



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΕΛΙΑΙΑΣ ΚΑΙ ΥΠΟΤΡΟΠΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ
ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

«Συμβατότητα του ενδοφυτικού βιολογικού παράγοντα FsK
με μυκητοκτόνα σε καλλιέργεια τομάτας»

“A *Fusarium solani* endophyte vs fungicides: Compatibility
in a *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*- tomato
pathosystem”

Δασκαλάκη Ευφροσύνη Ραφαέλλα

Χανιά, 2020

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Καβρουλάκης Νεκτάριος, Επιβλέπον Καθηγητής. Ερευνητής Β΄ του Ινστιτούτου Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών & Αμπέλου Χανίων, ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας.

Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος.

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Η βιολογική καταπολέμηση ασθeneιών των φυτών.	8
1.2. Χημική αντιμετώπιση (μυκητοκτόνα)	10
1.2.1 Μη εξειδικευμένοι παρεμποδιστές	11
1.2.1.1 Διθειοκαρβαμιδικά- Mancozeb	11
1.2.2 Εξειδικευμένοι παρεμποδιστές	12
1.2.2.1 Παρεμποδιστές του Συμπλόκου II της Αναπνευστικής Αλυσίδας (SDHIs)	12
1.2.2.1.1 Boscalid	14
1.2.2.2 Παρεμποδιστές του Συμπλόκου III της Αναπνευστικής Αλυσίδας.	14
1.2.2.2.1 Στρομπιλουρίνες ή Μεθοξακρυλικά	15
1.2.2.2.2 Μεθοξυκαρβαμιδικά-Pyraclostrobin	16
1.2.2.3 Παρεμποδιστές της εναλλακτικής αναπνοής.	16
1.2.2.3.1 SHAM	17
1.2.2.4. Παρεμποδιστές της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης -Φαινυλοπυρρολικά	17
1.2.2.4.1 Fludioxonil	18
1.2.2.5 Παρεμποδιστές της έκκρισης άλλων λυτικών ενζύμων-Ανιλινοπυριμιδίνες	18
1.2.2.5.1 Cyprodinil	19
1.2.2.6 Παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης Συστατικών των Κυτταρικών Μεμβρανών.	19
1.2.2.6.1 Παρεμποδιστές της Βιοσύνθεσης της Εργοστερόλης (EBIs) ή Παρεμποδιστές της Βιοσύνθεσης Στερολών (SBIs).	20
1.2.2.6.1.1 Ιμιδαζολικά- Prochloraz	21
1.2.2.6.1.2 Τριαζολικά- Difenoconazole	21
1.2.2.6.1.3 Υδροξυανιλίδια- Fenhexamid	22
1.3 Εδαφικοί φυτοπαθογόνοι μύκητες	22
1.3.1 Ο μύκητας <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis lycopersici</i> (FORL)	23
1.3.2 Η ασθένεια- αδροφουζαρίωση και ξηρές σήψεις	24
1.4 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί	25
1.4.1 Ο ενδοφυτικός μύκητας FsK	26
1.5 Σκοπός	27
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
2.1 Στελέχη μυκήτων και συνθήκες καλλιέργειας.	28
2.2 Μυκητοκτόνα	28
2.3 In vitro πειράματα μυκητοτοξικότητας.	29

2.4 Η επίδραση των μυκητοκτόνων στην παραγωγή κονιδίων του FsK.	29
2.5 Η επίδραση των μυκητοκτόνων στο FsK in planta.	30
2.5.1 Φυτικό υλικό και εμβολιασμός.	30
2.5.2 Η εφαρμογή των μυκητοκτόνων στα εμβολιασμένα με FsK φυτά ντομάτας.	31
2.5.2.1 Η επίδραση των μυκητοκτόνων στην επιβίωση του FsK.	31
2.5.2 Η επίδραση των μυκητοκτόνων στον αποικισμό των ριζών τομάτας από το FsK.	31
2.5.2.1 Απομόνωση DNA από φυτικούς ιστούς.	31
2.5.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός του αποικισμού του FsK μέσω qPCR.	31
2.6 Η επίδραση των μυκητοκτόνων στις κατασταλτικές ιδιότητες του FsK ενάντια στο <i>F. oxysporum f.sp. radicis-lycopersici</i> .	32
2.7 Ανάλυση δεδομένων.	33
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	34
3.1 Η in vitro ευαισθησία στα μυκητοκτόνα του FsK.	34
3.2 Η επίδραση της εφαρμογής των μυκητοκτόνων στην επιβίωση του FsK και στον αποικισμό των ριζών τομάτας.	39
3.3 Η επίδραση των μυκητοκτόνων στις κατασταλτικές ιδιότητες του FsK ενάντια στο <i>F. oxysporum f.sp. radicis-lycopersici</i> .	40
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	45

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ασκομύκητας *Fusarium solani* strain *K* (FsK), είναι ένας μη παθογόνος ενδοφυτικός μύκητας. Στην παρούσα μελέτη αξιολογείται η ικανότητά του να χρησιμοποιηθεί ως βιολογικός παράγοντας σε συνδυασμό με εννέα μυκητοκτόνα, τα οποία ενδείκνυνται για την καταπολέμηση ασθενειών των φυτών τομάτας στην Ελλάδα. Αρχικά πραγματοποιούνται *in vitro* δοκιμές για να ελεγχθεί η τοξικότητά τους ως προς το FsK. Τα μυκητοκτόνα thiophanate-methyl, fenhexamid, cyprodinil, boscalid και mancozeb, σε συγκεντρώσεις >100μg/mL δεν προκαλούν τοξικότητα. Αντιθέτως τα μυκητοκτόνα prochloraz, fludioxonil, pyraclostrobin και difenoconazole είναι τα πιο τοξικά. Κανένα από τα παραπάνω εννέα φυτοφάρμακα δεν εμφανίζουν αντισποριογόνο δράση ενάντια στο FsK. Επιπλέον γίνονται δοκιμές για να αξιολογηθεί η πιθανή αρνητική επίδραση των επιλεγμένων μυκητοκτόνων, στην αποίκιση των ριζών από τον ενδοφυτικό μύκητα. Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη Real Time PCR διαπιστώνεται ότι δεν είναι θανατηφόρα *in planta*. Έπειτα αποδεικνύεται ότι οι κατασταλτικές ιδιότητες του FsK ενάντια στο *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) δεν επηρεάζονται δυσμενώς μετά από τον εμβολιασμό των φυτών τομάτας στη συνηστώμενη δόση των εμπορικών συσκευασμάτων των fludioxonil (Switch) και pyraclostrobin (Comet). Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι το Comet μειώνει κατά 60% τις επιπτώσεις της ασθένειας στα μη εμβολιασμένα με FsK φυτά τομάτας, και κατά 66% στα φυτά που έχουν δεχθεί επέμβαση με το FsK σε συνδυασμό με το μυκητοκτόνο. Αυτή η αύξηση μαρτυρά μια ελαφριά αλλά σημαντική συνεργιστική δράση μεταξύ του pyraclostrobin (Comet) και του FsK. Εν κατακλείδι, ο βιολογικός αυτός παράγοντας δεν είναι μόνο κατάλληλος για προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης ασθενειών που περιλαμβάνουν όλα τα δοκιμασμένα μυκητοκτόνα, αλλά επίσης κάποιοι συνδυασμοί FsK-μυκητοκτόνων μπορούν να εμφανίσουν συνεργιστική δράση για την αντιμετώπιση της ασθένειας που προκαλεί ο εδαφικός παθογόνος μύκητας FORL.

ABSTRACT

The ascomycetes *Fusarium solani* strain K (FsK) is a non-pathogenic endophytic fungus. In this research the potential of FsK to be utilized as a biocontrol agent in combination with nine fungicides, registered for tomato crop protection in Greece, is evaluated. Firstly, *in vitro* tests are made to evaluate the fungitoxicity against the FsK. The fungicides thiophanate-methyl, fenhexamid, cyprodinil, boscalid and mancozeb are not toxic in concentrations $>100\mu\text{g/mL}$. In the other hand, prochloraz, fludioxonil, pyraclostrobin and difenoconazole, are the most toxic fungicides. None of the above pesticides affect conidial production of FsK. Moreover, tests are being carried out to evaluate the possible adverse effect of the selected fungicides on the root colonization by the endophytic fungus. Results from Real Time PCR show that they are not lethal *in planta*. Furthermore, it was shown that the disease suppressive ability of FsK against *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) is not adversely affected by the post-inoculation application of commercial formulations of fludioxonil (Switch) and pyraclostrobin (Comet). Remarkably, Comet reduces the symptoms of the disease by 60% on non-inoculated tomato plants, and by 66% on FsK-treated plants in combination with the fungicide. This increase indicates a slight but significant synergistic effect between pyraclostrobin (Comet) and FsK. In conclusion, the biological agent FsK is not only suitable for use in tomato intergrated disease management programs that include all tested fungicides but, also, some FsK-fungicide combinations may exhibit synergistic action in the treatment of soil-borne fungal disease (FORL).



Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/funbio

A *Fusarium solani* endophyte vs fungicides: Compatibility in a *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* – tomato pathosystem

Anastasios Malandrakis^{a, b, **}, Efosini Rafaella Daskalaki^{b, c}, Vasiliki Skiada^c,
Kalliope K. Papadopoulou^c, Nektarios Kavroulakis^{b, *}

^a Pesticide Science Laboratory, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, 11855 Athens, Greece

^b Hellenic Agricultural Organization “Demeter”, Institute for Olive Tree, Subtropical Plants and Viticulture, Agrokípio-Souda, 73164 Chania, Greece

^c Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Biopolis, 41500, Larissa, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2018

Received in revised form

7 October 2018

Accepted 12 October 2018

Available online 23 October 2018

Corresponding Editor: Nicholas Money

Keywords:

Biocontrol

Integrated disease management

Suppressive activity

Synergism

ABSTRACT

The potential of F_sK, a non-pathogenic endophytic *Fusarium solani* strain, to be utilized as a biocontrol agent in combination with nine selected fungicides registered in tomato crops in Greece was evaluated. *In vitro* fungitoxicity tests revealed that F_sK was insensitive to doses exceeding 100 µg/mL of thiophanate-methyl, fenhexamid, cyprodinil, boscalid and mancozeb. On the contrary, prochloraz, fludioxonil, pyraclostrobin and difenoconazole were most toxic to F_sK. None of the later fungicides affected conidial production in an adverse way. Drenching of tomato plants with the above fungicides at recommended doses did not significantly affect colonization of tomato roots by F_sK as revealed by *in vitro* isolation and Real Time PCR quantification. The disease suppressive ability of F_sK against *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) was not adversely affected by the post-inoculation application of commercial formulations of fludioxonil (Switch) and pyraclostrobin (Comet) at the recommended doses. Even more, the Comet–F_sK combination resulted in enhanced disease suppression compared to either of the two treatments applied individually. In conclusion, not only biocontrol agent F_sK is suitable for use in tomato integrated disease management programs that include all tested fungicides but also, some F_sK–fungicide combinations can have additive effect against FORL disease incidence.

© 2018 British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Available control strategies for disease management include the use of resistant host varieties, cultural, biological, physical or chemical methods individually or in an integrative manner (McGovern, 2015). Every method has both advantages and limitations, although chemical control is considered the most reliable and cost-effective one especially under conditions that favor disease

incidence (Malandrakis et al., 2015). Unfortunately, disease control failures due to the emergence and establishment of resistant to fungicides fungal strains, coupled with the increasing number of available fungicides being withdrawn from agricultural use as a result of the strict EU regulations, are indicative of the need for integration of alternative control measures for sustainable and effective control strategies (FRAC, 2007; Ma and Michailides, 2005).

A number of studies have demonstrated effective biological control of pathogens in various hosts, both pre and post-harvest, including economically important vegetables such as potato and tomato plants (Janisiewicz and Korsten, 2002; Lima et al., 2008; McGovern, 2015; van der Boogert and Luttikholt, 2004). Typically, bio-fungicides consist of commercial formulations containing fungal/fungal-like or bacterial microorganisms that suppress disease incidence via mechanisms involving antibiosis, competition for nutrients or site of colonization, host induced resistance and parasitism (Pal and McSpadden, 2006). Biocontrol agents have provided the means for significant disease reduction caused by, otherwise hard to control, soil-borne pathogens. In a recent study,

Abbreviations: EC₅₀, effective concentration causing 50% inhibition of mycelial growth; FOL, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*; FORL, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*; IPM, Integrated Pest Management; PDA, potato-dextrose-agar; WA, water agar.

* Corresponding author. Fax: +30 2821083439.

** Corresponding author. Hellenic Agricultural Organization “Demeter”, Institute for Olive Tree, Subtropical Plants and Viticulture, Agrokípio-Souda, 73164 Chania, Greece. Fax: +30 2821083439.

E-mail addresses: tasmal@aua.gr (A. Malandrakis), edaskalaki@uth.gr (E.R. Daskalaki), vask@uth.gr (V. Skiada), kalpapad@bio.uth.gr (K.K. Papadopoulou), nkavroulakis@nagref-cha.gr (N. Kavroulakis).

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.10.003>

1878-6146/© 2018 British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η βιολογική καταπολέμηση ασθενειών των φυτών.

Σύμφωνα με τους Cook & Baker (1983) βιολογική καταπολέμηση στη φυτοπαθολογία, είναι η μείωση της ποσότητας των μολυσμάτων ή και της παθογόνου δράσης ενός φυτοπαθογόνου, με τη βοήθεια ενός ή περισσοτέρων βιοτικών παραγόντων, άλλων από τον άνθρωπο.

Βασισμένοι στον παραπάνω ορισμό, οι οργανισμοί -βιολογικοί παράγοντες- και οι διαδικασίες που εμπλέκονται περιλαμβάνουν: α) μη μολυσματικά ή μειωμένης μολυσματικότητας άτομα ή πληθυσμούς ανάμεσα στα παθογόνα είδη, β) ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς, γ) χειρισμούς των φυτών ξενιστών, ώστε να αυξηθεί η ανθεκτικότητά τους στο παθογόνο (Alabouvette, Olivain, & Steinberg, 2006).

Σκοπός της βιολογικής καταπολέμησης των παθογόνων είναι (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2010):

A) Είτε να μειωθεί το μόλυσμα με τη μέθοδο της αμειψισποράς

B) Είτε να εμποδιστεί ή να επιβραδυνθεί το παθογόνο από βιολογικούς παράγοντες ανταγωνιστές

Γ) Είτε να διεγερθούν λανθάνοντες μηχανισμοί άμυνας και να αντιμετωπιστεί το παθογόνο.

Πολύ συχνά ως βιολογικοί παράγοντες καταστολείς ασθενειών χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί που διαβιούν στην ριζόσφαιρα των φυτών.

Κατά συνέπεια η βιολογική δράση τέτοιων ανταγωνιστικών μικροοργανισμών εξαρτάται, εν πολλοίς από την εδραίωση του πληθυσμού τους στη ριζόσφαιρα. Πολλοί εδαφικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η εδαφική υγρασία, το pH και η περιεκτικότητα της αργίλου, επηρεάζουν την επιβίωση και την εγκατάσταση των μικροοργανισμών και τις αλληλεπιδράσεις τους με το παθογόνο (Weller, 1988) .

