



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Σχολή Γεωπονικών Επιστημών**

**Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού  
Περιβάλλοντος**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση  
Περιβάλλοντος»**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**‘Ανίχνευση εναέριου μολύσματος του μύκητα *Mycosphaerella  
graminicola* (Fuckel) Schröt και αξιολόγηση διαφόρων ομάδων  
μυκητοκτόνων για την αντιμετώπιση της ασθένειας  
σεπτορίωση του σίτου’**

**ΒΟΛΟΣ 2017**

**Ελένη Ανθούλη**

**‘Ανίχνευση εναέριου μολύσματος του μύκητα *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schröt και αξιολόγηση διαφόρων ομάδων μυκητοκτόνων για την αντιμετώπιση της ασθένειας σεπτορίωση του σίτου’**

**Ελένη Ανθούλη**

Ευάγγελος Βέλλιος (Επιβλέπων Καθηγητής)

Επίκουρος Καθηγητής, Φυτοπαθολογία-Σύγχρονες Μέθοδοι  
Διαγνωστικής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Νικόλαος Τσιρόπουλος (Μέλος)

Καθηγητής, Χημεία, Ανάλυση και Προσδιορισμός Οργανικών  
Ουσιών Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Νικόλαος Δαναλάτος (Μέλος)

Καθηγητής, Γεωργία-Οικολογία Φυτών Μεγάλης  
Καλλιέργειας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Στην οικογένειά μου...

Copyright © ΕΛΕΝΗ ΑΝΘΟΥΛΗ 2017

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 γνώμων του συγγραφέα.

## Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, υπό την επίβλεψη του Ε. Βέλλιου, Επίκουρου Καθηγητή Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε θέτοντάς μου το παρόν θέμα, αλλά και για τις υποδείξεις του και την εμπιστοσύνη του κατά την διεξαγωγή του πειράματος. Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες, στην Dr. Φ. Λολιοπούλου για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφερε και την υποστήριξή της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Μ. Χατζηδημόπουλο και στην κα. Ε. Παναγιωτάκη για τις πολύ χρήσιμες συμβουλές τους κατά τη διάρκεια υλοποίησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής, την υποστήριξη και τη συνεργασία τους. Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Χημείας, Ανάλυσης και Προσδιορισμού Οργανικών Ουσιών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Ν. Τσιρόπουλο και τον Καθηγητή Γεωργίας και Οικολογίας Φυτών Μεγάλης Καλλιέργειας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Ν. Δαναλάτο, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή μου επιτροπή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όλους όσους με βοήθησαν και συνεργάστηκαν μαζί μου εντός και εκτός του εργαστηρίου. Ευχαριστώ τον Καθηγητή Εφαρμοσμένης Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Ν. Παπαδόπουλο για την παραχώρηση χώρου και μέσων του Εργαστηρίου Εντομολογίας για την ολοκλήρωση των πειραμάτων μου και τον Επίκουρο Καθηγητή Ζιζανιολογίας Α. Καρκάνη για τη συνεργασία του. Θα ήταν παράλειψη από μέρους μου να ξεχάσω να ευχαριστήσω τις φίλες μου δις Π. Αγραφιώτη και δις Κ. Παππά για την πολύτιμη βοήθειά τους. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου και ιδιαίτερα στους γονείς μου Χρήστο και Ιωάννα, για την υλική και ηθική τους υποστήριξη κατά τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και για την κατανόηση και την συμπαράσταση που μου επέδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια της σπουδής μου.

## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση διαφόρων ομάδων μυκητοκτόνων, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της ασθένειας σεπτορίωσης του σίτου, που οφείλεται στο μύκητα *Mycosphaerella graminicola*. Η συλλογή δειγμάτων πραγματοποιήθηκε την άνοιξη του 2016 από περιοχές των Νομών Μαγνησίας, Λαρίσης και Φθιώτιδας. Οι απομονώσεις έγιναν από τα προσβεβλημένα φύλλα των φυτών και εν συνεχεία η καλλιέργεια του μύκητα πραγματοποιήθηκε σε τεχνικό θρεπτικό υπόστρωμα. Επίσης κατά την διάρκεια της συλλογής των δειγμάτων εφαρμόστηκε αυτοσχέδια παγίδα ανίχνευσης εναερίου μολύσματος, για το μύκητα που προκαλεί την ασθένεια σεπτορίωση του σίτου. Την ίδια χρονική περίοδο πραγματοποιήθηκε μελέτη της επιδημιολογίας του μύκητα σε συγκεκριμένο αγρό στην περιοχή του Βελεσίνου Θεσσαλίας. Οι απομονώσεις του μύκητα ελέγχθηκαν στις δραστικές ουσίες proiconazole, azoxistrobin, chlorothalonil και procloraz και στο μίγμα eroxiconazoleme pyraclostrobin, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,001/0,01/0,1/1/10 mg L<sup>-1</sup>). Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας πραγματοποιήθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα σε πλάκες μικροπιλοδότσης όπως περιγράφεται η μέθοδος από τη FRAC. Τέλος, αξιολογήθηκε η ποικιλομορφία του γονιδιώματος επιλεγμένων απομονώσεων με τη χρήση έξι RAPDs εκκινητών. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν πως δεν υπάρχει ανθεκτικότητα στις δραστικές ουσίες που μελετήθηκαν. Στη παγίδα δεν διαπιστώθηκε η ύπαρξη ή μη, εναερίου μολύσματος από το παθογόνο. Η αντιμετώπιση της ασθένειας στον αγρό, στην περιοχή του Βελεσίνου του Νομού Μαγνησίας, ήταν επιτυχημένη. Η μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας των απομονώσεων που αξιολογήθηκαν με τη χρήση RAPDs εκκινητών, παρουσίασε ποικιλομορφία των γονιδιωμάτων τους. Τελικά παρατηρήθηκε ότι τα αποτελέσματα που διεξήχθησαν στο εργαστήριο συμπίπτουν με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στον αγρό.

## Abstract

In the present study various fungicide groups which are evaluated to treat the disease septoriosiis of the wheat caused by *Mycosphaerella graminicola*. The collection of samples of wheat leaves were evaluated from region of Magnesia, Larisa and Fthiotida. Consequently the fungus was isolated by leaves and culture liquid nutrient substrate. During the sample collection in the spring of the year 2016, a suction trap has been made for the detection of airborne inoculum responsible for the disease known as *Septoria* leaf blotch. Simultaneously a study of the epidimiology of the disease was carried out at the experimental field of the in Velestino (Magnesia). The fungal isolates were tested for resistance to fungicide groups which corresponded to their active substances of epoxiconazole with pyraclostrobin, propiconazole, azoxistrobin, chlorothalonil and procloraz in different concentrations (0.001/0.01/0.1/1/10 mg L<sup>-1</sup>). Fungicide resistance of the fungal isolates was tested according to FRAC protocol. Subsequently, further genetic diversity of the fungal isolate (apart from fungicide resistance) was tested with six RAPDs primers. The results showed hight effectiveness in those active substances. Regardless the suction trap, there was no evidence of the presence or absence of airborne inoculum. The control of *Mycosphaerella graminicola* in Velestino (Magnesia), was totally successful. The study of the genetic diversity was evaluated with primers RAPDs, detected variety of genomes. Finally, the results from the laboratory correlated with the results from the field.

Εγώ η Ελένη Ανθούλη, 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.

Ελένη Ανθούλη



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 Ελένη Ανθούλη.

Ευάγγελος Βέλλιος  
Επίκουρος Καθηγητής

## Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος-Ευχαριστίες .....	V
Περίληψη .....	VI
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Σεπτορίωση του σίτου .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Εύρος ξενιστών .....	2
1.1.2. Στάδια φυτού που προσβάλλονται .....	3
1.1.3. Συμπτώματα και Σημεία.....	3
1.1.4. Παθογόνο αίτιο .....	4
1.1.5. Επιδημιολογία .....	7
1.1.6. Αντιμετώπιση .....	8
1.2. Ανθεκτικότητα μυκήτων σε διάφορες δραστικές ουσίες.....	10
1.3. Ανθεκτικότητα του μύκητα .....	11
1.4. Μελέτη γενετικής ποικιλομορφίας μυκήτων .....	12
1.5. Εναέριο μόλυσμα .....	14
1.6. Σκοπός διατριβής .....	17
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>18</b>
2.1. Συλλογή δειγμάτων .....	19
2.1.1. Απομόνωση ολικού DNA από το μύκητα <i>Mycosphaerella graminicola</i> .....	22
2.2. Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας δραστικών ουσιών σε φυσικές μολύνσεις καλλιέργειας σίτου.....	23
2.3. Παγίδευση εναερίου μολύσματος .....	25
2.4. Έλεγχος ανθεκτικότητας δραστικών ουσιών <i>in vitro</i> .....	27
2.5. Ταυτοποίηση του μύκητα <i>Mycosphaerella graminicola</i> .....	22
2.6. Γενετική ποικιλομορφία των απομονώσεων του μύκητα <i>Mycosphaerella graminicola</i> .....	30

2.7. Οριζόντια ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης .....	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
3.1. Ανάπτυξη του μύκητα <i>Mycosphaerella graminicola</i> σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα.....	34
3.2. Ταυτοποίηση των απομονώσεων του μύκητα <i>Mycosphaerella graminicola</i> .....	35
3.3. Παγίδευση εναερίου μολύσματος .....	37
3.4. Μελέτη της επιδημιολογίας της ασθένειας σεπτορίωσης του σίτου.. ..	38
3.5. Έλεγχος ανθεκτικότητας ομάδων μυκητοκτόνων <i>in vitro</i> .....	41
3.6. Γενετική ποικιλομορφία των απομονώσεων του μύκητα <i>Mycosphaerella graminicola</i> .....	43
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	52
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	58

## Κατάλογος Πινάκων

<b>Πίνακας 1.</b> Περιοχές δειγματοληψίας ασθενών φυτών σίτου από σεπτορίωση..	21
<b>Πίνακας 2.</b> Φαινοτυπική ομαδοποίηση με βάση τη γενετική ποικιλομορφία των δειγμάτων που μελετήθηκαν. ....	44
<b>Πίνακας 3</b> Τιμές EC50 σχετικά με την ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα <i>M. graminicola</i> απορρόφησης 450 nm.....	74
<b>Πίνακας 4.</b> Τιμές EC50 σχετικά με την ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα <i>M. graminicola</i> απορρόφησης 630 nm.....	75

## Κατάλογος Εικόνων

<b>Εικόνα 1.</b> Σεπτορίωση σε φύλλο σίτου.....	19
<b>Εικόνα 2.</b> Περιοχές όπου πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες για συλλογή προσβεβλημένων φυτών σίτου με σεπτορίωση. Περιοχή Α:Βελεστίνο Ν. Μαγνησίας, Περιοχή Β: Στεφανοβίκειο Ν. Μαγνησίας, Περιοχή Γ: Σταυρός Ν. Λαρίσης, Περιοχή Δ: Καστρί Ν. Φθιώτιδας.....	20
<b>Εικόνα 3.</b> Γραφική απεικόνιση των φύλλων από φυτό σίτου.....	24
<b>Εικόνα 4.</b> Αυτοσχέδια παγίδα εναερίου μολύσματος.....	26
<b>Εικόνα 5.</b> Σχηματισμός πυκνιδίων σε ιστό από φύλλο σιταριού (Olympus SZ61).....	34
<b>Εικόνα 6.</b> Σχηματισμός σπειραμάτων πυκνιδιοσπορίων από πυκνίδια (Olympus SZ61).....	35
<b>Εικόνα 7.</b> Μέτρηση των διαστάσεων πυκνιδιοσπορίων του μύκητα <i>M. graminicola</i> (3,5μmΧ26,8μm) με χρήση μικροσκοπίου Nikon Laborhot-2 (200X).....	36
<b>Εικόνα 8.</b> Πυκνιδιοσπόρια του μύκητα <i>Mycosphaerella graminicola</i> (Motic BA310, 100X).....	36
<b>Εικόνα 9.</b> Πολυμορφισμός απομονώσεων του μύκητα <i>M. graminicola</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA. ....	37
<b>Εικόνα 10.</b> Εμφάνιση πυκνιδίων και έξοδος πυκνιδιοσπορίων σε μορφή σταγόνων σε καλλιέργεια του μύκητα <i>M. graminicola</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Olympus SZ61). ....	38
<b>Εικόνα 11.</b> Ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα <i>M. graminicola</i> σε πλάκα μικροτιτοδότσης στις 10 ημέρες ανάπτυξης. ....	42
<b>Εικόνα 12.</b> Προϊόν αντίδρασης PCR με RAPDs με χρήση των εκκινητών D07 και E15.....	45
<b>Εικόνα 13.</b> Γραφική απεικόνιση ( <i>in silico</i> ) των προϊόντων της αντίδρασης PCR με RAPDs με εκκινητές D07 και E15.....	46
<b>Εικόνα 14.</b> Απεικόνιση των προϊόντων της αντίδρασης PCR με RAPDs εκκινητές τους D01 και F04.....	47
<b>Εικόνα 15.</b> Γραφική απεικόνιση ( <i>in silico</i> ) των προϊόντων PCR με RAPDs με τη χρήση των εκκινητών D01 και F04.....	48

<b>Εικόνα 16.</b> Απεικόνιση των προϊόντων της αντίδρασης RAPDs με εκκινητές U10 και U19 .....	49
<b>Εικόνα 17.</b> Γραφική απεικόνιση ( <i>in silico</i> ) των προϊόντων RAPDs με εκκινητές U10 και U19 .....	50

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

- Διάγραμμα 1.** Διάγραμμα της διάταξης των πειραματικών τεμαχίων για την αξιολόγηση αποτελεσματικότητας δραστικών ουσιών για την αντιμετώπιση της σεπτορίωσης του σίτου. .... 25
- Διάγραμμα 2.** Σχηματική διάταξη της πλάκας μικροπιλοδότησης για τη δοκιμή *in vitro* της αποτελεσματικότητας δραστικών ουσιών. .... 28
- Διάγραμμα 3.** Αριθμός κηλίδων σε φύλλα που προέρχονται από φυσικές μολύνσεις του μύκητα *M. graminicola*, σε φυτά control σε σύγκριση με φυτά που πραγματοποιήθηκε επέμβαση. .... 39
- Διάγραμμα 4.** Αριθμός πυκνιδίων σε κηλίδες προσβεβλημένων φύλλων. .... 40
- Διάγραμμα 5.** Συνολική αξιολόγηση της επίδρασης μυκητοκτόνου σε φυσικές μολύνσεις. .... 40
- Διάγραμμα 6.** Μέσοι όροι τιμών EC50 των δραστικών ουσιών *epoxiconazole*, *propiconazole*, *azoxistrobin*, *chlorothanil* και *prochloraz* μετά τον *in vitro* έλεγχο ανθεκτικότητας απομονώσεων του μύκητα, σε απορρόφηση 405nm. 42
- Διάγραμμα 7.** Μέσοι όροι τιμών EC50 των δραστικών ουσιών *epoxiconazole*, *propiconazole*, *azoxistrobin*, *chlorothanil* και *prochloraz* μετά τον *in vitro* έλεγχο ανθεκτικότητας απομονώσεων του μύκητα, σε απορρόφηση 630nm. 43

# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## 1.1. Σεππορίωση του σίτου

Οι σεπποριάσεις των σιτηρών παρουσιάζουν αυξημένο ενδιαφέρον κατά τα τελευταία έτη. Η σπουδαιότητά τους έγκειται στην οικονομική τους σημασία σχετικά με την παραγωγή του σίτου, κυρίως στον Ευρωπαϊκό χώρο (Eyal and Levy, 1987; Polley and Thomas, 1991; van Ginkel & Rajaram, 1993; Eyal, 1999; Cowger *et al.*, 2000; Hardwick *et al.*, 2001; Chartrain *et al.*, 2004). Ο σίτος αποτελεί βασικό στοιχείο της διατροφής του παγκόσμιου πληθυσμού, μιας και η κατανάλωσή του ξεπερνά το 35% και η ζήτησή του διατηρείται υψηλή στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Ωστόσο, η παραγωγή σιταριού πλήττεται τα τελευταία χρόνια λόγω της κλιματικής αλλαγής που υφίσταται και της εμφάνισης σοβαρών ασθενειών των φυτών (Gurung *et al.*, 2014).

Η επικινδυνότητα της ασθένειας μπορεί να φέρει σημαντικές επιπτώσεις για τις σιτοκαλλιέργειες όταν σημειωθεί βροχερός καιρός με σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (μέχρι και 20 °C) (Magboul *et al.*, 1992; Gladders *et al.*, 2001; Pietravalle *et al.*, 2003; Ponomarenko *et al.*, 2011).

### 1.1.1. Εύρος ξενιστών

Ο μύκητας *Mycosphaerella graminicola* αποτελεί σημαντικό ξενιστή των σιτηρών και των triticales. Μπορεί να προσβάλλει περισσότερα από 100 είδη φυτών. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται ο σίτος, η βρώμη, η σίκαλη, το κριθάρι και πολλά αυτοφυή αγροστώδη φυτά (Fraaije *et al.* 1999; Hollaway 2014; Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia, 2016; Bockus *et al.*, 2010). Ο μύκητας έχει την ικανότητα να μεταλλάσσεται και να προσαρμόζεται ανάλογα με τον ξενιστή που προσβάλλει. Χαρακτηριστικό του μύκητα, που προκαλεί την ασθένεια γνωστή ως σεππορίωση, είναι οι διαφορετικές τέλειες μορφές του, ανάλογα με τον ξενιστή, και οι διαφορετικές οικογένειες στις οποίες ανήκουν (Kellner *et al.* 2014).

### 1.1.2. Στάδια φυτού που προσβάλλονται

Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έγινε προσπάθεια να εξακριβωθεί ποια στάδια του φυτού προσβάλλονται από το μύκητα που προκαλεί τη σεπτορίωση του σίτου (Wainshilbaum *et al.*, 1991; Arama *et al.*, 1999; Arraiano *et al.*, 2006). Μελετήθηκε επίσης η επίδραση της βροχόπτωσης και της θερμοκρασίας. Τελικά δεν παίζει ρόλο το στάδιο στο οποίο βρίσκεται το φυτό στη μόλυνση από το παθογόνο, αλλά οι συνθήκες θερμοκρασίας και διαβροχής του. (Wainshilbaum *et al.*, 1991). Αυτό ισχύει και για άλλους ξενιστές του μύκητα, όπως η βρώμη και η σίκαλη (Department of Crop Sciences University of Illinois at Urbana-Champaign, 1989).

Παρόλα αυτά, σε τεχνητές μολύνσεις διαπιστώθηκε ότι ήταν δυσκολότερη η μόλυνση των ανώτερων φύλλων, καθώς το φυτά τα οποία μολύνονταν μεγάλωναν (Arama *et al.* 1999; Arraiano *et al.* 2006; Eyal, 1987).

### 1.1.3. Συμπτώματα και Σημεία

Τα συμπτώματα της ασθένειας εκδηλώνονται μέχρι την αρχή της άνοιξης στα κατώτερα φύλλα των φυτών που βρίσκονται κοντά στο έδαφος και πολύ λιγότερο στα ανώτερα φύλλα (Ponomarenko *et al.*, 2011). Έχουν τη μορφή κυκλικών επίμηκων κηλίδων που εξελίσσονται σε νεκρωτικές (Bockus *et al.*, 2010). Οι κηλίδες επεκτείνονται κατά μήκος των νεύρων των φύλλων (Ponomarenko *et al.*, 2011). Συμπτώματα της ασθένειας μπορεί να εμφανιστούν και στα στελέχη και τα λέπυρα των φυτών που προσβάλλονται (Eyal, 1987).

Μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων και την μεγέθυνση των κηλίδων, στο κέντρο τους εκδηλώνεται πολυστιγμία. Η πολυστιγμία είναι πολύ μικρά μαύρα στίγματα από τις σχηματιζόμενες καρποφορίες (πυκνίδια) του μύκητα. Τα πυκνίδια που σχηματίζονται είναι σφαιροειδή ή ωοειδή και παράγουν υαλώδη, σκληρόμορφα μακριά και πολύ λεπτά, τρικύτταρα πυκνιδιοσπόρια. (Ben hassine and Hamada, 2013; Hollaway, 2014).

Τα πυκνιδιοσπόρια του μύκητα εμφανίζουν έως και 7 σέπτα με εύρος διαστάσεων που κυμαίνεται μεταξύ 20 έως 98 μm X 1,4 έως 3,8 μm Τα ασκοσπόρια του μύκητα έχουν μεγέθους 11 μm x 2,5 μm (Sanderson and

Hampton, 1978; Ponomarenko *et al.*, 2011; Ben hassine and Hamada, 2013; Morais *et al.*, 2015; Steinberg, 2015).

#### **1.1.4. Παθογόνο αίτιο**

Παθογόνο αίτιο είναι ο μύκητας *Zymoseptoria tritici* (συν. *Septoria tritici*) Rob. in Desm. Η τέλεια μορφή του μύκητα είναι ο Ασκομύκητας *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Scröt (indexfungorum, 2/6/17; mycobank, 2/6/17).

Τα ασκοσπόρια του μύκητα αποτελούν το πρωτογενές μόλυσμα. Τα πυκνιδιοσπόρια και τα κονίδια του μύκητα αποτελούν το δευτερογενές μόλυσμα για τη διάδοση της ασθένειας (Suffert *et al.*, 2011).

##### **1.1.4.1. Συστηματική κατάταξη**

Οι μύκητες που προκαλούν την ασθένεια αυτή, ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων, του φύλου ή συνομοταξίας Ascomycota, της ομοταξίας των Dothideomycetes, της τάξης των Carpodiales, της οικογένειας των Mycosphaerellaceae, του γένους *Mycosphaerella*, του είδους *M. graminicola* με ατελή μορφή το είδος *Septoria tritici* (Palmer and Skinner, 2002; mycobank, 2/6/17)

##### **1.1.4.2. Περιγραφή μυκηλίου**

Ο μύκητας φαίνεται να έχει μορφολογική διαφοροποίηση κατά την ανάπτυξη του μυκηλίου του. Πολλαπλασιάζεται αγενώς όταν πρόκειται για την ατελή μορφή του (πυκνιδιοσπόρια) και εγγενώς πολλαπλασιάζονται οι τέλειες μορφές του (ασκοσπόρια). Ο μύκητας αναπτύσσεται στο έδαφος, όπου και σχηματίζει ψευδοθήκια (περιθήκια) διαστάσεων 76-80 x 77-100 μm. Αυτά περιέχουν ασκούς (34-41 x 11-13 μm) που στο εσωτερικό του περιέχονται 8 ασκοσπόρια μεγέθους 10-15 x 2,5-3 μm (Sanderson and Hampton, 1978; Bockus *et al.*, 2010). Η ανάπτυξη αποικίας του μυκηλίου φέρει την εμφάνιση πολυχρωμίας, όπως την εμφάνιση λευκού χρώματος, γκρι και ροζ (Bockus *et al.*, 2010). Το μυκήλιο είναι επίσης σημαντικός μολυσματικός παράγοντας του παθογόνου και προκαλεί την ταχεία καταστροφή των κυττάρων των

προσβεβλημένων φυτών. Το μυκήλιο εκλαμβάνει τα θρεπτικά συστατικά από το μεσόφυλλο με αποτέλεσμα την τελική κατάρρευση των κυττάρων μετά τη 10η ημέρα από την ημέρα της μόλυνσης. Στα κατεστραμμένα κύτταρα δημιουργούνται τα πυκνίδια σε κοιλότητες. (Kema *et al.*, 1996; Eyal, 1987).

#### **1.1.4.3. Περιγραφή καρποφοριών τέλειας μορφής**

Ο μύκητας *Mycosphaerella graminicola* σχηματίζει ψευδοθήκια (περιθήκια) στα υπολείμματα των καλλιεργειών από την προηγούμενη καλλιεργητική περίοδο και η μέγιστη συγκέντρωσή τους σημειώνεται τους μήνες Δεκέμριο και Ιανουάριο με σταδιακή μείωσή τους. Τα περιθήκια περιέχουν ασκούς που μέσα στους οποίους αναπαράγονται αγενώς τα ασκοσπόρια του μύκητα (Zhan *et al.*, 1998; Suffert *et al.*, 2011). Τα ασκοσπόρια εκτινάσσονται από τα περιθήκια μετά από τη διαβροχή τους και μπορούν να μεταφερθούν σε μεγάλες αποστάσεις μέσω του αέρα (Suffert *et al.*, 2011). Ο βλαστικός σωλήνας των ασκοσπορίων εισέρχεται εντός των ιστών των φύλλων του ξενιστή, μέσω των ανοιγμάτων των στοματίων τους (Agrios, 1988; Stephen and Goodwin, 2011; Ronomarenko *et al.*, 2011). Σύμφωνα με τον Suffert (2011), από ένα ασκοσπόριο μπορεί να προκύψουν πολλά ψευδοθήκια, που το καθένα από αυτά μπορεί να εκτοξεύσει πολλά ασκοσπόρια. Τα ασκοσπόρια είναι υπεύθυνα για τις πρωτογενείς μολύνσεις. Η πρωτογενής μόλυνση του χειμερινού σίτου συμβαίνει το φθινόπωρο, κυρίως από τα ασκοσπόρια που παράγονται σε κατάλοιπα από την καλλιέργεια της προηγούμενης περιόδου (Ronomarenko *et al.*, 2011; Eyal, 1987). Το παθογόνο επιβιώνει ως τέλεια μορφή και σχηματίζονται τα ψευδοθήκιά του, ενώ αυτοφυή φυτά συμβάλλουν στη διατήρηση του παθογόνου ως ξενιστές του (Ronomarenko *et al.*, 2011). Τα ψευδοθήκια αναπτύσσονται στα κατώτερα φύλλα του φυτού και αποτελούν δευτερογενές μόλυσμα (Eyal, 1987).

