall of a Successful Class of Agricultural Fungicides. pp. 203–220. <https://doi.org/10.5772/13205>
- Sanderson Fr, Scharen A.I, Scott P.r, 1985. Sources and importance of primary infection and identities of associated propagules. ARS U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USA), (no. 12) p. 57-64. "
- Fones, H., Gurr, S., 2015. The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, *Septoria tritici* blotch disease of wheat: Tools and techniques to study the pathogen *Zymoseptoria tritici* 79, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.004>
- Fraaije, B.A., Lovell, D.J., Rohel, E.A., Hollomon, D.W., 1999. Rapid detection and diagnosis of *Septoria tritici* epidemics in wheat using a polymerase chain reaction/PicoGreen assay. *Journal of Applied Microbiology* 86, 701–708. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00716.x>
- Fraaije, B.A., Butters, J.A., Coelho, J.M., Jones, D.R., Hollomon, D.W., 2002. Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathology* 51, 45–54. <https://doi.org/10.1046/j.0032-0862.2001.00650.x>
- Fraaije, B.A., Cools, H.J., Kim, S.-H., Motteram, J., Clark, W.S., Lucas, J.A., 2007. A novel substitution I381V in the sterol 14 α -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Molecular Plant Pathology* 8, 245–254. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00388.x>
- Fraaije, B.A., Bayon, C., Atkins, S., Cools, H.J., Lucas, J.A., Fraaije, M.W., 2012. Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control *Septoria* leaf blotch in wheat. *Molecular Plant Pathology* 13, 263–275. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00746.x>
- Francisco, C.S., Ma, X., Zwysig, M.M., McDonald, B.A., Palma-Guerrero, J., 2019. Morphological changes in response to environmental stresses in the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Sci Rep* 9, 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45994-3>
- Fox, R. T. V. (1993). Principles of diagnostic techniques in plant pathology. CAB INTERNATIONAL

- Garnault, M., Duplaix, C., Leroux, P., Couleaud, G., Carpentier, F., David, O., Walker, A., 2019. Spatiotemporal dynamics of fungicide resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in France. *Pest. Manag. Sci.* 75, 1794–1807. <https://doi.org/10.1002/ps.5360>
- Garnault, M., Duplaix, C., Leroux, P., Couleaud, G., David, O., Walker, A.-S., Carpentier, F., 2021. Large-scale study validates that regional fungicide applications are major determinants of resistance evolution in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in France. *New Phytologist* 229, 3508–3521. <https://doi.org/10.1111/nph.17107>
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., McCaffery, A., 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* 58, 859–867. <https://doi.org/10.1002/ps.565>
- Goodwin, S.B., Ben M'Barek, S., Dhillon, B., Wittenberg, A.H.J., Crane, C.F., Hane, J.K., Foster, A.J., Van der Lee, T.A.J., Grimwood, J., Aerts, A., Antoniw, J., Bailey, A., Bluhm, B., Bowler, J., Bristow, J., van der Burgt, A., Canto-Canché, B., Churchill, A.C.L., Conde-Ferràez, L., Cools, H.J., Coutinho, P.M., Csukai, M., Dehal, P., De Wit, P., Donzelli, B., van de Geest, H.C., van Ham, R.C.H.J., Hammond-Kosack, K.E., Henrissat, B., Kilian, A., Kobayashi, A.K., Koopmann, E., Kourmpetis, Y., Kuzniar, A., Lindquist, E., Lombard, V., Maliepaard, C., Martins, N., Mehrabi, R., Nap, J.P.H., Ponomarenko, A., Rudd, J.J., Salamov, A., Schmutz, J., Schouten, H.J., Shapiro, H., Stergiopoulos, I., Torriani, S.F.F., Tu, H., de Vries, R.P., Waalwijk, C., Ware, S.B., Wiebenga, A., Zwiers, L.-H., Oliver, R.P., Grigoriev, I.V., Kema, G.H.J., 2011. Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure, Chromosome Plasticity, and Stealth Pathogenesis. *PLoS Genet* 7, e1002070. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002070>
- Gullino, M., Leroux, P., Smith, C., 2000. Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection* 19, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(99\)00095-2](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(99)00095-2)
- Hartmann, F.E., Vonlanthen, T., Singh, N.K., McDonald, M.C., Milgate, A., Croll, D., 2021. The complex genomic basis of rapid convergent adaptation to pesticides across continents in a fungal plant pathogen. *Molecular Ecology* 30, 5390–5405. <https://doi.org/10.1111/mec.15737>
- Hagerty, C.H., Klein, A.M., Reardon, C.L., Kroese, D.R., Melle, C.J., Graber, K.R., Mundt, C.C., 2021. Baseline and Temporal Changes in Sensitivity of *Zymoseptoria tritici* Isolates to Benzovindiflupyr in Oregon, U.S.A., and Cross-Sensitivity to Other SDHI Fungicides. *Plant Diseases* 105, 169–174. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2125-RE>
- Heick, T., Berg, G., Semaskiene, R., Mehl, A., Sierotzki, H., Stammler, G., Justesen, A., Jørgensen, L., 2015. Impact of DMI and SDHI fungicides on disease control and CYP51