Η ικανότητα των ανταγωνιστικών μικροοργανισμών να ελέγχουν φυτοπαθογόνα έχει συσχετισθεί με διάφορους μηχανισμούς (Haddar & Papadopoulou, 2012). Σε αυτούς τους μηχανισμούς συμπεριλαμβάνονται: α) Η ικανότητα αποίκησης του ξενιστή, η οποία είναι απαραίτητη για την επίτευξη του βιολογικού ελέγχου (Weller, 1983; de Weger et al., 1987; Parke, 1991) . β) Ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά. Οι διάφοροι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται μεταξύ τους για διάφορα θρεπτικά συστατικά που βρίσκονται στο έδαφος. Επομένως, αν συνυπάρχει ένας βιολογικός παράγοντας με ένα παθογόνο για να διασφαλίσουν την επιβίωσή τους θα αναπτύξουν ανταγωνιστικές σχέσεις ως προς το διαθέσιμο θρεπτικό μέσο, γεγονός που θα οδηγήσει στη μείωση της δραστηριότητας του παθογόνου μικροοργανισμού (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010). Οι σιδηροφόροι αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα μηχανισμού ανταγωνισμού για την πρόσληψη σιδήρου μεταξύ βιολογικών παραγόντων και παθογόνων (Neillands, 1981; Neillands and Nakamura, 1991). γ) Η παραγωγή ανταγωνιστικών ενώσεων, όπως αντιβιοτικά, τοξίνες, αμμωνία, κυανιδίνη, υδρολυτικά ένζυμα. Η παραγωγή αντιβιοτικών έχει περιγραφεί ως ένας δυναμικός τρόπος δράσης στην καταστολή της ασθένειας από την οποία και η δραστηριότητα του παθογόνου καταστέλλεται (Handilsman & Stabb, 1996). δ) Ο παρασιτισμός με τη διαδικασία της αδρανοποίησης του παθογόνου από ένζυμα του βιολογικού παράγοντα. Ένζυμα όπως, χιτινάσες, υδρολάσες, γλουκανάσες και πρωτεάσες προκαλούν κυτταρόλυση των παθογόνων (Di Pietro et al., 1993; Lorito et al., 1993a, 1994). ε) Η επαγωγή ενδογενών μηχανισμών άμυνας του φυτού (SAR και ISR). Οι διάφοροι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των

παθογόνων μικροοργανισμών, διεγείρουν την επαγόμενη διασυστηματική αντοχή των φυτών, ενισχύοντας την αντοχή τους (Kuc, 1995) (Van Loon, Bakker, & Pieterse, 1998).

Η βιολογική καταπολέμηση πλεονεκτεί έναντι της συμβατικής (χημικής) αντιμετώπισης γιατί (Ζιωγας και Μαρκόγλου 2010):

1. Το κόστος περιορίζεται στο κόστος της αρχικής εφαρμογής. Οι βιολογικοί παράγοντες προστατεύουν το φυτό-ξενιστή για μεγάλες χρονικές περιόδους μετά από την αρχική εφαρμογή και την ικανότητα τους να αποικούν τους ξενιστές.
2. Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί με τους οποίους οι βιολογικοί παράγοντες ασκούν την αντιμικροβιακή τους δράση και σημειώνουν μεγάλη επιτυχία στην καταπολέμηση των παθογόνων, καθώς τα παθογόνα αναπτύσσουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης ανθεκτικότητας ως προς τους βιολογικούς παράγοντες όταν γίνεται συνδυασμός δύο ή περισσότερων μηχανισμών.
3. Το κόστος ανάπτυξης ενός βιολογικού παράγοντα είναι σημαντικά μικρότερο (2 εκ. και περίπου 3 έτη) από το αντίστοιχο κόστος ανάπτυξης μιας χημικής ένωσης (200 εκ δολάρια και περίπου 8-10 έτη).
4. Έχουν μικρό περιβαλλοντικό κόστος και δεν επιβαρύνουν την ανθρώπινη υγεία.

Μερικά από τα μειονεκτήματα του βιολογικού ελέγχου έχουν ως ακολούθως:

1. Οι βιολογικοί παράγοντες είναι εκλεκτικά αποτελεσματικοί σε ένα είδος παθογόνου. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι όταν σε μία καλλιέργεια υπάρχουν παραπάνω από μία ασθένειες που πρέπει να αντιμετωπιστούν, είναι αναγκαία η συνδυασμένη εφαρμογή διαφορετικών βιολογικών παραγόντων ή ο συνδυασμός βιολογικών παραγόντων και μυκητοκτόνων.
2. Η αποτελεσματικότητα των βιολογικών παραγόντων επηρεάζεται σημαντικά από περιβαλλοντικές παραμέτρους, καθώς και από το καλλιεργούμενο φυτό. Πολλοί βιολογικοί παράγοντες δεν είναι αποτελεσματικοί όταν χρησιμοποιούνται σε περιοχές με διαφορετικές συνθήκες από αυτές που απομονώθηκαν.
3. Σχετικά αργή δράση των βιολογικών παραγόντων σε σύγκριση με τη χημική καταπολέμηση. Ένας βιολογικός παράγοντας που απαιτεί μία περίοδο αρκετών εβδομάδων ή μηνών για να είναι αποτελεσματικός δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις περιπτώσεις που απαιτούνται άμεσα αποτελέσματα.
4. Τα βιολογικά σκευάσματα έχουν γενικά μικρό χρόνο ζωής κατά την αποθήκευσή τους.
5. Πιθανές επιπτώσεις σε οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχο. Η βιολογική καταπολέμηση οφείλεται πολλές φορές, στην παραγωγή χημικών ουσιών όπως π.χ. αντιβιοτικών, βακτηριοσινών ή άλλων δευτερογενών μεταβολιτών, από το βιολογικό παράγοντα.

Πιθανά η συνδυασμένη χρήση των βιολογικών παραγόντων με συμβατικά χημικά φυτοπροστατευτικά μέσα θα βοηθούσε στη διατήρηση της αποτελεσματικότητας τόσο των υπαρχόντων μυκητοκτόνων όσο και ίδιων των παραγόντων βιολογικής καταπολέμησης για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

1.2. Χημική αντιμετώπιση (μυκητοκτόνα)

Ο συνηθέστερος τρόπος αντιμετώπισης των φυτοπαθογόνων είναι η χημική καταπολέμηση, δηλαδή η χρήση ουσιών που θανατώνουν το παθογόνο ή επιβραδύνουν ή παρεμποδίζουν την ανάπτυξή του (Ζιωγας και Μαρκόγλου, 2010).

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μυκητοκτόνα, δηλαδή ενώσεις που καταπολεμούν τους μύκητες, τα οποία έχουν πάρει έγκριση για την καλλιέργεια της τομάτας. Ο κατάλογος δραστικών ουσιών των εγκεκριμένων μυκητοκτόνων στην καλλιέργεια της τομάτας, του υπουργείου γεωργικής ανάπτυξης αναγράφονται στον Πίνακα 1.

Δραστική Ουσία
<u>8-hydroxyquinoline</u>
<u>ametoctradin</u>
<u>Ampelomyces quisqualis</u>
<u>Azocyclotin</u>
<u>Azoxystrobin</u>
<u>Bacillus amyloliquifaciens subsp. plantarum D747</u>
<u>Bacillus subtilis strain QST 713</u>
<u>Benthiavalicarb</u>
<u>Bordeaux mixture</u>
<u>Boscalid (formerly nicobifen)</u>
<u>Bupirimate</u>
<u>Chlorothalonil</u>
<u>Copper hydroxide</u>
<u>Copper oxide</u>
<u>Copper oxychloride</u>
<u>Cyflufenamid</u>
<u>Cymoxanil</u>
<u>Cyprodinil</u>
<u>Difenoconazole</u>
<u>Dimethomorph</u>
<u>Etridiazole</u>
<u>Famoxadone</u>
<u>Fenamidone</u>
<u>Fenhexamid</u>
<u>Fenpyrazamine</u>
<u>Fludioxonil</u>
<u>Flutriafol</u>
<u>Folpet</u>
<u>Fosetyl</u>
<u>Imazalil</u>
<u>Iprovalicarb</u>
<u>Isopyrazam</u>
<u>Mancozeb</u>
<u>Mandipropamid</u>
<u>Mepanipyrim</u>
<u>Metalaxyl</u>
<u>Metalaxyl-m</u>
<u>Metiram</u>
<u>Metrafenone</u>

<u>Myclobutanil</u>
<u>Penconazole</u>
<u>penthiopyrad</u>
<u>Potassium hydrogen carbonate</u>
<u>Propamocarb</u>
<u>Propineb</u>
<u>Pyraclostrobin</u>
<u>Pyrimethanil</u>
<u>Pythium oligandrum strain M1</u>
<u>Sulphur</u>
<u>Tebuconazole</u>
<u>Thiophanate-methyl</u>
<u>Triadimenol</u>
<u>Tribasic copper sulfate</u>
<u>Trichoderma aspellerum strain TV1</u>
<u>Trichoderma asperellum strain ICC012</u>
<u>Trichoderma asperellum strain T25</u>
<u>Trichoderma atroviride strain T11</u>
<u>Trichoderma gamsii (formerly T. viride) strain ICC</u>
<u>Trichoderma harzianum strain T-22</u>
<u>Trifloxystrobin</u>
<u>Zoxamide</u>

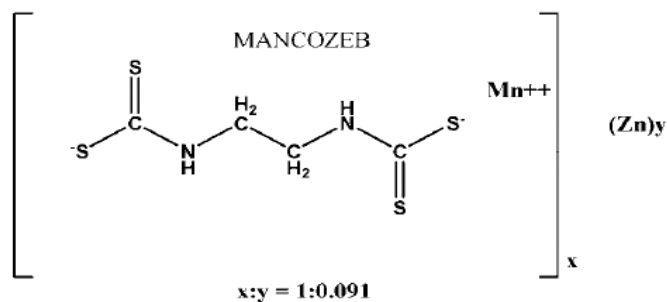
Πίνακας 1 Ο κατάλογος δραστικών ουσιών των εγκεκριμένων μυκητοκτόνων στην καλλιέργεια της τομάτας (Υπουργίο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων)

Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 9 μυκητοκτόνα, τα οποία αποτελούν εξειδικευμένους και μη παρεμποδιστές λειτουργιών του κυττάρου σε υποκυτταρικό επίπεδο και περιείχαν τις εξής δραστικές ουσίες: Mancozeb, Boscalid, Pyraclostrobin, SHAM, Fludioxonil, Cyprodinil, Procloraz, Difenoconazol, Fenhexamid, Thiophanate-methyl, και Iprodione.

1.2.1 Μη εξειδικευμένοι παρεμποδιστές

1.2.1.1 Διθειοκαρβαμιδικά- Mancozeb

Τα διθειοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση πολλών ασθενειών, είτε με απολύμανση πολλαπλασιαστικού υλικού είτε με ψεκασμούς υπέργειων οργάνων των φυτών. Από χημικής δομής τα μυκητοκτόνα αυτά διακρίνονται σε: α) θειουραμ-δισουλφίδια, β) δι-μεθυλο-διθειοκαρβαμιδικά και γ) μονο-αλκυλο-διθειοκαρβαμιδικά (όπου στην κατηγορία αυτή ανήκει και το mancozeb) (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).



Εικόνα 1 Χημική δομή του Mancozeb.

Το mancozeb (Εικ. 1) είναι ένα σύμπλοκο maneb και άλατος ψευδαργύρου (Tomlin, 2004-05). Χρησιμοποιείται ως προστατευτικό μυκητοκτόνο φυλλώματος, με δευτερεύουσα ακαρεοκτόνο δράση. Δεν είναι φυτοτοξικό στις συνιστωμένες δόσεις και δίνει στο φύλλωμα καλύτερη εμφάνιση σε σχέση με τα χαλκούχα. Καταπολεμά ευρύ φάσμα ασθενειών όπως: *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans* (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Σε ότι αφορά το μηχανισμό δράσης του, έχει χαρακτηριστεί από τη FRAC (FRAC Code List 2019) ως μυκητοκτόνο με πολλαπλή δράση στις φυσιολογικές και κυτταρικές λειτουργίες (Gullino et al, 2010). Υπάρχουν τρεις πιθανοί μηχανισμοί μυκητοτοξικής δράσης των διθειοκαρβαμιδικών. Πιο συγκεκριμένα, όταν το μόριο βρεθεί στην ενδοκυτταρική περιοχή του παθογόνου μύκητα, του αποστερεί από τα ένζυμα ή από άλλα ζωτικά συστατικά τα απαραίτητα για τη λειτουργία τους μέταλλα. Επιπλέον τα σύμπλοκα διθειοκαρβαμικού με το μέταλλο προσκολλούνται πάνω στα ένζυμα, παρεμποδίζοντας έτσι την ενζυμική τους δράση. Τέλος η πιθανότερη εκδοχή είναι να μετατρέπεται, όπως και οι υπόλοιπες ενώσεις της ομάδας του, σε παράγωγα ισοθειοκυανικού οξέος που αντιδρούν με σουλφυδρυλικές ομάδες πρωτεϊνών, σχηματίζοντας σύμπλοκες ενώσεις ισοθειοκυανικού οξέος-πρωτεΐνης. Η δέσμευση τέτοιων σουλφυδρυλικών ομάδων από το ισοθειοκυανικό οξύ έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της δράσης πολλών ενζύμων στο κύτταρο του παθογόνου (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

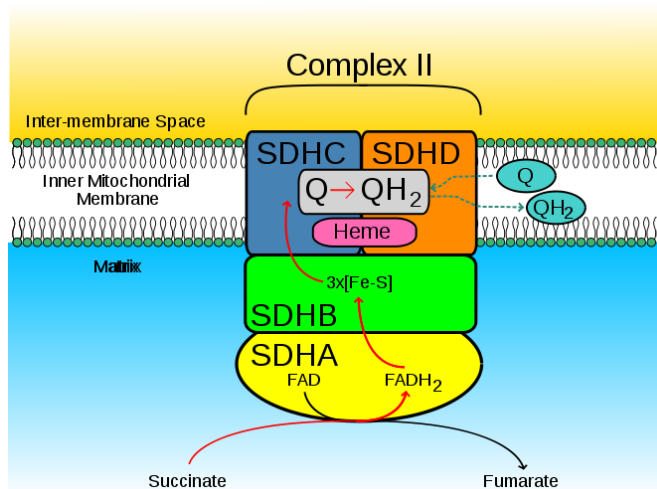
Αξίζει να επισημανθεί ότι ένας κοινός μεταβολίτης των μονο-αλκυλο-διθειο-καρβαμιδικών είναι η αιθυλενο-θειουρία (ETU), η οποία προκύπτει από την αποδόμηση των μυκητοκτόνων αυτών, και αποδείχθηκε ότι είναι τερατογόνος και καρκινογόνος σε διάφορα είδη πειραματόζωων. Μικρές ποσότητες της ένωσης αυτής (0,02-4%) σχηματίζονται κατά τη βιομηχανική παραγωγή και την αποθήκευση, αλλά και στον αγρό, ιδιαίτερα όταν οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας είναι υψηλές. Επιπλέον, σχηματίζεται και κατά τον μεταβολισμό των μονο-αλκυλο-διθειο-καρβαμιδικών στα φυτά, τα ζώα, το έδαφος και το νερό. Οι αλκαλικές συνθήκες και η υψηλή θερμοκρασία ευνοούν το σχηματισμό της. Τα εμπορικά σκευάσματα δεν πρέπει να περιέχουν πάνω από 0,5 ppm ETU (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

1.2.2 Εξειδικευμένοι παρεμποδιστές

1.2.2.1 Παρεμποδιστές του Σύμπλοκου II της Αναπνευστικής Αλυσίδας (SDHIs)

Το μιτοχονδριακό σύμπλοκο II (σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος) οξειδώνει το ηλεκτρικό οξύ και ανάγει το συνένζυμο Q. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από δύο υδροφιλικές υπομονάδες, SDHA & SDHB και από δύο υδρόφοβες υπομονάδες SDHC & SDHD (Εικόνα. 2). Οι υπομονάδες SDHA και SDHB, είναι υπεύθυνες για τη δράση της sdh ως καταλύτη της οξειδωσης του ηλεκτρικού οξέος σε φουμαρικό οξύ. Η υπομονάδα A, (SDHA) είναι μια φλαβοπρωτεΐνη (Fp) της οποίας το ομοιοπολικό συνένζυμο FAD είναι μέρος του καταλυτικού κέντρου. Η υπομονάδα B (SDHB), είναι μια πρωτεΐνη σιδήρου –θείου (Ip), η οποία αποτελείται από τρεις διαφορετικούς έλικες σιδήρου –θείου [2Fe-2S], [4Fe-4S] και [3Fe-4S], οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την μεταφορά ηλεκτρονίων από το συνένζυμο FAD στην ουμπικινόνη της μεμβράνης (Hägerhäll, 1997). Οι υδρόφοβες υπομονάδες SDHC & SDHD είναι αγκιστρωμένες στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβρανή και σχηματίζουν τις μεγάλες και μικρές υπομονάδες του κυτοχρώματος b (Lemos et al., 2002). Η περιοχή που αγκιστρώνεται στην εσωτερική μεμβράνη περιλαμβάνει ειδικές θέσεις πρόσδεσης για την αναγωγή της ουμπικινόνης (Shenoy, Yu, & Yu, 1997), καθώς και για τους παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (Sun, et al., 2005). Ένας ακόμα

ρόλος είναι η συγκράτηση των υπομονάδων SDHA και SDHB στην εσωτερική μεμβράνη, οι οποίες έχουν τον λειτουργικό ρόλο της μεταφοράς των ηλεκτρονίων στην ομπικινόνη (Ackrell et al., 1992 ; Hägerhäll et al., 1996 ; Yankovskaya et al., 2003).