#### **1.1.4.4. Περιγραφή καρποφοριών ατελούς μορφής**

Τις ατελείς μορφές του μύκητα αποτελούν τα πυκνίδια, από τα οποία παράγονται τα πυκνιδιοσπόρια (Eyal, 1987; Wiese, 1991; Hunter *et al.*, 1999). Τα πυκνίδια κάνουν την εμφάνισή τους στις κοιλότητες των κατεστραμμένων

ιστών από το μυκήλιο του μύκητα (Kema *et al.*, 1996; Eyal, 1987). Είναι ορατά και έχουν τη μορφή μικρών, σφαιρικών, μαύρων σπιγμάτων και συνήθως εμφανίζονται στα κατώτερα φύλλα των προσβεβλημένων φυτών (Bockus *et al.*, 2010). Από τα πυκνίδια του μύκητα παράγονται τα πυκνιδιοσπόρια. Τα πυκνίδια έχουν διάμετρο 60-200 μm και σχηματίζονται στο εσωτερικό της οστεόλης. Τα κονίδια που σχηματίζονται είναι λεπτά και μακριά, διαστάσεων 20-98 μm x 1,4-3,8 και τα άκρα τους είναι κωνικής μορφής (Bockus *et al.*, 2010). Τα πυκνίδια και πυκνιδιοσπόρια αναπαράγονται αγενώς. Στην απελευθέρωση και διασπορά των πυκνιδιοσπορίων, συμβάλλουν η διαβροχή τους και ο άνεμος. Αυτά είναι υαλώδη, σκληρόμορφα και πολύ λεπτά στο μήκος τους (Morais *et al.*, 2015; Palma-Guerrero, 2016). Ακολουθεί η σαπροφυτική φάση των προσβεβλημένων ιστών, όπου συμβάλει σημαντικά στην επιδημιολογία του μύκητα, λόγω της ανάπτυξης των ψευδοθηκίων και των ασκοσπορίων (τέλεια μορφή) που είναι υπεύθυνα για τις πρωτογενείς μολύνσεις (Palma-Guerrero, 2016).

#### **1.1.4.5. Συνθήκες ανάπτυξης παθογόνου *in vitro***

Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί για τη μελέτη του μύκητα *Septoria tritici*, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα θρεπτικά μέσα. Μερικά από αυτά είναι το V8 (vegetable juice agar, χυμός από λαχανικά και άγαρ), PDA (potato-dextrose agar, πατάτα- δεξτρόζη- άγαρ), WLEI (wheat leaf extract agar, εκχύλισμα φυτών σίτου- άγαρ), WA-M (water agar (Oxoid L13) supplemented with sterile pieces of maize leaves, νερό, άγαρ- κομμάτια από φύλλο αραβόσιπου), WA-W (water agar with sterile pieces of wheat leaves, νερό, άγαρ- κομμάτια από φύλλο σίτου), CLA (water agar with sterile pieces of carnation leaves, νερό- άγαρ- κομμάτια από φύλλο γαρύφαλου), YMDA (YE- malt extract (YE)- dextrose- agar, εκχύλισμα βύνης- δεξτρόζη- άγαρ), CA (carrot extract- agar, εκχύλισμα καρότου- άγαρ) (Eyal, 1987; Kema and Annone, 1991; Saidi, 2012). Τα μέσα αυτά αξιολογήθηκαν με βάση την ανάπτυξη του μυκηλίου, το σχηματισμό πυκνιδιοσπορίων και κονιδίων. Διαπιστώθηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη μυκηλίου είναι 18-20°C (Kema and Annone, 1991; Saidi, 2012) Τα σπόρια του μύκητα παρατηρούνται 7 με 10 ημέρες μετά την ανάπτυξη του μυκηλίου (Saidi, 2012). Το μυκήλιο αναπτύσσεται

πολυμορφικά στα διάφορα υποστρώματα. Αρχικά η απόχρωση που παίρνει είναι ροζ υαλώδη που μοιάζει με ζύμη. Στην πορεία σκουραίνει και αποκτά μια σκούρα γκρι απόχρωση. Όταν το μυκήλιο πάρει το σκούρο αυτό χρώμα είναι ικανό να σποροποιήσει (Kema and Annone, 1991).

Το φως επηρεάζει σημαντικά το χρώμα της αποικίας και τον αριθμό των κονιδίων, αλλά είναι απαραίτητο για το σχηματισμό δευτερογενών. Το pH του υποστρώματος μπορεί να επηρεάζει τον παράγοντα σχηματισμού σπορίων (Saidi, 2012). Το pH του θρεπτικού μέσου μπορεί να επηρεάσει το σχηματισμό δευτερογενών κονιδίων. Σε pH 2, 10 και 11 τα κονίδια αναπτύσσονται ελάχιστα, ενώ το ουδέτερο pH μεταξύ ήταν το ιδανικό (Guo and Verreest, 2008). Σύμφωνα με τον Saidi (2012) τα καταλληλότερα μέσα για την ανάπτυξη του μύκητα είναι τα YMDA και YMB. Αντιθέτως οι Kema and Annone (1991), υποστηρίζουν πως το PDA είναι το καταλληλότερο τεχνητό υπόστρωμα.

#### **1.1.5. Επιδημιολογία**

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, αναφέρουν πως όταν ένα φύλλο μολυνθεί από το μύκητα *Mycosphaerella graminicola*, αυτομάτως αποτελεί δυνητική πηγή μόλυσματος. Η ποσότητα του εναερίου μόλυσματος ευνοείται από τις καιρικές συνθήκες και την πυκνότητα των φυτών που έχουν καλλιεργηθεί. Η πιθανότητα της μόλυνσης του φυτικού ιστού από το μύκητα εξαρτάται από την ημερήσια μέση θερμοκρασία και τις βροχοπτώσεις. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την εμφάνιση προσβολών και τη διάδοση του μύκητα στην καλλιέργεια είναι οι 19° C (Magboul *et al.*, 1992; Gladders *et al.*, 2001; Pietravalle *et al.*, 2003; Suffert *et al.*, 2011). Οι κλιματικές αλλαγές αποτελούν τον παράγοντα εκείνο που μπορεί να επηρεάσει τη σοβαρότητα της εμφάνισης της σεπτορίωσης (Gouache *et al.*, 2013; Hollaway, 2014). Κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου του σίτου, υπάρχει το ενδεχόμενο ανάπτυξης επιδημιών που οφείλονται σε υπολείμματα καλλιεργειών που έχουν παραμείνει στο έδαφος μετά τη συγκομιδή από την προηγούμενη καλλιεργητική περίοδο. Σε αυτή την περίπτωση το παθογόνο επιβιώνει ως τέλεια μορφή και σχηματίζονται τα ψευδοθήκιά του, ενώ αυτοφυή φυτά συμβάλλουν στη διατήρηση του παθογόνου ως ξενιστές του (Ponomarenko *et al.*, 2011).

Το μόλυσμα διασπείρεται με τη βροχή, ενώ τα πυκνίδια του μύκητα, αναπτύσσονται στο κέντρο των κηλίδων. Τα περιθήκια σχηματίζονται στους νεκρούς ιστούς και γι' αυτό συνήθως τα βρίσκουμε στα υπολείμματα της καλλιέργειας. Το παθογόνο διαχειμάζει με τη μορφή μυκηλίου, πυκνιδίων και ψευδοθήκιων στα υπολείμματα των καλλιεργειών και είναι ικανό να προσβάλει ξανά το σιτάρι με την έναρξη της νέας καλλιεργητικής περιόδου (Ponomarenko *et al.*, 2011; Agrios, 2005).

Έχει παρατηρηθεί ότι η εξάπλωση της ασθένειας επηρεάζεται συνήθως από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Σε τεχνητά μέσα, συχνά ο μύκητας αναπτύσσεται πολυμορφικά και υπάρχει η δυνατότητα παραγωγής δευτερογενών κονιδίων και πυκνιδιοσπορίων (Kema and Annone, 1991).

#### **1.1.6. Αντιμετώπιση**

Η γενετική μεταβλητότητα και η βιολογία του παθογόνου καθιστά δύσκολη την αντιμετώπισή του (Goodwin, 2011). Παρόλα αυτά υπάρχουν μέθοδοι που συνίστανται για αυτή. Η καταστροφή υπολειμμάτων από προηγούμενη καλλιέργεια, η όψιμη ή πρώιμη σπορά, η αμειψισπορά, οι καλλιεργητικές τεχνικές, η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού και η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών αποτελούν ορισμένες από αυτές (Wiese, 1991; Bockus *et al.*, 2010).

Η χρήση χημικών σκευασμάτων αφορά διάφορες κατηγορίες και ομάδες μυκητοκτόνων, όπως τα προστατευτικά μυκητοκτόνα, τα θεραπευτικά μυκητοκτόνα και τα διασυστηματικά μυκητοκτόνα (SDHI). Η χημική αντιμετώπιση της ασθένειας ορίζεται από το υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων από υπηρεσίες του οποίου είναι αρμόδιες για τον έλεγχο φακέλων και την έκδοση αδειών για χρήση συγκεκριμένων σκευασμάτων (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2017).

Οι στρομπιλουρίνες αποτελούν μια ομάδα μυκητοκτόνων, που ως φυσικές χημικές ουσίες φαίνεται να υπήρχαν στο μανιτάρι *Strobilurus tenacellus*, έχοντας ρόλο δευτερογενών μεταβολιτών, χωρίς να είναι γνωστός ο τρόπος δράσης τους και η χρησιμότητά τους (Anke *et al.*, 1977; Bartlett *et al.*, 2002; Ζιώγας και Μαρκογλου, 2010). Αργότερα αυτό έγινε γνωστό και τη δεκαετία του 90' επιτεύχθηκε η παραγωγή των φυσικών τους ενώσεων με την πρώτη

εμπορική ένωση να κάνει την εμφάνισή της. Η πρώτη δραστική ουσία που έγινε γνωστή ήταν η azoxistrobin (Ζιώγας και Μαρκογλου, 2010).

Οι στρομιλουρίνες είναι παρεμποδιστές του κέντρου οξειδωσης της ουμπεκινόλης και δρουν στο σύμπλοκο III της μιτοχονδριακής αναπνοής στους μύκητες. Συγκεκριμένα ανακόπτει την μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του κυτοχρώματος b και του c στο ενζυμικό σύμπλοκο bc. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσκόλληση των μορίων των ουσιών αυτών στο κυτόχρωμα b. Με άλλα λόγια οι στρομπιλουρίνες αναστέλλουν την κανονική αναπνοή των μυκήτων. Έχουν διασυστηματική δράση και χρησιμοποιούνται προληπτικά αλλά και για τη θεραπεία πολλών μυκητολογικών ασθενειών στη γεωργική εκμετάλλευση, που οφείλονται σε ομάδες Ωομυκήτων, Βασιδιομυκήτων και Ασκομυκήτων (Cornell University, 2000; Bartlett *et al.*, 2002; Brent and Hollomon, 2007).

Τα χλωροφαινύλια είναι ακόμα μια ομάδα δραστικών ουσιών που στη χώρα μας είναι εγκεκριμένο για τη σεπτορίωση των σιτηρών. Το chlorothalonil ανήκει σε αυτή την ομάδα και συναντάται για πρώτη φορά τη δεκαετία του 60', όπου και χρησιμοποιήθηκε ως φυτοπροστατευτική ένωση. Σήμερα αποτελεί σημαντικό προστατευτικό μυκητοκτόνο. Χρησιμοποιείται για μια μεγάλη γκάμα ασθενειών πολλών φυτών, όπως το φουζικλάδιο της μηλιάς, τις σκωριάσεις σε πολλά καλλωπιστικά και κηπευτικά φυτά και τις σεπτορίώσεις (Ζιώγας και Μαρκογλου, 2010).

Το chlorothalonil δε διαθέτει εξειδικευμένο μηχανισμό δράσης, και αναφέρεται ως πολλαπλής δράσης μυκητοκτόνο. Συγκεκριμένα, έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τη δράση ενζύμων στις αντιδράσεις αναπνοής και ενζύμων που περιέχουν θειόλες, οι οποίες συμβάλουν στην κυτταρική αναπνοή. Το chlorothalonil αντιδρά με τη θειόλη και σχηματίζει παράγωγα γλουταθειόνης που έχουν την ιδιότητα μυκητοκτόνου (Long *et al.*, 1973; Malathrakis, 1989).

Τα μυκητοκτόνα που λειτουργούν ως αναστολείς απομεθυλίωσης (DMI-DeMethylation Inhibitors) κάναν την πρώτη τους εμφάνιση στα μέσα της δεκαετίας του 70'. Σήμερα γίνεται ευρεία χρήση τους σε ποσοστό που αντιστοιχεί στα ένα τρίτο όλων των προστατευτικών μυκητοκτόνων που χρησιμοποιούνται (Brent and Hollomon, 2007; Ribas *et al.*, 2016).



Τα συγκεκριμένα μυκητοκτόνα δρουν παρεμποδιστικά της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης, όπου αποτελεί σημαντικό συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων (Brent and Hollomon, 2007). Αυτά δρουν παρεμβαίνοντας στο ένζυμο 14-α απομεθυλάση του κυτοχρώματος P450 που εμπλέκεται στη μετατροπή της λανοστερόλης σε 4,4-dimethylcholesta-8 (9), 14,24-τριεν-3β –όλη. Με αυτόν τον τρόπο το ένζυμο αυτό πληθαίνει και δρα ανασταλτικά στη δρατικότητα του κυτοχρώματος. Τα κυτοχρώματα παράγουν φωσφολιπίδια, τα οποία που συμβάλουν στη δομή των μυκήτων. Έτσι η απουσία της εργοστερόλης και η αύξηση των ενδιάμεσων ενώσεων δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη μυκήτων (Becher and Wirsal, 2012).

Οι αζόλες, και ιδιαίτερα οι τριαζόλες δρουν με προληπτικό ή και θεραπευτικό τρόπο σε πολλές περιπτώσεις ασθενειών, αναστέλλοντας τη μυκηλιακή ανάπτυξη και το σχηματισμό βλαστικού σωλήνα στα σπόρια πολλών μυκήτων (Pontzen and Scheinrflug ,1989; Leroux *et al.*, 1999). Οι περισσότερες τριαζόλες έχουν υπολειπόμενη περίοδο περίπου 14 ημερών και παρουσιάζουν μακροπρόθεσμη σταθερότητα (Ribas *et al.*, 2016).

## **1.2. Ανθεκτικότητα μυκήτων σε μυκητοκτόνα**

Πολλές μελέτες κάνουν λόγο για την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα ή δραστικές ουσίες και αναφέρεται όταν ένα σύνολο ατόμων ενός παθογόνου δεν ανταποκρίνεται στη χρήση τους. Αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα που έχει προκύψει από την αλόγιστη ή την αποκλειστική χρήση συγκεκριμένων δραστικών ουσιών από μεριά των παραγωγών, δημιουργώντας έτσι ανθεκτικά στελέχη (Brent and Hollomon, 2007).

Ανθεκτικότητα μπορεί να σημειωθεί ύστερα από τη μετάλλαξη του στόχου της δραστικής ουσίας. Ο στόχος αυτός μπορεί να είναι σημείο μιας πρωτεΐνης (ένζυμο). Στην περίπτωση αυτή το αμινοξύ που αποτελεί μέσο πρόσδεσης για το μυκητοκτόνο αλλάζει εξαιτίας μετάλλαξης του γονιδίου που εκφράζει την πρωτεΐνη. Η λειτουργικότητα της πρωτεΐνης δεν επηρεάζεται, κι έτσι το μυκητοκτόνου παύει να δρα. Αυτού του είδους η ανθεκτικότητα που αναπτύσσεται είναι και η πιο κοινή (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992; Brent and Hollomon, 2007).

Άλλος ένας σημαντικός τρόπος εμφάνισης ανθεκτικότητας είναι η μετατροπή του μυκητοκτόνου από τα κύτταρα σε μη τοξική μορφή. Στην περίπτωση αυτή, συνήθως τα ένζυμα του μεταβολισμού των κυττάρων απεκκρίνουν το φάρμακο, μέσω της μετατροπής τους από λιπόφυλλα μόρια σε υδατοδιαλυτά (Chen, 2007). Κύριος μηχανισμός αντίστασης σε μυκητοκτόνα είναι η υπερέκφραση που εμφανίζεται από το στόχο δράσης του μυκητοκτόνου. Εδώ ο βιοχημικός στόχος μεταβάλλεται είτε ποσοτικά είτε ποιοτικά. Ποσοτικά, στο στάδιο της μεταγραφής του γονιδίου όπου κωδικοποιεί το στόχο δράσης, ο υποκινητής επεκτείνεται κι έτσι εμφανίζεται αυξημένος αριθμός του στόχου δράσης. Αντίστοιχα λειτουργεί και σε ποιοτικό επίπεδο, χωρίς όμως την αύξηση του υποκινητή (Schnabel and Jone, 2001).

Ένας ακόμα τρόπος εμφάνισης ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα είναι η απομάκρυνση του μυκητοκτόνου από τη θέση στόχου δράσης του. Αυτό συμβαίνει λόγω της αυξημένης κυτταρικής δράσης ώστε τα μόρια του φαρμάκου να απομακρύνονται (Leroux *et al.*, 1989; Brent and Holleman, 1998; Leroux *et al.*, 1999; Genet *et al.*, 2009; Kretscmer *et al.*, 2009). Διαμεμβρανικοί μεταφορείς που σχετίζονται με την υπερέκκριση των κυττάρων είναι οι ABC και οι MFS. Η απέκκριση μπορεί να αφορά τα μόρια ενός ή περισσοτέρων μυκητοκτόνων. Στην περίπτωση των περισσότερων του ενός μυκητοκτόνου αναφερόμαστε σε πολυμορφική ή πολυτροπική εμφάνιση ανθεκτικότητας (MDR ή PDR) (Leroux *et al.*, 1989; Deising *et al.*, 2008; Genet *et al.*, 2009; Kretscmer *et al.*, 2009). Επιπλέον τρόπος ανάπτυξης ανθεκτικότητας είναι η μεταβολή του βιοχημικού στόχου του φαρμάκου, ώστε τα κύτταρα στόχοι υποστηρίζουν εναλλακτικούς μηχανισμούς που διαθέτουν για την σωστή λειτουργία τους (Ziogas *et al.*, 1997).

### **1.3. Ανθεκτικότητα του μύκητα *Mycosphaerella graminicola* σε μυκητοκτόνα**

Ο τρόπος δράσης τους των φυτοπροστατευτικών προϊόντων είναι γνωστός σήμερα σχεδόν εξ ολοκλήρου. Σημαντική εξέλιξη των φυτοφαρμάκων σημειώνεται κατά τα τελευταία χρόνια όμως η κατά κόρον χρήση τους οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Συγκεκριμένα για την ασθένεια σεπτορίωση του

σίτου έχει σημειωθεί ανθεκτικότητα (Ζιώγας 2010; HGCA, 2012) από τα μέσα της δεκαετίας του 80'. Εκείνη τη χρονική περίοδο ξεκίνησε να σημειώνεται ανθεκτικότητα του παθογόνου στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, ενώ ακολούθησε τη δεκαετία του 90' ανθεκτικότητα στα DMIs μυκητοκτόνα που επιδεινώθηκε κατά την προηγούμενη δεκαετία μαζί με την εμφάνιση ανθεκτικότητας στελεχών στις στρομπιλουρίνες (QoI's). Σήμερα χρησιμοποιούνται περισσότερο αζόλες σε σχέση με άλλες δραστικές ουσίες όπως το eroxiconazole και το prothioconazole με καλή δράση στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μυκήτων (HGCA, 2012).

#### **1.4. Μελέτη γενετικής ποικιλομορφίας μυκήτων**

Η εμφάνιση της ανθεκτικότητας πολλών δραστικών ουσιών στην αντιμετώπιση πολλών φυτοπαθογόνων μυκήτων, είναι ένας βασικός παράγοντας για τη διαχείριση και τον έλεγχο των ασθενειών (Ma and Micheilides, 2005). Προκειμένου να ελεγχθεί η εμφάνιση ανθεκτικότητας των μυκήτων στις δραστικές ουσίες και να μελετηθεί η γενετική βάση της ανθεκτικότητας, έχουν αναπτυχθεί μοριακές μέθοδοι ελέγχου με μεγάλη επιτυχία στη χρήση τους (Beckerman, 2013).

Σύμφωνα με τη FRAC οι τεχνικές για τη μελέτη της ανθεκτικότητας θα πρέπει να μπορούν να επαναληφθούν φέροντας τα ίδια αποτελέσματα στις επαναλήψεις των πειραμάτων που περατώνονται. Επίσης θα πρέπει να είναι απλές στην εφαρμογή τους, οικονομικά προσιτές, αξιόπιστες και να φέρουν αποτέλεσμα σε σύντομο χρονικό διάστημα (FRAC Monitoring Methods, 2009; Vincelli and Tisserat, 2008). Ορισμένες από αυτές τις μεθόδους είναι οι δοκιμές που σχετίζονται με τον έλεγχο βλάστησης σπορίων με σημειακή εναπόθεση, την ανάπτυξη μυκηλίου ή τη μέτρηση του βλαστικού σωλήνα του εξεταζόμενου μύκητα, σε θρεπτικό υπόστρωμα με γνωστή συγκέντρωση μυκητοκτόνου (Beyer *et al.*, 2001).

Η μέθοδος βιοδοκιμής με χρήση πλάκας μικροτιτλοδότησης (microtiter test) αποτελεί μια σύγχρονη τεχνική βιοδοκιμής στην οποία μελετάται η ανθεκτικότητα ή η ευαισθησία πλήθους μυκήτων σε δραστικές ουσίες. Χαρακτηρίζεται ως ακριβής, με καλή επαναληψιμότητα, γρήγορη, με σημαντικά

πλεονεκτήματα έναντι άλλων μεθόδων όπως η μέτρηση βλαστικού σωλήνα (Stammler and Speakman, 2006).

Η μέθοδος περιγράφεται από την FRAC και βασίζεται στη μέτρηση της ανάπτυξης μυκηλίου μέσω της απορρόφησης του φωτός σε φασματοφωτόμετρο. Στα βοθρία της πλάκας μικροπιλοδότησης αναμιγνύεται αιώρημα σπορίων της υπό εξέταση απομόνωσης του μύκητα με διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης μυκητοκτόνου. Μετά από επώαση για την ανάπτυξη του και σε συγκεκριμένες συνθήκες, γίνεται μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο (Pijls *et al.*, 1994). Κατά την επώαση, οι πλάκες σφραγίζονται για να αποφευχθεί η εξάτμιση των διαλυμάτων από τα βοθρία (Stergiopoulos *et al.*, 2003). Μια προσαρμοσμένη καμπύλη δόσης-απόκρισης (EC50) που υπολογίζεται με ανάλυση Probit, στην πορεία μας οδηγεί σε συμπέρασμα (Pijls *et al.*, 1994). Το EC50 ορίζεται ως εκείνη τη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου, η οποία είναι ικανή να παρεμποδίσει την ανάπτυξη του εξεταζόμενου μύκητα στο 50% σε σχέση με το μάρτυρα (Chen *et al.*, 2007 ; Rekanonić, *et al.*, 2010). Πολλές φορές υπολογίζεται και ο συντελεστής ανθεκτικότητας (RF, Resistance Factor), για την κατάταξη των απομονώσεων που εξετάζεται η ανθεκτικότητά τους, σε ανθεκτικές, μετρίως ανθεκτικές και ευαίσθητες (Milgate *et al.*, 2016 Gouot, 1994). Το RF ισούται με το λόγο του EC50 της εξεταζόμενης απομόνωσης προς το EC50 της ευαίσθητης απομόνωσης του ίδιου μύκητα (Rekanonić *et al.*, 2010).