- mutations in populations of *Zymoseptoria tritici* from Northern Europe. *European Journal of Plant Pathology* 143, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0737-1>
- Heick, T.M., Justesen, A.F., Jørgensen, L.N., 2017. Anti-resistance strategies for fungicides against wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* with focus on DMI fungicides. *Crop Protection* 99, 108–117.
- Heick, T.M., Justesen, A.F., Jørgensen, L.N., 2017. Erratum to: Resistance of wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* to DMI and QoI fungicides in the Nordic-Baltic region - a status. *European Journal Plant Pathology* 149, 241–241. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1224-7>
- Heick, T.M., Justesen, A.F., Jørgensen, L.N., 2017. Resistance of wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* to DMI and QoI fungicides in the Nordic-Baltic region - a status. *European Journal Plant Pathology* 149, 669–682. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1216-7>
- Heick, T.M., Matzen, N., Jørgensen, L.N., 2020. Reduced field efficacy and sensitivity of demethylation inhibitors in the Danish and Swedish *Zymoseptoria tritici* populations. *European Journal Plant Pathology* 157, 625–636. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02029-2>
- HGCA. 2010. Decision guide T0, T1 and T2 (The wheat disease management guide 2010). Available: http://cereals2.ahdb.org.uk/publications/documents/17_2010_Decisions_guide.pdf.
- HGCA. 2012. *Septoria tritici* in winter wheat
- Hýšek, J., Vavera, R., Růžek, P., 2017. Influence of temperature, precipitation, and cultivar characteristics on changes in the spectrum of pathogenic fungi in winter wheat. *International Journal Biometeorol* 61, 967–975. <https://doi.org/10.1007/s00484-016-1276-y>
- Hilu, H.M. and Bever, W.M. 1957. Inoculation, oversummering, and suscept-pathogen relationship of *Septoria tritici*. *Triticum* species. *Phytopathology*, 47, 474–480.
- Hobbelen, P.H.F., Paveley, N.D., van den Bosch, F., 2011. Delaying Selection for Fungicide Insensitivity by Mixing Fungicides at a Low and High Risk of Resistance Development: A Modeling Analysis. *Phytopathology* 101, 1224–1233. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-10-0290>