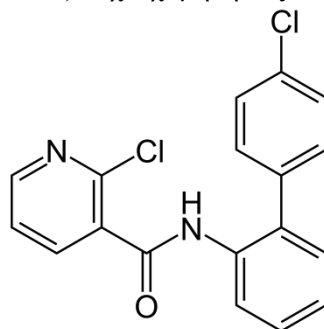
Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των υπομονάδων του Αναπνευστικού συμπλόκου II (Wikipedia Free Encyclopedia)

Στους παρεμποδιστές του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας ανήκουν τα μυκητοκτόνα της ομάδας των καρβοξαμιδικών. Σε ότι αφορά το εύρος δράσης τους, αρχικά τα μυκητοκτόνα αυτά ήταν εκλεκτικά αποτελεσματικά για παθογόνα της κλάσης των Βασιδιομυκήτων όπως οι σκωριάσεις, οι άνθρακες, ο δαυλίτης και ο *Rhizoctonia solani*. Στις δεκαετίες όμως που ακολούθησαν εμφανίστηκαν νέα μόρια τα οποία δρούσαν, όπως και τα πρώτα, σε Βασιδιομύκητες των γενών *Puccinia*, *Ustilago*, *Tilletia*, *Rhizoctonia*, *Pythula*, *Sclerotium*, *Gymnosporangium* καθώς και σε άλλα. Τα τελευταία χρόνια, έχουν εμφανιστεί στο εμπόριο καρβοξαμιδικά μυκητοκτόνα, όπως τα boscalid, isopyrazam κ.α., τα οποία εμφανίζουν δράση σε περισσότερες κλάσεις, με αποτέλεσμα και την αντιμετώπιση σοβαρότερων παθογόνων όπως *Botrytis*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Monilinia*, *Venturia* και οΐδια πολλών καλλιεργειών (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Οι παρεμποδιστές του αναπνευστικού συμπλόκου II, είναι εξειδικευμένοι παρεμποδιστές του ενζυμικού συμπλόκου της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος και φαίνεται ότι δρουν στα κέντρα Fe-S των υπομονάδων του συμπλόκου (Mattson & Hederstedt, 2001; Keon, White, & Hargreaves, 1991). Αν και δεν παρεμποδίζουν την αναγωγή τους, πειράματα έχουν δείξει πως παρεμποδίζουν την επανοξειδωσή τους, δηλαδή τη μεταβίβαση των ηλεκτρονίων στο συνένζυμο Q. Προφανώς τα καρβοξαμιδικά μυκητοκτόνα παρεμβάλλονται στη ροή των ηλεκτρονίων προς το συνένζυμο Q μετά την SDH, με προσκόλληση στις υπομονάδες SDHC και SDHD. (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2010). Αποτέλεσμα της παρεμπόδισης αυτής είναι η διακοπή του κύκλου του Krebs που οδηγεί σε πάυση της αναγωγής του FAD προς FADH₂, αλλά και στον σχηματισμό του μεγαλύτερου μέρους του NAD⁺ προς NADH (Nelson & Cox, 2008; Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010). Στη συνέχεια παρατηρείται συσσώρευση του ηλεκτρικού οξέος, καθώς και έλλειψη NADH, το οποίο προκαλεί μείωση, έως και διακοπή της λειτουργίας του συμπλόκου I. Με τη διακοπή της μεταφοράς ηλεκτρονίων προς το συνένζυμο Q, επέρχεται η μείωση, έως και διακοπή της λειτουργίας των αντλιών πρωτονίων προς το διαμεμβρανικό χώρο (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

1.2.2.1.1 Boscalid

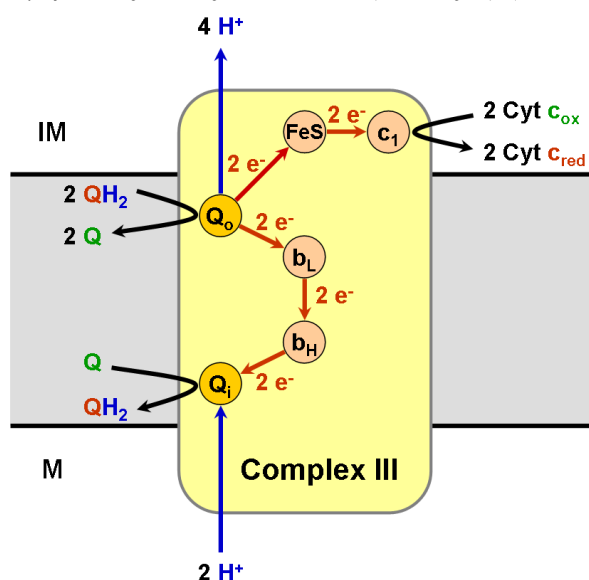
Το Boscalid (Εικ. 3) έχει διασυστηματικές ιδιότητες και είναι αποτελεσματικό σε πολλές καλλιέργειες σποροφόρων, κηπευτικών και καλλωπιστικών φυτών, στην αντιμετώπιση σοβαρών παθογόνων, όπως *Botrytis*, *Alternaria*, *Fusarium sp.*, *Monilinia* και οιδιών (O'Reilly et al., 1992). Αναστέλει την βλάστηση των σπορίων, έχει ισχυρή αντιμικροβιακή και προστατευτική δράση (Ammermann, Stierl, Hanke, Scherer, Υρεμα, & Berdinelli, 2002; Stammler & Speakman, 2006; Stammler, Benzinger, & Speakman, 2007). Έχει χαμηλή τοξικότητα στη συνηστώμενη δόση.



Εικόνα 3. Χημικός τύπος του Boscalid.

1.2.2.2 Παρεμποδιστές του Συμπλόκου III της Αναπνευστικής Αλυσίδας.

Το σύμπλοκο III (σύμπλοκο bc₁ ή ρεδουκτάση του κυτοχρώματος c) καταλύει την αναγωγή του κυτοχρώματος c μέσω της οξείδωσης της ουμπικινόλης. Έτσι μεταφέρει τα ηλεκτρόνια από τη μήτρα στον μεσομεμβρανικό χώρο (διαμεμβρανικό διάστημα) ρυθμίζοντας έτσι την χημειωσμοτική συγκέντρωση κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης. Το σύμπλοκο bc₁ αποτελείται από δέκα υπομονάδες και περιέχει τέσσερα οξειδοαναγωγικά κέντρα: το κυτόχρωμα b, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη FeS (ISP) και το κυτόχρωμα c₁ (Trumpower, 1990). Οι επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις της ουμπικινόλης συζευγνύονται με μία σειρά συμπλόκων πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικές θέσεις: Q_o και Q_i (κύκλος Q) (Mitchell, 1976).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της αλυσίδας μεταφοράς των e⁻ στο σύμπλοκο III (Wikipedia).

Η οξείδωση της κινόλης (Εικ. 4) ξεκινά με την απώλεια ενός e⁻, το οποίο μεταφέρεται κατά μήκος της αλυσίδας υψηλού δυναμικού, στο κέντρο Rieske FeS. Η προκύπτουσα ουβι-ημι-κινόλη

σταθεροποιείται στη θέση Q₀, διευκολύνοντας τη μεταφορά ενός δευτέρου e⁻ στην αίμο bL. Η δεύτερη αντίδραση μεταφοράς, αποσταθεροποιεί τη δεσμευμένη κινόνη στη θέση Q₀, προάγοντας την περιστροφή της ανιγμένης FeS πρωτεΐνης (προς το σύμπλοκο c₁) και την απώλεια της κινόνης από αυτή τη θέση (Joseph-Horne et al., 2001; Crofts & Berry, 1998; Smith, 1998). Η μεταφορά του e⁻ από τη δεσμευμένη και σταθεροποιημένη στη θέση Q₀ ημικινόνη προς τη θέση Q_i, που βρίσκεται στην αρνητική πλευρά της μεμβράνης, συμβαίνει μέσω του χαμηλού δυναμικού αίμο bL, και του υψηλού δυναμικού αίμο bH, και είναι ηλεκτρογενής. Επομένως, απαιτούνται δύο μόρια ημικινόνης στη θέση Q₀ αφού μεταφέρονται δύο ηλεκτρόνια κατά μήκος της αλυσίδας υψηλού δυναμικού (Ding, Moser, Robertson, Tokito, Daldal, & Dutton, 1995; Brandt, 1996; T. Joseph - Horne et al., 2001).

Τις τελευταίες δεκαετίες ένας μεγάλος αριθμός μυκητοκτόνων που παρεμποδίζουν την παραγωγή ενέργειας στα κύτταρα των μυκήτων με δράση στο σύμπλοκο III (bc₁) εισήλθε στη γεωργική πράξη. Τα μυκητοκτόνα αυτά διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες: α) τους Q₀ και β) τους Q_i παρεμποδιστές. Οι Q₀ παρεμποδιστές δρουν στο κέντρο οξειδωσης της ουμπικινόλης, ενώ οι Q_i παρεμποδιστές στο κέντρο αναγωγής της ουμπικινόλης (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Στους Q₀ παρεμποδιστές περιλαμβάνονται τα μυκητοκτόνα των χημικών ομάδων των στρομπιλουρινών ή β-μεθοξακρυλικών (azoxystrobin, picoxystrobin), των μεθοξυιμινοοξικών (trifloxystrobin), μεθοξυιμινοακεταμιδίων (dimoxystrobin, metominostrobin), των διυδροδιοξαζινών (fluoxastrobin) των μεθοξυκαβαμιδικών (pyraclostrobin) (J.R. Godwin et al., 1992; Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010). Στη θέση Q₀ του παραπάνω συμπλόκου δρουν επίσης και τα μυκητοκτόνα της χημικής ομάδας των αζολονών, αλλά και η προσκόλληση των μορίων αυτών στην Q₀ υποστηρίζεται ότι γίνεται με διαφορετικό τρόπο από εκείνων των στρομπουλινών (Jordan et al., 1999).

Στην Q_i θέση δρουν οι κυανοιμιδαζόλες (dimefluaazole, cyazofamid), το αντιβιοτικό antimycin-A και η υδροξυκινολίνη (HQNO).

1.2.2.2.1 Στρομπιλουρίνες ή Μεθοξακρυλικά

Οι στρομπιλουρίνες αποτελούν τη σημαντικότερη ομάδα των γεωργικών μυκητοκτόνων, οι οποίες είναι παράγωγα του β- μεθοξυ-ακρυλικού οξέως (φυσικές ενώσεις όπως strobilurins, oudemansins και myxothiazol, που παράγονται από διάφορα είδη μυκήτων και βακτηρίων) και ανήκουν στην κατηγορία των MOA (Mode of Action)-παρεμποδιστών (Von Jagow & Link, 1986; Weber et al., 1990a,b). Οι στρομπιλουρίνες πήραν το όνομά τους, από το γένος *Strobilurus* αφού το πρώτο μέλος της ομάδας η strobilurin A, απομονώθηκε από υγρές καλλιέργειες του βασιδιομύκητα *Strobilurus tenacellus* (Anke et al., 1977).

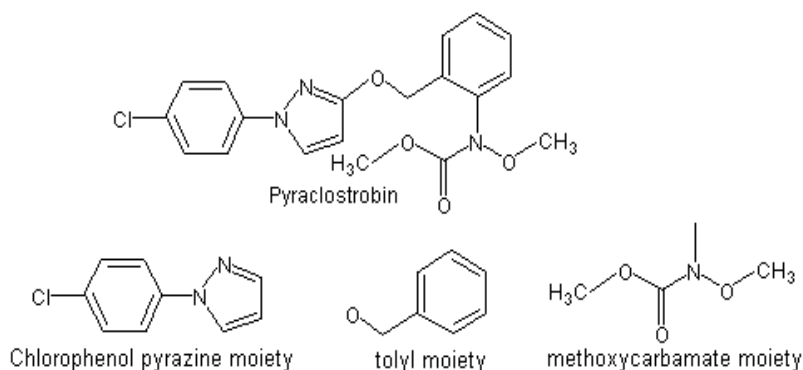
Πρόκειται για μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος δράσης, που σε μικρές συγκεντρώσεις μπορούν να καταπολεμήσουν σημαντικά φυτοπαθογόνα και από τις τέσσερις κλάσεις των μυκήτων, όπως Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes και Oomycetes . Παρουσιάζουν πολύ καλή προστατευτική αλλά και θεραπευτική δράση (Koehle H, 2002), παρεμποδίζοντας τη βλάστηση των σπορίων των μυκήτων και χαρακτηρίζονται από υψηλή διασυστηματική κίνηση, αν και η ικανότητα διασυστηματικής και διελεσματικής κίνησης ποικίλει στα διάφορα μέλη της ομάδας (Bartlett et al., 2002).

Οι στρομπιλουρίνες αναστέλλουν την μιτοχονδριακή αναπνοή των μυκήτων, με το να προσδένονται στο κέντρο Q₀ του κυτοχρώματος b. Όταν ένας από τους αναστολείς συνδεθεί, μπλοκάρει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα b στο κυτόχρωμα c₁ πράγμα που έχει σαν

αποτέλεσμα τη διαταραχή του ενεργειακού κύκλου και το σταμάτημα της παραγωγής ATP. Η σύνδεση αυτή είναι αντιστρεπτή, αφού καθένα από τα παράγωγα αυτά μπορεί να αντικαταστήσει το άλλο στη συγκεκριμένη θέση πρόσδεσης (Bartlett et al., 2002).

1.2.2.2 Μεθοξυκαρβαμικά-Pyraclostrobin

Το pyraclostrobin αναπτύχθηκε από την BASF και είναι ένα από τα πιο νέα μυκητοκτόνα των Qo παρεμποδιστών με χημικό τύπο της που παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του χημικού τύπου του μυκητοκτόνου Pyraclostrobin.