Για την ανίχνευση και την κατάταξη ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών έχουν χρησιμοποιηθεί μοριακές μέθοδοι με κυρίαρχη αυτήν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Η PCR είναι μια αξιόπιστη μοριακή μέθοδος που έχει σαν αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένης περοχής γονιδιώματος, του υπό εξέταση οργανισμού, σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων, ώστε να είναι δυνατή η παρατήρησή τους (Guyer and Koshland, 1989; Williams *et al.*, 1990; Hoelzel, 1998). Απαιτείται κατάλληλο ζεύγος εκκινητών της περιοχής DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται η μέθοδος τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPID Random Amplified Polymorphic DNA), εργαλείο μελέτης γενετικής παραλλακτικότητας (Williams *et al.* 1990). Είναι ένα χρήσιμο εργαλείο της γενετικής μιας και χαρακτηρίζεται από την ευαισθησία και την εξειδίκευσή της

(Doohan *et al.* 1998). Η διαφορά της με την απλή PCR είναι ότι στη RAPD δε χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών αλλά απλοί εκκινητές ολιγάριθμων βάσεων, που έχουν τη δυνατότητα να υβριδίζουν σε πολυάριθμες θέσεις του γονιδιώματος τυχαία, καθώς θα υβριδίσουν σε διαφορετικές θέσεις στο γονιδίωμα συγγενικών οργανισμών (ίδιου είδους π.χ.) εξαιτίας των μεταλλάξεων που έχουν συσσωρευτεί σε αυτούς τους οργανισμούς (Williams *et al.*, 1990; McDonald, 1997; Kumar and Gurusubramanian, 2011).

Οι δείκτες RAPDs χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας (McDonald, 1997; Iqbal *et al.*, 2010; Mofokeng, 2012) και τη γενετική απεικόνιση των ειδών με σκοπό το διαχωρισμό τους για την περαιτέρω μελέτη τους (Williams *et al.*, 1990; Welsh and McClelland, 1990; Younes 2010). Αυτή η τεχνική έχει εφαρμογή στη διαφοροποίηση μεταξύ των απομονώσεων μυκήτων (Midorikawa *et al.*, 2008) αλλά και τη συσχέτιση της διαφοροποίησης γενοτύπων μέσω της μεθόδου αυτής με την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών σε ομάδες μυκητοκτόνων (Paplomatias *et al.*, 2004). Επιπλέον μοριακή μέθοδος που χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό είναι η μέθοδος ISSR ή SSR (Wang *et al.*, 2005).

### 1.5. Εναέριο μόλυσμα

Βασική παράμετρος για τη μελέτη της επιδημιολογίας είναι το εναέριο μόλυσμα, για τα παθογόνα που μεταδίδονται με αερομεταφερόμενο μόλυσμα, μιας και είναι υπεύθυνο για τις πρωταρχικές μολύνσεις. Τα ασκοσπόρια μπορούν να μεταφέρονται μέσω του αέρα σε μακρινές αποστάσεις (Wiese, 1991; Bockus *et al.*, 2010). Έχει παρατηρηθεί ότι ο αριθμός των ασκοσπόρια μπορεί να αυξηθεί σταδιακά από το στάδιο GS32 των φυτών μέχρι τη συγκομιδή (Hunter *et al.*, 1999). Υπό κατάλληλες συνθήκες τα ασκοσπόρια του μύκητα *M. graminicola* μπορεί να ανιχνευθούν όλο το χρόνο (Kema *et al.*, 1996b)

Ένας από τους τρόπους παγίδευσης εναέριων μολυσμάτων αποτελεί η παθητική δειγματοληψία κατά την οποία γίνεται χρήση παγίδων που περιέχουν προσκολλητικό μέσο όπου προσγείνονται σε αυτό το υλικό με τη βοήθεια της βαρύτητας. Τέτοιες είναι οι παγίδες βαρύτητας, οι τύπου Andersen, οι κασέτες

φίλτρων (Air-O-Cell, MCE, Allergenco air samplers, Membrane filter) και οι καθίζησης (Wang *et al.*, 2007; Bayliss and Jackson, 2011).

Υπάρχουν παγίδες που λειτουργούν με αναρρόφηση, κατά τις οποίες τα σπόρια προσκρούουν μέσω της ροής του αέρα σε μια μικρή επιφάνεια που περιέχει ένα μέσο συλλογής (Fox, 1993). Άλλοι μέθοδοι παγίδευσης σπορίων αποτελούν οι παγίδες τύπου Hirst, οι οποίες παγιδεύουν σπόρια που βρίσκονται σε δεδομένο όγκο αέρα (Burkard Manufacturing Company Ltd), παγίδες μικροτιλοδότησης που βασίζονται στο τρόπο λειτουργίας των παγίδων τύπου Hirst (Kennedy *et al.*, 2000) και ιοντικές παγίδες σπορίων (Schneider *et al.*, 2009). Στη συγκεκριμένη παγίδα μεταδίδεται ηλεκτροστατικό φορτίο υψηλής τάσης στον αέρα. Τα φορτισμένα σωματίδια που υπάρχουν εναέρια έλκονται και συλλέγονται από αντίστοιχο στέλεχος συλλογής που βρίσκεται εντός της. Η παγίδα αυτή είναι υποψήφια για το δίπλωμα ευρεσιτεχνίας και η διαφορά του με τις άλλες παγίδες είναι η επεξεργασία μεγάλου όγκου αέρα και η σύλληψη σωματιδίων μεγέθους νανομέτρου. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων βασίζεται στην εφαρμογή qPCR, με χρήση αντιορού και με μικροσκοπική παρατήρηση (φωτός και σάρωσης ηλεκτρονίων) (DS Scientific, 2011).

Η παγίδα με πλάκα μικροτιλοδότησης (συσσκευή MTIST), χρησιμοποιεί ένα σύστημα αναρρόφησης του αέρα. Σε αυτό τα σωματίδια του αέρα προσκρούουν στα βοθρία μιας πλάκας μικροτιλοδότησης, η οποία έχει τοποθετηθεί στη συσκευή. Αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταχεία ανίχνευση μέσω της τεχνικής της ανοσοκαθήλωσης και να προσδιοριστεί με τη μέθοδο της ELISA (Kennedy *et al.*, 2000).

Οι παγίδες τύπου Hirst, βασίζονται στην αναρρόφηση αέρα σε θάλαμο με τη βοήθεια ενσωματωμένης αντλίας. Η συσκευή τοποθετείται αντίθετα της φοράς του ανέμου, ενώ υπάρχει και εξάρτημα για προστασία από τη βροχή. Ο αέρας με τα αιωρούμενα σωματίδια που φέρει, προσκρούει σε περιστρεφόμενο τύμπανο το οποίο είναι επικαλυπτόμενο με μια κολλώδη επιφάνεια όπου και εκεί προσκολλώνται. Η παγίδα λειτουργεί με μπαταρία που έχει τάση 12 volt και διαθέτει έναν ωρολογιακό μηχανισμό που ρυθμίζει το χρόνο εφαρμογής της. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να λειτουργήσει από 24 ώρες μέχρι και 7 ημέρες.

Μετά τη συλλογή των σπορίων γίνεται μικροσκοπική παρατήρηση ή εφαρμογή μοριακών τεχνικών για τον προσδιορισμό τους (Jenkyn, 1974; Kennedy *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 2009).

Για την ανίχνευση και την αναγνώριση αερομεταφερόμενου μολύσματος μπορεί να γίνει χρήση μικροσκοπίου αλλά και ποσοτικές μέθοδοι ανάλυσης, όπως είναι οι ανοσολογικές και οι μοριακές τεχνικές (PCR). Οι διάφοροι τύποι παγίδες, χρησιμοποιούνται λαμβάνοντας υπόψη μας ορισμένες παραμέτρους. Αυτοί είναι το μέγεθος, ο αριθμός και το είδος των σπορίων που μελετώνται ανάλογα με την ώρα της ημέρας, τον καιρό, την εποχή και τη γεωγραφική θέση στην οποία η παγίδα τοποθετείται. Ως εκ τούτου, η γεωγραφική θέση, ο χρόνος εφαρμογής δειγματοληψία και η διάρκεια της πρέπει να εξεταστούν πολύ προσεκτικά για να εξασφαλιστεί η λήψη αντιπροσωπευτικού δείγματος. Επιπλέον, ο τύπος της συσκευής δειγματοληψίας που χρησιμοποιείται αποτελεί σημαντική παράμετρος όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της δειγματοληψίας και τη μορφή της ανάλυσης που αναμένεται. Τελικά οι παγίδες εναερίου μολύσματος αποτελούν έναν αξιόλογο τρόπο πρόβλεψης ή ανίχνευσης αερομεταφερόμενων μολυσμάτων για την γεωργική δραστηριότητα και βοηθά σημαντικά στην ανάπτυξη στρατηγικών για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου μιας σοβαρής πανδημίας (Jackson and Bayliss 2011; Wang *et al.* , 2007).

## 1.6. Σκοπός διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής υπήρξε η μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας με ιδιαίτερη έμφαση στην ανθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα και η μελέτη επιδημιολογίας της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *Mycosphaerella graminicola*. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της βιοδοκιμή για τη μελέτη ανθεκτικότητας απομονώσεων του παθογόνου σε πλάκες μικροτιτλοδότησης. Στην πορεία εξετάστηκε η γενετική ποικιλομορφία απομονώσεων του μύκητα με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης (PCR), με χρήση RAPDs εκκινητών. Τέλος διερευνήθηκε η ανίχνευση εναερίου μολύσματος (ασκοσπορίων) του μύκητα, την άνοιξη του 2016 στην περιοχή της Θεσσαλίας (Βελεστίνο). Στην ίδια περιοχή εξετάστηκε και η επιδημιολογία του μύκητα με βάση το ποσοστό προσβολής και την εμφάνιση πυκνιδίων σε αγρό που πραγματοποιήθηκε χημική επέμβαση και σε βιολογικό αγρό. Τα πειράματα που διεξήχθησαν, αποσκοπούσαν στη μελέτη της αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνων *in vitro* και *in vivo*, στην αντιμετώπιση της ασθένειας σεπτορίωσης του σίτου.



## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1. Συλλογή δειγμάτων

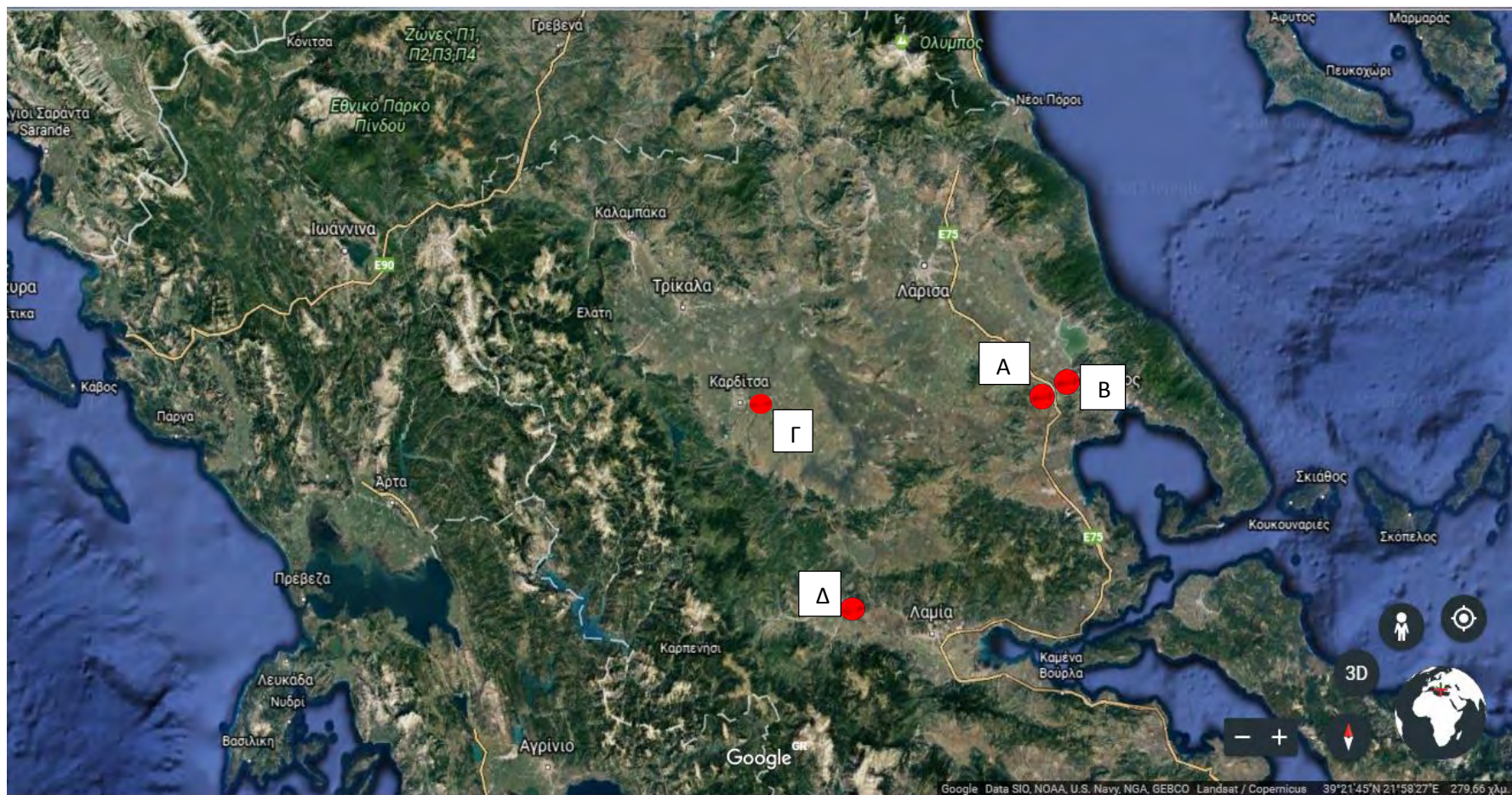
Η διαδικασία συλλογής δειγμάτων πραγματοποιήθηκε τους μήνες Μάρτιο, Απρίλιο και Μάιο, του έτους 2016. Τα δείγματα ήταν φύλλα σίτου που έφεραν κηλίδες με καστανό μεταχρωματισμό, με ευδιάκριτο το σχηματισμό πυκνιδίων (Εικ. 1). Συνολικά συλλέχθηκαν 53 δείγματα από 4 αγρούς, όπως φαίνονται στο χάρτη (Εικ. 2). Τα φύλλα από τα οποία πραγματοποιήθηκε απομόνωση του μύκητα προήλθαν από αγρούς που είχαν πραγματοποιηθεί χημικές επεμβάσεις, αγρούς που δεν πραγματοποιήθηκαν χημικές επεμβάσεις με μυκητοκτόνα και αγρούς που δεν υπάρχουν πληροφορίες για τις επεμβάσεις που πιθανόν έγιναν (Πιν.1).

Μετά τη μεταφορά των δειγμάτων στο χώρο του εργαστηρίου, έγινε στερεοσκοπική παρατήρηση. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με μεταφορά των σπειραμάτων πυκνιδιοσπορίων, με τη βοήθεια βακτηριολογικής βελόνης, σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA) (Sambrook *et al.*, 1989). Στην περίπτωση που δεν είχαν σχηματιστεί σπειράματα από τα πυκνίδια, τα φύλλα τοποθετούνταν σε υγρό θάλαμο για 24-52 h, έως την εμφάνιση συσσωμάτων των πυκνιδιοσπορίων.

Για το σχηματισμό συσσωματώματος πυκνιδιοσπορίων τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε αυτοσχέδιους υγρούς θαλάμους, ως ακολούθως: Η κηλίδα του φύλλου που έφερε εμφανή σημεία (πυκνίδια) τοποθετήθηκε σε απολυμασμένη αντικειμενοφόρο πλάκα και στερεώθηκε με χρήση κολλητικής ταινίας.



**Εικόνα 1.** Σεπτορίωση σε φύλλο σίτου.



**Εικόνα 2.** Περιοχές όπου πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες για συλλογή προσβεβλημένων φυτών σίτου με σεπτορίωση. Περιοχή Α:Βελεσίτινο Ν. Μαγνησίας, Περιοχή Β: Στεφανοβίκειο Ν. Μαγνησίας, Περιοχή Γ: Σταυρός Ν. Λαρίσης, Περιοχή Δ: Καστρί Ν. Φθιώτιδας.

**Πίνακας 1.** Περιοχές δειγματοληψίας ασθενών φυτών σίτου από σεπτορίωση. Δίνονται οι εφαρμογές που έγιναν σε κάθε αγρό, η περιοχή συλλογής όπως φαίνεται στην Εικόνα 1 και ο κωδικός της κάθε απομόνωσης που προέκυψε από την κάθε περιοχή.

Χημικές επεμβάσεις	Περιοχή συλλογής	Κωδικός απομόνωσης
<b>Όχι</b>	<b>A</b>	C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26, C27 C28, C29, C30, C31, C32, C33, CA, CB, CG
<b>Ναι</b>	<b>A</b>	M1, M2, M3, M1.1., M1.2., M1.3., M1.4.
	<b>Δ</b>	K1, K2, K3
<b>Άγνωστο</b>	<b>B</b>	6.1., 6.2., 6.3., 6.4.
	<b>Γ</b>	Σ1, Σ3, Σ4, Σ5, Σ7

Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε, πάνω σε πλαστικά υποστηρίγματα, εντός τρυβλίου Petri που έφερε στη βάση του αποστειρωμένο απιονισμένο νερό, κατά τρόπο ώστε ο ιστός να μην έρχεται σε επαφή με το νερό. Τα τρυβλία διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 24-52 h, έως την εμφάνιση πυκνιδιοσπορίων, τα οποία μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υπόστρωμα PDA, με τη βοήθεια βακτηριολογικής βελόνης και παρέμειναν σε θάλαμο θερμοκρασίας 25 °C.

Τα τρυβλία που αρχικά μεταφέρθηκαν τα σπειράματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία 25 °C. Κατόπιν έγινε μεταφορά μέρος του μυκηλίου (όταν η αποικία είχε μέγεθος 5 mm) σε δοκιμαστικό σωλήνα.

### **2.1.1. Ταυτοποίηση απομονώσεων μύκητα από φυτά σίτου με συμπτώματα σεπτορίωσης**

Από όλες τις απομονώσεις που διεξήχθησαν, έγιναν παρασκευάσματα, των οποίων τα σπόρια παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά. Συγκεκριμένα έγινε χρήση σύνθετου οπτικού Nikon Labophot-2 EFD3, από το οποίο τα σπόρια φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και σε μεγέθυνση 200X. Με τη χρήση του λογισμικού Motic Images Plus 2.0. (MOTIC, BA310), μετρήθηκαν οι διαστάσεις των σπορίων, με σκοπό την ταυτοποίηση του μύκητα με τη βοήθεια των μορφολογικών χαρακτηριστικών των σπορίων, όπως αυτά περιγράφονται βιβλιογραφικά.

### **2.1.2. Απομόνωση ολικού DNA από απομονώσεις του μύκητα *Mycosphaerella graminicola***

Για την απομόνωση του ολικού DNA από τις 53 απομονώσεις του μύκητα, αρχικά έγινε υγρή καλλιέργεια. Ο καθαρισμός του DNA βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Doyle and Doyle (1990). Σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα PDB (Potato Dextrose Broth) (Sambrook *et al*, 1989) και υπό στείρες συνθήκες, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός τμήματος της αποικίας που είχε αναπτυχθεί σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια οι υγρές καλλιέργειες μεταφέρθηκαν και επωάστηκαν σε επωαστικό θάλαμο με περιστρεφόμενη βάση, σε θερμοκρασία 25 °C και σε 150 στροφές/min για περίπου 10 ημέρες.

Ακολούθως η υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στα 3169 g για 40 min, από το σωλήνα φυγοκέντρωσης απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα στέγνωσε με τη βοήθεια αποστειρωμένου διηθητικού χαρτιού. Από το ίζημα ζυγίστηκαν 200mg του μυκηλίου, τα οποία μεταφέρθηκαν σε σωληνίσκους φυγοκέντρωσης. Σε αυτά έγινε προσθήκη 400μl διαλύματος εξαγωγής (CTAB-60 mL απιονισμένο νερό, 2 g hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), 28 mL NaCl 5M, 4 mL διαλύματος Disodium Ethylenediaminetetraacetate, 2 H<sub>2</sub>O (EDTA) 0,5M, 5 mL Tris HCl, 0,2 mL 2-mercaptoethanol) και 25mg Polyvinylpyrrolidone (PVP) 25, ο ιστός ομογενοποιήθηκε με τη βοήθεια micropestle και παρέμεινε για 25 min στους 60 °C. Ακολούθως προστέθηκαν 200μl φαινόλης και 200μl χλωροφορμίου. Με ανάδευση για 1 min προέκυψε

αιώρημα με μορφή γαλακτώματος, το οποίο φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 17500 g. Μετά τη φυγοκέντρηση, 200 ml του υπερκείμενου μεταφέρθηκαν σε νέο μικροσωληνίσκο, όπου και έγινε προσθήκη 1/2 του όγκου του 5M NaCl (Sambrook *et al*, 1989) και 2 φορές του όγκου του αιθυλική αλκοόλη (EtOH) 95% με ανάδευση κάθε φορά. Το μείγμα παρέμεινε στους -20 °C για 18 ώρες.

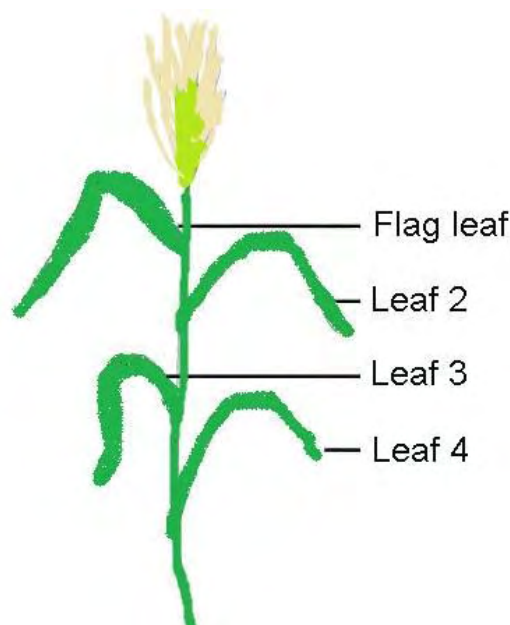
Επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση του μείγματος για 10 min στις 17500 g. Μετά τη φυγοκέντρηση έγινε απόρριψη της υπερκείμενης φάσης και προσθήκη αιθυλικής αλκοόλης 70%. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 min στις 17500 g και κατόπιν απόρριψη της αιθυλικής αλκοόλης που είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ιζήματος (*pellet*). Ακολούθησε παραμονή τους σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20-30 min και μετά την εξάτμιση της αιθυλικής αλκοόλης, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 50-100 ml υπερκάθαρου νερού, αναλόγως το μέγεθος του ιζήματος κάθε δείγματος. Τα δείγματα αναδεύτηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Μετά την εξαγωγή του ολικού DNA, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο (Unikon Spectrophotometer 922, Kontron instruments) και απορροφήσεις 260 και 280nm. Η καθαρότητα τους απορρέει από το λόγο των δύο αυτών απορροφήσεων και οι αποδεκτές τιμές καθορίζονται μεταξύ των τιμών 1,8 και 2, ενώ η ποσότητα DNA προκύπτει από το 1000πλάσιο της τιμής που εμφανίζεται στα 260nm (Sambrook *et al.*, 1989).

## **2.2. Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνων σε φυσικές μολύνσεις καλλιέργειας σίτου**

Στο αγρόκτημα του αγροκτήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σπάρθηκε σιτάρι σε 18 πειραματικά τεμάχια το μήνα Νοέμβριου του 2015 (Διάγρ. 1). Στα 6 πειραματικά τεμάχια πραγματοποιήθηκε εφαρμογή μυκητοκτόνου που περιείχε μίγμα των δραστικών ουσιών *epoxiconazole* και *pyraclostrobin* στις 8 Μαρτίου του έτους 2016, στη συνιστώμενη δόση (200 ml/στρέμμα). Μετά από 22 ημέρες αργότερα παρατηρήθηκαν οι πρώτες κηλίδες από φυσικές μολύνσεις και στις 14 Απριλίου συλλέχθηκαν φύλλα στα οποία και παρατηρήθηκε σχηματισμός πυκνιδίων σε προσβεβλημένους ιστούς και

διεξήχθη η απομόνωση και καλλιέργεια του μύκητα. Στις 27 Απριλίου έγινε συλλογή και παρατήρηση 20 φυτών σίτου από κάθε πειραματικό τεμάχιο και τα οποία βρίσκονταν στο στάδιο GS70-79 κατά Zadoks Growth Stage (Poole, 2005). Τα φυτά προήλθαν από το κέντρο του κάθε πειραματικού τεμαχίου και τα φύλλα που αξιολογήθηκαν ήταν τα φύλλα σημαίας (Flag Leafs-FL), τα δεύτερα (Leaf 2-L2), τα τρίτα (Leaf 3-L3) και τα τέταρτα φύλλα (Leaf 4-L4) κάθε φυτού (Εικ. 3). Τα συλλεχθέντα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για να αξιολογηθεί η επίδραση του μυκητοκτόνου σε φυσικές μολύνσεις. Οι μετρήσεις αφορούσαν α) μέγεθος κηλίδων, β) αριθμό πυκνιδίων που σχηματίστηκαν στις κηλίδες, στα 4 ανώτερα φύλλα του φυτού.



**Εικόνα 3.** Γραφική απεικόνιση των φύλλων από φυτό σίτου.

Για τη διεξαγωγή των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των δεδομένων με το στατιστικό πακέτο SPSS (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0).