- Hunter, T., Coker, R.R., Royle, D.J., 1998. The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of septoria tritici blotch on winter wheat in the UK. *Plant Pathol* 48, 51–57. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00310.x>
- Jones, D. G. & LEE, N. P. Production of secondary conidia by *Septoria tritici* in culture. *Transactions British Mycological Society* 62,212–213 ,1974.
- Jørgensen, L.N., Hovmøller, M.S., Hansen, J.G., Lassen, P., Clark, B., Bayles, R., Rodemann, B., Flath, K., Jahn, M., Goral, T., Jerzy Czembor, J., Cheyron, P., Maumene, C., De Pope, C., Ban, R., Nielsen, G.C., Berg, G., 2014. IPM Strategies and Their Dilemmas Including an Introduction to www.eurowheat.org. *Journal of Integrative Agriculture* 13, 265–281. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60646-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60646-2)
- Jørgensen, L.N., Matzen, N., Heick, T.M., Havis, N., Holdgate, S., Clark, B., Blake, J., Glazek, M., Korbas, M., Danielewicz, J., Maumene, C., Rodemann, B., Weigand, S., Kildea, S., Bataille, C., Brauna-Morževska, E., Gulbis, K., Ban, R., Berg, G., Semaskiene, R., Stammler, G., 2021. Decreasing azole sensitivity of *Z. tritici* in Europe contributes to reduced and varying field efficacy. *Journal Plant Disease Protection* 128, 287–301. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00372-4>
- Kellner, R., Bhattacharyya, A., Poppe, S., Hsu, T.Y., Brem, R.B., Stukenbrock, E.H., 2014. Expression Profiling of the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici* Reveals Genomic Patterns of Transcription and Host-Specific Regulatory Programs. *Genome Biol Evol* 6, 1353–1365. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu101>
- Kema, G.H.J., Annone, J.G., 1991. In vitro production of pycnidia by *Septoria tritici*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97, 65–72. <https://doi.org/10.1007/BF01974270>
- Kema, G.H.J., Annone, J.G., Sayoud, R., Silfhout, C.H. van, Ginkel, M. van, Bree, J. de, 1996. Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. 1. Interactions between pathogen isolates and host cultivars. *Phytopathology* 86, 200–212.
- Kema, G.H.J., Yu, D.Z., Rijkenberg, F.H.J., Shaw, M.W. and Baayen, R.P.1996d. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology*, 86(7), 777–786.
- Klink, H., Verreet, J.-A., Hasler, M., Birr, T., 2021. Will Triazoles Still Be of Importance in Disease Control of *Zymoseptoria tritici* in the Future? *Agronomy* 11, 933. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050933>

- Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M., Walker, A.-S., 2007. Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 63, 688–698. <https://doi.org/10.1002/ps.1390>
- Leroux, P., Walker, A.-S., 2011. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 67, 44–59. <https://doi.org/10.1002/ps.2028>
- Lesniak, K. E., Proffer, T. J., Beckerman, J. L., & Sundin, G. W. 2011 . Occurrence of QoI resistance and detection of the G143A mutation in Michigan populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease*, 95: 927-934.
- Lovell, D. j., Parker, S. r., Hunter, T., Royle, D. j., Coker, R. r., 1997. Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in winter wheat. *Plant Pathology* 46, 126–138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-206.x>
- Lucas, J.A., Fraaije, B.A., 2008. QoI resistance in *Mycosphaerella graminicola*: what have we learned so far? *Modern fungicides and antifungal compounds V: 15th International Reinhardsbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany, May 6-10, 2007* 71–77.
- Lucas, J.A., Hawkins, N.J., Fraaije, B.A., 2015. The evolution of fungicide resistance. *Advance Appliances Microbiology* 90, 29–92. <https://doi.org/10.1016/bs.aamb.2014.09.001>
- Mäe, A., Fillinger, S., Sooväli, P., Heick, T.M., 2020. Fungicide Sensitivity Shifting of *Zymoseptoria tritici* in the Finnish-Baltic Region and a Novel Insertion in the MFS1 Promoter. *Frontiers in Plant Science* 11.
- Maier, R.M., Pepper, I.L., 2015. Chapter 3 - Bacterial Growth, in: Pepper, I.L., Gerba, C.P., Gentry, T.J. (Eds.), *Environmental Microbiology (Third Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 37–56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X>
- McDonald BA, Zhan J, Yarden O, Hogan K, Garton J and Pettway RE 1999. The population genetics of *Mycosphaerella graminicola* and *Phaeosphaeria nodorum*. In: Lucas JA, Bowyer P and Anderson HM (eds) *Septoria on Cereals: A Study of Pathosystems* (pp 44–69) CABI Publishing, Oxon, UK
- McDonald, B.A., Pettway, R.E., Chen, R.S., Boeger, J.M., Martinez, J.P., 1995. The population genetics of *Septoria tritici* (teleomorph *Mycosphaerella graminicola*). *Canadian Journal Botanical*. 73, 292–301. <https://doi.org/10.1139/b95-259>