Παρουσιάζει κυρίως προστατευτική και έως ένα βαθμό θεραπευτική δράση, ενώ αντιμετωπίζει ένα μεγάλο εύρος παθογόνων όπως *Septoria tritici*, *Puccinia spp.*, *Plasmopara viticola*, *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, που ανήκουν σε όλες τις κατηγορίες μυκήτων σε μεγάλο αριθμό καλλιεργειών (πατάτα, τομάτα, σιτηρά, αμπέλι) (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

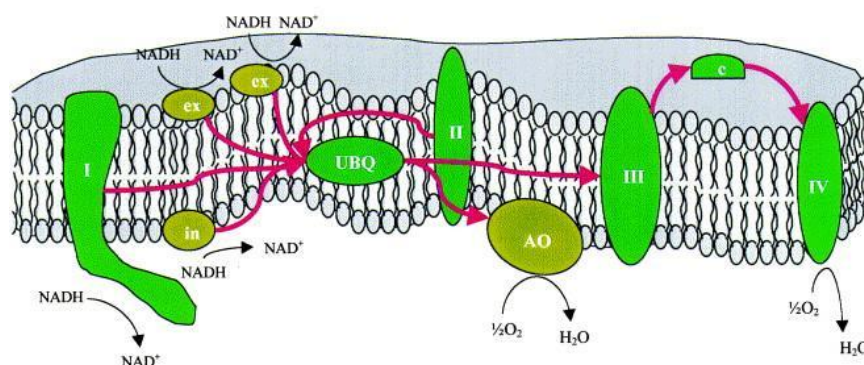
Αξίζει να σημειωθεί, ότι σε πειράματα που έγιναν, βρέθηκε ότι βοηθάει στην καλύτερη χρησιμοποίηση του εδαφικού αζώτου από το φυτό, αυξάνοντας σημαντικά τη δραστηριότητα του ενζύμου νιτρική αναγωγή, ενώ ταυτόχρονα μειώνει την παραγωγή αιθυλενίου σε συνθήκες ξηρασίας, αποτρέποντας έτσι την πρόωρη ωρίμανση των καρπών, πράγμα που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή. Επίσης, επιταχύνει σημαντικά τον σχηματισμό αμυντικών πρωτεϊνών ενάντια σε διάφορους ιούς, δίνοντας έτσι στο φυτό επιπρόσθετη προστασία (Köehle, et al., 2003).

1.2.2.3 Παρεμποδιστές της εναλλακτικής αναπνοής.

Το ένζυμο που ελέγχει την εναλλακτική αναπνοή, είναι η εναλλακτική οξειδάση AOX (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010). Η εναλλακτική οξειδάση δρα παράλληλα με το σύμπλοκο III και καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από την οξυγονογονική κατευθείαν στο O₂, χωρίς την παρέμβαση των συμπλόκων III και IV της κυτοχρωμικής οδού (Εικόνα 6) (Moore & Siedow, 1991). Έτσι, το ένζυμο αυτό δεν επηρεάζεται από τους παρεμποδιστές του συμπλόκου του κυτοχρώματος bc₁ (Qols, Qils) και τους αναστολείς της οξειδάσης του κυτοχρώματος c όπως CN⁻, NaN₃, CO και NO (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010; Siedow & Umbach, 1995). Ο ρόλος της εναλλακτικής οξειδάσης AOX είναι πολυσύνθετος και σχετίζεται με την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων, τον έλεγχο των επιπέδων της ανηγμένης οξυγονογονικής, του πυροσταφυλικού οξέος και του NADPH. Με άλλα λόγια έχουμε έλεγχο της παραγωγής ενέργειας ή αντιμετώπιση μεταβολικών καταστάσεων που οδηγούν σε συσσώρευση NADPH ή ανηγμένης οξυγονογονικής. Όταν η συγκέντρωση κάποιου από αυτά τα συστατικά αυξηθεί, ενεργοποιείται η εναλλακτική οξειδάση, αυξάνοντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο O₂, ώστε να επέλθει η ενεργειακή ισορροπία. Αν κάτι τέτοιο δε συμβεί υπάρχει κίνδυνος υπερπαραγωγής των υποστρωμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας, με πιθανή παραγωγή επικίνδυνων ριζών O₂ (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010)..

Η εναλλακτική αναπνοή επάγεται από φυσικά αίτια όπως οι χαμηλές θερμοκρασίες και η παρουσία χημικών ενώσεων που παρεμποδίζουν το κυτοχρωμικό σύστημα ή τη μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση. Η ροή των ηλεκτρονίων δια μέσου του εναλλακτικού συστήματος έχει ως αποτέλεσμα την σημαντικά μειωμένη παραγωγή χημικής ενέργειας (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

INTER MEMBRANE SPACE



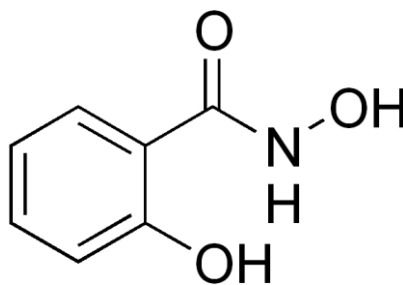
MATRIX

Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της μιτοχονδριακής ηλεκτρονιακής μεταφοράς του μύκητα. I, II, III και IV είναι τα σύμπλοκα ηλεκτρονιακής μεταφοράς. ex:εξωτερικό NADH: οξειδοοδουκτάση της ουμπικινόνης. In:εσωτερικό NADH: οξειδοοδουκτάση της ουβικινόνης. UBQ, ουβικινόνη, c: περιφερικό κυτόχρωμα c. Τα βέλη δείχνουν τη ροή των ηλεκτρονίων.

Εξειδικευμένοι παρεμποδιστές της εναλλακτικής οξειδάσης είναι τα υδροξαμικά οξέα SHAM (salicyhydroxamic acid) και BHAM (benzhydroxamic acid), καθώς και το n-προπυλο ανιόν του γαλλικού οξέος (Schonbaum et al.,1972; Siedow an Bickett, 1981; Ζιώγας και Γεωργόπουλος, 1984).

1.2.2.3.1 SHAM

Το SHAM αποτελεί εξειδικευμένο παρεμποδιστή της εναλλακτικής αναπνοής και έχει τον παρακάτω χημικό τύπο (Εικόνα 7):



Εικόνα 7. Χημικός τύπος SHAM (salicyhydroxamic acid).

Δρα ως ανταγωνιστής της ανηγμένης ουμπικινόνης, χωρίς απαραίτητα να υπάρχει αλληλεπίδραση με το καταλυτικό κέντρο της οξειδάσης που ανάγει το οξυγόνο (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

1.2.2.4. Παρεμποδιστές της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης - Φαινυλοπυρρολικά

Τα φαινυλοπυρρολικά μυκητοκτόνα είναι παράγωγα του αντιβιοτικού pyrgrolnitrin το οποίο παράγεται κατά το δευτερογενή μεταβολισμό του βακτηρίου *Pseudomonas pyrocinia* (Imanaka et al., 1965). Η μεγάλη αποτελεσματικότητά του, κατά διάφορων παθογόνων, οδήγησε στη δημιουργία δύο συνθετικών αναλόγων του, του fenpiclonil και του fludioxonil, τα οποία καταπολεμούν Ασκομύκητες, Βασιδιομύκητες και Αδηλομύκητες (Koch & Leadbeater, 1992). Τα φαινυλοπυρρολικά ενδείκνυται για την καταπολέμηση εδαφογενών παθογόνων των γενών

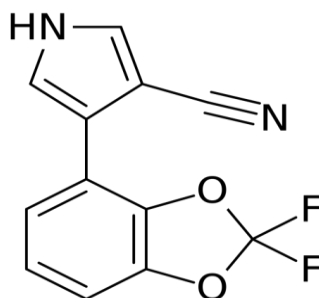
Fusarium, *Rhizoctonia*, *Alternaria* κ.α., παρεμποδίζοντας την βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα και του μυκηλίου (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης των φαινυλοπυρρολικών δεν είναι απόλυτα γνωστός μέχρι σήμερα. Έρευνες έχουν δείξει, ότι πιθανόν η δράση τους σχετίζεται με τη δομή και τη λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών (Jesper & De Waard, 1995). Μελέτες στους μύκητες *Ustilago maydis* και *Neurospora crassa* έδειξαν ότι τα φαινυλοπυρρολικά δρουν σε πρωτεϊνικές κινάσες, όπως οι PK-III και cAMP-PKA, που συμμετέχουν στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης της γλυκερόλης και του ωσμωτικού δυναμικού του κυττάρου. Η παρεμπόδιση της PK-III προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης των μη φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την υπερλειτουργία της μεταβολικής οδού, την αυξημένη βιοσύνθεση γλυκερόλης (Pillonel & Meyer, 1997) και τελικά, βλάβες στη δομή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ή/και του κυτταρικού τοιχώματος (Uesugi, 1998).

Η ύπαρξη διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των φαινυλοπυρρολικών και των μυκητοκτόνων της ομάδας AHDs, και η ικανότητα τους να αυξάνουν τους μιτωτικούς ανασυνδυασμούς, οδήγησε στην ένταξη τους στην ευρύτερη ομάδα των AHDs (Leroux et al., 1992; Ziogas & Kalamarakis, 2001).

1.2.2.4.1 Fludioxonil

Το Fludioxonil (Είκ. 8) εμφανίστηκε στα μέσα της δεκαετίας του '90 και είναι ένα μη διασυστηματικό μυκητοκτόνο με καλή υπολειμματική δράση και μικρό κίνδυνο εμφάνισης τοξικότητας στα θηλαστικά.



Εικόνα 8. Χημικός τύπος Fludioxonil.

Αρχικά, αναπτύχθηκε για επένδυση σπόρων σιτηρών για προστασία από συγκεκριμένα είδη μυκήτων (*Fusarium nivale*, *Tilletia caries*), αλλά αντιμετωπίζει και άλλα είδη, όπως *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* κ.α., καθώς και παθογόνα φυλλώματος κυρίως των γεννών *Botrytis*, *Alternaria* και *Monilinia*. Έχει καλή σταθερότητα στο φως και παρεμποδίζει τη βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα και του μυκηλίου. Χρησιμοποιείται κυρίως σε ψεκασμούς φυλλώματος στα αμπέλια, στα λαχανικά, στο ρύζι κ.α. (Gehman, Nyfeler, Leadbeater, Nevill, & Sozzi, 1990).

1.2.2.5 Παρεμποδιστές της έκκρισης άλλων λυτικών ενζύμων-Ανιλινοπυριμιδίνες

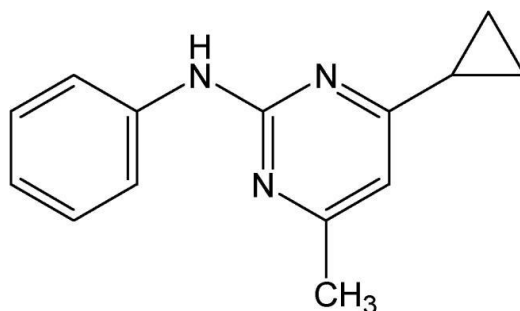
Οι ανιλινοπυριμιδίνες είναι μία νέα χημική ομάδα μυκητοκτόνων με προληπτική αλλά και θεραπευτική δράση. Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα μυκητοκτόνα pyrimethanil (Neumann, Winter, & Pittis, 1992), cyprodinil (Heye, Speich, Siegle, Steinemann, Forster, & Knauf-Beiter, 1994) και meranipyryin (Maeno, Miura, Masuda, & Nagata, 1990) και εφαρμόζονται σε ευρύ φάσμα μυκήτων, των κλάσεων των Ασκομυκήτων και των Αθλομυκήτων (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Από άποψη χημικής δομής, τα μυκητοκτόνα αυτά από μία ομάδα ανιλνοπυριμιδίνης στην οποία συνδέονται διάφορες πλευρικές ομάδες, που καθορίζουν και τη δραστικότητα αυτών των ενώσεων (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Ο βιοχημικός μηχανισμός τους δεν έχει γίνει απόλυτα σαφής, φαίνεται όμως ότι σχετίζεται με την παρεμπόδιση της έκκρισης υδρολυτικών ενζύμων όπως λακάση, λιπάση, πρωτεάση, ινβερτάση, καθώς και ένζυμα που συμβάλουν στην αποικοδόμηση των κυττάρων όπως κουτινάσες και κυτταρολάσες, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση, αφού είναι απαραίτητα για την λύση και την αποδιοργάνωση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών από τα παθογόνα (Miura et al., 1994; Milling & Richardson, 1995). Η επίδραση των ανιλνοπυριμιδίων στην έκκριση των λυτικών ενζύμων, πιθανώς σχετίζεται με την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της μεθειονίνης, λόγω πιθανής δράσης στο ένζυμο β- λυάσης της κυσταθειόνης (ή β-κυσταθειονάση) (Masner et al., 1994; Fritz et al., 1997). Τα μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής δεν έχουν εμφανίσει μέχρι σήμερα διασταυρωτή ανθεκτικότητα με μυκητοκτόνα άλλων ομάδων (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010) και σύμφωνα με την FRAC εμφανίζουν μέσο κίνδυνο εμφάνισης ανθεκτικότητας από τα παθογόνα *Botrytis* και *Venturia* (FRAC- Fungicide Resistance Action Committee).

1.2.2.5.1 Cyprodinil

Το cyprodinil εμφανίστηκε στη γεωργική πράξη το 1994 και ο χημικός του τύπος εμφανίζεται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 9. Χημικός τύπος Cyprodinil.

Είναι ένα διασυστηματικό φυτοφάρμακο, προσλαμβάνεται γρήγορα από τα φύλλα και δρα κυρίως κατά τη διαδικασία σχηματισμού υφών διεισδύσεων αναστέλλοντάς την (Knauf-Beiter, Dahmn, Heye, Staub, 1994). Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των φουζικλαδίων, των μηλοειδών *Venturia inaequalis* και *V. pyrina*, της φαιάς σήψης από τον *Monilinia fructicola*, του *Botrytis cinerea* κ.α. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

1.2.2.6 Παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης Συστατικών των Κυτταρικών Μεμβρανών.

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών και οι παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης των φωσφολιπιδίων.

Οι στερόλες αποτελούν τα κύρια συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών και έχουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση και την αναπαραγωγή αυτών. Η κύρια στερόλη των κυτταρικών μεμβρανών των ανωτέρω μυκήτων, όπως των Ασκομυκήτων, Βασιδιομυκήτων και Αδηλομυκήτων, αλλά και μερικών κατώτερων (όπως π.χ. Ζυγομυκήτες) με εξαίρεση τους Ωμομυκήτες και τους Χυτρίδιομυκήτες, είναι η εργοστερόλη (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Η εργοστερόλη παράγεται κατά το γενικότερο μεταβολισμό των λιπιδίων και ειδικότερα των ισοπρενοειδών ενώσεων. Το μεβαλονικό οξύ, το οποίο σχηματίζεται από τρία μόρια οξικού οξέος,

αποτελεί την εναρκτήρια ένωση για τη βιοσύνθεση των ενώσεων αυτών. Κατά την οδό της βιοσύνθεσης των λιποειδών παράγονται και άλλες σημαντικές ενώσεις όπως οι ορμόνες, οι μυκοτοξίνες, τα λιπαρά οξέα, η χλωροφύλλη, οι κυτοκινίνες, τα καροτενοειδή, οι γιβερελλίνες, τα αλκαλοειδή κ.α. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Η βιοσύνθεση της εργοστερόλης και γενικότερα των στερολών διακρίνεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη φάση πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες και έχουμε το σχηματισμό του οξικού οξέος και του ακέτυλου-CoA και μετά από μία αλληλουχία αντιδράσεων και ενδιάμεσων προϊόντων, η αντίδραση αυτή καταλήγει στο σχηματισμό του μη πολικού μορίου του σκουαλενίου (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Η δεύτερη φάση πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες όπου το σκουαλένιο μεταφέρεται στις κυτταρικές μεμβράνες και μετά από μία σειρά οξειδωτικών ενζυμικών αντιδράσεων, κυκλοποιείται σε στερόλες στους μύκητες, τα φυτά, τα έντομα, τα θηλαστικά και σε οπανοειδή στα βακτήρια (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

1.2.2.6.1 Παρεμποδιστές της Βιοσύνθεσης της Εργοστερόλης (EBIs) ή Παρεμποδιστές της Βιοσύνθεσης Στερολών (SBIs).

Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης (Ergosterol Biosynthesis Inhibitors, EBIs), που ονομάζονται και παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών (Sterol Biosynthesis Inhibitor, SBIs), αποτελώντας μία μεγάλη και πολύ σημαντική ομάδα διασυστηματικών μυκητοκτόνων (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Εμφανίστηκαν στην γεωργική πράξη κατά τα τέλη της δεκαετίας του '60, και χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την καταπολέμηση των οιδίων και των σκωριάσεων σε πολλές καλλιέργειες, όπως στα σιτηρά, μηλοειδή, κολοκυνθοειδή, ψυχανθή, καλλωπιστικά. Επιπλέον Πολλά από αυτά τα μυκητοκτόνα είναι αποτελεσματικά και για την αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από είδη των γενών *Monilinia*, *Septoria*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Penicillium*, *Altenaria* κ.α. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Από άποψη χημικής δομής οι SBIs έχουν στο μόριο τους έναν αζωτο-ετεροκυκλικό δακτύλιο, που μπορεί να είναι ακόρεστος ή κορεσμένος. Στην πρώτη περίπτωση υπάγονται τα μυκητοκτόνα των υποομάδων των πυριδινικών, πυριμιδινικών, ιμιδαζολικών και τριαζολικών, που χρησιμοποιούνται κυρίως στη φυτοπροστασία. Στη δεύτερη περίπτωση ανήκουν τα μυκητοκτόνα των χημικών υποομάδων των πιπεραζινικών, μορφολινικών και πιπεριδινικών. Εκτός των μυκητοκτόνων αυτών, τα νέα μυκητοκτόνα spiroxamine και fenhexamid των ομάδων των σπυροκεταλαμινών και υδροξυανιλιδίων αντίστοιχα, παρεμβαίνουν στη βιοσυνθετική οδό των στερολών, αν και δεν χαρακτηρίζονται από την παρουσία αζωτο-ετεροκυκλικού δακτυλίου (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Είναι πλέον γνωστό ότι η δράση των SBIs εντοπίζεται στην παρεμπόδιση συγκεκριμένων ενζυμικών σταδίων της βιοσυνθετικής οδού των στερολών, προκαλώντας βλάβες στη δομή της κυτταρικής τους μεμβράνης με αποτέλεσμα την έξοδο του πρωτοπλάσματος από τα κύτταρα. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Έτσι, με βάση το μηχανισμό δράσης τα μυκητοκτόνα αυτά μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις ομάδες, οι οποίες είναι (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010):

1. Οι παρεμποδιστές της απομεθυλίωσης του C-14, γνωστοί και ως DMIs (Demethylation Inhibitors) στους οποίους υπάγονται τα τριαζολικά, τα ιμιδαζολικά, τα πιπεραζινικά, τα πυριδινικά και τα πυριμιδινικά μυκητοκτόνα.
2. Τα μορφολινικά και συγγενή πιπεριδινικά μυκητοκτόνα και οι σπυροκεταλαμίνες, που παρεμποδίζουν ενζυμικά στάδια μεταγενέστερα της απόμεθυλίωσης του C-14 και

συγκεκριμένα της αναγωγής του διπλού δεσμού Δ^{14} ή/και της μετατόπισης του διπλού δεσμού από τη θέση $\Delta^{8,9}$ στη θέση $\Delta^{8,7}$, που καταλύονται από τα ένζυμα Δ^{14} -αναγωγάση και $\Delta^{8,7}$ -ισομεράση, αντίστοιχα.

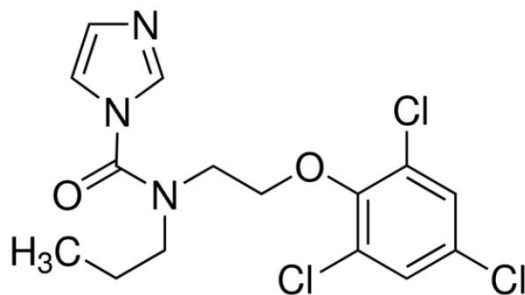
3. Τα υδροξυανιλίδια, που παρεμποδίζουν τα στάδια της απομεθυλίωσης του C-4.
4. Οι αλλυλαμίνες, που παρεμποδίζουν εξειδικευμένα την εποξειδάση του σκουαλενίου.

Έχει διαπιστωθεί ότι οι SBIs επιβραδύνουν τη διαδικασία ανάπτυξης σε νεαρά στάδια των φυτών, καθώς παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση γιββερελλινών ή/και φυτοστερολών. Τα DMIs δρουν σε βιοσυνθετικές λειτουργίες των φυτών οι οποίες καταλύονται από το κυτόχρωμα P₄₅₀. Η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης φυτοστερολών έχει ως αποτέλεσμα, όπως και στους μύκητες, τη συσσώρευση 14^α-μεθυλοστερολών και την αποδιοργάνωση των κυτταρικών μεμβρανών (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Επίσης, οι DMIs παρεμβαίνουν στη διαδικασία οξείδωσης του καουρενίου από το κυτόχρωμα P450 σε καουρενοϊκό οξύ, παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση των γιββεριλλινών. Οι παραπάνω επιδράσεις των μυκητοκτόνων αυτών παρατηρούνται σε συγκεντρώσεις πολύ υψηλότερες από τις συνιστώμενες για την καταπολέμηση των μυκήτων, που προφανώς οφείλεται στη μικρή χημική συγγένεια των DMIs με τα κυτοχρώματα P450 των φυτών (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

1.2.2.6.1.1 Ιμιδαζολικά- Prochloraz

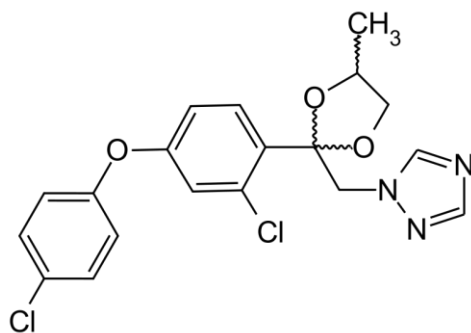
Το prochloraz (Εικ. 10) αποτελεί αναστολέα της 14 α -απομεθυλάσης της λανοστερόλης (CYP51), ένα ένζυμο κλειδί για τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης στους μύκητες (White, Marr, & Bowden, 1998). Το μυκητοκτόνο αυτό είναι αποτελεσματικό σε ευρύ φάσμα φυτοπαθογόνων μυκήτων κυρίως των σιτηρών (*Pseudocercospora*, *Pyrenophora* κ.α), αλλά και των ψυχανθών (*Ascochyta*, *Botrytis*), των τεύτλων (*Cercospora* και *Erysiphe*) και του ρυζιού (*Pyricularia oryzae*). Επίσης χρησιμοποιείται μετασυλλεκτικά στα εσπεριδοειδή και σε ασθένειες μανιταριών, καθώς και σε επεμβάσεις στο σπόρο για την προστασία από μύκητες των γενών *Cochliobolus*, *Fusarium*, *Pyrenophora*, *Alternaria* κ.α. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).



Εικόνα 10. Χημικός τύπος Prochloraz

1.2.2.6.1.2 Τριαζολικά- Difenconazole

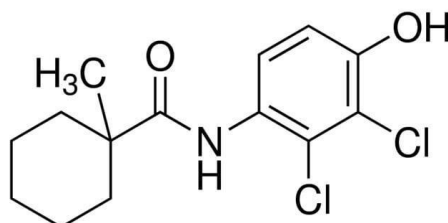
Το difenoconazole (Είκ. 11) είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο ευρέου φάσματος, που εμφανίστηκε στη γεωργική πράξη στα τέλη της δεκαετίας του '80 με το εμπορικό όνομα Score. Επιδεικνύει μεγάλη υπολειμματική δράση εναντίον Ασκομυκήτων, Βασιδομυκήτων, και Αδηλομυκήτων, συμπεριλαμβανομένου των γενών *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Septoria* κ.α. σε πολλές καλλιέργειες (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Το μυκητοκτόνο αυτό αναστέλλει την απομεθυλίωση κατά βιοσύνθεση της εργοστερόλης, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του σχηματισμού της κυτταρικής μεμβράνης (de Figueirêdo, et al., 2019; Hamada, Yin, & Ma, 2011).



Εικόνα 11. Χημικός τύπος Difenoconazole

1.2.2.6.1.3 Υδροξυανιλίδια- Fenhexamid

Τα μυκητοκτόνα που ανήκουν στην ομάδα των υδροξυανιλιδίων αποτελούν αναστολείς της απομεθυλίωσης του C-4. Το fenhexamid (Εικ. 12) είναι ένα νέο βοτρυδιοκτόνο που εισήχθη στη γεωργική πράξη με το εμπορικό όνομα Teldor. Είναι αποτελεσματικό για την καταπολέμηση του *Botrytis*, *Monilia* sp. και άλλων παθογόνων ασκομυκήτων σε αμπέλι, μηλοειδή, εσπεριδοειδή και καλλωπιστικά φυτά.



Εικ. 12 Χημικός τύπος Fenhexamid

1.3 Εδαφικοί φυτοπαθογόνοι μύκητες

Υπάρχουν 4 κύριες ομάδες φυτοπαθογόνων εδάφους: οι μύκητες, οι νηματώδεις, τα βακτήρια και οι ιοί (Agrios, 2005), με τους μύκητες και τους ωομύκητες να αποτελούν τα πιο σημαντικά εδαφογενή φυτοπαθογόνα (Raaijmakers et al. 2008), διότι είναι τα πιο ευρέως κατανεμημένα και τα πιο καταστροφικά παράσιτα των φυτών (Ingold and Hudson 1993). Υπάρχουν χιλιάδες είδη φυτοπαθογόνων μυκήτων τα οποία συλλογικά είναι υπεύθυνα για το 70% όλων των γνωστών ασθενειών των φυτών (Carrisetal., 2012).

Οι μύκητες είναι ετερότροφοι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί με εξωκυτταρική θρέψη και τα κύτταρά τους περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο συνίσταται από χιτίνη ή/και κυτταρίνη. Το σώμα τους, που ονομάζεται μυκήλιο, είναι νηματοειδές διακλαδιζόμενο ή αμοιβαδοειδές. Επιπλέον αναπαράγονται αγενώς ή εγγενώς και ζουν σε ποικιλία υποστρωμάτων και συνθηκών ως παράσιτα ή σαπρόφυτα (Alexopoulos, Mims, & Blackwell, 1996).

Δεν είναι όλοι οι μύκητες παθογόνοι για τα φυτά. Έχουν αναφερθεί 10.000 είδη μυκήτων που προκαλούν σοβαρές ασθένειες στα φυτά, και τα 6.500 είδη από αυτά, που είναι υποχρεωτικά παράσιτα. Όλα τα φυτά προσβάλλονται από έναν ή περισσότερους μύκητες και συχνά ένας μύκητας προσβάλλει περισσότερα από ένα, καλλιεργούμενα ή αυτοφυή είδη φυτών.

Ανάλογα με τον τρόπο ζωής τους οι μύκητες μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες: βιοτροφοί, νεκρότροφοι και ήμι-βιότροφοι. Οι βιότροφοι μύκητες αντλούν ενέργεια από τα ζωντανά κύτταρα του φυτού ξενιστή χωρίς όμως να τα θανατώνουν. Οι περισσότεροι φυτοπαθογόνοι μύκητες είναι νεκρότροφοι, που σημαίνει ότι σκοτώνουν τον ιστό ξενιστή που προσβάλλουν με ένζυμα και τοξίνες πριν από τον σχηματισμό των υφών, καθώς δεν είναι απαραίτητα για την πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών. Οι ήμι-βιότροφοι μύκητες ξεκινούν τον κύκλο ζωής τους ως βιότροφοι και έπειτα

μετατρέπονται σε νεκρότροφοι (Moore, Robson, & Trinci, 2019). Η επιβίωση και η ανάπτυξη των παθογόνων, εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες του περιβάλλοντος, δηλαδή από την υγρασία, την θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα θρεπτικών και από παράγοντες που καθορίζουν την ικανότητα πρόσληψης των θρεπτικών. Για το λόγο αυτό, σε αντίξοες συνθήκες τα παθογόνα του εδάφους εντοπίζονται στις ανθεκτικές τους μορφές (χλαμιδοσπόρια, κονίδια, σκληρότια ή επιβιώνουν στις ρίζες των φυτών και σε υπολείμματα καλλιεργειών) (Bruehl, 1987).

1.3.1 Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL)

Γενικά το γένος *Fusarium*, προσβάλλει διάφορες καλλιέργειες και κυρίως κηπευτικά, προκαλώντας ασθένειες όπως αδρομυκώσεις και ξηρές σήψεις (Λαχανοκομία, Κ.Γ. Δημητράκης, 1998). Το είδος *Fusarium oxysporum* μπορεί περαιτέρω να υποδιαιρεθεί σε φυλές, με βάση την παθογένεια μιας απομόνωσης σε συγκεκριμένη καλλιέργεια ξενιστή.

Ο *F. oxysporum* είναι ένας εδαφογενής μύκητας και εντοπίζεται με τη μορφή των σπορίων του (Agiros 2005). Παράγει 3 ειδών σπορίων: τα μακροκονίδια, τα μικροκονίδια και τα χλαμιδοσπόρια (Nelson P. , 1981). Τα μακροκονίδια αποτελούνται από 3-5 κύτταρα και εντοπίζονται κυρίως στην επιφάνεια νεκρών φυτών τα οποία έχει προηγουμένως θανατώσει ο μύκητας (Agiros, 2005; Kang et al., 2014). Τα μικροκονίδια αποτελούνται από 1-2 κύτταρα και συνιστούν τα σπόρια που παράγονται συχνότερα και σε μεγαλύτερο βαθμό παντού, ακόμη και στο εσωτερικό των αγγείων του φυτού. Τα χλαμιδοσπόρια αποτελούνται από 1-2 κύτταρα, παράγονται από υφές και κονίδια με συμπύκνωση, και περιβάλλονται από παχύ τοίχωμα (Agiros 2005). Είναι οι ανθεκτικές μορφές του μύκητα και μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε φυτικά υπολείμματα στο έδαφος απουσία ξενιστή. Παρουσία φυτικών ριζών ή φρέσκων φυτικών υπολειμμάτων τα χλαμιδοσπόρια βλασταίνουν και παράγουν υφές αλλά και κονίδια και περισσότερα χλαμιδοσπόρια (Jendoubi et al., 2017). Το μυκήλιο στη συνέχεια προσβάλλει τη ρίζα είτε από τις άκρες, είτε διαμέσου πηλγών, είτε από το σημείο σχηματισμού πλευρικών ριζών (Agiros, 2005). Στη συνέχεια, μετακινείται στον φλοιό της ρίζας αποπλαστικά και καταλήγει στα αγγεία του ξυλώματος, όπου και εισέρχεται (Bishop & Cooper, 1983). Το μυκήλιο από εκεί και στη συνέχεια, παραμένει αποκλειστικά στα αγγεία, και μεταφέρεται μέσω αυτών στο υπόλοιπο φυτό παράγοντας μικροκονίδια (Agiros, 2005). Τα μικροκονίδια μεταφέρονται μέσω των αγγείων (Nelson, 1981) και, σε περίπτωση που η μεταφορά τους παρεμποδιστεί, βλασταίνουν και εισβάλλουν στο διπλανό αγγείο όπου παράγουν περισσότερα μικροκονίδια (Agiros, 2005). Ο μαρasmus επέρχεται αφότου αποφραχθούν τα αγγεία με το μυκήλιο, μικροκονίδια και προϊόντα της άμυνας του φυτού και παρεμποδιστεί η μεταφορά του νερού (Agiros, 2005).