Τέλος από αυτά τα δείγματα έγινε και συλλογή απομονώσεων όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1., για να διαπιστωθεί εάν αυτές οι απομονώσεις είχαν αναπτύξει ανθεκτικότητα στις συγκεκριμένες δραστικές.

C	M	C
C	C	M
C	M	C
C	C	M
C	M	C
C	C	M

**Διάγραμμα 1.** Διάγραμμα της διάταξης των πειραματικών τεμαχίων για την αξιολόγηση αποτελεσματικότητας δραστικών ουσιών για την αντιμετώπιση της σεπτορίωσης του σίτου.

### 2.3. Παγίδευση εναερίου μολύσματος

Για την ανίχνευση εναερίου μολύσματος ασκοσπορίων του μύκητα *Mycosphaerella graminicola* έγινε τοποθέτηση αυτοσχέδιας παγίδας σε αγρό. Συγκεκριμένα, η εγκατάστασή της έγινε στην περιοχή του Βελεσίνου Μαγνησίας, στο κέντρο του πειραματικού αγρού που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση δραστικών ουσιών για την αντιμετώπιση τη σεπτορίωσης του σίτου (παράγραφος 2.2).

Η παγίδα είχε ως βάση της κυλινδρικό πλαστικό δοχείο όγκου 5,4 L, στο οποίο είχε προσαρμοστεί ένα σύστημα αναρρόφησης που προήλθε από σκούπα αυτοκινήτου. Ο μηχανισμός λειτουργούσε με τη χρήση μπαταρίας αυτοκινήτου και εισερχόμενος αέρας προσέπιπτε σε πλαστικό δοχείο (όγκου 500 mL), το οποίο περιείχε νερό όγκου 25ml (Εικ. 4).

Στο υδατικό αιώρημα (στο οποίο είχαν παγιδευτεί πιθανόν και σπόρια μυκήτων) προστίθονταν ίσος όγκος αιθυλικής αλκοόλης (EtOH) 100%. Η



αποθήκευσή τους έγινε στους 4 °C σε κωνικά σωληνάρια φυγοκέντρου Falcon χωρητικότητας 25 ml, μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας. Η παγίδα τοποθετήθηκε στο χωράφι τους μήνες Μάρτιο και Απρίλιο πέντε φορές κατά τις πολύ πρωινές ώρες.

Πριν την επεξεργασία και τη μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων, για την ανίχνευση σπορίων του μύκητα, πραγματοποιήθηκε δοκιμή επεξεργασίας αιωρήματος σπορίων από καλλιέργεια του μύκητα *M. graminicola*. Το αιώρημα γνωστής συγκέντρωσης, φυγοκεντρήθηκε αρχικά για 40 min στα 3169 g.



**Εικόνα 4.** Αυτοσχέδια παγίδα εναερίου μολύσματος.

Στη συνέχεια το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε διαφορετικό σωλήνα φυγοκέντρωσης για δεύτερη φυγοκέντρωση. Τα ιζήματα που δημιουργήθηκαν μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια φυγοκέντρωσης μικρότερης χωρητικότητας όπου φυγοκεντρήθηκαν ξανά για 10 min στα 1.400rpm (21.000 g). Ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση του ιζήματος. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και για μικρότερους χρόνους φυγοκέντρωσης.

#### 2.4. Έλεγχος ανθεκτικότητας δραστικών ουσιών *in vitro*

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας σε ομάδες μυκητοκτόνων χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά σκευάσματα με τις δραστικές ουσίες proiconazole, azoxistrobin, chlorothalonil και procloraz και ενός μίγματος με δραστικές ουσίες το eroxiconazole και το pyraclostrobin, που ανήκουν αντίστοιχα στις ομάδες αζολών, στρομπιλουρινών και χλωροφαινιλίων. Χρησιμοποιήθηκε μία δραστική ουσία ανά ομάδα μυκητοκτόνων. Οι συγκεκριμένες δραστικές ουσίες είναι εγκεκριμένες από το Υπουργείο Γεωργίας και Αγροτικού Περιβάλλοντος για χρήση στην καλλιέργεια σίτου και επίσης χρησιμοποιούνται συχνά από τους παραγωγούς. Ακολούθησε αραίωση των δραστικών ουσιών σε συγκεντρώσεις 10, 1, 0,1, 0,01 και 0,001 mgL<sup>-1</sup>. Οι αραιώσεις έγιναν με θρεπτικό υπόστρωμα PDB.

Ο *in vitro* έλεγχος των απομονώσεων του μύκητα *Mycosphaerella graminicola* πραγματοποιήθηκε βάση πρωτοκόλλου της FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) (Sierotzki H., 2006; Stammler *et al.*, 2008). Ο μύκητας καλλιεργήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα. Για το υγρό αιώρημα σπορίων, πάνω στην αποικία του παθογόνου στο δοκιμαστικό σωλήνα, γινόταν προσθήκη 5 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος PDB και με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου έσπαγαν τα πυκνίδια (μετά από πίεση) και ελευθερώνονταν τα πυκνιδιοσπόρια.

Σε αποστειρωμένα γυάλινα φιαλίδια προσαρμόζονταν αποστειρωμένο χωνί, στο άνοιγμα του οποίου εναποτίθονταν αποστειρωμένο τουλπάνι για να κατακρατούνται τα θραύσματα μυκηλίου και πυκνιδίων που είχαν προκύψει από την παρασκευή του αιωρήματος. Η συγκέντρωση των σπορίων μετρούνταν με τη βοήθεια του αιματοκυττόμετρου (Neubauer, Rhône-Poulenc). Η τελική συγκέντρωσή τους ήταν 5x10<sup>4</sup> σπόρια/ml και ο καθορισμός της επιτυχάνονταν με αραίωση του αρχικού αιωρήματος.

Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοδότησης έγινε δοκιμή αποτελεσματικότητας των δραστικών ουσιών σε μία απομόνωση και σε τρεις επαναλήψεις κάθε συγκέντρωσης μυκητοκτόνου, στην οποία προστέθηκε και αιώρημα σπορίων όπως φαίνεται στο διάγραμμα 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	PDB	Prop	Proch	Erox	Erox	Prop	Prop	Az	Az	Chl	Chl	Proch
		10	10	0,01	1	0,01	10	0,01	10	0,1	10	0,1
<b>B</b>	PDB	Azox	Proch	Erox	Erox	Prop	Prop	Az	Az	Chl	Proch	Proch
		10	10	0,01	10	0,01	10	0,1	10	0,1	0,001	0,1
<b>C</b>	PDB	Azox	PDB + ΣΠΟΡΙΑ	Erox	Erox	Prop	Prop	Az	Chl	Chl	Proch	Proch
		10		0,01	10	0,1	10	0,1	0,001	0,1	0,001	1
<b>D</b>	Erox	Azox	PDB + ΣΠΟΡΙΑ	Erox	Erox	Prop	Az	Az	Chl	Chl	Proch	Proch
		10		0,1	10	0,1	0,001	0,1	0,001	1	0,001	1
<b>E</b>	Erox	Chl	PDB + ΣΠΟΡΙΑ	Erox	Prop	Prop	Az	Az	Chl	Chl	Proch	Proch
		10		0,1	0,001	0,1	0,001	1	0,001	1	0,01	1
<b>F</b>	Erox	Chl	Erox	Erox	Prop	Prop	Az	Az	Chl	Chl	Proch	Proch
		10	0,001	0,1	0,001	1	0,001	1	0,01	1	0,01	10
<b>G</b>	Prop	Chl	Erox	Erox	Prop	Prop	Az	Az	Chl	Chl	Proch	Proch
		10	0,001	1	0,001	1	0,01	1	0,01	10	0,01	10
<b>H</b>	Prop	Proch	Erox	Erox	Prop	Prop	Az	Az	Chl	Chl	Proch	Proch
		10	0,001	1	0,01	1	0,01	10	0,01	10	0,1	10

**Διάγραμμα 2.** Σχηματική διάταξη της πλάκας μικροπιλοδότησης για τη δοκιμή *in vitro* της αποτελεσματικότητας δραστικών ουσιών.

Για κάθε απομόνωση πραγματοποιούνταν 2 πανομοιότυπες πλάκες μικροπιλοδότησης, εκ των οποίων η μία μετρώνταν τη μέρα δημιουργίας της (ώρα μηδέν) και η δεύτερη μετά την πάροδο δέκα ημερών. Σε καθένα βοθρίο της πλάκας περιέχονταν συνολικός όγκος διαλύματος 100μl αιώρημα σποριών και διάλυμα δραστικής ουσίας.

Η πλάκα μικροπιλοδότησης είχε 96 βοθρία (A, B, C, D, E, F, G, H x 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Στα βοθρία A1-E3 χρησιμοποιήθηκαν οι μάρτυρες. Ως PDB: υγρό θρεπτικό μέσο Potato Dextroze Broth, Erox 10: το μίγμα eroxiconazole-pyraclostrobin (όπου η αραίωση του μίγματος πραγματοποιήθηκε με βάση τη δραστική ουσία eroxiconazole), στη μέγιστη συγκέντρωση (10 mg L<sup>-1</sup>), Prop10: propiconazole στη μέγιστη συγκέντρωση (10 mg L<sup>-1</sup>), Az 10: azoxistrobin στη μέγιστη συγκέντρωση (10 mg L<sup>-1</sup>), Chl 10: chlorothalonil στη μέγιστη συγκέντρωση (10 mg L<sup>-1</sup>), Proch 10: prochloraz στη

μέγιστη συγκέντρωση ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), PDB+ ΣΠΟΡΙΑ: τα σπόρια του μύκητα που μελετήθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό PDB. Το θρεπτικό υγρό υλικό ως μάρτυρας αφορούσε τον έλεγχο του στείρου υλικού, τα διαλύματα των δραστικών ουσιών στις μέγιστες συγκεντρώσεις αφορούσαν τον έλεγχο της απορρόφησης των δραστικών ουσιών στα μέγιστες συγκεντρώσεις και το θρεπτικό υλικό με το αιώρημα σπορίων αφορούσε τον έλεγχο της ανάπτυξης μυκηλίου για καθεμιά από τις απομονώσεις που εξετάστηκε. Ακολούθησαν τα διαλύματα του αιωρήματος σπορίων του μύκητα και των δραστικών ουσιών στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν. Στα βοθρία C3-H12 περιέχονταν μίγμα της δραστικής ουσίας και αιωρήματος σπορίων του μύκητα. Ως Erox 0,001: eroxiconazole στη μέγιστη συγκέντρωση ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Erox 0,01: eroxiconazole στη μέγιστη συγκέντρωση ( $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Erox 0,1: eroxiconazole στη μέγιστη συγκέντρωση ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Erox 1: eroxiconazole στη μέγιστη συγκέντρωση ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Erox 10: eroxiconazole στη μέγιστη συγκέντρωση ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Prop 0,001: propiconazole στη μέγιστη συγκέντρωση ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Prop 0,01: propiconazole στη μέγιστη συγκέντρωση ( $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Prop 0,1: propiconazole στη μέγιστη συγκέντρωση ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Prop 1: propiconazole στη μέγιστη συγκέντρωση ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Prop 10: propiconazole στη μέγιστη συγκέντρωση ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Az 0,001: azoxistrobin στη μέγιστη συγκέντρωση ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Az 0,01: azoxistrobin στη μέγιστη συγκέντρωση ( $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Az 0,1: azoxistrobin στη μέγιστη συγκέντρωση ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Az 1: azoxistrobin στη μέγιστη συγκέντρωση ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Az 10: azoxistrobin στη μέγιστη συγκέντρωση ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Chl 0,001: chlorothalonil στη μέγιστη συγκέντρωση ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Chl 0,01: chlorothalonil στη μέγιστη συγκέντρωση ( $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Chl 0,1: chlorothalonil στη μέγιστη συγκέντρωση ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Chl 1: chlorothalonil στη μέγιστη συγκέντρωση ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Chl 10: chlorothalonil στη μέγιστη συγκέντρωση ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Proch 0,001: prochloraz στη μέγιστη συγκέντρωση ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ ) με αιώρημα σπορίων, Proch 0,01: prochloraz στη μέγιστη συγκέντρωση ( $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ) με

αιώρημα σπορίων, Proch 0,1: prochloraz στη μέγιστη συγκέντρωση (0,1 mg L<sup>-1</sup>) με αιώρημα σπορίων, Proch 1: prochloraz στη μέγιστη συγκέντρωση (1 mg L<sup>-1</sup>) με αιώρημα σπορίων, Proch 10: prochloraz στη μέγιστη συγκέντρωση (10 mg L<sup>-1</sup>) με αιώρημα σπορίων.

Η μέτρηση έγινε με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου ELISA (Biotek ELx808), που διατέθηκε από το Εργαστήριο Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, του τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις απορροφήσεις 405 και 630. Στο φωτόμετρο καταγράφηκε η απορρόφηση της ανάπτυξης του μυκηλίου και στη συνέχεια έγινε Probit στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με το στατιστικό πακέτο SPSS (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0) και καταγράφηκε η τιμή του EC50 για κάθε μία από τις απομονώσεις σε 6 επαναλήψεις.

Επίσης μετρήθηκε η απορρόφηση των δραστικών ουσιών στις μέγιστες συγκεντρώσεις (ώστε να διαπιστωθεί εάν επηρεάζει η δραστική ουσία την απορρόφηση).

## **2.5. Γενετική ποικιλομορφία των απομονώσεων του μύκητα *Mycosphaerella graminicola***

Για τη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας, επιλέχθηκαν οι απομονώσεις Σ3, Σ7, C2, C18, CB, 6.1., 6.2., M1, M1.3., K2.1. και K3. Η επιλογή έγινε με βάση την περιοχή συλλογής των δειγμάτων.

Χρησιμοποιήθηκαν οι έξι εκκινητές RAPDs:

- ◆ D07 (50-TTGGCACGGG-30)-primer 1
- ◆ E15(50-ACGCACAACC-30)-primer 2
- ◆ F01 (50-ACGGATCCTG-30)-primer 3
- ◆ F04 (50-GGTGATCAGG-30)-primer 4
- ◆ U10 (50-ACCTCGGCAC-30)-primer 5 και
- ◆ U19 (50-GTCAGTGCGG-30)-primer 6 (Sigma-Aldrich)

Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ένα δείγμα χωρίς προσθήκη DNA, μόνο με νερό και ένα δείγμα με DNA από διαφορετικό είδος. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε μικροσωληνίσκους PCR. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης για

κάθε δείγμα ήταν 25 μl από τα οποία 12,5 μL Taq 2X Master Mix (NEB- 1X Master Mix Composition: 10mM Tris-HCl, 50mM KCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTPs, 5% Glycerol, 0,08% IGEPAC CA-630, 0,05% Tween 20, 25 units/ml Taq DNA polymerase) , 1 μL εκκινητή, 10,5 μL υπερκάθαρο νερό και 1 μl δείγματος DNA (-προϊόν DNA extraction).

Για τις αντιδράσεις της PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές σε συγκέντρωση 0,3 μM και DNA κάθε δείγματος σε συγκέντρωση 30 ng. Για το θερμοκρασιακό προφίλ των δειγμάτων αποτελούνταν από 13 βήματα και 43 κύκλους. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή (Master Cycler Gradient Eppendorf), σε θερμοκρασία 80°C. Στη συνέχεια αυξήθηκε η θερμοκρασία στους 94°C για 2 min. Τα δείγματα παρέμειναν για ακόμα 30 sec στη θερμοκρασία αυτή, ώστε οι αλυσίδες του δίκλωνου DNA να αποδιαταχθούν. Στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώθηκε στους 36°C για τον υβριδισμό των εκκινητών για 30'' και θερμοκρασία 68 °C για 120 sec που οδήγησε στην επιμήκυνση των θυγατρικών αλυσίδων. Αυτός ο κύκλος επαναλήφθηκε 2 φορές. Στην πορεία ακολούθησαν 20 κύκλοι με θερμοκρασίες 94 °C για 20 sec, 36 °C για 15 sec, 45 °C για 15 sec και 69 °C για 90 sec, ενώ για 19 κύκλους το θερμοκρασιακό προφίλ ήταν 94 °C για 20 sec (αυξανόμενο 1 sec /κύκλο), 36 °C για 15 sec, 45 °C για 15 sec και 69 °C για 90 sec (αυξανόμενο 3 sec/κύκλο). Τέλος τα δείγματα παρέμειναν για 10 min στους 68°C και απομακρύνθηκαν από τον θερμοκυκλοποιητή όταν η θερμοκρασία ταπεινώθηκε στους 10°C. Το πρόγραμμα PCR που ακολουθήθηκε, περιγράφεται από τους Isabel Tenzer and Cesare Gessler (1999) και Koller *et al.*, (1993).

## **2.6. Οριζόντια ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτική αгарόζης**

Με το πέρας της διαδικασίας της PCR, πραγματοποιήθηκε οριζόντια ηλεκτροφόρηση. Κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης από 5μl από κάθε αντίδραση αναμείχθηκε με 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης τμήματος (loading buffer A186 Takara- 50% Glycerol, 0.9% SDS, 0.05% Bromophenol Blue). Τα μείγματα που δημιουργήθηκαν διοχετεύθηκαν στα βοθρία της πηκτικής

αγαρόζης 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα 10X TBE (108g βορικό οξύ (Boric acid), 40ml EDTA 0,5M, pH: 8.0, for 1 liter). Σε ξεχωριστό βοθρίο διοχετεύθηκαν 5μl DNA ladder δείκτη μοριακού βάρους DNA 1kb (NEB, New England Biolabs) (Εικ. 9). Η πηκτική αγαρόζης βυθίστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 10X TBE. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης για 40 min και με σταθερή τάση 120V. Όταν η ηλεκτροφόρηση περατώθηκε, η πηκτική τοποθετήθηκε σε δοχείο όπου και καλύφθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 1xTBE. Σε αυτό προστέθηκαν 1,6 μg/ml βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma-Aldrich), και η πηκτική παρέμεινε για 30-45 min για χρώση. Στη συνέχεια ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό και τοποθετήθηκε σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (312 nm), όπου και ήταν ορατές οι ζώνες DNA των προϊόντων της PCR και του δείκτη DNA. Το μέγεθος των προϊόντων της PCR υπολογίστηκε μετά από σύγκρισή τους με το δείκτη DNA.

## **3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

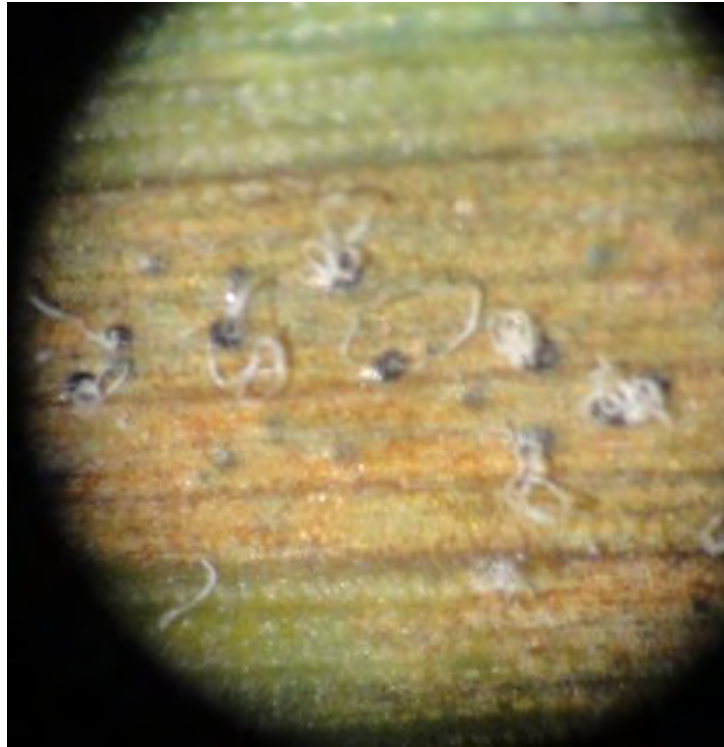


### 3.1. Ανάπτυξη απομονώσεων του μύκητα *Mycosphaerella graminicola* σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα

Μετά την τοποθέτηση των προσβεβλημένων φύλλων που εμφάνιζαν πυκνίδια (Εικ. 5) σε υγρούς θαλάμους, σχηματίστηκαν πυκνιδιοσπόρια του μύκητα. Τα συσσωματώματα των πυκνιδιοσπορίων που δημιουργήθηκαν (Εικ. 6), μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υπόστρωμα PDA, με τη βοήθεια βακτηριολογικής βελόνης και παρέμειναν αρχικά σε θάλαμο θερμοκρασίας 27 °C. Σε χρονικό διάστημα ενός μήνα η ανάπτυξη της καλλιέργειας του μύκητα ήταν ικανοποιητική. Παρόλα αυτά ο μύκητας δεν σποριοποίησε. Στη συνέχεια, οι απομονώσεις μεταφέρθηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας 22 °C. Τη 8<sup>η</sup> ημέρα παραμονής των απομονώσεων στους 22 °C οι καλλιέργειες του μύκητα εμφάνισαν σπόρια. Δοκιμάστηκε η επώαση των απομονώσεων στους 25 °C, όπου και θεωρήθηκε η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και σποριοποίησης του μύκητα *M. graminicola*. Κατόπιν έγινε μεταφορά μέρος του μυκηλίου (όταν η αποικία είχε μέγεθος 5 mm) σε δοκιμαστικό σωλήνα. Ο μέσος χρόνος για την ανάπτυξη μυκηλίου στο τρυβλίο ήταν 3 dpi (days post inoculation - ημέρες μετά τον εμβολιασμό).



**Εικόνα 5.** Σχηματισμός πυκνιδίων σε ιστό από φύλλο σιταριού (Olympus SZ61).



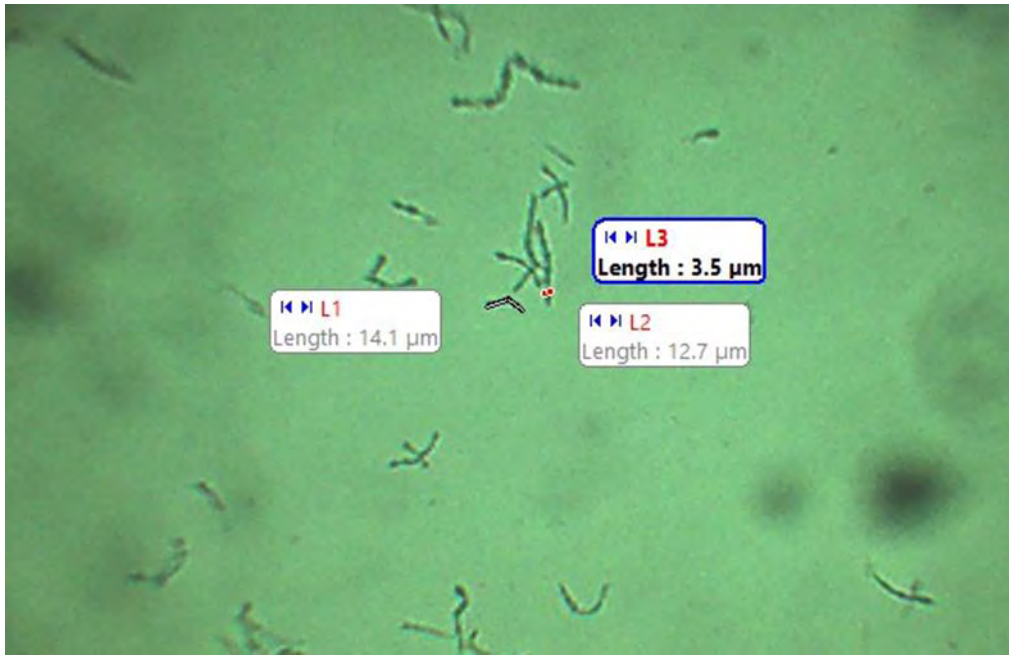
**Εικόνα 6.** Σχηματισμός σπειραμάτων πυκνιδιοσπορίων από πυκνίδια (Olympus SZ61).

### **3.2. Ταυτοποίηση των απομονώσεων του μύκητα *Mycosphaerella graminicola***

Η ταυτοποίηση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Mycosphaerella graminicola* έγινε με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου. Τα σπόρια του μύκητα παρατηρήθηκαν και έγινε μέτρηση των διαστάσεών τους, η οποία αντιστοιχούσε με αυτήν που αναγράφεται στη βιβλιογραφία (μεταξύ 20 έως 98  $\mu\text{m}$  X 1,4 έως 3,8  $\mu\text{m}$ ) (Εικ. 7) (Morais *et al.*, 2015).

Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε για όλες τις απομονώσεις των δειγμάτων που συλλέχθηκαν κατά την χειμερινή καλλιεργητική περίοδο του 2016. Στα σπόρια που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκαν από 2 έως 4 σέπτα, (Εικ. 8), ήταν υαλώδη, σκωληκόμορφα και στο μήκος τους ήταν πολύ λεπτά.