- Miguez, M., Reeve, C., Wood, P.M., Hollomon, D.W., 2004. Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QOI fungicides. *Pest Management Science* 60, 3–7. <https://doi.org/10.1002/ps.837>
- Morais, D., Sache, I., Suffert, F. and Laval, V. 2016. Is the onset of *Septoria tritici* blotch epidemics related to the local pool of ascospores?. *Plant Pathology* 65 (2), 250-260.
- Mundt CC, Hoffer ME, Ahmed HU, Coakley SM, DiLeone JA and Cowger C 1999 Population genetics and host resistance. In: Lucas JA, Bowyer P and Anderson HM (eds) *Septoria on Cereals: A Study of Pathosystems* (pp 115–130) CABI Publishing, Oxon, UK
- O’Driscoll, A., Kildea, S., Doohan, F., Spink, J., Mullins, E., 2014. The wheat-*Septoria* conflict: a new front opening up? *Trends Plant Sci* 19, 602–610. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.04.011>
- Olaya, G., Geddens, R., 2019. CHAPTER 3: The Methyl Benzimidazole Carbamate Fungicides (FRAC Code 1), in: G, O., R, G. (Eds.), *Fungicide Resistance in North America, Second Edition, Mycology. The American Phytopathological Society*, pp. 29–40. <https://doi.org/10.1094/9780890546222.003>
- Omrane, S., Sghyer, H., Audéon, C., Lanen, C., Duplaix, C., Walker, A.-S., Fillinger, S., 2015. Fungicide efflux and the MgMFS1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. *Environmental Microbiology* 17, 2805–2823. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12781>
- Omrane, S., Audéon, C., Ignace, A., Duplaix, C., Aouini, L., Kema, G., Walker, A.-S., Fillinger, S., 2017. Plasticity of the MFS1 Promoter Leads to Multidrug Resistance in the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici* 2, 18.
- Palmer, C.-L., Skinner, W., 2002. *Mycosphaerella graminicola*: latent infection, crop devastation and genomics. *Molecular Plant Pathology* 3, 63–70. <https://doi.org/10.1046/j.1464-6722.2002.00100.x>
- Paplomatas, E.J., Pappas, A.C., Antoniadis, D., 2004. A Relationship among Fungicide-resistant Phenotypes of *Botrytis cinerea* Based on RAPD Analysis. *Journal of Phytopathology* 152, 503–508. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00887.x>
- Pijls, C.F.N., Shaw, M.W., Parker, A., 1994. A rapid test to evaluate in vitro sensitivity of *Septoria tritici* to flutriafol, using a microtitre plate reader. *Plant Pathology* 43, 726–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1994.tb01612.x>
- Pollastro, S., 2000. Usage of Molecular Markers (PCR-RAPD) for Studying Genetic Variability in “*Phellinus*” (“*Fomitiporia*”) sp. Usage of Molecular Markers (PCR-

- RAPD) for Studying Genetic Variability in “Phellinus” (“Fomitiporia”) sp. 1000–1005. <https://doi.org/10.1400/57827>
- Ponomarenko A., S.B. Goodwin, and G.H.J. Kema. 2011. Septoria tritici blotch (STB) of wheat. Plant Health Instructor [Online]. Available at <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/pdlessons/Pages/Septoria.aspx> [Accessed 1 February 2023]
- Quaedvlieg, W., Kema, G.H.J., Groenewald, J.Z., Verkley, G.J.M., Seifbarghi, S., Razavi, M., Mirzadi Gohari, A., Mehrabi, R., Crous, P.W., 2011. Zymoseptoria gen. nov.: a new genus to accommodate Septoria-like species occurring on graminicolous hosts. Persoonia 26, 57–69. <https://doi.org/10.3767/003158511X571841>
- Rehfus, A., Strobel, D., Bryson, R., Stammler, G., 2018. Mutations in sdh genes in field isolates of Zymoseptoria tritici and impact on the sensitivity to various succinate dehydrogenase inhibitors. Plant Pathology 67, 175–180. <https://doi.org/10.1111/ppa.12715>
- Rekanovic, E., Mihajlovic, M., Potocnik, I., 2010. In vitro sensitivity of Fusarium graminearum (Schwabe) to difenoconazole, prothioconazole and thiophanate-methyl. Pesticidi i fitomedicina 25, 325–333. <https://doi.org/10.2298/PIF1004325R>
- Roohparvar, R., Mehrabi, R., Van Nistelrooy, J.G., Zwiers, L.-H., De Waard, M.A., 2008. The drug transporter MgMfs1 can modulate sensitivity of field strains of the fungal wheat pathogen Mycosphaerella graminicola to the strobilurin fungicide trifloxystrobin. Pest. Manag. Sci. 64, 685–693. <https://doi.org/10.1002/ps.1569>
- Royle, D.J., Parker, S.R., Lovell, D.J. and Hunter, T. 1995. Interpreting trends and risks for better control of Septoria in winter wheat. In: A Vital Role for Fungicides in Cereal Production (Hewitt, H.G., Tyson, D., Hollomon, D.W., Smith, J.M., Davies, W.P. and Dixon, K.R., eds). BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK, pp. 105–115.
- Rudd, J.J., Kanyuka, K., Hassani-Pak, K., Derbyshire, M., Andongabo, A., Devonshire, J., Lysenko, A., Saqi, M., Desai, N.M., Powers, S.J., Hooper, J., Ambroso, L., Bharti, A., Farmer, A., Hammond-Kosack, K.E., Dietrich, R.A., Courbot, M., 2015. Transcriptome and Metabolite Profiling of the Infection Cycle of Zymoseptoria tritici on Wheat Reveals a Biphasic Interaction with Plant Immunity Involving Differential Pathogen Chromosomal Contributions and a Variation on the Hemibiotrophic