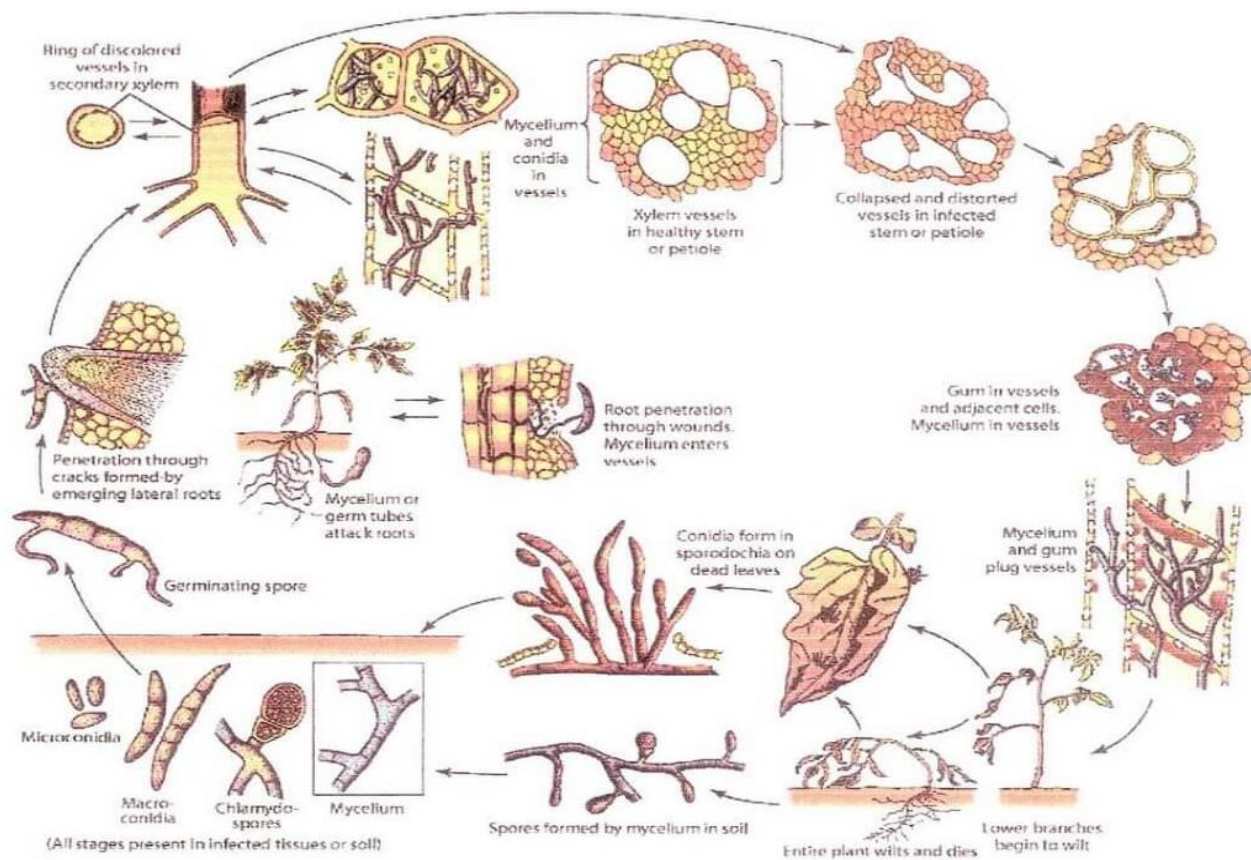
Το *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) είναι ένας εδαφογενής μύκητας ,ο οποίος μπορεί να παραμείνει στο έδαφος για αρκετά χρόνια χωρίς να έχει προσβάλει κάποιον ξενιστή. Τα υγιή φυτά μπορούν να μολυνθούν από το *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL), μόνο εάν το έδαφος στο οποίο αναπτύσσονται έχει μολυνθεί από το παθογόνο (Mijatović et al., 2007).

Το *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) επιβιώνει σε μολυσμένα φυτικά θραύσματα στο έδαφος ως μυκήλιο και σε όλες τις μορφές των σπορίων του αλλά, πιο συχνά, σε ιδιαίτερα ψυχρές εύκρατες περιοχές, ως χλαμιδοσπόρια σε φυτικά υπολείμματα (Agiros, 2005). Ο μύκητας μπορεί να είναι παράσιτο ζιζανίων, σπόρων και πολλών άλλων ξενιστών, όπου αποικίζει τους φλοιούς των ριζών. Ο παθογόνος οργανισμός μπορεί να μολύνει τις ρίζες της ντομάτας και στη συνέχεια το ξύλωμα, όπου μέσω αυτού μετακινείται παθητικά μέσα στο αγγειακό σύστημα του φυτού. Συνήθως η λοίμωξη στο ξύλωμα ευνοείται από πληγές στις ρίζες, συμπεριλαμβανομένων

εκείνων που δημιουργούνται από τα root-knot των νηματοειδών. Η δευτερογενής εξάπλωση του παθογόνου από το ένα φυτό στο άλλο συμβαίνει σπάνια. Ωστόσο, η εξάπλωση σε μεγάλο μήκος του παθογόνου μπορεί να γίνει με τη χρήση μολυσμένου, από το παθογόνο, εξοπλισμού εδάφους, των κιβωτίων συσκευασίας και μέσω των εργαζομένων ή των μολυσμένων μοσχευμάτων. Έχει επίσης αναφερθεί ότι ο παθογόνος παράγοντας μπορεί να μεταφερθεί και εναερία υπό συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες (Correll & Jones, 2014).

1.3.2 Η ασθένεια- αδροφουζαρίωση και ξηρές σήψεις

Ο κύκλος της ασθένειας που προκαλεί το *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) φαίνεται στην Εικόνα 13. Έχει παρατηρηθεί, ότι το FORL έχει την ικανότητα να καταστρέφει τους παρεγχυματικούς ιστούς νεαρών ριζών και να επεκτείνεται στο βλαστό σε περιορισμένη απόσταση. Τα αγγεία των προσβεβλημένων φυτών δείχνουν σαν να έχουν προσβληθεί από ασθένειες σήψης (Charest et al., 1984).



Εικόνα 13. Ο κύκλος της ασθένειας του *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) (Agiros, 2005.)

Το παθογόνο βρίσκεται στο φυτό-ξενιστή σε μορφή μυκηλίου ή κονιδίων, αρχικά ως μικροκονίδια, παραγόμενα σε μολυσμένα αγγεία. Όσο η ασθένεια εξελίσσεται, ο μύκητας προσβάλλει παρακείμενους στο ξύλο ιστούς όπως την εντερώνη, το κάμβιο, τον ηθμό και τον φλοιό. Σε ώριμες καλλιέργειες παρατηρείται καφέ σήψη του λαιμού στο ύψος της επιφάνειας του εδάφους, και καφέ μεταχρωματισμοί στα αγγεία μέχρι και 25cm από το έδαφος. Μάρανση φύλλων, άχρωμοι μαλακοί καρποί συνθέτουν την τελική εικόνα (Εικόνα 14). Σε κάποιες περιπτώσεις εκτεταμένη αποίκηση έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ρωγμών και εξωτερικών καρκινωμάτων στο στέλεχος. Όταν η έκφραση των συμπτωμάτων είναι τόσο πολύ σοβαρή, το φυτό υποκύπτει στην ασθένεια (Agiros, 2005).

Η εμφάνιση των συμπτωμάτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία. Η άριστη θερμοκρασία για την εκδήλωση της ασθένειας είναι 15-18°C (Jarvis, 1988).



Εικόνα 14. Αδροφουζαρίωση-Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici-Τομάτα (Tjamos)

1.4 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί

Τα φυτά, στα φυσικά οικοσυστήματα, τις περισσότερες φορές συμβιώνουν με μικροοργανισμούς οι οποίοι δεν τους προκαλούν συμπτωματολογία κάποιας ασθένειας. Στην περίπτωση των ενδοφυτικών μικροοργανισμών, αυτοί έχουν την ικανότητα να διαβιούν μέσα στο φυτικό σώμα και πολλές φορές επεκτείνονται διαμέσων αυτού. Σε αντίθεση με τις μυκώριζες, οι ενδοφυτικοί μύκητες συνήθως αναπτύσσονται μόνο εντός του φυτικού σώματος, ενώ ανιχνεύονται εκτός μόνο κατά τη φάση της κονιδιοποίησης μετά την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου του φυτού (Stone et al., 2004). Για παράδειγμα, όλες οι γνωστές κλάσεις ενδοφυτικών μυκήτων, εκπροσωπούνται κυρίως από τους ασκομύκητες, ενώ οι βασιδιομύκητες είναι οι λιγότερο επικρατέστεροι (Rodrigues et al., 2009). Ο ορισμός του ενδοφυτισμού δεν προσδιορίζει μια συγκεκριμένη λειτουργική σχέση μεταξύ των συμβιωτών. Από την άποψη αυτή, η συμβίωση μπορεί να είναι αμοιβαία επωφελής, να επωφελείται μόνο ένας από τους εταίρους (commensalistic) ή απλώς ο μικροσυμβιώτης να είναι λανθάνον παθογόνο/σαπρόφυτο (Fesel & Zuccaro, 2016). Για παράδειγμα, ο μύκητας *Piriformospora indica* (Varma et al., 1999; Peškan-Berghöfer, et al., 2004) αναπτύσσει εναλλακτικές στρατηγικές τρόπου ζωής εξαρτώμενες από τον ξενιστή (Lahrmann, et al., 2013), και εκμεταλλεύεται τους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου του ξενιστή (Deshmukh et al. 2006; Zuccaro et al., 2011; Jacobs et al., 2011; Qiang et al., 2012). Σε κάθε περίπτωση όμως ο μικροσυμβιώτης εξαρτάται ολοκληρωτικά για την ανάπτυξη και διατήρηση του από το φυτό ξενιστή. Σε αντάλλαγμα, σε ορισμένες περιπτώσεις, κάποιοι μικροσυμβιώτες επιδρούν θετικά στην ανάπτυξη του φυτού ξενιστή, προσφέροντας ανοχή έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Rodriguez, et al., 2008). Για παράδειγμα κάποιοι ενδοφυτικοί μύκητες μπορούν να δρουν ως βιολογικοί παράγοντες ελέγχου φυτοπαθογόνων. Σε αυτές τις περιπτώσεις έχουν περιγραφεί κυρίως δύο μηχανισμοί δράσης που σχετίζονται με ανταγωνισμό θέσης ή/και θρεπτικά και ενεργοποίηση ενδογενών μηχανισμών άμυνας του φυτού (Kavroulakis et al., 2007; Pantelides et al., 2009).

1.4.1 Ο ενδοφυτικός μύκητας FsK

Ο ασκομύκητας *Fusarium solani* είναι η ατελής μορφή του *Nectria haematococca*, και μέλος ενός μονοφυλετικού κλάδου που περιέχει αυτή τη στιγμή τουλάχιστον 60 διακριτά φυλογενετικά είδη, γνωστά ως ‘*F. solani* είδη (FSSC)’ (Coleman et al., 2009; Coleman, 2016). Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται είδη υγειονομικής και αγρονομικής σημασίας. Σε αυτά με γεωργική σπουδαιότητα περιλαμβάνονται παθογόνα, ενδοφυτικά και σαπροφυτικά είδη (Zhang et al. 2006; Coleman et al. 2009; Shweta et al. 2010). Έχουν δε την ικανότητα να προσαρμόζονται τόσο γενετικά όσο και μεταβολικά σε μια πληθώρα περιβαλλοντικών καταστάσεων (Coleman et al. 2009).

Το στέλεχος *Fusarium solani* strain K (FsK) είναι ένα ενδοφυτικό, μη παθογόνο στέλεχος του είδους *F. solani*, το οποίο απομονώθηκε από ρίζες ντομάτας που αναπτύχθηκαν σε ένα επισκευτικό compost (Kavroulakis et al. 2007). Το FsK είναι ικανό να αποικίζει τις ρίζες των φυτών και παράλληλα να τα προστατεύει από παθογόνα τόσο της ριζόσφαιρας όσο και του υπέργειου τμήματος, μία ένδειξη επαγωγής της συστημικής άμυνας. Επιπλέον μειώνει τα επίπεδα μεταγραφής ορισμένων γονιδίων παθογένειας (*PR5* και *P69*) στους ιστούς της ρίζας, ανεξαρτήτως από την παρουσία ενός παθογόνου της ρίζας (Kavroulakis et al. 2007). Επιπροσθέτως, με τη χρήση μεταλλαγμένων σειρών τομάτας, ως προς τη σύνθεση του αιθυλενίου και του γιασμονικού οξέος (JA), αποδείχθηκε ότι το μονοπάτι μετάδοσης σήματος του αιθυλενίου είναι απαραίτητο για την εκδήλωση της προστατευτικής δράσης του FsK, ενώ το σηματοδοτικό μονοπάτι του JA δεν παίζει κανένα ρόλο στο μηχανισμό αυτό (Kavroulakis et al. 2007). Τελευταία έχει βρεθεί ότι ο αποικισμός των ριζών ντομάτας με το στέλεχος FsK αυξάνει την ανθεκτικότητα των φυτών στην έλλειψη νερού (Kavroulakis et al., 2018) ενώ επηρεάζει και τα επίπεδα προσβολής τους από ζωικούς εχθρούς (Garantonakis et al., 2018; Pappa et al., 2018).

1.5 Σκοπός

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία το 1969. Ο μύκητας αυτός, προσβάλλει τα φυτά τομάτας, προκαλώντας τους αδροφουζαρίωση και ξηρές σήψεις, οδηγώντας σε τεράστιες απώλειες καρπών. Το γεγονός αυτό, και καθώς ο μύκητας είναι τόσο διαδεδομένος και ανθεκτικός στα εδάφη, η αποστείρωση και αμειψισπορά, μολονότι θεωρούνται ορθές πρακτικές, έχουν περιορισμένη αξία. Η πιο δραστική μέθοδος για την πρόληψη της προσβολής των φυτών τομάτας, είναι η χρήση χημικών μυκητοκτόνων. Ωστόσο η εφαρμογή αυτής της μεθόδου, εκτός από τη μείωση της μικροχλωρίδας του εδάφους, μπορεί να είναι επιβλαβής και για άλλους ζωντανούς οργανισμούς (Lewis et al., 1996). Ο βιολογικός έλεγχος, που περιλαμβάνει μη χημικούς παράγοντες, αναφέρεται σε διάφορες περιπτώσεις ότι είναι εξίσου αποτελεσματικός με τον χημικό έλεγχο (Elad et al., 1993). Οι βιολογικοί παράγοντες αποικίζουν τις ρίζες του φυτού, και έχουν την ικανότητα να μειώνουν την συχνότητα εμφάνισης της νόσου, αλλά συχνά είναι πιο αποτελεσματικοί όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες βιολογικού ελέγχου και διαφορετικές στρατηγικές ολοκληρωμένης αντιμετώπισης.

Η χρήση ενός βιολογικού παράγοντα σε συνδυασμό με χημικά μυκητοκτόνα, αποτελεί πιθανότατα μία ολοκληρωμένη στρατηγική αντιμετώπισης της ασθένειας. Ο συνδυασμός αυτός οδηγεί σε μειωμένη χρήση φυτοφαρμάκων, καθώς ο βιολογικός παράγοντας συνεισφέρει στην αντιμετώπιση της ασθένειας. Σημαντική προϋπόθεση για να υπάρξει μία επιτυχημένη ολοκληρωμένη αντιμετώπιση, αποτελεί το γεγονός ότι οι βιολογικοί παράγοντες θα πρέπει να είναι ασφαλείς ως προς τον άνθρωπο και τα φυτά και επιπλέον, τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του παθογόνου να μην επηρεάζουν τον βιολογικό κύκλο και τις φυσιολογικές λειτουργίες του βιολογικού παράγοντα.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε: α) η εκτίμηση της συμβατότητας επιλεγμένων μυκητοκτόνων που έχουν πάρει έγκριση για την καλλιέργεια τομάτας στην Ελλάδα, με το ενδοφυτικό στελέχος FsK του μύκητα *Fusarium solani*, σε *in vitro* συνθήκες καθώς και β) η διερεύνηση των επιπτώσεων των μυκητοκτόνων αυτών στην επιβίωση, στον αποικισμό των ριζών και στις κατασταλτικές ιδιότητες του FsK ενάντια στο παθογόνο FORL σε φυτά τομάτας.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Στελέχη μυκήτων και συνθήκες καλλιέργειας.