Η ανάπτυξη των αποικιών δεν ήταν ομοιόμορφη (στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα και στις ίδιες συνθήκες ανάπτυξης) σε όλες τις απομονώσεις και σε όλες τις μεταφορές που πραγματοποιήθηκαν, αλλά εμφάνισαν έντονο πολυμορφισμό (Εικ. 9). Η παραγωγή πυκνιδίων παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο 28 dpi. Η βλάστηση των σπορίων σημειώθηκε στις 23-25 h (Εικ. 10).



**Εικόνα 7.** Μέτρηση των διαστάσεων πικνιδιοσπορίων του μύκητα *M. graminicola* (3,5μmΧ26,8μm) με χρήση μικροσκοπίου Nikon Laborphot-2 (200X).



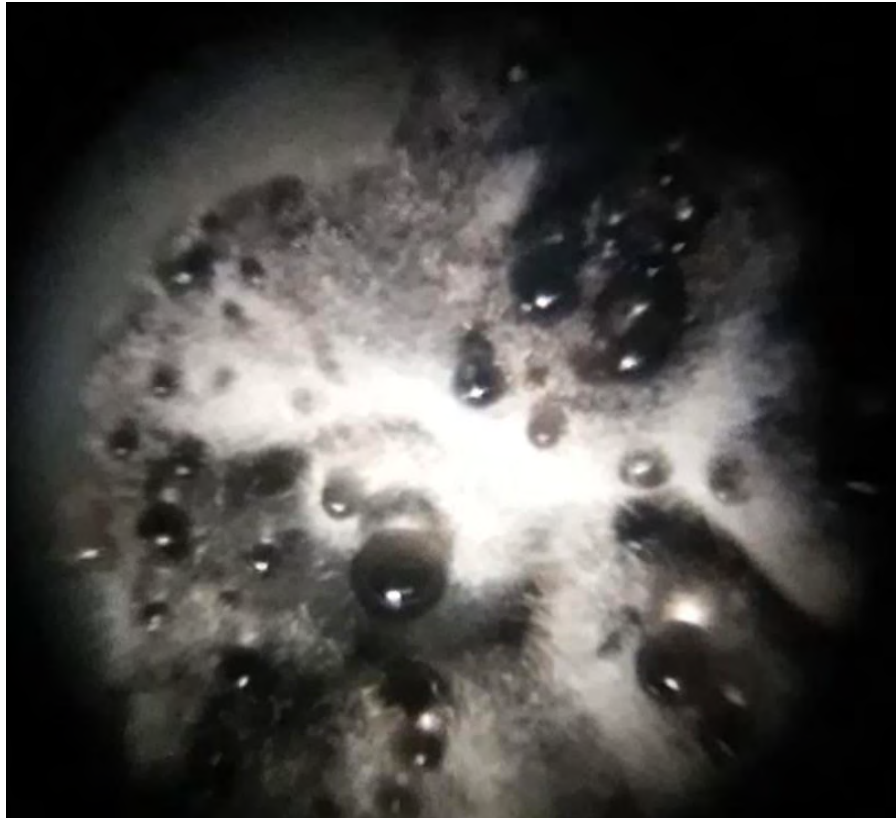
**Εικόνα 8.** Πικνιδιοσπόρια του μύκητα *Mycosphaerella graminicola* (Motic BA310, 100X).



**Εικόνα 9.** Πολυμορφισμός απομονώσεων του μύκητα *M. graminicola* σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA.

### **3.3. Παγίδευση εναερίου μολύσματος**

Τα αποτελέσματα των δοκιμαστικών πειραμάτων από αιώρημα σπορίων καλλιέργειας του μύκητα, έπειτα από μικροσκοπική παρατήρηση, έδειξαν τον κατακερματισμό των σπορίων. Κατά τη φυγοκέντρηση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από την αυτοσχέδια παγίδα εναερίου μολύσματος δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση του μύκητα από τα θραύσματα των σπορίων.



**Εικόνα 10.** Εμφάνιση πικνιδίων και έξοδος πικνιδιοσπορίων σε μορφή σταγόνων σε καλλιέργεια του μύκητα *M. graminicola* σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Olympus SZ61).

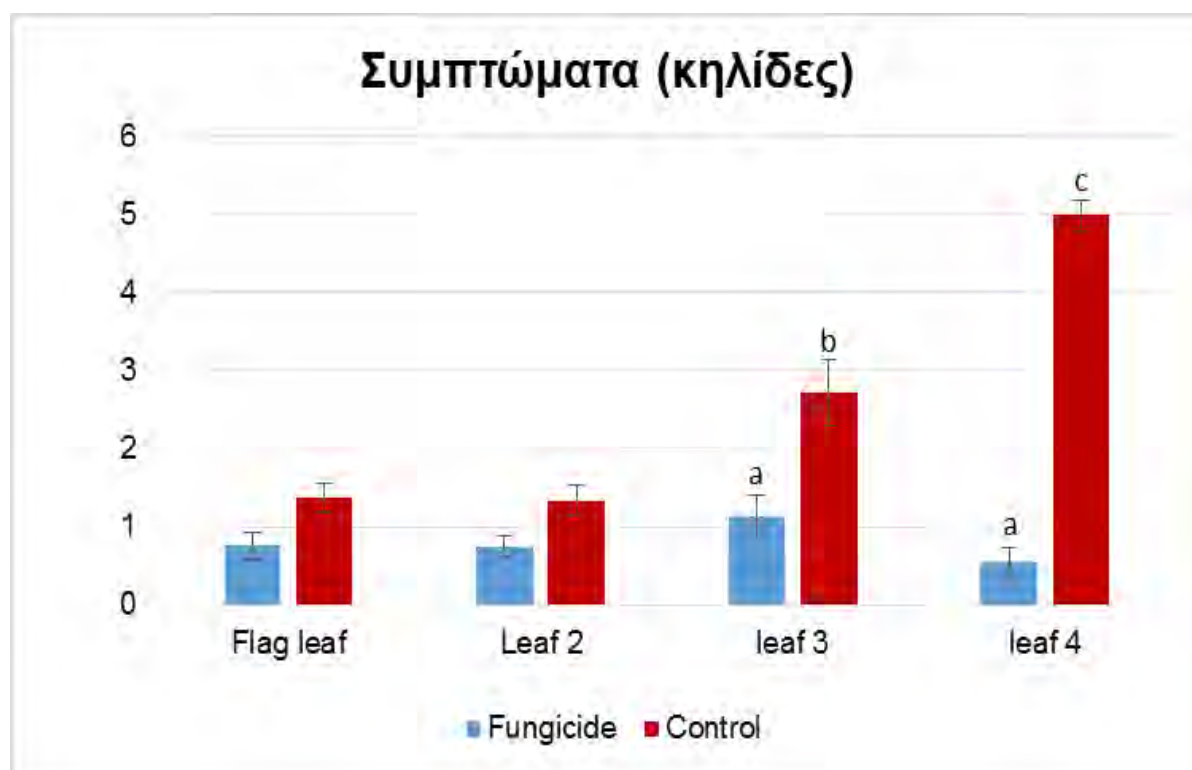
### **3.4. Φυσικές μολύνσεις και αποτελεσματικότητα μυκητοκτόνου *in vivo* για τη σεπτορίωση του σίτου**

Για την αξιολόγηση φυσικών μολύνσεων και τη μελέτη της αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνου *in vivo* μετρήθηκε το μέγεθος των κηλίδων και ο αριθμός των πικνιδίων που σχηματίστηκαν στις κηλίδες. Σχετικά με τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν και αφορούσαν το μέγεθος των κηλίδων, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τα 4 κορυφαία φύλλα των φυτών που υπήρξε επέμβαση με σκεύασμα δεν διέφεραν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά. Τα 2 κορυφαία φύλλα των φυτών του μάρτυρα (control) δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, ενώ στο τρίτο και τέταρτο φύλλο των φυτών υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά (b, c). Τα τρίτα και τέταρτα κορυφαία φύλλα των φυτών control και των φυτών που πραγματοποιήθηκε επέμβαση με σκεύασμα διέφεραν στατιστικά σημαντικά (a-b, a-c) (Διάγρ. 3).

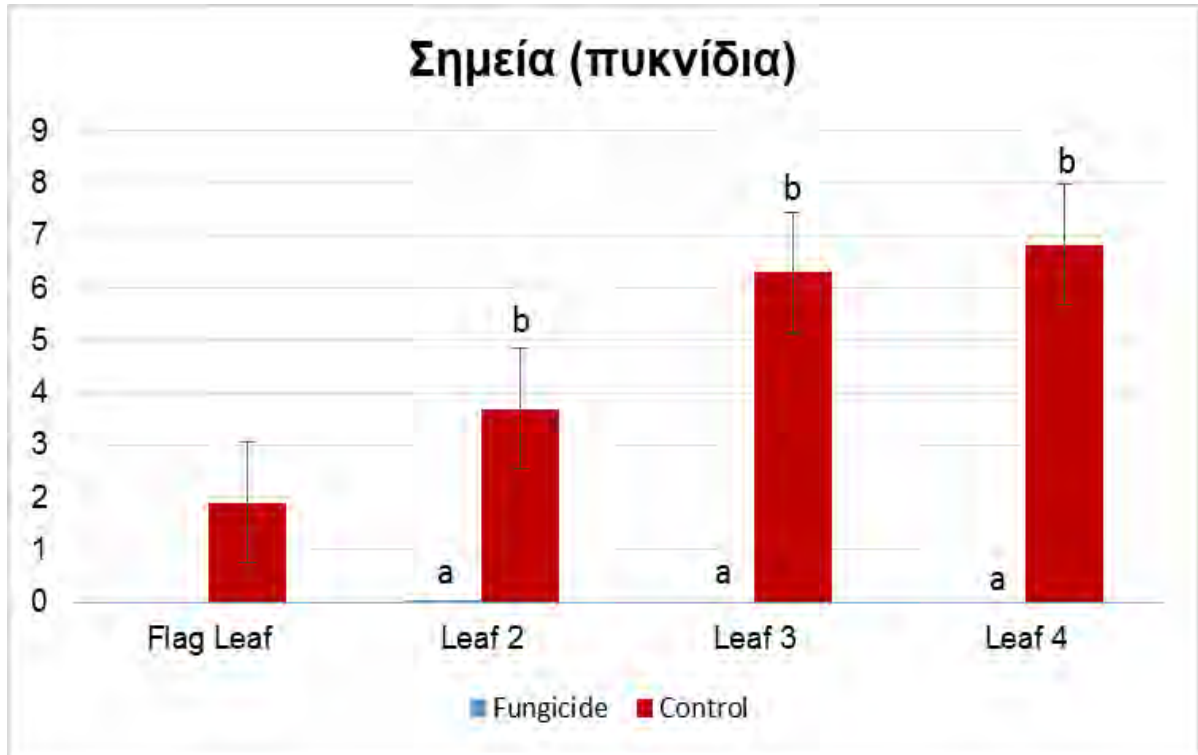
Σχετικά με τον αριθμό των πικνιδίων που σχηματίστηκαν στις κηλίδες, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τα 4 κορυφαία φύλλα των

φυτών που υπήρξε επέμβαση με σκεύασμα δεν διέφεραν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά. Τα φύλλα των φυτών control επίσης δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ως προς την εμφάνιση πυκνιδίων στους προσβεβλημένους ιστούς. Τα δεύτερα, τρίτα και τέταρτα κορυφαία φύλλα των φυτών control και των φυτών που έγινε επέμβαση, διέφεραν στατιστικά σημαντικά (a-b) (Διάγρ. 4).

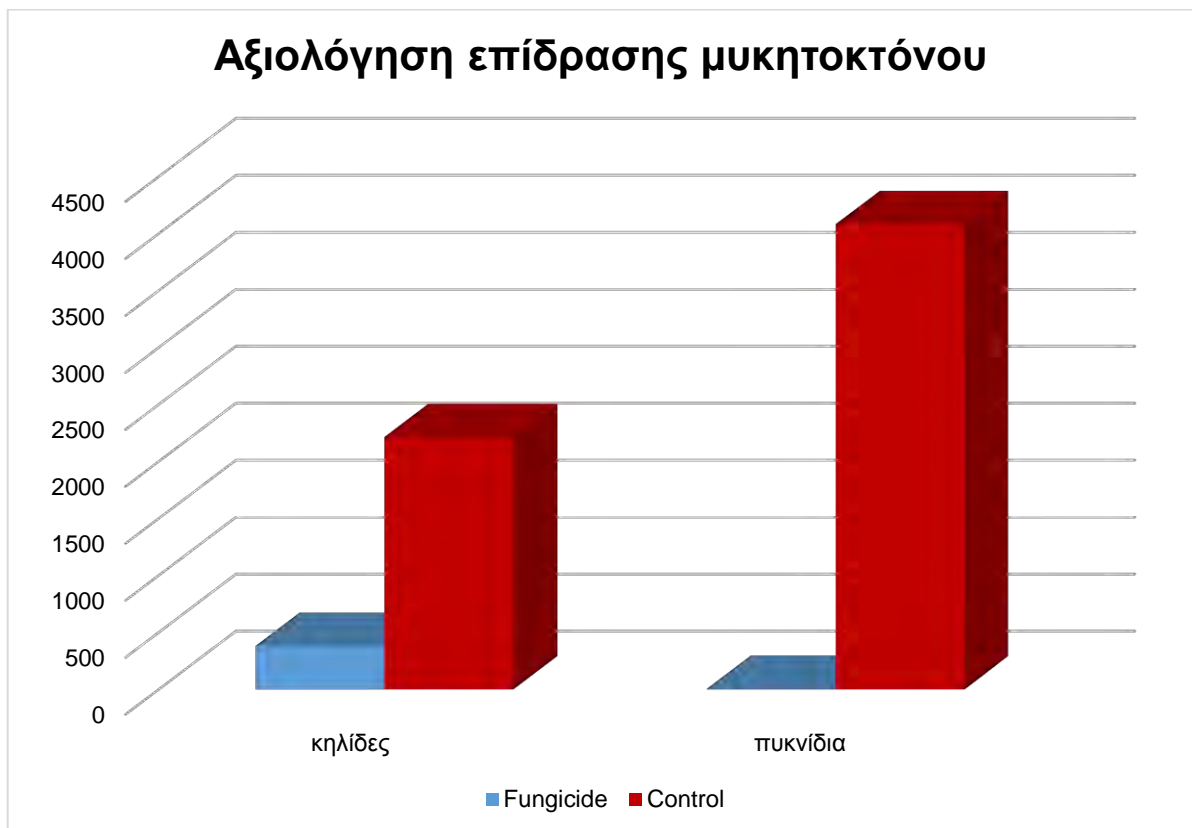
Τελικά, αξιολογώντας τα αποτελέσματα και των δύο παραμέτρων που αναφέρθηκαν προηγουμένως, η διαφορά μεταξύ των φυτών που πραγματοποιήθηκε χημική επέμβαση με μυκητοκτόνο και των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ήταν σημαντική (Διάγρ. 5).



**Διάγραμμα 3.** Αριθμός κηλίδων σε φύλλα που προέρχονται από φυσικές μολύνσεις του μύκητα *M. graminicola*, σε φυτά control σε σύγκριση με φυτά που πραγματοποιήθηκε επέμβαση.



**Διάγραμμα 4.** Αριθμός πυκνιδίων σε κηλίδες προσβεβλημένων φύλλων.



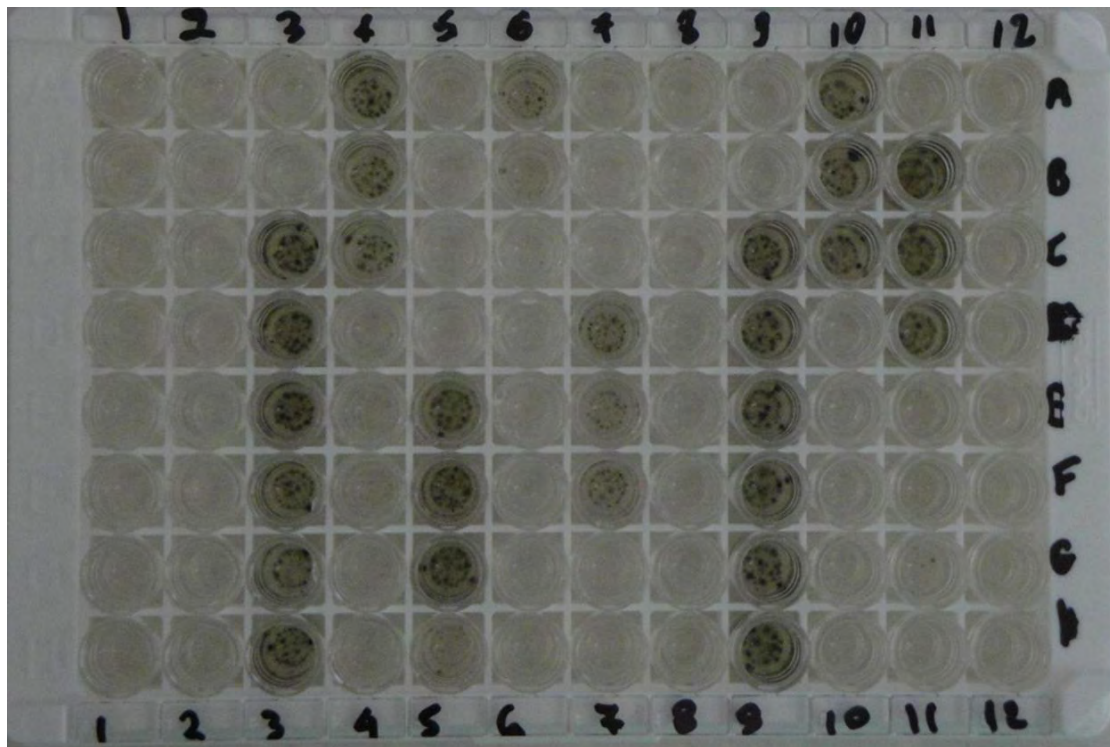
**Διάγραμμα 5.** Συνολική αξιολόγηση της επίδρασης μυκητοκτόνου σε φυσικές μολύνσεις.

### 3.5. Έλεγχος ανθεκτικότητας ομάδων μυκητοκτόνων *in vitro*

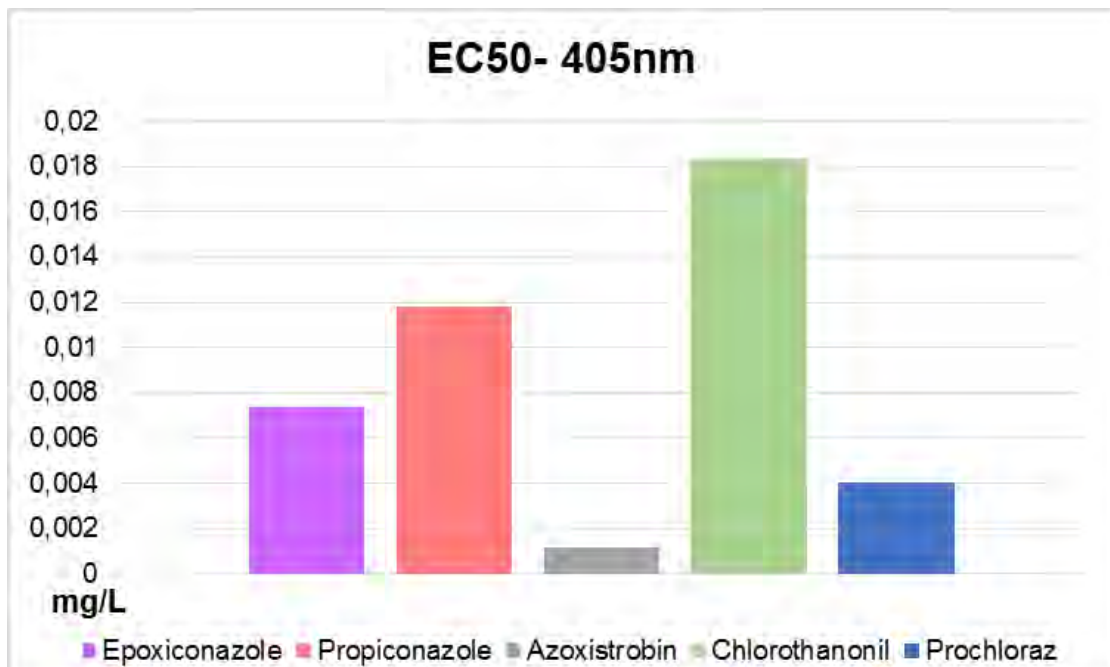
Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας του μύκητα *Mycosphaerella graminicola* στα μυκητοκτόνα και στις συγκεντρώσεις των δραστικών ουσιών που επελέγησαν έγινε με χρήση πλακών μικροτιπλοδότησης, όπως αυτή περιγράφεται από την FRAC (Sierotzki, 2006; Stammer, 2009), με την πάροδο 10 ημερών όπου το μυκήλιο του μύκητα είχε αναπτυχθεί επαρκώς (Εικ. 11). Η απορρόφηση των δραστικών ουσιών και του μίγματος που χρησιμοποιήθηκαν στις μέγιστες συγκεντρώσεις τους και στα μήκη κύματος που μετρώνταν οι απορροφήσεις, βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα. Στην πλάκα μικροτιπλοδότησης που χρησιμοποιήθηκε, εξετάστηκε η ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα. Βάση των μετρήσεων που ελήφθησαν, οι απομονώσεις που εξετάστηκαν αξιολογήθηκαν ως μη ανθεκτικές στις υπό εξέταση δραστικές ουσίες. Το αποτέλεσμα αυτό προέκυψε ύστερα από στατιστική ανάλυση Probit των μετρήσεων και του EC50 όπως φαίνεται από τους πίνακες 3 και 4 του παραρτήματος. Οι τιμές EC50 για το μίγμα δραστικών ουσιών στο οποίο εξετάστηκε με βάση το eroxiconazole κυμάνθηκε για την απορρόφηση 405nm από συγκεντρώσεις  $\ll 0,001$  έως 0.096. Για τη δραστική ουσία propiconazole στην ίδια απορρόφηση (405nm) το εύρος τιμών EC50 ήταν από συγκεντρώσεις  $\ll 0.001$ -0.087, αντίστοιχα για τη δραστική ουσία azoxistrobin από συγκεντρώσεις  $\ll 0.001$ -0,0018, για τη δραστική ουσία chlorothalonil από συγκεντρώσεις  $\ll 0.001$ -0,017 και για τη δραστική ουσία prochloraz από συγκεντρώσεις  $\ll 0.001$ -0,017 (Πίν. 3).

Οι τιμές EC50 για το μίγμα δραστικών ουσιών στο οποίο εξετάστηκε με βάση το eroxiconazole κυμάνθηκε για την απορρόφηση 630nm από 0.000002 έως 0.04. Για τη δραστική ουσία propiconazole στην ίδια απορρόφηση (630nm) το εύρος τιμών EC50 ήταν από συγκεντρώσεις  $\ll 0.001$ -0,172, αντίστοιχα για τη δραστική ουσία azoxistrobin από συγκεντρώσεις  $\ll 0.001$ -0.002, για τη δραστική ουσία chlorothalonil 0,001-0.082 και για τη δραστική ουσία prochloraz από συγκεντρώσεις  $\ll 0.001$ -0,113 (Πιν. 4). Οι απομονώσεις των δειγμάτων που εξετάστηκαν, βάσει της τιμής EC50 χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες στις ουσίες που εξετάστηκαν, καθώς οι τιμές που προέκυψαν ήταν ιδιαίτερα χαμηλές.

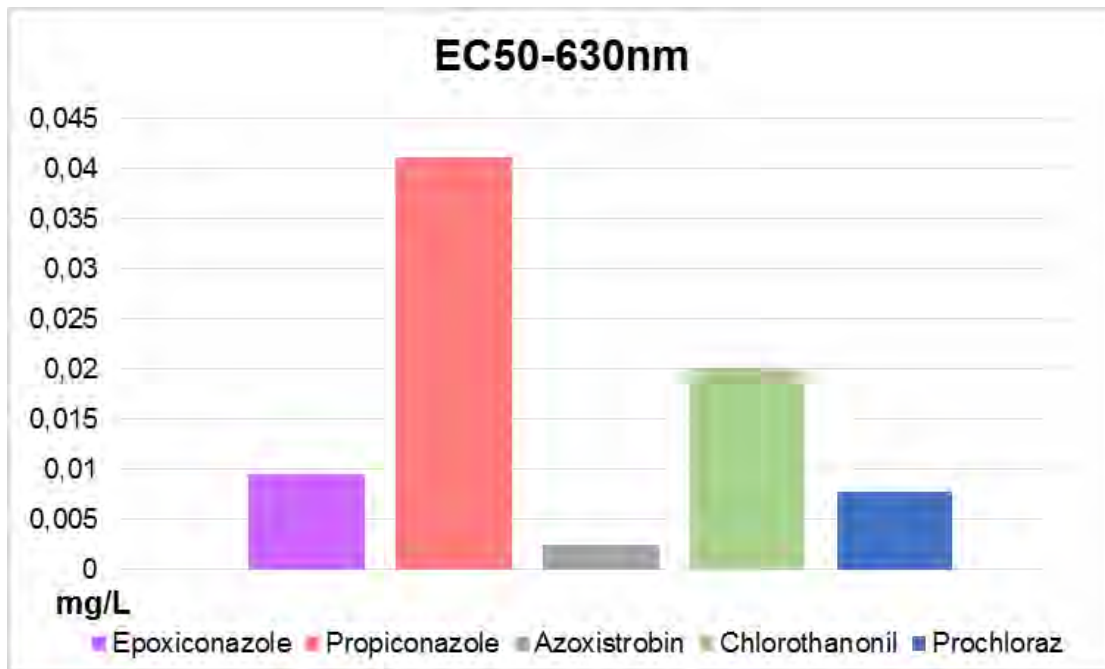




**Εικόνα 11.** Ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα *M. graminicola* σε πλάκα μικροτιπλοδότησης στις 10 ημέρες ανάπτυξης.