Lifestyle Definition. Plant Physiology 167, 1158–1185.
<https://doi.org/10.1104/pp.114.255927>

Sanderson, F.R. and Hampton, J.G. 1978 Role of the perfect states in the epidemiology of the common Septoria diseases of wheat. NZ J. Agriculture Research. 21, 277–281

Sanderson, F.R., 1976. *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Sanderson comb. nov., the ascogenous state of *Septoria tritici* Rob. apud Desm. New Zealand Journal of Botany 14, 359–360. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1976.10428910>

Scalliet, G., Bowler, J., Luksch, T., Kirchofer-Allan, L., Steinhauer, D., Ward, K., Niklaus, M., Verras, A., Csukai, M., Daina, A. and Fonné-Pfister, R. 2012. Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, PLoS ONE 7(4), e35429.

Sebei, Abdennour, and M. Harrabi. "Assessment of virulence variability in *Septoria tritici* isolates and resistance of selected durum wheat cultivars." Tunisian Journal of Plant Protection 3.11 (2008).

Shaw, M.W., 1991. Interacting effects of interrupted humid periods and light on infection of wheat leaves by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*). Plant Pathology 40, 595–607. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991.tb02424.x>

Shaw, M.W., Royle, D.J., 1989. Airborne inoculum as a major source of *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) infections in winter wheat crops in the UK. Plant Pathology 38, 35–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1989.tb01425.x>

Shewry, P.R., Hey, S.J., 2015. The contribution of wheat to human diet and health. Food Energy Secur 4, 178–202. <https://doi.org/10.1002/fes3.64>

Sierotzki, H., Gisi, U., 2003. Molecular diagnostics for fungicide resistance in plant pathogens. Chemistry of crop protection: progress and prospects in science and regulation 71–88.

Sierotzki, H., Scalliet, G., 2013. A Review of Current Knowledge of Resistance Aspects for the Next-Generation Succinate Dehydrogenase Inhibitor Fungicides. Phytopathology 103, 880–887. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0009-RVW>

Stammler, G., Speakman, J., 2006. Microtiter Method to Test the Sensitivity of *Botrytis cinerea* to Boscalid. Journal of Phytopathology 154, 508–510. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01139.x>

Stammler G., L. Kern, M. Semar, A. Glättli and U. Schöfl 2008. Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to DMI fungicides related to mutations in the target gene *cyp51* (14 α -demethylase). In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds V. pp. 137-142.