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η συμβατότητα των 9 μυκητοκτόνων, που προαναφέρθηκαν στην παράγραφο 1.3, με το βιολογικό παράγοντα FsK, ένα μη παθογόνο στέλεχος του *F. solani* (Kavroulakis et al., 2007). Επιπλέον εξετάστηκε η επίδραση των επιλεγμένων μυκητοκτόνων στις κατασταλτικές ιδιότητες του FsK, ενάντια στο παθογόνο *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* σε μολυσμένα φυτά ντομάτας (Jarvis & Shoemaker στέλεχος CBS, Centaal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands). Και τα δυο στελέχη του μύκητα, καλλιεργούνταν σε θρεπτικό μέσο Potato-Dextrose-Agar (PDA), το οποίο αποστειρωνόταν σε κλίβανο, στους 121°C για 20min. Το θρεπτικό μέσο PDA μοιραζόταν σε τριβλύα, εμβολιάζονταν με τα στελέχη των μυκήτων και διατηρούνταν σε σκοτεινό θάλαμο ανάπτυξης στους 25 °C ή στους 4 °C για μακροχρόνια αποθήκευση.

2.2 Μυκητοκτόνα

Τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν στις *in vitro* δοκιμές μυκητοτοξικότητας, ήταν τεχνικής (95%) ή αναλυτικής καθαρότητας (99%), εκτός από τα mancozeb και thiophanate methyl, όπου χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα τα εμπορικά τους σκευάσματα Trimanoc (75WG) και Neotopsin (70WG). Συγκεκριμένα, οι δραστικές ουσίες και τα εμπορικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη αναγράφονται στον Πίνακα 2.

ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΟ (Δραστική ουσία)	ΕΜΠΟΡΙΚΟ ΣΚΕΥΑΣΜΑ	ΕΤΑΙΡΙΑ
Mancozeb	Trimanoc (75WG)	
Thiophanate-methyl	Neotopsin (70WG)	
Fludioxonil		Syngenta Crop Protection AG
Cyprodinil		Syngenta Crop Protection AG
Difenoconazol		Syngenta Crop Protection AG
Prochloraz	Octave(46WG)	Bayer Crop Science
Salicylhydroxamate (SHAM)		Aldrich
Pyraclostrobin	Comet (20EC)	BASF AG
Fludioxonil+Cyprodinil	Switch (50 WG)	
Boscalid		BASF AG
Iprodione		BASF AG
Fenhexamid		

Πίνακας 2. Παρουσίαση μυκητοκτόνων, των εμπορικών τους σκευασμάτων και της εταιρίας παραγωγής που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Ως διαλύτης, για την προετοιμασία των στοκ -πρότυπων- μυκητοκτόνων διαλυμάτων, χρησιμοποιούνταν η μεθανόλη, εκτός για τα δραστικά συστατικά fludioxonil και cyprodinil τα οποία αραιώνονταν σε αιθανόλη και το fenhexamid σε 2-προπανόλη. Για την προετοιμασία των

πρότυπων αιωρημάτων των εμπορικών συσκευασμάτων, έγινε χρήση αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού. Σε αποστειρωμένο μέσο ανάπτυξης (PDA), το οποίο δεν είχε εμβολιαστεί και δεν είχε ακόμα μοιραστεί σε τριβλύα, προσθέταμε ασηπτικά τις επιθυμητές ποσότητες των δραστικών ουσιών από τα stock διαλύματα. Βεβαιωνόμασταν πάντα, ότι ο διαλύτης δεν ξεπερνούσε το 1% v/v του συνολικού όγκου των δειγμάτων επεξεργασίας και ελέγχου.

2.3 In vitro πειράματα μυκητοτοξικότητας.

Στη παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* μυκητοτοξικά test, για να αξιολογηθεί η ευαισθησία των στελεχών του μύκητα στα μυκητοκτόνα. Η αξιολόγηση έγινε, με τη μέτρηση της διαμέτρου του μυκηλίου, το οποίο είχε αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο PDA ή Water Agar (WA), στην περίπτωση του boscalid και του cyprodinil. Το υδατικό άγαρ (WA) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αποφευχθούν οι ψευδείς ενδείξεις ευαισθησίας που παρατηρούνται όταν γίνεται χρήση θρεπτικών μέσων, πλούσια σε γλυκόζη ή αμινοξέα, για την *in vitro* εκτίμηση των μυκητοκτόνων boscalid ή cyprodinil αντίστοιχα. Επίσης, για να παρεμποδιστεί η εναλλακτική οδός, που ακολουθείται από μύκητες για να αποφύγουν την αναστολή της αναπνοής, που την προκαλούν μυκητοκτόνα της κατηγορίας QoI (όπως το pyraclostrobin), προσθέταμε 1mM από τον εξειδικευμένο παρεμποδιστή της εναλλακτικής οξειδάσης SHAM, στο μέσο PDA κατά τις *in vitro* δοκιμές μυκητοτοξικότητας του pyraclostrobin. Προκειμένου να αξιολογηθεί η ευαισθησία του FsK στα μυκητοκτόνα, υπολογίστηκαν οι τιμές EC_{50} (η συγκέντρωση του μυκητοκτόνου που προκαλεί κατά 50% παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης) για κάθε μυκητοκτόνο που δοκιμάστηκε. Για την κατασκευή της καμπύλης μυκητοτοξικότητας, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις των 0, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ από τα fludioxonil, mancozeb, και prochloraz, τα οποία προστίθονταν στο θρεπτικό υλικό PDA. Στην περίπτωση των pyraclostrobin, difenoconazole, fenhexamid και thiophanate-methyl οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις ήταν: 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$. Οι παραπάνω συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν και για το θρεπτικό υλικό WA στην περίπτωση του boscalid και του cyprodinil. Οι επιδράσεις των Octave, Switch, Comet και Neotopsin, με δραστικές ουσίες τα prochloraz, pyraclostrobin + cyprodinil, pyraclostrobin και thiophanate-methyl αντίστοιχα, εκτιμήθηκαν *in vitro* στην ανάπτυξη των μυκηλίων του FsK και του FORL προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα από κάθε εμπορικό σκεύασμα, σύμφωνα με τις συνισταμένες δόσεις από τον κατασκευαστή, στο αποστειρωμένο PDA. Ο εμβολιασμός των τριβλύων Petri που περιείχαν μυκητοκτόνο ή όχι με το μόλυσμα, πραγματοποιούνταν, χρησιμοποιώντας ένα μυκηλιακό κομμάτι 5mm από την περιφέρεια αποικιών των μυκήτων ηλικίας 5 ημερών, οι οποίες είχαν αναπτυχθεί σε PDA. Οι καλλιέργειες επωάζονταν για 7 ημέρες σε σταθερή θερμοκρασία 25 °C στο σκοτάδι. Με βάση τη μέση διάμετρο της αποικίας σε κάθε επέμβαση υπολογίζονταν το ποσοστό αύξησης ως προς το μάρτυρα (control) με βάση τον τύπο: % Ανάπτυξη = τη μέση διάμετρος της αποικίας επέμβασης/ μέση διάμετρος της αποικίας του μάρτυρα X 100 . Η επι τοις εκατό παρεμπόδιση που προκαλούνταν από κάθε επέμβαση υπολογίζονταν από τον τύπο: % Παρεμπόδιση= 100 - % Ανάπτυξη. Όλες επεμβάσεις επαναλαμβάνονταν 2 φορές για κάθε συγκέντρωση και μυκητοκτόνο.

2.4 Η επίδραση των μυκητοκτόνων στην παραγωγή κονιδίων του FsK.

Σε τρυβλία Petri προστέθηκε θρεπτικό υλικό PDA το οποίο περιείχε το εκάστοτε μυκητοκτόνο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για το κάθε μυκητοκτόνο ήταν ίση με την αντίστοιχη τιμή EC_{50} . Τα τρυβλία αυτά εμβολιάζονταν με ένα μυκηλιακό κομμάτι 5mm, και επωάζονταν για 6 ημέρες στους 25°C σε έναν σκοτεινό θάλαμο ανάπτυξης. Μετά από 6 ημέρες μεταφέρθηκαν από την επιφάνεια ενός 9cm τρυβλίου Petri τμήματα μυκηλιακής μάζας με κονίδια σε 10mL αποσταγμένου νερού. Για την απόκτηση μόνο κονιδίων

διηθούσαμε το διάλυμα με τη χρήση μιας γάζας, μετά από ανάδευση στο vortex. Με ένα αιματοκυτταρόμετρο, (2 μετρήσεις ανά πλαίσιο παρατήρησης), υπολογίζόταν η συγκέντρωση του εναιωρήματος ($[\text{κονιδίων}] = \frac{\text{αραιώση} \times \text{M.O.}}{4} \times 10^5$). Τα σπορία εκφράζονταν ως αριθμός των κονιδίων/cm² της αποικίας του μύκητα. Έτσι με αυτόν τον τρόπο επιτυγχανόταν η εκτίμηση της επίδρασης των επιλεγμένων μυκητοκτόνων, που ήταν αποτελεσματικά ενάντια στην παραγωγή των σπορίων FsK.

2.5 Η επίδραση των μυκητοκτόνων στο FsK in planta.

2.5.1 Φυτικό υλικό και εμβολιασμός.

Σπόροι ντομάτας (*Solanum lycopersicon*, cv. ACE 55), αποστειρώνονταν επιφανειακά σε 2,5% NaOCl και φυτεύονταν απευθείας σε γλάστρες, οι οποίες περιείχαν κατά προσέγγιση 400 cm³ τύρφη και NPK λίπασμα (20-20-20), με μία τελική συγκέντρωση 0,8 g/L. Οι γλάστρες τοποθετούνταν πάντα σε θερμοκήπιο στους 20-25°C με μία 16h φωτοπερίοδο και με 65% RH.



Εικόνα 15. Διάταξη γλαστρών μία εβδομάδα μετά τη σπορά σπερμάτων τομάτας και τον εμβολιασμό των φυτών με FsK.

Για τα πειράματα *in planta* χρησιμοποιούνταν τα εναιωρήματα κονιδίων των FsK και FORL. Για την παρασκευή των εναιωρημάτων απαιτείται ένα μυκηλιακό κομμάτι 5mm από την περιφέρεια των αποικιών από κάθε στέλεχος, τα οποία τοποθετούνταν σε τρυβλία Petri, που περιείχαν μόνο PDA και επωάζονταν για 6 ημέρες στους 25°C στο σκοτάδι. Η απομόνωση των κονιδίων από κάθε στέλεχος, γινόταν μέσω διήθησης με την απομάκρυνση των μυκηλιακών θραυσμάτων, και έπειτα φυγοκέντρωση στα 4000g και επανα-αιώρηση σε κατάλληλο όγκο 0,85% NaCl. Η επιθυμητή συγκέντρωση του εμβολίου επιτυγχανόταν με τη χρήση πάντα του αιματοκυτταρόμετρου. Μία εβδομάδα μετά τη σπορά γινόταν ο εμβολιασμός των φυτών τομάτας με το FsK (Εικ. 15). Η εφαρμογή του εναιωρήματος, συγκέντρωσης 10⁴ κονίδια ανά cm³ του μίγματος της γλάστρας, γινόταν με ριζοπότισμα.

2.5.2 Η εφαρμογή των μυκητοκτόνων στα εμβολιασμένα με FsK φυτά τομάτας.

2.5.2.1 Η επίδραση των μυκητοκτόνων στην επιβίωση του FsK.

Δύο εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό, εφαρμόστηκαν, με ριζοπότισμα, τα εμπορικά σκευάσματα Comet 20 EC, Neotopsin 70 WG, Switch 50 WG και Octave 46 WP (100mL συνολικό όγκο νερού ανά γλάστρα), με τις αντίστοιχες συνιστώμενες δόσεις τους σε κάθε γλάστρα. Για το πείραμα ελέγχου χρησιμοποιούνταν ίση ποσότητα αποσταγμένου νερού. Η κάθε θεραπεία αποτελούνταν από 10 γλάστρες που η κάθε γλάστρα περιείχε 3 φυτά τομάτας.

Μετά από δέκα ημέρες από την επέμβαση με τα μυκητοκτόνα γινόταν η αξιολόγηση της επιβίωσης του FsK, στις ρίζες των φυτών τομάτας με απομόνωση του μύκητα από τις ρίζες των φυτών. Η διαδικασία αυτή περιελάμβανε τα εξής βήματα: 1. Αρχικά απομονώθηκε ο ιστός της ρίζας και καθαρίζεται από τα υπολείμματα της τύρφης 2. αποστειρώθηκε η επιφάνεια του ιστού της ρίζας για 2 min σε 30mL υδατικού διαλύματος χλωρίνης 0,05% v/v, 3. Ξεπλύθηκε η ρίζα για 10 min και στεγνώσε σε αποστειρωμένο χαρτί. 4. Τοποθετήθηκε ο ιστός της ρίζας σε ένα γυάλινο τρυβλίο και την τεμαχίστηκε 5. Τοποθετήθηκαν τα τμήματα της ρίζας σε όξινο μέσο PDA-lactic acid και 6. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 2-5 ημέρες σε θαλάμους ανάπτυξης, στους 25°C στο σκοτάδι. Η ταυτοποίηση των αποικιών του στελέχους FsK που αναπτύχθηκαν γινόταν και μορφολογικά, με τη χρήση μικροσκοπίου, αλλά και με μοριακές μεθόδους και συγκεκριμένα με ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών ITS του FsK με τη χρήση των εκκινητών FFsITS (5'-TGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') και RFsITS (5'-GGTATGTTTCACAGGGTTGATG-3') και αλληλούχηση. Το πείραμα επαναλαμβάνεται δύο φορές.

2.5.2 Η επίδραση των μυκητοκτόνων στον αποικισμό των ριζών τομάτας από το FsK.

2.5.2.1 Απομόνωση DNA από φυτικούς ιστούς.

Για τη διερεύνηση του αποικισμού των ριζικών ιστών από το FsK, σε φυτά τομάτας που είχαν δεχτεί επεμβάσεις με μυκητοκτόνα ή όχι, συλλέχθηκαν ολόκληρες οι ρίζες από τέσσερα φυτά ανά επέμβαση, πλύθηκαν και στέγνωσαν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί. Τα δείγματα των ριζικών ιστών, χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του γονομικού DNA, με τη χρήση του "NucleoSpin® Plant II genomic DNA extraction" kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.KG, Duren, Germany) σύμφωνα με το προτεινόμενο από τους κατασκευαστές πρωτόκολλο.

2.5.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός του αποικισμού του FsK μέσω qPCR.

Η ποσοτικοποίηση του FsK στις ρίζες τομάτας, έγινε με τη χρήση της τεχνικής Real Time PCR, με τη βοήθεια εξειδικευμένων εκκινητών για την περιοχή ITS του *F. solani*, FFsITS (5'-TGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') και RFsITS (5'-GGTATGTTTCACAGGGTTGATG-3'). Ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου ITS, από τα συνολικά δείγματα DNA που απομονώθηκαν από τις ρίζες των φυτών που είχαν εμβολιαστεί με FsK αξιολογήθηκε, όπως προαναφέρθηκε, με τη δημιουργία μιας εξωτερικής πρωτότυπης καμπύλης (Garantonakis et al.,2018).