**Διάγραμμα 6.** Μέσοι όροι τιμών EC50 των δραστικών ουσιών epxiconazole, propiconazole, azoxistrobin, chlorothanonil και prochloraz μετά τον *in vitro* έλεγχο ανθεκτικότητας απομονώσεων του μύκητα, σε απορρόφηση 405nm.



**Διάγραμμα 7.** Μέσοι όροι τιμών EC50 των δραστικών ουσιών epxiconazole, propiconazole, azoxistrobin, chlorothanoniil και prochloraz μετά τον *in vitro* έλεγχο ανθεκτικότητας απομονώσεων του μύκητα, σε απορρόφηση 630nm.

Στα διαγράμματα 6 και 7, παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών EC50 μετά από στατιστική ανάλυση για τις δύο απορροφήσεις. Οι ουσίες με την καλύτερη δραστηριότητα φάνηκαν να είναι η azoxistrobin και το prochloraz. Παρόλα αυτά οι μέσοι όροι όλων των δραστικών ουσιών φαίνονται να είναι ιδιαίτερα χαμηλοί με πολύ καλή αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση του μύκητα, όπως διαπιστώθηκε από τον έλεγχο ανθεκτικότητας *in vitro*.

### 3.6. Γενετική ποικιλομορφία των απομονώσεων του μύκητα *Mycosphaerella graminicola*

Οι απομονώσεις που εξετάστηκαν ομαδοποιήθηκαν σε φαινοτύπους, σύμφωνα με την γενετική ποικιλομορφία που παρουσίασαν, μετά την πραγματοποίηση της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης (PCR) με RAPD εκκινητές όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 5.

Οι απομονώσεις που εξετάστηκαν και δεν συμπληρώθηκαν στον πίνακα, δεν παρουσίασαν προϊόν PCR κατά την ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτική αγαρόζη. Από την αντίδραση της PCR, με τη χρήση του εκκινητή D07 διαπιστώθηκε η ύπαρξη τεσσάρων φαινοτύπων. Αντίστοιχα τα προϊόντα της

αντίδρασης με τον εκκινητή E15 παρουσίασε επτά φαινότυπους, με τον εκκινητή D01 τέσσερεις φαινότυπους, όπου σε ίδιο φαινότυπο ανήκουν οι απομονώσεις Σ7 και CB, με τον εκκινητή F04 επτά φαινότυπους, με τον εκκινητή U10 οχτώ φαινότυπους και με τον εκκινητή U19 επτά φαινότυπους εκ των οποίων οι απομονώσεις Σ7 και 6.1. ανήκαν στον ίδιο φαινότυπο.

**Πίνακας 2.** Φαινοτυπική ομαδοποίηση με βάση τη γενετική ποικιλομορφία των δειγμάτων που μελετήθηκαν.

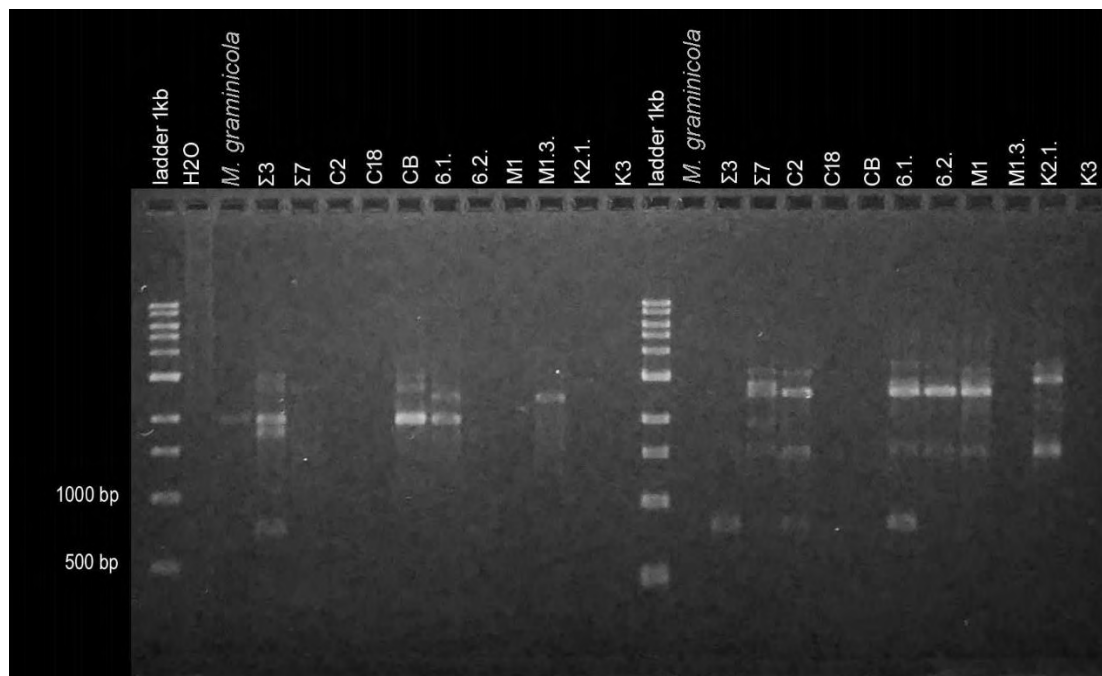
Φαινότυποι	D07	E15	D01		F04	U10	U19	
Φ1	C12	C12	Σ7	CB	C12	C12	C12	
Φ2	Σ3	Σ3	6.1.		Σ3	Σ3	Σ3	
Φ3	CB	Σ7	6.2		CB	Σ7	Σ7	6.1.
Φ4	M1.3.	CB	M1		6.1.	CB	CB	
Φ5		6.1.			6.2	6.1.	6.2.	
Φ6		6.2.			M1.3.	6.2.	M1.3.	
Φ7		M1.3.			K2.1.	M1.3.	K3	
Φ8						K3		

Στις εικόνες 12, 14 και 16 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την απεικόνιση των απομονώσεων που εξετάστηκαν με PCR σε πηκτή αγαρόζης και στις εικόνες 13, 15 και 17 η γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων (*in silico*).

Στη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας των 11 απομονώσεων που πραγματοποιήθηκε PCR με τον RAPD εκκινητή D07, σημειώνεται η διαφοροποίηση τεσσάρων φαινότυπων. Οι διαφορετικοί φαινότυποι προέρχονται είτε από την ίδια περιοχή είτε από διαφορετικές περιοχές. Στην ίδια περιοχή ανήκαν τα δείγματα CB, M1.3. και ο θετικός μάρτυρας, ο οποίος ήταν το δείγμα C12 (περιοχή A) σε διαφορετική περιοχή από αυτά ανήκε το δείγμα Σ3 (περιοχή Γ). Οι περιοχές παρουσιάζονται στο χάρτη της εικόνας 1.

Στη γραφική απεικόνιση (*in silico*) των αποτελεσμάτων των προϊόντων διαχωρίζεται εμφανώς οι διαφορετικοί φαινότυποι που προέκυψαν, καθώς και τα μεγέθη τους. Στα αποτελέσματα που προέκυψαν από με τον εκκινητή D07, το δείγμα C12 μεγέθους 2000 bp (base pair-ζεύγη βάσεων), το δείγμα Σ3 εμφάνισε μεγέθη 3000, 2800, 2000, 1750 και 750 bp, το δείγμα CB 2800 και

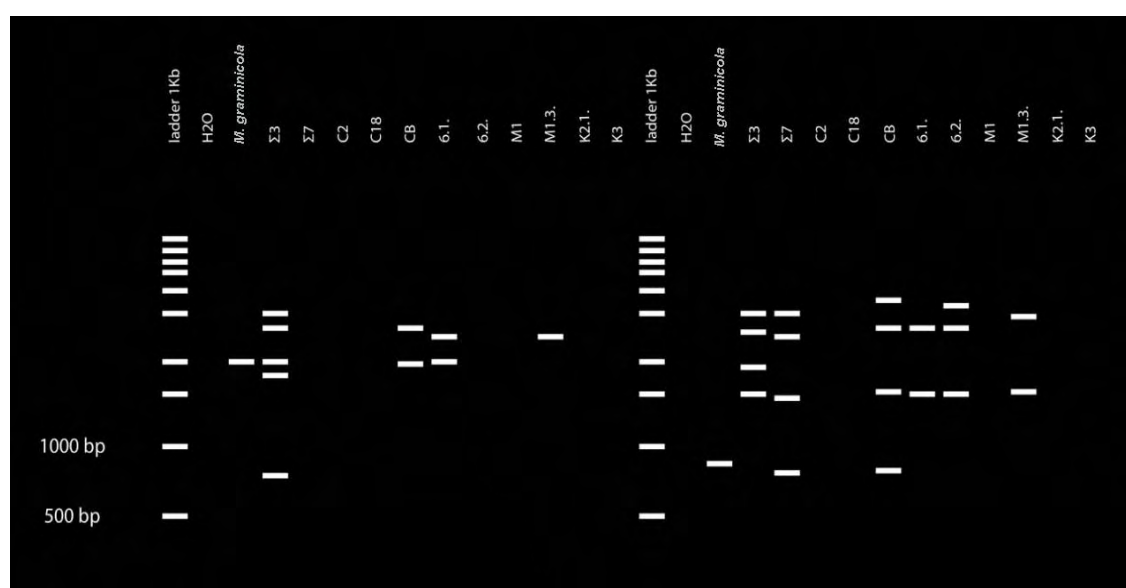
2000 bp, το δείγμα 6.1. ήταν 2700 και 2000 bp και το δείγμα M1.3. ήταν μεγέθους 2700 bp.



**Εικόνα 12.** Προϊόν αντίδρασης PCR με RAPDs με χρήση των εκκινητών D07 και E15. Από αριστερά προς τα δεξιά στο βοθρίο 1 έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb. Ακολούθως φαίνονται διαδοχικά τα προϊόντα της αντίδρασης με primer τον D07, με σειρά δειγμάτων ως εξής: βοθρίο 2: H<sub>2</sub>O, βοθρίο 3: *Mycosphaerella graminicola*, βοθρίο 4: Σ3, βοθρίο 5: Σ7, βοθρίο 6: C2, βοθρίο 7: C18, βοθρίο 8: CB, βοθρίο 9: 6.1., βοθρίο 10: 6.2., βοθρίο 11: M1, βοθρίο 12: M1.3., βοθρίο 13: K2.1., βοθρίο 14: K3 και βοθρίο 15 έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb. Ακολουθούν τα προϊόντα της αντίδρασης με primer τον F04 με σειρά δειγμάτων ως εξής: βοθρίο 16: H<sub>2</sub>O, βοθρίο 17: *Mycosphaerella graminicola*, βοθρίο 18: Σ3, βοθρίο 19: Σ7, βοθρίο 20: C2, βοθρίο 21: C18, βοθρίο 22: CB, βοθρίο 23: 6.1., βοθρίο 24: 6.2., βοθρίο 25: M1, βοθρίο 26: M1.3., βοθρίο 27: K2.1., βοθρίο 28: K3.

Η μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας των ίδιων απομονώσεων με τον εκκινητή E15, έδειξε 7 διαφορετικούς φαινοτύπους. είτε από την ίδια περιοχή είτε από διαφορετικές περιοχές. Στην ίδια περιοχή συλλογής ανήκαν τα δείγματα C12, CB και M1.3. (περιοχή Α), Σ3 και Σ7 (περιοχή Γ), 6.1. και 6.2. (περιοχή Β), όπως αυτές παρουσιάζονται στο χάρτη της εικόνας 1.

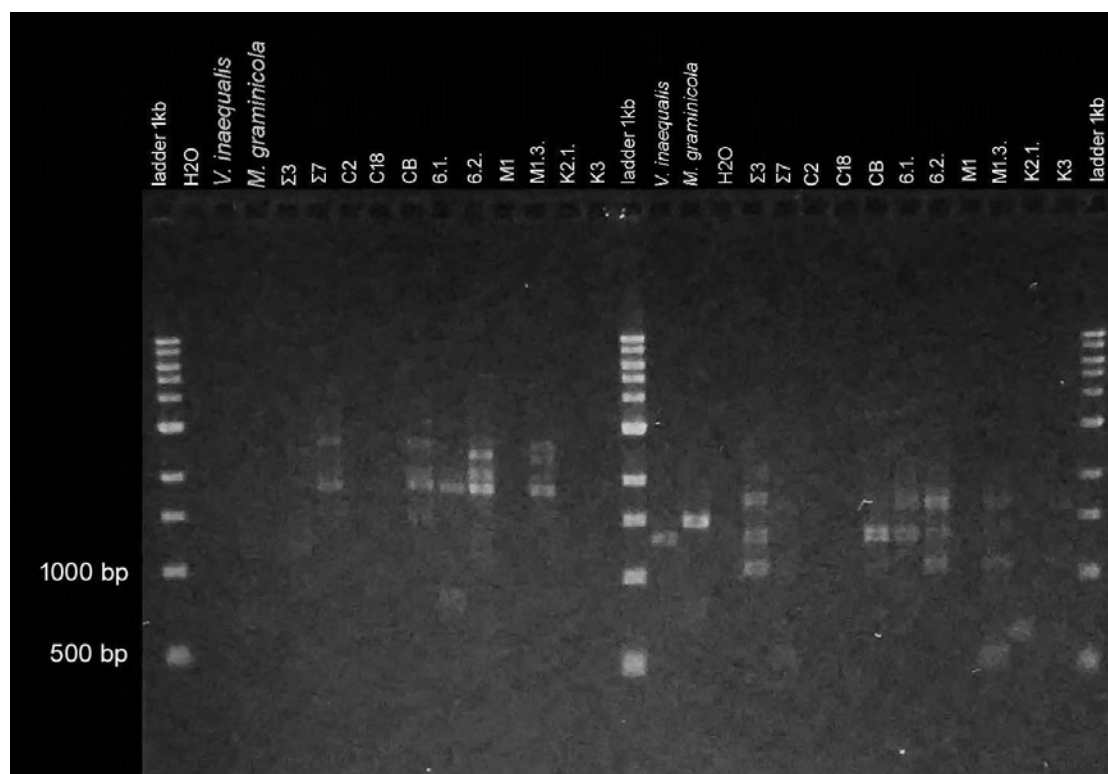
Αντίστοιχα τα μεγέθη των φαινοτύπων που προέκυψαν από την αντίδραση με τον εκκινητή E15 ήταν για το δείγμα C12 800 bp, για το δείγμα Σ3 3000, 2800 και 1500 bp, για το δείγμα Σ7 3000, 2700, 1400 και 750 bp, για το δείγμα CB 3500, 2800, 1500 και 750 bp, για το δείγμα 6.1. 2800 και 1500 bp, για το δείγμα 6.2. 3400, 2800 και 1500 bp και για το δείγμα M1.3. 3000 και 1500 bp. Η μέτρηση έγινε κατά προσέγγιση, σε σύγκριση με τον ladder 1kb που χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστούν τα μεγέθη βάσεων, των προϊόντων που προέκυψαν.



**Εικόνα 13.** Γραφική απεικόνιση (*in silico*) των προϊόντων της αντίδρασης PCR με RAPDs με εκκινητές D07 και E15. Από αριστερά προς τα δεξιά στο βοθρίο 1 έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb. Ακολούθως φαίνονται διαδοχικά τα προϊόντα της αντίδρασης με primer τον D07, με σειρά δειγμάτων ως εξής: βοθρίο 2: H2O, βοθρίο 3: *Mycosphaerella graminicola*, βοθρίο 4: Σ3, βοθρίο 5: Σ7, βοθρίο 6: C2, βοθρίο 7: C18, βοθρίο 8: CB, βοθρίο 9: 6.1., βοθρίο 10: 6.2., βοθρίο 11: M1, βοθρίο 12: M1.3., βοθρίο 13: K2.1., βοθρίο 14: K3 και βοθρίο 15 έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb. Ακολουθούν τα προϊόντα της αντίδρασης με primer τον F04 με σειρά δειγμάτων ως εξής: βοθρίο 16: H2O, βοθρίο 17: *Mycosphaerella graminicola*, βοθρίο 18: Σ3, βοθρίο 19: Σ7, βοθρίο 20: C2, βοθρίο 21: C18, βοθρίο 22: CB, βοθρίο 23: 6.1., βοθρίο 24: 6.2., βοθρίο 25: M1, βοθρίο 26: M1.3., βοθρίο 27: K2.1., βοθρίο 28: K3.

Στη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας με τον RAPD εκκινητή D01, σημειώνεται η διαφοροποίηση τεσσάρων φαινοτύπων. Οι διαφορετικοί φαινότυποι προέρχονται είτε από την ίδια περιοχή είτε από διαφορετικές

περιοχές. Στην ίδια περιοχή ανήκαν τα δείγματα 6.1. και 6.2. (περιοχή Β) και τα δείγματα CB και M1 (περιοχή Α). Ίδιο φαινότυπο παρουσίασαν τα δείγματα από δύο διαφορετικές περιοχές, το Σ7 και CB, που προήλθαν από τις περιοχές Γ και Α αντίστοιχα.

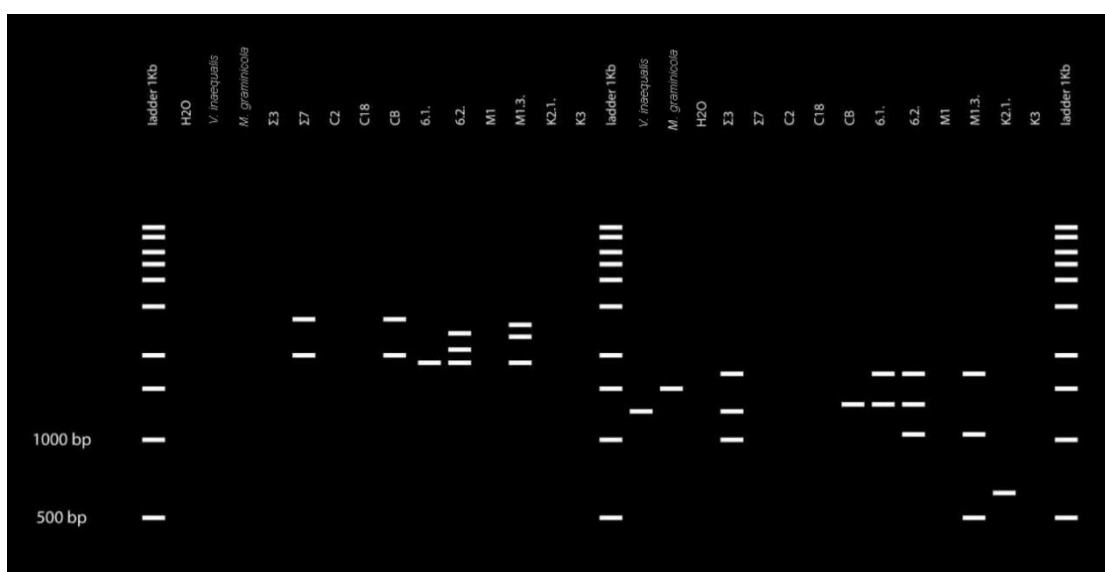


**Εικόνα 14.** Απεικόνιση των προϊόντων της αντίδρασης PCR με RAPDs εκκινητές τους D01 και F04. Από αριστερά προς τα δεξιά στο βοθρίο έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb. Ακολούθως φαίνονται διαδοχικά τα προϊόντα της αντίδρασης με primer τον D01 με σειρά δειγμάτων ως εξής: βοθρίο 2: H<sub>2</sub>O, βοθρίο 3: αρνητικός μάρτυρας, βοθρίο 4: *Mycosphaerella graminicola*, βοθρίο 5: Σ3, βοθρίο 6: Σ7, βοθρίο 7: C2, βοθρίο 8: C18, βοθρίο 9: CB, βοθρίο 10: 6.1., βοθρίο 11: 6.2., βοθρίο 12: M1, βοθρίο 13: M1.3., βοθρίο 14: K2.1., βοθρίο 15: K3 και βοθρίο 16 έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb. Ακολουθούν τα προϊόντα της αντίδρασης με primer τον F04 με σειρά δειγμάτων ως εξής: βοθρίο 17: αρνητικός μάρτυρας, βοθρίο 18: *Mycosphaerella graminicola*, βοθρίο 19: H<sub>2</sub>O βοθρίο 20: Σ3, βοθρίο 21: Σ7, βοθρίο 22: C2, βοθρίο 23: C18, βοθρίο 24: CB, βοθρίο 25: 6.1., βοθρίο 26: 6.2., βοθρίο 27: M1, βοθρίο 28: M1.3., βοθρίο 29: K2.1., βοθρίο 30: K3 και βοθρίο 31 έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb.

Στη γραφική απεικόνιση (*in silico*), τα αποτελέσματα μετά από την αντίδραση με τον εκκινητή D01, τα δείγματα Σ7 και CB φέρουν μεγέθη 2800 bp

και 2000 bp, το δείγμα 6.1. 1900 bp, το δείγμα 6.1. 1900 bp, το δείγμα 6.2. 2500, 2100 και 1900 bp και το δείγμα M1 2600, 2400 και 1900 bp.

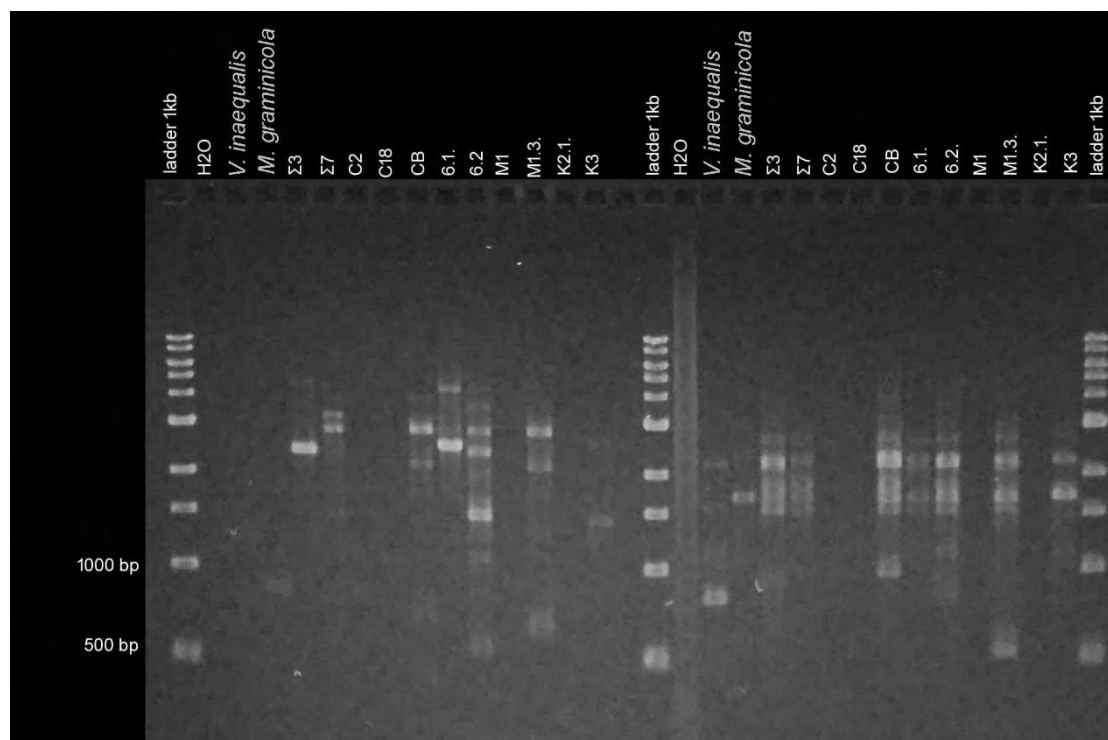
Η μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας των ίδιων απομονώσεων με τον εκκινητή F04, έδειξε 7 διαφορετικούς φαινοτύπους. από διαφορετικές περιοχές αλλά και διαφορετικούς φαινοτύπους μεταξύ δειγμάτων της ίδιας περιοχής. Στην ίδια περιοχή συλλογής ανήκαν τα δείγματα C12, CB και M1.3. (περιοχή A), Σ3 και Σ7 (περιοχή Γ), 6.1. και 6.2. (περιοχή Β).