- Stammler G., M. Carstensen, A. Koch, M. Semar, D. Strobel and S. Schlehner 2008. Frequency of different CYP51-haplotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and -field efficacy. *Crop Protection* 27, 1448-1456.
- Stammler, G., Kern, L., Semar, M., Glattli, A., Schofl, U. (2008). Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to DMI fungicides related to mutations in the target gene *cyp51* (14 α -demethylase). *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, 137-142.
- Stammler, G., Semar, M., 2011. Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph: *Septoria tritici*) to DMI fungicides across Europe and impact on field performance. *EPPO Bulletin* 41, 149–155. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2011.02454.x>
- Steinberg, G., 2015. Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.002>
- Strobel et al., Mefentrifluconazole (Revysol) - The First Isopropanol-Azole. In: Deising HB; Fraaije B; Mehl A; Oerke EC; Sierotzki H; Stammler G (Eds), "Modern Fungicides and Antifungal Compounds", Vol. IX, pp. 259-264. © 2020. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, ISBN: 978-3-941261-16-7
- Suemoto, H., Matsuzaki, Y., Iwahashi, F., 2019. Metyltetraprole, a novel putative complex III inhibitor, targets known QoI-resistant strains of *Zymoseptoria tritici* and *Pyrenophora teres*. *Pest Manag Sci* 75, 1181–1189. <https://doi.org/10.1002/ps.5288>
- Suffert, F., Sache, I., Lannou, C., 2011. Early stages of septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathology* 60, 166–177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02369.x>
- Taylor, J.W., Branco, S., Gao, C., Hann-Soden, C., Montoya, L., Sylvain, I., Gladieux, P., 2017. Sources of Fungal Genetic Variation and Associating It with Phenotypic Diversity, in: *The Fungal Kingdom*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 635–655. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch30>
- Torriani, S.F., Brunner, P.C., McDonald, B.A., Sierotzki, H., 2009. QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 65, 155–162. <https://doi.org/10.1002/ps.1662>
- Torriani, S.F.F., Melichar, J.P.E., Mills, C., Pain, N., Sierotzki, H., Courbot, M., 2015. *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to

control. Fungal Genetics and Biology, *Septoria tritici* blotch disease of wheat: Tools and techniques to study the pathogen *Zymoseptoria tritici* 79, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.010>

Weber G, 1922. *Septoria* diseases of wheat. *Phytopathology* 12, 537–85.

Wiese, M.V., 1987. *Compendium of wheat diseases*. Second edition. *Compendium of wheat diseases*. Second edition.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18, 6531–6535.

Wood, P.M., Hollomon, D.W., 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of Complex III. *Pest Management Science* 59, 499–511. <https://doi.org/10.1002/ps.655>

Yamashita, M., Fraaije, B., 2018. Non-target site SDHI resistance is present as standing genetic variation in field populations of *Zymoseptoria tritici*. *Pest Management Science* 74, 672–681. <https://doi.org/10.1002/ps.4761>

Zhan, J., McDonald, B.A., 2004. The interaction among evolutionary forces in the pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* 41, 590–599. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.01.006>

Zhan, J., Mundt, C.C., McDonald, B.A., 1998. Measuring Immigration and Sexual Reproduction in Field Populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 88, 1330–1337. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.12.1330>

Zhan, J., Mundt, C.C., McDonald, B.A., 2001. Using Restriction Fragment Length Polymorphisms to Assess Temporal Variation and Estimate the Number of Ascospores that Initiate Epidemics in Field Populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology*® 91, 1011–1017. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.10.1011>

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Ανθούλη Ε .2017. Ανίχνευση εναέριου μολύσματος του μύκητα *Mycosphaerellagraminicola* (Fuckel) Schröt και αξιολόγηση διαφόρων ομάδων μυκητοκτόνων για την αντιμετώπιση της ασθένειας σεπτορίωση του σίτου. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος
- Κωνσταντίνου Αικατερίνη: Άσκηση Καμπύλη Ανάπτυξης Βακτηρίων, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο Κωνσταντίνο Αικατερίνη,Phd, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών, Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, Καμπύλη Ανάπτυξης [Online]. Available at <<https://biologylab.eap.gr>> [Accessed 09 February 2023]
- Παντούλα Β. 2018. Αξιολόγηση μυκητοκτόνων ως προς την βλάστησησπορίων και την ανάπτυξη μυκηλίου απομονώσεων του μύκητα *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt.,συλλεχθέντων κατά τα έτη 2014-2015.Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,Βόλος
- Ζιώγας Βασίλειος και Μάρκογλου Αναστάσιος: Γεωργική Φαρμακολογία(Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων) Δεύτερη Έκδοση, Αθήνα 2010