**Εικόνα 15.** Γραφική απεικόνιση (*in silico*) των προϊόντων PCR με RAPDs με τη χρήση των εκκινητών D01 και F04. Από αριστερά προς τα δεξιά στο βοθρίο έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb. Ακολουθώς φαίνονται διαδοχικά τα προϊόντα της αντίδρασης με primer τον D01 με σειρά δειγμάτων ως εξής: βοθρίο 2: H<sub>2</sub>O, βοθρίο 3: αρνητικός μάρτυρας, βοθρίο 4: *Mycosphaerella graminicola*, βοθρίο 5: Σ3, βοθρίο 6: Σ7, βοθρίο 7: C2, βοθρίο 8: C18, βοθρίο 9: CB, βοθρίο 10: 6.1., βοθρίο 11: 6.2., βοθρίο 12: M1, βοθρίο 13: M1.3., βοθρίο 14: K2.1., βοθρίο 15: K3 και βοθρίο 16 έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb. Ακολουθούν τα προϊόντα της αντίδρασης με primer τον F04 με σειρά δειγμάτων ως εξής: βοθρίο 17: αρνητικός μάρτυρας, βοθρίο 18: *Mycosphaerella graminicola*, βοθρίο 19: H<sub>2</sub>O βοθρίο 20: Σ3, βοθρίο 21: Σ7, βοθρίο 22: C2, βοθρίο 23: C18, βοθρίο 24: CB, βοθρίο 25: 6.1., βοθρίο 26: 6.2., βοθρίο 27: M1, βοθρίο 28: M1.3., βοθρίο 29: K2.1., βοθρίο 30: K3 και βοθρίο 31 έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb.

Τα μεγέθη των φαινοτύπων που προέκυψαν από την αντίδραση με τον εκκινητή F04 ήταν για το δείγμα C12 1500 bp, για το δείγμα Σ3 1750, 1250 και

1000 bp, για το δείγμα CB 1300 bp, για το δείγμα 6.1. 1750 και 1300 bp, για το δείγμα 6.2. 1750, 1300 και 1000 bp, για το δείγμα M1.3. 1750, 1000 και 500 bp και για το δείγμα K2.1. 700 bp. Ο αρνητικός μάρτυρας είχε μέγεθος 1250 bp.



**Εικόνα 16.** Απεικόνιση των προϊόντων της αντίδρασης RAPDs με εκκινητές U10 και U19. Από αριστερά προς τα δεξιά στο βοθρίο έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb. Ακολούθως φαίνονται διαδοχικά τα προϊόντα της αντίδρασης με primer τον U10 με σειρά δειγμάτων ως εξής: βοθρίο 2: H<sub>2</sub>O, βοθρίο 3: αρνητικός μάρτυρας, βοθρίο 4: *Mycosphaerella graminicola*, βοθρίο 5: Σ3, βοθρίο 6: Σ7, βοθρίο 7: C2, βοθρίο 8: C18, βοθρίο 9: CB, βοθρίο 10: 6.1., βοθρίο 11: 6.2., βοθρίο 12: M1, βοθρίο 13: M1.3., βοθρίο 14: K2.1., βοθρίο 15: K3 και βοθρίο 17 έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb. Ακολουθούν τα προϊόντα της αντίδρασης με primer τον U19 με σειρά δειγμάτων ως εξής: βοθρίο 18: H<sub>2</sub>O, βοθρίο 19: αρνητικός μάρτυρας, βοθρίο 20: *Mycosphaerella graminicola*, βοθρίο 21: Σ3, βοθρίο 22: Σ7, βοθρίο 23: C2, βοθρίο 24: C18, βοθρίο 25: CB, βοθρίο 26: 6.1., βοθρίο 27: 6.2., βοθρίο 28: M1, βοθρίο 29: M1.3., βοθρίο 30: K2.1., βοθρίο 31: K3 και βοθρίο 32 έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb

Με τον RAPD εκκινητή U10, σημειώνεται η διαφοροποίηση οκτώ φαινοτύπων. Οι διαφορετικοί φαινότυποι προέρχονται είτε από την ίδια περιοχή είτε από διαφορετικές περιοχές. Στην ίδια περιοχή ανήκαν τα δείγματα C12, CB,



M1.3. (περιοχή Α), τα δείγματα Σ3 και Σ7 (περιοχή Γ), τα δείγματα 6.1. και 6.2. (περιοχή Β).

Στη γραφική απεικόνιση (*in silico*), τα αποτελέσματα μετά από την αντίδραση με τον εκκινητή U10, το δείγμα C12 ήταν 900 bp, το δείγμα Σ3 2400 bp, το δείγμα Σ7 3200 και 2800 bp, το δείγμα CB 3900, 2800 και 2200 bp, το δείγμα 6.1. 4000 και 2400 bp, το δείγμα 6.2 4000, 2800, 2200, 2300, 1500, 1100 και 500 bp και το δείγμα M1.3. 2200, 1900 και 700 bp.



**Εικόνα 17.** Γραφική απεικόνιση (*in silico*) των προϊόντων RAPDs με εκκινητές U10 και U19. Από αριστερά προς τα δεξιά στο βοθρίο έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb. Ακολούθως φαίνονται διαδοχικά τα προϊόντα της αντίδρασης με primer τον U10 με σειρά δειγμάτων ως εξής: βοθρίο 2: H<sub>2</sub>O, βοθρίο 3: αρνητικός μάρτυρας, βοθρίο 4: *Mycosphaerella graminicola*, βοθρίο 5: Σ3, βοθρίο 6: Σ7, βοθρίο 7: C2, βοθρίο 8: C18, βοθρίο 9: CB, βοθρίο 10: 6.1., βοθρίο 11: 6.2., βοθρίο 12: M1, βοθρίο 13: M1.3., βοθρίο 14: K2.1., βοθρίο 15: K3 και βοθρίο 17 έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb. Ακολουθούν τα προϊόντα της αντίδρασης με primer τον U19 με σειρά δειγμάτων ως εξής: βοθρίο 18: H<sub>2</sub>O, βοθρίο 19: αρνητικός μάρτυρας, βοθρίο 20: *Mycosphaerella graminicola*, βοθρίο 21: Σ3, βοθρίο 22: Σ7, βοθρίο 23: C2, βοθρίο 24: C18, βοθρίο 25: CB, βοθρίο 26: 6.1., βοθρίο 27: 6.2., βοθρίο 28: M1, βοθρίο 29: M1.3., βοθρίο 30: K2.1., βοθρίο 31: K3 και βοθρίο 32 έχει χρησιμοποιηθεί ο ladder 1kb

Με τον RAPD εκκινητή U19, σημειώνεται η διαφοροποίηση επτά φαινοτύπων. Οι διαφορετικοί φαινότυποι προέρχονται είτε από την ίδια περιοχή είτε από διαφορετικές περιοχές. Στην ίδια περιοχή ανήκαν τα δείγματα C12, CB,

M1.3. (περιοχή Α), τα δείγματα Σ3 και Σ7 (περιοχή Γ), τα δείγματα 6.1. και 6.2. (περιοχή Β), δείγμα Κ3 (περιοχή Δ).

Αντίστοιχα τα μεγέθη των φαινοτύπων που προέκυψαν από την αντίδραση με τον εκκινητή U19 ήταν για το δείγμα C12 1600 bp, για το δείγμα Σ3 2600, 2100 και 1750 bp, για τα δείγματα Σ7 και 6.1. που παρουσίασαν το ίδιο φαινότυπο 2200, 1750 και 1600 bp, για το δείγμα CB 2200, 1750, 1600 και 800 bp, για το δείγμα 6.1. 2200, 1750 και 1600 bp, για το δείγμα 6.2. 2200, 1750, 1600 και 1200 bp, για το δείγμα M1.3. 3000, 2200, 1200 και 500 bp και για το δείγμα Κ3 2200 και 1600 bp. Τα αποτελέσματα φέρουν ομοιομορφία μεταξύ τους αν και δεν φαίνεται να ανήκουν όλα στους ίδιους φαινοτύπους. Ο αρνητικός μάρτυρας είχε μέγεθος 2100 και 800 bp.

## **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Η σεπτορίωση αποτελεί μια από τις σημαντικότερες ασθένειες του σίτου ανά τον κόσμο. Αυτό οφείλεται στην τεράστια οικονομική του σημασία (Eyal and Levy, 1987; Polley and Thomas, 1991; van Ginkel & Rajaram, 1993; Eyal, 1999; Cowger *et al.*, 2000; Hardwick *et al.*, 2001; Chartrain *et al.*, 2004). Στην περιοχή του Θεσσαλικού κάμπου, κατά τα έτη 2014, 2015, 2016 παρουσιάστηκε μεγάλη προσβολή από το συγκεκριμένο παθογόνο και η οποία χαρακτηρίστηκε επιδημική. Η σεπτορίωση, βρέθηκε ότι οφειλόταν στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Mycosphaerella graminicola*, όπου και μελετήθηκε κατά το έτος 2016 στην παρούσα διατριβή.

Ο μύκητας *M. graminicola* απομονώθηκε από φύλλα σίτου και καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε μόνο από τα φύλλα του φυτού και όχι από την ταξιανθία του. Οι απομονώσεις του μύκητα προέκυψαν από τη δειγματοληψία τεσσάρων διαφορετικών περιοχών των Νομών Φθιώτιδας, Θεσσαλίας και Λαρίσης όπου η προσβολή ήταν εκτεταμένη.

Ο μύκητας εξετάστηκε σχετικά με την ευαισθησία του σε 5 ομάδες μυκητοκτόνων στις δραστικές ουσίες εροχiconazole (σε μίγμα με το pyraclostrobin), propiconazole, azoxistrobin, chlorothalonil και procloraz και σε έξι συγκεντρώσεις 10, 1, 0,1, 0,01 και 0,001 mgL<sup>-1</sup>. Τα κριτήρια επιλογής των μυκητοκτόνων ήταν η εγκεκριμένη από το αρμόδιο υπουργείο χρήση τους στον αγρό, η συχνότητα της εφαρμογής τους στις περιοχές δειγματοληψίας αλλά και οι διαφορετικές ομάδες στις οποίες αυτές ανήκουν. Ο έλεγχος ευαισθησίας σε μυκητοκτόνα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο microtiter test, όπου εξετάστηκε η ανάπτυξη του μυκηλίου και μετρήθηκε η απορρόφηση του σε δύο μήκη κύματος όπως περιγράφεται η μέθοδος από τη FRAC.

Έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες έως τώρα, στις οποίες μελετάται ο έλεγχος της ευαισθησίας του μύκητα *M. graminicola* σε πολλές δραστικές ουσίες (Stammler & Semar, 2011). Οι στρομπιλουρίνες σύμφωνα με τη FRAC, παρουσίασαν προβλήματα ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο μύκητα, ύστερα από μετάλλαξη του γονιδίου G143A, σε αναφορά που έγινε το 2012. Παρόλα αυτά έχει αναφερθεί ότι η ανθεκτικότητα του μύκητα στις στρομπιλουρίνες

μειώνεται σημαντικά όταν αυτές αναμειχθούν με άλλες δραστικές ουσίες (Sierotzki, 2014).

Το eroxiconazole και το proproconazole έχουν χαρακτηριστεί ως πολύ αποτελεσματικά. Παρόλα αυτά έχει σημειωθεί ότι η αποτελεσματικότητά τους έχει ελαττωθεί από το έτος 2005 σε διάφορες χώρες της Ευρώπης, όμως όχι σε σημαντικό βαθμό (Cools *et al.*, 2013). Αν και το chlorothalonil είναι από τα παλαιότερα μυκητοκτόνα που έγινε χρήση του, διατηρεί την πλήρη αποτελεσματικότητά του επί πολλά έτη εφαρμογής του και μέχρι σήμερα (Fungicides sorted by FRAC Code, 2017).

Μελέτες άλλων ερευνητών αποκάλυψαν μια ευρεία διακύμανση της ευαισθησίας σε μυκητοκτόνα μεταξύ των απομονώσεων του *M. graminicola* μεταξύ δειγμάτων που ελήφθησαν από τις ίδιες χώρες Gisi *et al.* (1997). Επίσης στη FRAC αναφέρεται ότι από τη στιγμή εφαρμογής της οποιασδήποτε δραστικής ουσίας και χρήσης του αντίστοιχου μυκητοκτόνου χρειάζονται 2 με 10 χρόνια για την εμφάνιση της ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών. Αυτό δικαιολογεί απόλυτα τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον έλεγχο ευαισθησίας του μύκητα *M.graminicola* στην παρούσα διατριβή, όπου δεν παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα σε καμία δραστική ουσία από αυτές που εξετάστηκαν. Η συστηματική χρήση των μυκητοκτόνων για την αντιμετώπισή του παθογόνου από τις περιοχές δειγματοληψίας, ξεκίνησε κατά το έτος 2014 και η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε 2 χρόνια μετά.

Στο πλαίσιο της διερεύνησης της γενετικής ποικιλομορφίας του μύκητα *M. graminicola*, από δείγματα διαφορετικών περιοχών συλλογής, έγινε χρήση PCR με RAPDs εκκινητές. Οι συγκεκριμένοι εκκινητές ήταν οι D07, E15, F01, F04, U10 και U19 και οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία για την ανάδειξη φαινοτύπων από τους Tenzer *et al.*, (1999) και Koller *et al.*, (1993) για το μύκητα *Venturia inaequalis*. Η χρήση της PCR αποτελεί μια σύγχρονη μέθοδος της μελέτης της γενετικής βάσης της ανθεκτικότητας. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεθόδου για το μύκητα *M. graminicola* έδειξαν το εύρος των διαφορετικών φαινοτύπων των δειγμάτων που αξιολογήθηκαν. Η ποικιλομορφία τους είναι εμφανής στην αποτύπωση των αποτελεσμάτων.

Σύμφωνα με τους Stammler *et al.*, (2008), πολλές φορές οι δοκιμές υπό συνθήκες εργαστηρίου δεν συσχετίζονται με τις συνθήκες του αγρού. Αυτό συμβαίνει διότι σε επίπεδο αγρού υπάρχουν αστάθμητοι παράγοντες, οι οποίοι σχετίζονται με το χρόνο εφαρμογής των μυκητοκτόνων και τις επικρατούσες καιρικές συνθήκες και μπορεί να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων.

Αναφορικά με την επιδημιολογία του μύκητα, σε τυχαίοποιημένο αγρό σπάρθηκε σιτάρι, όπου και χωρίστηκε σε πειραματικά τεμάχια. Σε αυτά έγινε εφαρμογή μίγματος μυκητοκτόνου που αποτελούν από τις δραστικές *epoxiconazole* και *pyraclostrobin*, ενώ υπήρχαν και αφέκαστα αγροτεμάχια (control). Σε έρευνες που διεξήχθησαν, έγινε σάρωση προσβεβλημένων φύλλων σίτου από σεπτορίωση και μεταφορά της εικόνας στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ακολούθησε ανάλυση της εικόνας σε κατάλληλο λογισμικό επεξεργασίας εικόνας (Severity Pro). Με αυτό το λογισμικό υπολογίστηκε το ποσοστό προσβολής με βάση την έκταση του προσβεβλημένου ιστού και το ποσοστό της ύπαρξης ή μη ύπαρξης πυκνιδίων στο φύλλο. Η στατιστική επεξεργασία αυτών των αποτελεσμάτων έγινε με κατάλληλο λογισμικό (Shahini *et al.*, 2012; Vrapı *et al.*, 2012).

Στην παρούσα μελέτη αγρού συλλέχθηκαν 20 φυτά από κάθε πειραματικό τεμάχιο, στα οποία σημειώθηκε κατά προσέγγιση το ποσοστό προσβολής των τεσσάρων ανωτέρων φύλλων και την ύπαρξη πυκνιδίων. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση όπου και έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από φύλλα φυτών που είχε εφαρμοστεί μυκητοκτόνο και από αυτά που δεν είχε γίνει καμία εφαρμογή. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι σχετικά με το ποσοστό των προσβεβλημένων ιστών η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική. Η στατιστική ανάλυση σχετικά με την ύπαρξη πυκνιδίων παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των φύλλων φυτών που είχε εφαρμοστεί μυκητοκτόνο και των φυτών control. Αυτό αποδεικνύει τη θετική συσχέτιση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο σε σχέση με την αποτελεσματικότητα που υπάρχει σε επίπεδο αγρού.

Ερευνητές επιχείρησαν να εγκλωβίσουν ασκοσπόρια μυκήτων μέσω ενός συστήματος που οι ίδιοι δημιούργησαν. Το σύστημα αυτό ήταν από πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC) και διέθετε ένα συγκρότημα λεπτών φύλλων διαταγμένων κυκλικά. Το συγκρότημα των λεπτών φύλλων εκτελούσε περιστροφική κίνηση. Διέθετε ασπίδα για τη βροχή και ήταν προσαρμοσμένο σε μια σταθερή βάση ώστε να μην επηρεάζεται από τον άνεμο. Μέσω μιας σχισμής ο αέρας μετέφερε τα σωματίδια εντός της παγίδας και προσκρούονταν σε υλικό συλλογής. Αυτό είναι ένα κολλητικό μέσο όπου τα σπόρια έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν σε αυτό και στην πορεία να διαχωριστούν και να αναγνωριστούν (Gadoury *et al.*, 1983; Neumeister-Kemp *et al.*, 2004).

Για την εφαρμογή μιας παγίδας χρειάζεται να είναι γνωστές οι επικρατούσες καιρικές συνθήκες, οι κατευθύνσεις του ανέμου και η θερμοκρασία. Σημαντικό ρόλο παίζει και η καλή γνώση λειτουργίας της παγίδας μας. Θα πρέπει να είναι γνωστός ο τρόπος και ο όγκος αναρρόφησης του αέρα στη μονάδα του χρόνου (Naturhistoriska riksmuseet, 2014). Η τροφοδοσία του προγράμματός της καλό θα είναι να έχει ισχύ 24 ώρες ώστε να μπορούμε να διαπιστώσουμε κατά τη διάρκεια της ημέρας την ύπαρξη ή τη διακύμανση των σπορίων στον αέρα (DS Scientific, 2011). Η παγίδα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας ήταν επίσης αυτοσχέδια. Η βάση της ήταν από PVC και κούμπωνε με ένα σύστημα αναρρόφησης που στο επάνω μέρος του διέθετε μια σχισμή ώστε να εισέρχονται σε αυτό τα σωματίδια του αέρα. Τα αναρροφώμενα σπόρια, μέσω ενός σωλήνα από PVC εισέρχονταν σε δοχείο που περιείχε μικρή ποσότητα νερού βρύσης (50 ml). Η συσκευή δούλεψε με τη χρήση μπαταρίας αυτοκινήτου κατά τις πρωινές ώρες της ανοιξιάτικης περιόδου του έτος 2016 και η εφαρμογή της είχε διάρκεια μιας ώρας κάθε φορά. Η παγίδα εφαρμόστηκε συνολικά 5 φορές τους μήνες Μάρτιο και Απρίλιο. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν δεν έδωσαν αποτελέσματα στο εργαστήριο. Η δυσκολία μελέτης των συλλεχθέντων δειγμάτων έγκειται στο γεγονός ότι ο όγκος των δειγμάτων που έπρεπε να αξιολογηθούν ήταν πολύ μεγάλος και η μελέτη τους σε επίπεδο μικροσκοπίου ήταν δύσκολη. Στις δοκιμές για την καλύτερη επεξεργασία των δειγμάτων από την παγίδα εναερίου μολύσματος επιχειρήθηκε η δημιουργία συμπαγούς pellet από διάλυμα σπορίων. Το ίζημα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί είτε για μοριακές δοκιμές είτε για

μικροσκοπική παρατήρηση. Παρόλα αυτά το ίζημα δεν ήταν συμπαγές και. έπειτα από μικροσκοπική παρατήρηση, διαπιστώθηκε ο κατακερματισμός των σπορίων. Τα αποτελέσματα από την παγίδευση εναερίου μολύσματος με αυτοσχέδια παγίδα ήταν ασαφή. Η εφαρμογή της παγίδας διήρκησε για λίγη ώρα και ελάχιστες φορές λόγω δυσκολίας στην τροφοδοσία της, ενώ δεν ήταν γνωστός ο όγκος του αέρα που προσροφώνταν στη μονάδα του χρόνου. Η χρήση μιας τέτοιας παγίδας χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για την εφαρμογή της.



## **5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ♦ **Γεωργόπουλος, Σ.** (1984). *Βασικές Γνώσεις Φυτοπαθολογίας*. Εκδόσεις Σταμούλη. σελ. 253-260
- ♦ **Γεωργόπουλος, Σ., Ζιώγας, Β.** (1992). *Αρχές και Μέθοδοι Καταπολέμησης των ασθενειών των Φυτών*. Αθήνα.
- ♦ **Ζιώγας, Β., Μάρκογλου, Α.** (2010). *Γεωργική Φαρμακολογία, Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων*. Β' Έκδοση-εμπλουτισμένη. σελ. 10-12

## ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ◆ **Agrios, G. N.** (1988). *Plant Pathology*. 3<sup>rd</sup> Edition. New York Academic Press.
- ◆ **Anke, T., Oberwinkler F., Steglich, B. R. D. W., Schramm, G.** (1977). The strobilurins –New antifungal antibiotics from the Basidiomycetes *Strobilurus tenacellus* .*The Journal of Antibiotics* 30 (10), 806-810.
- ◆ **Arama P. F., Parlevliet J. E., van Silfhout C. H.,** (1999). Heading date and resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat not genetically associated. *Euphytica* 106, 63–8.
- ◆ **Arraiano, L. S., Brading, P. A., Dedryver , F., Brown, J. K. M.** (2006). Blackwell Publishing Ltd Resistance of wheat to *Septoria tritici* blotch (*Mycosphaerella graminicola*) and associations with plant ideotype and the 1BL –1RS translocation. *Plant Pathology* 55 (2), 54–61.
- ◆ **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 (7), 649-662.
- ◆ **Bayliss, K. L., Jackson S. L.** (2011). Spore traps need improvement to fulfil plant biosecurity requirements. *Plant Pathology* 60 (5), 801-810.
- ◆ **Becher, R., Wirsal, S. G. R.** (2012). Fungal cytochrome P450 sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. *Applied I Microbiology Biotechnology* 95 (4), 825–840.
- ◆ **Beyer, M., Kiesner, F., Verreet, J. A., Klink H.** (2011).Fungicides sensitivity of *Septoria tritici* field isolates is affected by an interaction between fungicidal mode of action and time. *Journal of Plant Pathology* 93 (1).
- ◆ **Bockus, W. W., Bowden, R. L., Hunger, R. M., Morrill, W. L., Murray, T. D., Smiley, R. W.** (2010). *Compendium of Wheat Diseases and Pests*. 3<sup>rd</sup> Edition. American Phytopathological Society.

- ◆ **Brent, K. J., Holleman, D. W.** (1998). Fungicide resistance: the assessment of risk. FRAC Monograph II. *Global Crop Protection*.
- ◆ **Changjun, C., Jianxin, W., Qingquan, L., Shankui, Y., Mingguo, Z.** (2017). Characterization and fitness of carbendazim-resistant strains of *Fusarium graminearum* (wheat scab). *Pest Management* 62 (12), 1201–1207.
- ◆ **Chartain, L., Brading, P. A., Widdowson, J. P., Brown J. K. M.** (2004). Partial resistance to *Septoria tritici* brotch (*Mycosphaerella graminicola*) in wheat cultivars Arina and Riband. *Phytopathology* 94 (5), 497-504.
- ◆ **Chen, C., Wang, J., Luo, Q., Yuan, S. and Zhou, M.** ( 2007). Characterization and fitness of carbendazim-resistant strains of *Fusarium graminearum* (wheat scab). *Pest Management Science* 63(12), 1201-7.
- ◆ **Cools, H. J., Hawkins N. J., Fraaije, B. A** (2013). Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi. *Plant Pathology* 62 (1) 36–42.
- ◆ **Cowger, C., Hoffer, M. E., Mundt, C. C.** (2000). Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathology* 9 (4), 445–51.
- ◆ **Doohan, F. M., Parry, D. M., Jenkinson, P., Nicholson. P.** (1998). The use of species-specific PCR-based assays to analyse *Fusarium* ear blight of wheat. *Plant Pathology* 47 (2), 197-205.
- ◆ **Eyal, Z.** (1999). The *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* blotch diseases of wheat. *European Journal of Plant Pathology* 105 (7), 629–41.
- ◆ **Eyal, Z., Levy E.** (1987). Variations in pathogenicity patterns of *Mycosphaerella graminicola* within *Triticum spp.* in Israel. *Euphytica* 36 (1), 237–50.

- ◆ **Eyal, Z., Scharen, A. L., Prescott, J. M., van Ginkel., M.** (1987). *The Septoria Diseases of Wheat: Concepts and methods of disease management*. Mexico, pp.1-38.
- ◆ **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 (4), 701-708.
- ◆ **Fox, R. T. V.** (1993). *Principles of diagnostic techniques in plant pathology*. CAB INTERNATIONAL
- ◆ **Gadoury, D. M., MacHardy, W. E.** (1983). A 7-Day Recording Volumetric Spore Trap. *Phytopathology* 73 (11) 1526-1531.
- ◆ **Genet, J. L., Jaworska. G.** (2009) Baseline sensitivity to proquinazid in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* and *Erysiphe necator* and cross-resistance with other fungicides. *Pest management science* 65 (8) 878-884.
- ◆ **Ginkel, M. V., Rajaram, S.** (1993). *Breeding for durable resistance to diseases in wheat: an international perspective*. In- *Durability of Disease Resistance*. Volume 18. Editors Jacobs, Parlevliet,. Dordrecht, the Netherlands: *Kluwer Academic*, pp.258–79.
- ◆ **Gisi, U., Hermann, D., Ohi, L., Steden, C.** (1997). Sensitivity profiles of *Mycosphaerella graminicola* and *Phytophthora infestans* populations to different classes of fungicides. *Pesticide Science* 51 (3), 290-298.
- ◆ **Gladders, P., Paverely, N.D Barrie, I.A., Hardwick, N., Hims, M.J., Langton, S., Taylor M. C.** (2001). Agronomic and meteorological factors affecting the severity of leaf blotch caused by *Mycosphaerella graminicola* in commercial wheat crops in England. *Annals of Applied Biology* 138 (3), 301-311.
- ◆ **Gouache, D., Bensadoun, A., Brun, F., Page C., Makowski, D., Wallach D.** (2013). Modelling climate change impact on *Septoria tritici*

blotch (STB) in France: Accounting for climate model and disease model uncertainty. *Agricultural and Forest Meteorology* 170, 242-252.

- ◆ **Guo, J. R., Verreet, J. A.** (2008). Formation and Germination of *Septoria tritici* Secondary Conidia as Affected by Environmental Factors. *Journal Phytopathology* 156 (10) 635-637.
- ◆ **Gouot, J. M.** (1994). *Characteristics and population dynamics of Botrytis cinerea and other pathogens resistant to dicarboximides. In: Fungicide Resistance in North America (Delp C.J., ed.)*. The American Phytopathological Society, USA, p. 53-55.
- ◆ **Guerrero, J. P., Torriani, S. F. F., Zala, M., Carter, D., Courbot, M., Rudd, J. J., McDonald, B. A., Croll, D.** (2016). Comparative transcriptomic analyses of *Zymoseptoria tritici* strains show complex lifestyle transitions and intraspecific variability in transcription profiles. *Molecular Plant Pathology* 17 (6), 845-859.
- ◆ **Gurung, R. B., Purdie, A. C., Whittington, R. J., Begg, D. J.** (2014). Cellular and humoral immune responses in sheep vaccinated with candidate antigens MAP2698 and MAP3567 from *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Cellular and Infection Microbiology* 93 (4).
- ◆ **Hardwick, N. V., Jones, D. R., Slough J. E.** (2001). Factors affecting diseases of winter wheat in England and Wales. *Plant Pathology* 50 (5), 453–62.
- ◆ **Hoelzel, A. R.** (1998). *Molecular Genetic Analysis of Populations; a Practical Approach*. Practical Approach. Oxford: Oxford University Press.
- ◆ **Hunter, T., Coker, R. R., Royle D. J.** (1999). The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of *Septoria tritici* blotch on winter wheat in the UK. *Plant Pathology* 48 (1), 51–57.

- ◆ **Iqbal, Z., Lateef, M., Jabbar, A., Gilani A. H.** (2010). *In vivo* anthelmintic activity of *Azadirachta indica* A. Juss seeds against gastrointestinal nematodes of sheep. *Veterinary Parasitology* 168 (1-2), 342–345.
- ◆ **Jenkyn, J. F., Brainbridge, A.** (1973). Disease gradients and small experiments on barley mildew. *Annals of Applied Biology* 76 (3), 269-279.
- ◆ **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 Biology* 6(6), 1353-1365.
- ◆ **Kema, G. H. J., Annone J. G.** (1991). *In vitro* production of pycnidia by *Septoria tritici*. *Netherlands Journal of Pathology* 97 (2) 65-72.
- ◆ **Kema G. H. J., Verstappen E. C. P., Todorova M., Waalwijk C.** (1996b). Successful crosses and molecular tetrad and progeny analyses demonstrate heterothallism in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics* 30 (3), 251-258.
- ◆ **Kennedy, R., Wakeham ,A. J., Byrne, K. G., Meyer, U. M., Dewey, F. M.,** (2000). A New Method To Monitor Airborne Inoculum of the Fungal Plant Pathogens *Mycosphaerella brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (7), 2996–3003.
- ◆ **Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J. M., Gessler, C.,** (1993). Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 85 (6), 901-904.
- ◆ **Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A. S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H. J., Pradier, J. M., Leroux, P., De Waard, M., Hahn, M.** (2009). Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLOS Pathogens* 5 (12).

- ◆ **Kumar, N.S., Gurusubramanian, G.** (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Science Vision*, 1 (1), 11, 116-124.
- ◆ **Lendenmann, M.H., Croll, D., Stewart, E.L., McDonald, B.A.** (2014). Quantitative Trait Locus Mapping of Melanization in the Plant Pathogenic Fungus *Zymoseptoria tritici*. *G3: GENES, GENOMES, GENETICS* 4 (12), 2519-2533.
- ◆ **Leroux, P., Gredt, M.** (1989). Negative cross-resistance of benzimidazole-resistant strains of *Botrytis cinerea*, *Fusarium nivale* and *Pseudocercospora herpotrichoides* to various pesticides. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 95 (1) 121-127.
- ◆ **Leroux, M.R., Fandrich, M., Klunker, D., Siegers, K., Lupas, A.N., Brown, J.R., Schiebel, E., Dobson, C.M., Hartl, F.U.** (1999). MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin. *Journal EMBO* 18 (23), 6730-43.
- ◆ **Leroux, P., Walker, AS.** (2010). Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 67 (1), 44-59.
- ◆ **Long, J.W., Siegel, M. R. and Tillman, R.W.** (1973). Mechanism of action and fate of the fungicide chlorothalonil (2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile) in biological systems: I. Reactions with cells and subcellular components of *Saccharomyces pastorianus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 3 (2), 160-167.
- ◆ **Ma, Z., Michailides, T. J.** (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24 (10), 853-863.
- ◆ **Magboul, A.M, Geng, S. Gilchrist, D.G and Jackson, L.F.** (1992). Environmental influence of the infection of wheat by *Mycosphaerella graminicola*. *Physiopathology* 82 (12), 1407–13.



- ◆ **Malathrakis, N.E.** (1989). Resistance of *Botrytis cinerea* to dichlofluanid in greenhouse vegetables. *Plant Disease* 73 (2), 138-41.
- ◆ **McDonald, B.A.** (1997). The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87, 448–453.
- ◆ **Midorikawa, G.E.O., Pinheiro, M.R.R., Vidigal, B.S., Arruda, M.C., Costa, F.F., Pappas, G.J. Jr., Ribeiro, S. G., Freire, F. and Miller, R.N.G.** (2008). Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. *Letters in Applied Microbiology* 47 (1), 12-18.
- ◆ **Mofokeng, M.A.** (2012). Full Length Research Paper Comparison between random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) markers with high resolution melt analyses in genetic variation analysis among selected sorghum genotypes. *African Journal of Biotechnology* 11 (102), 16697-16707.
- ◆ **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.
- ◆ **Palma-Guerrero, J., Torriani, S. F. F., Zala, M., Carter, D., Courbot, M., Rudd, J.J, McDonald, B. A., Croll, D.** (2016). Comparative transcriptomic analyses of *Zymoseptoria tritici* strains show complex lifestyle transitions and intraspecific variability in transcription profiles. *Molecular Plant Pathology* 17 (6) 845-859. [Online]. Available at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10,1111/mpp.12333/supinfo>>. [Last Access: eion: 5/6/17]
- ◆ **Paplomatas, E. J., Pappas, C. and Antoniadis, D.** (2014). Analysis A Relationship among Fungicide-resistant Phenotypes of *Botrytis cinerea* Based on RAPD . *Journal of Phytopathology* 152 (9-8), 503-508
- ◆ **Pietravalle, S., Shaw, M. W., Parke, S. R. and Van den Bosch F.** (2003). Modeling of Relationships Between Weather and *Septoria tritici*

Epidemics on Winter Wheat: A Critical Approach. *Phytopathology* 93 (10), 1330-1339.

- ◆ **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 (4), 726-732.
- ◆ **Polley R. W and Thomas M. R.** (1991). Surveys of diseases of winter wheat in England and Wales. *Annals of Applied Biology* 119 (1), 1–20.
- ◆ **Pontzen, R., Scheinpflug, H.** (1989). Effects of triazole fungicides on sterol biosynthesis during spore germination of *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* and *Puccinia graminis* f s: *tritici*. *Netherland Journal of Plant Pathology* 95 (5), 151–160.
- ◆ **Rekanović, E., Mihajlović, M., PotočnikPestic, I.** (2010). *In vitro* Sensitivity of *Fusarium graminearum* (Schwabe) to Difenconazole. *Prothioconazole and Thiophanate-Methyl*. *Phytomedical* 25 (4), 325–333.
- ◆ **Ribas, A.D., Spolti, P., Del Ponte, E.M., Donatoc, K.Z., Schrekker, H., Fuentesfria, A.M.** (2016). Is the emergence of fungal resistance to medical triazoles related to their use in the agroecosystems? A mini review. *Brazilian Journal of Microbiology* 47 (4), 793–799.
- ◆ **Saidi, A., Eslahi, M. R., Safaie, N.** (2012). Efficiency of *Septoria tritici* sporulation on different culture media. *Trakia. Journal of Sciences* 10 (3) 15-18.
- ◆ **Sanderson, F. R. and Hampton, J. G.** (1978). Role of the perfect states in the epidemiology of the common *Septoria* diseases of wheat. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21 (2), 277-81.
- ◆ **Shahini, Z., Vrapı, H., Varaku, S.** (2012). Wheat leaf diseases dynamics in Albania. *International Refereed Journal of Engineering and Science* 1 (4) 32-36.

- ◆ **Schnabel, G. and Jones, A.L.** (2001). The 14a-demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology* 91 (1), 102–110.
- ◆ **Steinberg, G.** (2015). *Cell biology of Zymoseptoria tritici: Pathogen cell organization and wheat infection*. Fungal Genetics and Biology 79, pp 17-23.
- ◆ **Stammler, G., Speakman J.** (2006). Microtiter Method to Test the Sensitivity of Botrytis cinerea to Boscalid. *Journal Phytopathology* 154 (7-8), 508–510.
- ◆ **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<sup>α</sup>-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 (2), 103-252.
- ◆ **Steinberg, G.** (2015). *Cell biology of ZymoSeptoriatritici: Pathogen cell organization and wheat infection*. Fungal Genetics and Biology 79, 17-23.
- ◆ **Stephen, B. Goodwin** (2011), Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure, Chromosome Plasticity, and Stealth Pathogenesis, *Plos Genetics* 7 (6).
- ◆ **Suffert, F., Satche, I.** (2011). Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe. *Plant Pathology* 60 (5), 878–889.
- ◆ **Tenzer, I. and Gessler, C.** (1999). Genetic diversity of *Venturia inaequalis* across Europe. *European Journal of Plant Pathology* 105 (6), 545–552.

- ◆ **Vincelli, P. and Tisserat, N.** (2008). Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. *Plant Diseases* 92 (5), 660-669.
- ◆ **Vrapı, H., Gıxhari, B., Kasht, F., Sulovari, H., Ruci T.** (2012). The Relationship between Diseases Index of *Septoria* Leaf Blotch, Leaf Rust and Yield Losses in Bread Wheat Cultivar in Albania. *Journal of Environmental Science and Engineering USA*. 8 (1) 957-965
- ◆ **Wainshilbaum, S. J. and Lipps, P. E. (1991).** Effect and Growth on Development of Leaf and Glume Blotch Caused by *Septoria tritici* and *S. nodorum*. *Plant Disease* 75 (10), 993-998.
- ◆ **Wang, J., Patel, V., Woolsey, C.A., Hovakimyan, N. and Schmale D.G.,** (2007). L1 Adaptive control of a UAV for aerobiological sampling. American Control Conference, New York, USA. IEEE Ed. pp.11-13.
- ◆ **Wang ,S, Miao, X., Zhao, W., Huang, B., Fan, M., Li, Z., Huang, Y.**(2015).Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). *Mycological Research* 109 (12), 1364-1372.
- ◆ **Wiese, M. V.** (1991). *Compedium of Wheat Diseases*. 2<sup>nd</sup> Edition. American Phytopathological Society.
- ◆ **Welsh, J., McClelland, M.,** (1990),Fingerprln tln g genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18 (24), 7213-7218.
- ◆ **Williams, J. G. K., 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 Research* 18 (22), 6531-6535.
- ◆ **Zhang, J., Rosenberg, H. F., Nei. M.** (1998). Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *National Academy of Sciences (USA)* 95 (7), 3708-3713.

- ◆ **Ziogas B. N., Baldwin, B. C., Young, J. E.** (1997). Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pesticide Science* 50 (1), 28-34.

## ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

- ◆ **Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.** Κατάλογος δραστικών ουσιών ανά καλλιέργεια. [Online]. Available at <[http://www.minagric.gr/syspest/syspest\\_crops.aspx](http://www.minagric.gr/syspest/syspest_crops.aspx)> [Last Access: 2/6/17]
- ◆ **Ben hassine, A., Hamada, W.** (2014). First isolation of the *Mycosphaerella graminicola* teleomorph stage causing *Septoria* leaf blotch on wheat in Tunisia. *New Disease Reports* 29, 18. [Online]. Available at <<https://www.ndrs.org.uk/article.php?id=029018>> [Last Access: 2/6/17]
- ◆ **Cornell University.** [n.d]. Resistance Management is Essential with Strobilurin Fungicides. [Online]. Available at <<http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Strobilurins.htm>> [Last Access: 2/6/17]
- ◆ **Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia.** (2016). Diagnosing *Septoria avenae* blotch in oats. [Online]. Available at <<https://www.agric.wa.gov.au/oats/diagnosing-Septoria-avenae-blotch-oats>> [Last Access: 2/6/17]
- ◆ **Department of Crop Sciences University of Illinois at Urbana-Champaign.** *Septoria* Disease of Oats. [Online]. Available at <<https://ipm.illinois.edu/diseases/rpds/111.pdf>> [Last Access: 2/6/17]
- ◆ **DS Scientific.** Scientific Product catalog. (2011). [Online]. Available at <<http://ionicsporetrap.com/~ionicspo/uploads/File/DS%20catalog%20011.pdf>> [Last Access: 2/6/17]
- ◆ **FRAC.** (2006). Mutations associated with QoI resistance. Available online at <<http://frac.info/frac/work/Mutations%20associated%20with%20QoI%20resistance.pdf>> [Last Access: 2/6/17]

- ◆ **FRAC.** (2009). FRAC Code List: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Codenumbering). [Online]. Available at <[http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC\\_CODE\\_LIST.pdf](http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC_CODE_LIST.pdf)> [Last Access: 2/6/17]
  
- ◆ **FRAC.** (2012). List of pathogens with field resistance towards QoI fungicides 2012 [Online]. Available at <[http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-quick-references/species-with-qo-resistance-\(updated-2012\).pdf?sfvrsn=4](http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-quick-references/species-with-qo-resistance-(updated-2012).pdf?sfvrsn=4)> [Last Access: 2/6/17]
  
- ◆ **Monitoring Methods.** (FRAC). [Online]. Available at <<http://www.frac.info/monitoring-methods>> [Last Access: 2/6/17]
  
- ◆ **Fungicides sorted by FRAC Code.** FRAC CODE LIST 1. (FRAC). [Online]. Available at <[http://ipm.ifas.ufl.edu/resources/success\\_stories/T&PGuide/pdfs/Appendices/Appendix6-FRAC.pdf](http://ipm.ifas.ufl.edu/resources/success_stories/T&PGuide/pdfs/Appendices/Appendix6-FRAC.pdf)> [Last Access: 2/6/17]
  
- ◆ **HGCA.** (2012). *Septoria tritici* In Winter Weat. [Online]. Available at <[https://cereals.ahdb.org.uk/media/178045/ts113\\_Septoria\\_tritici\\_in\\_winter\\_wheat.pdf](https://cereals.ahdb.org.uk/media/178045/ts113_Septoria_tritici_in_winter_wheat.pdf)> [Last Access: 2/6/17]
  
- ◆ **Hollaway, G.** (2014). *Septoria tritici* Blotch of Wheat (Information Note AG1336). Victorian Government Department of Environment and Primary Instruction. Available at <[http://agriculture.vic.gov.au/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0016/262330/Septoria-Tritici-Blotch-Wheat-AG1336-May-V5-GH.pdf](http://agriculture.vic.gov.au/__data/assets/pdf_file/0016/262330/Septoria-Tritici-Blotch-Wheat-AG1336-May-V5-GH.pdf)> [Last Access: 2/6/17]
  
- ◆ **Index Fungorum.** [n.d]. *Mycosphaerella graminicola* [Online]. Available at <<http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>> [Last Access: 2/6/17]
  
- ◆ **McDonald, B. A.** (1997). The population genetics of fungi: tools and techniques. [Online]. Available at <[http://apsjournals.apsnet.org/doi/10,1094/PHYTO.1997.87.4.448](http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.1997.87.4.448)> [Last Access: 2/6/17]

- ◆ **Mycobank.** [n.d]. *Mycosphaerella graminicola*. [Online]. Available at <<http://www.mycobank.org/BioloMICSDetails.aspx?Rec=50925>> [Last Access: 2/6/17]
  
- ◆ **Naturhistoriska riksmuseet.** (2014). [Online]. Available at <[http://www.nrm.se/english/researchandcollections/environmentalresearchandmonitoring/palynologicalaboratory/airbornepollenandsporesanalyses.285\\_en.html](http://www.nrm.se/english/researchandcollections/environmentalresearchandmonitoring/palynologicalaboratory/airbornepollenandsporesanalyses.285_en.html)> [Last Access: 2/6/17]
  
- ◆ **Poole, N.** 2005. *Cereal growth stages – the link to crop management*. Grains Research and Development Corporation GRDC. [Online] Available at <<http://www.grdc.com.au/uploads/documents/GRDCCerealGrowthStagesGuide1.pdf>> [Last Access: 5/6/17]
  
- ◆ **Ponomarenko, A., Goodwin, S.B., Kema G.H.J.** (2011). *Septoria tritici* blotch (STB) of wheat. Plant Health Instructor. [Online] Available at <<https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=249265>> [Last Access: 5/6/17]
  
- ◆ **Rogers, D. W., Baldini, F., Battaglia, F., Panico, M., Dell, A., Morris, H. R., Catteruccia, F.** (2009). Transglutaminase-Mediated Semen Coagulation Controls Sperm Storage in the Malaria Mosquito. *PLOS Biology*. [Online]. Available at <[http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10,1371/journal.pbio.1000272](http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1000272)> [Last Access: 2/6/17]
  
- ◆ **Sierotzki, H.** QoI Working Group. (FRAC) [Online]. Available at <<http://www.frac.info/working-group/qol-fungicides>> [Last Access: 2/6/17]
  
- ◆ **Sierotzki, H., Regula, F.,** (2006). Syngenta Crop Protection, Schaffhauserstrasse. (FRAC) [Online]. Available at <<http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/plasvi-microtiter.pdf?sfvrsn=4>> [Last Access: 2/6/17]



## Παράρτημα

Πίνακας 3 Τιμές EC50 σχετικά με την ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα *M. graminicola* απορρόφησης 450 nm.

EC50- 405nm					
Απομόνωση	Epoixiconazole	Propioconazole	Azoxistrobin	Chlorothanoniil	Prochloraz
C1	0,027	0,001		0,002	0,002
C3	0,001	<<0,001		0,005	<<0,001
C4	0,01	0,0018		0,002	<<0,001
C5	0,001	0,002		0,003	0,001
C6	0,001	0,001		0,002	<<0,001
C8	0,002	0,007		0,025	0,005
C9	<<0,001	<<0,001		0,001	0,001
C10	0,001	0,002		0,001	0,001
C11	0,002	0,001		0,001	0,004
C12	0,002	0,002		0,031	<<0,001
C13	0,027	0,007	<<0,001	0,049	0,002
C14	0,001	0,003	0,001	0,03	0,002
C15	0,033	0,005	0,001	0,058	0,004
C17	0,003	0,002	<<0,001	0,034	0,003
C18	0,002	0,001	0,0018	<<0,001	0,004
C20	<<0,001	<<0,001		0,001	<<0,001
C21	0,001	0,001	0,004	<<0,001	0,002
C24	0,043	0,006		0,091	<<0,001
C27	<<0,001	0,087		0,031	0,006
C29	0,004	0,035		0,037	0,017
C31	<<0,001	<<0,001		0,001	<<0,001
C33	<<0,001	<<0,001		<<0,001	<<0,001
CB	0,003	0,002	0,0018	0,018	<<0,001
CG	0,0018	<<0,001	0,001	<<0,001	<<0,001
6.1	0,002	0,073		0,027	0,019
6.2	0,002	0,08		0,021	0,02
6.3	0,001	0,074		0,029	0,02
6.4.	0,002	0,082		0,031	0,017
Σ1	0,018	0,003	0,001	0,037	0,002
Σ3	0,012	0,006	<<0,001	0,058	0,005
Σ4	0,001	0,001	0,0015	0,007	<<0,001
Σ5	0,0017	0,001	0,001	0,004	0,005
Σ7	0,002	0,001	0,0017	0,034	0,01
M1	<<0,001	0,002		0,029	0,003
M2	0,003	0,004		0,037	0,003
M3	0,096	0,008		0,019	0,002
M1.1	<<0,001	<<0,001		0,005	0,002
M1.2	0,001	0,001		0,01	0,002
M1.3	0,001	0,002		0,002	0,002
M1.4	<<0,001	<<0,001	<<0,001	0,002	0,002
K1	0,002	0,001		0,002	0,002
K2	<<0,001	0,001		0,002	0,002
K3	0,004	0,001		0,006	<<0,001

**Πίνακας 4.** Τιμές EC50 σχετικά με την ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα *M. graminicola* απορρόφησης 630 nm

<b>EC50- 630nm</b>					
<b>Απομόνωση</b>	<b>Epoixiconazole</b>	<b>Propioconazole</b>	<b>Azoxistrobin</b>	<b>Chlorothanoni</b>	<b>Prochloraz</b>
<b>C1</b>	0,002	<<0,001		0,002	0,002
<b>C3</b>	0,001	<<0,001		0,082	0,002
<b>C4</b>	<<0,001	0,005		0,024	0,002
<b>C5</b>	0,001	0,002		0,002	0,001
<b>C6</b>	0,008	0,029		0,003	0,014
<b>C8</b>	0,002	0,005		0,015	0,01
<b>C9</b>	0,001	<<0,001		0,002	0,001
<b>C10</b>	0,001	0,003		0,001	0,002
<b>C11</b>	0,001	0,0032		0,002	0,002
<b>C12</b>	0,012	0,002		0,032	<<0,001
<b>C13</b>	0,0032	0,006	0,004	0,048	0,003
<b>C14</b>	0,03	0,004	0,004	0,038	0,005
<b>C15</b>	0,044	0,009	<<0,001	0,062	0,009
<b>C17</b>	0,004	0,002	<<0,001	0,032	0,0003
<b>C18</b>	0,003	0,001	0,002	0,002	0,0036
<b>C20</b>	<<0,001	<<0,001		0,002	0,001
<b>C21</b>	0,001	0,003	0,0031	0,001	0,001
<b>C24</b>	0,043	0,006		0,096	<<0,001
<b>C27</b>	<<0,001	0,0517		0,009	0,006
<b>C29</b>	0,004	0,132		0,022	0,018
<b>C31</b>	<<0,001	<<0,001		0,002	0,001
<b>C33</b>	<<0,001	<<0,001		0,001	<<0,001
<b>CB</b>	0,003	0,003	<<0,001	0,018	0,001
<b>CG</b>	<<0,001	<<0,001	0,004	0,001	<<0,001
<b>6.1</b>	0,002	0,0137		0,019	0,018
<b>6.2</b>	0,001	0,2		0,02	0,018
<b>6.3</b>	0,002	0,7		0,039	0,113
<b>6.4.</b>	0,002	0,172		0,023	0,016
<b>Σ1</b>	0,032	0,004	0,003	0,038	0,002
<b>Σ3</b>	0,027	0,009	0,001	0,038	0,006
<b>Σ4</b>	<<0,001	0,001	0,001	0,008	<<0,001
<b>Σ5</b>	0,002	0,007	0,001	0,01	0,007
<b>Σ7</b>	0,018	0,001	0,001	0,009	0,002
<b>M1</b>	<<0,001	0,002		0,023	0,003
<b>M2</b>	0,004	0,005		0,036	0,004
<b>M3</b>	0,016	0,007		0,028	0,003
<b>M1.1</b>	<<0,001	0,001		0,006	0,003
<b>M1.2</b>	0,002	0,004		0,018	0,003
<b>M1.3</b>	0,001	0,0018		0,0032	0,001
<b>M1.4</b>	<<0,001	<<0,001	<<0,001	0,003	0,002
<b>K1</b>	0,002	0,001		0,002	0,002
<b>K2</b>	<<0,001	<<0,001		0,004	0,002
<b>K3</b>	0,03	0,001		0,04	<<0,001