2.6 Η επίδραση των μυκητοκτόνων στις κατασταλτικές ιδιότητες του FsK ενάντια στο *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*.

Στη μελέτη αυτή διερευνήθηκαν τυχόν δυσμενείς επιπτώσεις των μυκητοκτόνων Octave[®], Switch[®], Comet[®] και Neotopsin[®] στις κατασταλτικές ιδιότητες του FsK, ενάντια στο φυτικό παθογόνο *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL). Η επιλογή του Switch, ένα μυκητοκτόνο που χρησιμοποιήθηκε ενάντια στον *Botrytis cinerea* στις καλλιέργειες τομάτας, έγινε με βάση την περιεκτικότητά του σε fludioxonil, ένα από τα πιο αποτελεσματικά δραστικά συστατικά που ελέγχθηκε στην παρούσα μελέτη *in vitro*. Η επιλογή του FORL έγινε με βάση πρόσφατων μελετών που αποδείκνυαν ότι το FsK έχει κατασταλτικές ιδιότητες εναντίον του συγκεκριμένου παθογόνου (Kavroulakis et al., 2007). Το εμβόλιο FsK προετοιμαζόταν και εφαρμοζόταν με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην ενότητα «Η επίδραση των μυκητοκτόνων στην ευαισθησία του FsK *in planta*». Το FORL εφαρμοζόταν με ριζοπότισμα ως ένα υδατικό εναιώρημα το οποίο περιείχε 10⁶ κονίδια ανά cm³ του μίγματος της γλάστρας, δέκα ημέρες μετά την εφαρμογή του FsK. Μία εβδομάδα μετά εφαρμοζόνταν με ριζοπότισμα τα: Comet 20 EC, Neotopsin 70 WG, Switch 50 WG, και Octave 46 WP (100mL του συνολικού όγκου του νερού ανά γλάστρα) στη συνιστώμενη, από τους κατασκευαστές, αντίστοιχη δόση σε κάθε γλάστρα. Το πειραματικό μέρος περιείχε δέκα επεμβάσεις: 1. FORL, 2. FsK + FORL, 3. FsK + FORL+Switch, 4. FsK + FORL + Comet, 5. FsK + FORL + Neotopsin, 6. FsK + FORL + Octave, 7. FORL + Switch, 8. FORL + Comet, 9. FORL + Neotopsin, 10. FORL + Octave. Κάθε επέμβαση αποτελούνταν από έξι γλάστρες που περιείχαν έξι φυτά τομάτας (Εικ 16). Η καταγραφή των συμπτωμάτων γινόταν ανά δύο ημέρες. Η καταγραφή της ασθένειας έγινε ως εξής: καταγράφηκε ο αριθμός των φυτών ανά γλάστρα με σοβαρό μαρασμό ή ξήρανση, διαιρεμένο με τον συνολικό αριθμό των φυτών ανά επέμβαση. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές.



Εικόνα 16. Καταγραφή της συμπτωματολογίας των φυτών τομάτας που είχαν ή όχι υποστεί επέμβαση.

2.7 Ανάλυση δεδομένων.

Οι τιμές EC50 κάθε είδους του μύκητα και μυκητοκτόνου, υπολογίστηκαν με παλινδρόμηση από παρεμπόδισης της μυκηλιακής ανάπτυξης ως προς το δεκαδικό λογάριθμο της συγκέντρωσης του μυκητοκτόνου. Τα αποτελέσματα της επίδρασης του FsK και των μυκητοκτόνων στην ένταση της ασθένειας που προκαλούνταν από το FORL, υποβλήθηκαν σε ανάλυση της διακύμανσης (two-way ANOVA repeated measures), με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA), που είναι χαρακτηριστικό για τον προσδιορισμό των κύριων και διαδραστικών επιδράσεων των ανεξάρτητων μεταβλητών. Ο μέσος όρος σύγκρισης-διαχωρισμού των πειραμάτων αποίκησης της ρίζας και παραγωγής σπορίων διεξήχθη χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία t-Student, όπως η δοκιμή πολλαπλού εύρους Duncan ($P < 0.05$).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η *in vitro* ευαισθησία στα μυκητοκτόνα του *FsK*.

Εννέα μυκητοκτόνα που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες, με διασυστηματική ή όχι δράση, χρησιμοποιήθηκαν σε *in vitro* δοκιμασίες μυκητοτοξικότητας, για να αξιολογηθεί η συμβατότητά τους με τον βιολογικό παράγοντα *FsK*. Το prochloraz αποδείχθηκε να είναι το πιο δραστικό μυκητοκτόνο, παρουσιάζοντας μία τιμή EC_{50} ίση με 0.035 $\mu\text{g}/\text{mL}$, και έπειτα ακολουθούν τα fludioxonil, pyraclostrobin και difenoconazole με τιμές EC_{50} ίσες με 0.065, 5 και 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αντίστοιχα (Πίνακας 3). Η δοσοεξαρτώμενη απόκριση της μυκηλιακής ανάπτυξης του *FsK* στα τέσσερα πιο δραστικά μυκητοκτόνα φαίνεται στην Εικόνα 16.

Πίνακας 3. Η επίδραση των μυκητοκτόνων στην μυκηλιακή ανάπτυξη του στελέχους *FsK*.

Μυκητοκτόνα	Χημική Ομάδα	Μηχανισμός Δράσης	Μετακίνηση στο φυτό	EC_{50}^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
thiophanate-methyl	Benzimidazoles	Μίτωση (β -tubulin inhibitor)	S ^b	> 100
Difenoconazole	Triazoles	Βιοσύνθεση Εργοστερόλης (C-14 demethylase inhibitor)	S	15
Prochloraz	Imidazoles	Βιοσύνθεση Εργοστερόλης (C-14 demethylase inhibitor)	S	0.035
Fenhexamid	Hydroxylanilides	Βιοσύνθεση Εργοστερόλης (C-4 demethylase inhibitor)	C ^b	>100
Pyraclostrobin	Methoxycarbamates	Αναπνοή (cyt-b inhibitor)	C	5
Fludioxonil	Phenylpyrroles	Ωσμωτική Ευαισθησία (MAP-kinases)	C	0.065
Cyprodinil	Anilinopyrimidines	Ένζυμα παθογένειας (cystathionione- β -lyase)	S	>100
Boscalid	Amides	Αναπνοή (Αναστολέας της ηλεκτρικής δευδρογονάσης)	S	>100
Mancozeb	Dithiocarbamates	Αναστολείς πολλαπλών θέσεων	C	>100

^a EC₅₀ = Η δραστική συγκέντρωση που προκαλεί μείωση του ρυθμού της μυκηλιακής ανάπτυξης κατά 50 %.

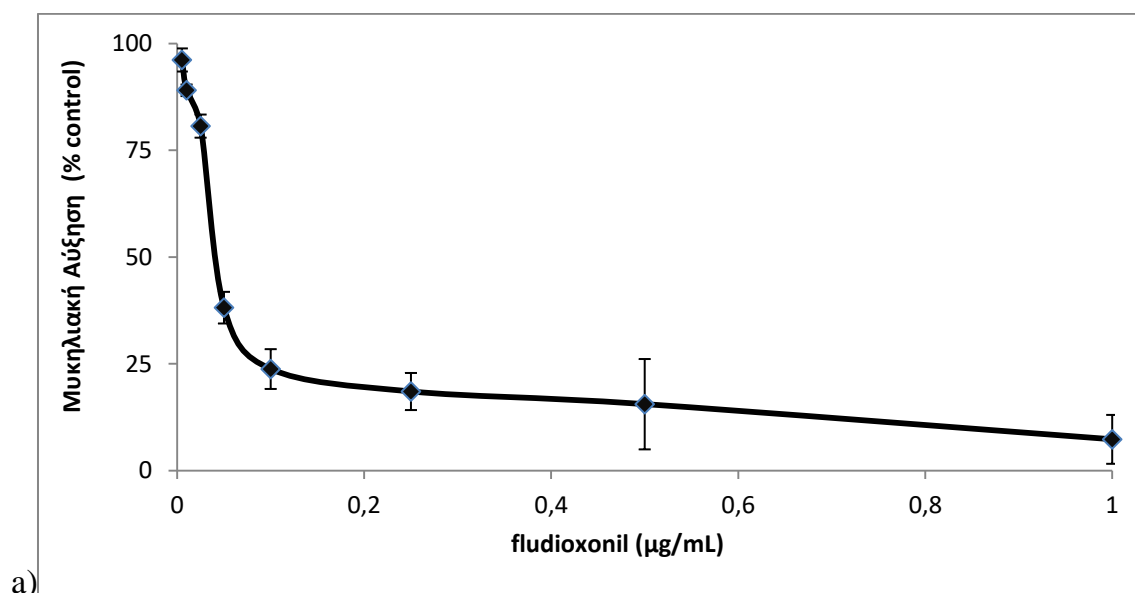
^b S: διασυστηματική, C: επαφής- μη διασυστηματική δράση

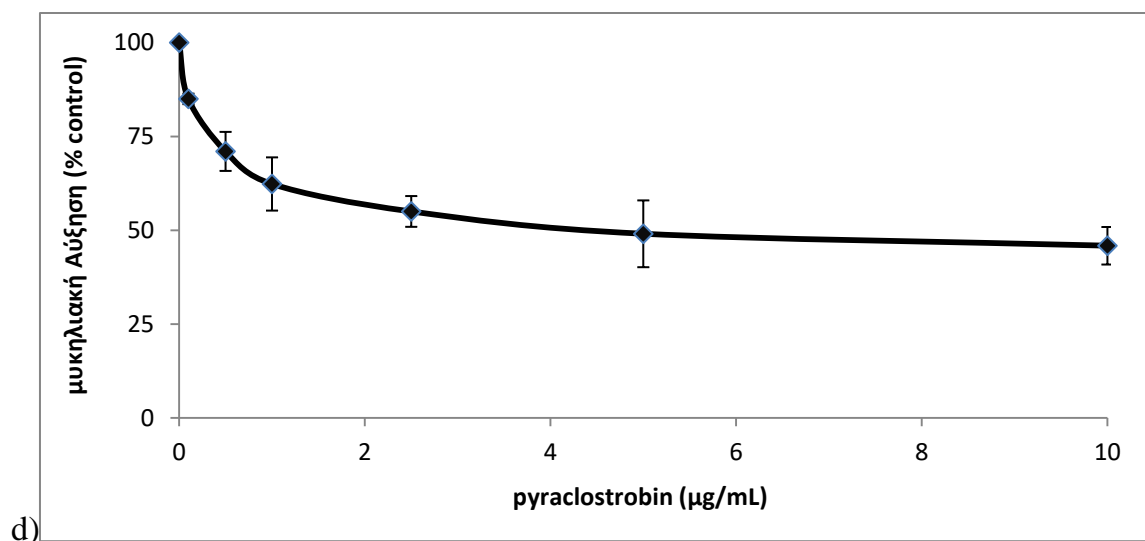
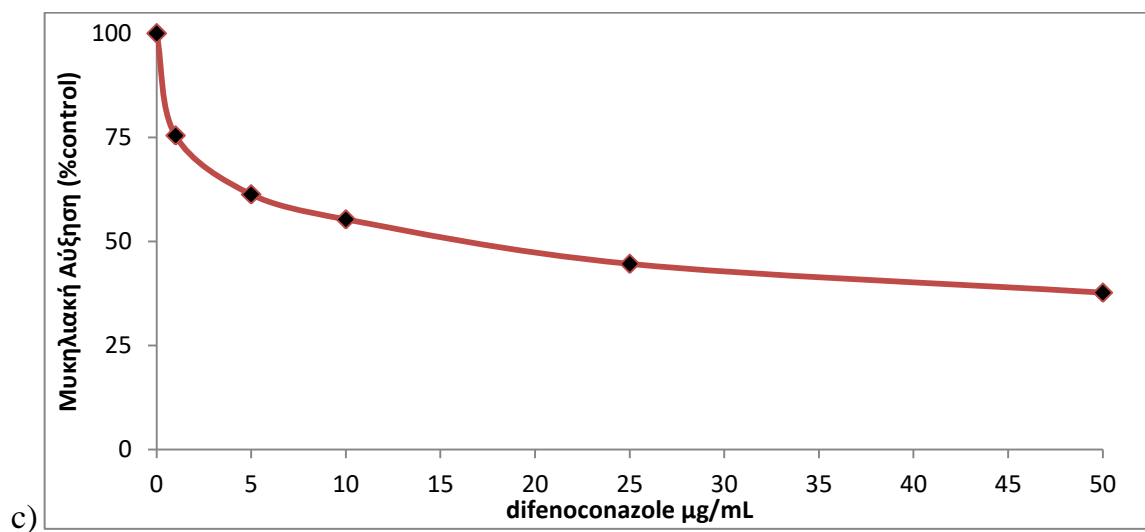
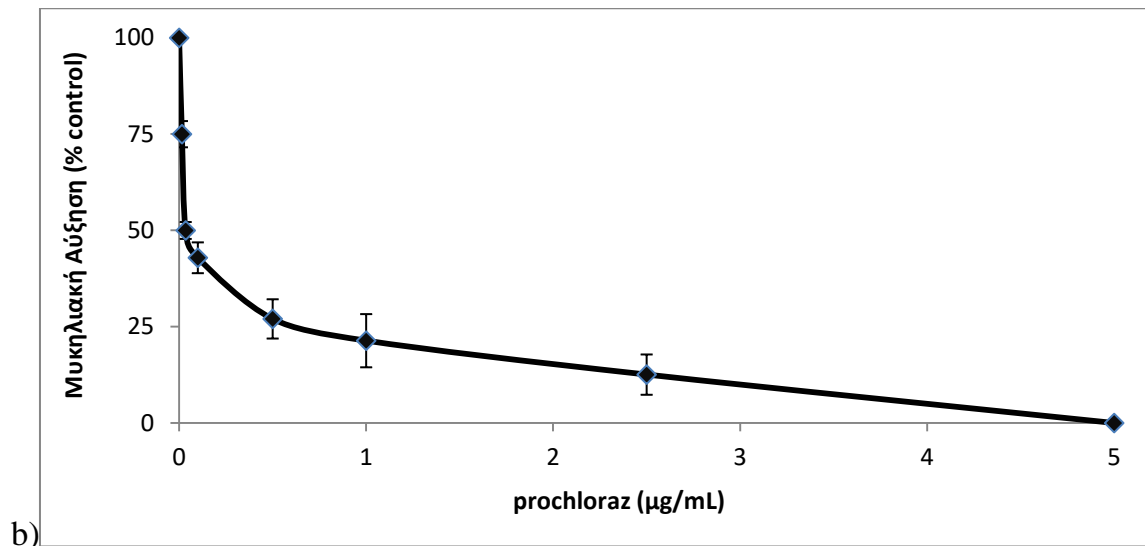
Πίνακας 4. Η *in vitro* αποτελεσματικότητα των συνιστώμενων δόσεων των εμπορικών σκευασμάτων στην αναστολή την μυκηλιακής ανάπτυξης των στελεχών *FsK* και *FORL*.

Μυκητοκτόνο	Δραστική Ουσία	Δόση ($\mu\text{g of a.i. /mL}$)	% Αναστολή ^a (Mean \pm SE ^b)	
			FsK ^c	FORL
Neotopsin	thiophanate-methyl	700	60.00 \pm 0.28	100
Comet	Pyraclostrobin	835	58.33 \pm 0.15	100
Switch	fludioxonil/cyprodinil	250/375	100	54.88 \pm 0.25
Octave	Prochloraz	460	100	100

^a Υπολογίστηκε ως η τις % αναστολή της ακτίνας ανάπτυξης του κάθε μυκηλιακού στελέχους που υποβλήθηκε σε θεραπεία με μυκητοκτόνο σε σχέση με το control.

^b Το τυπικό σφάλμα.

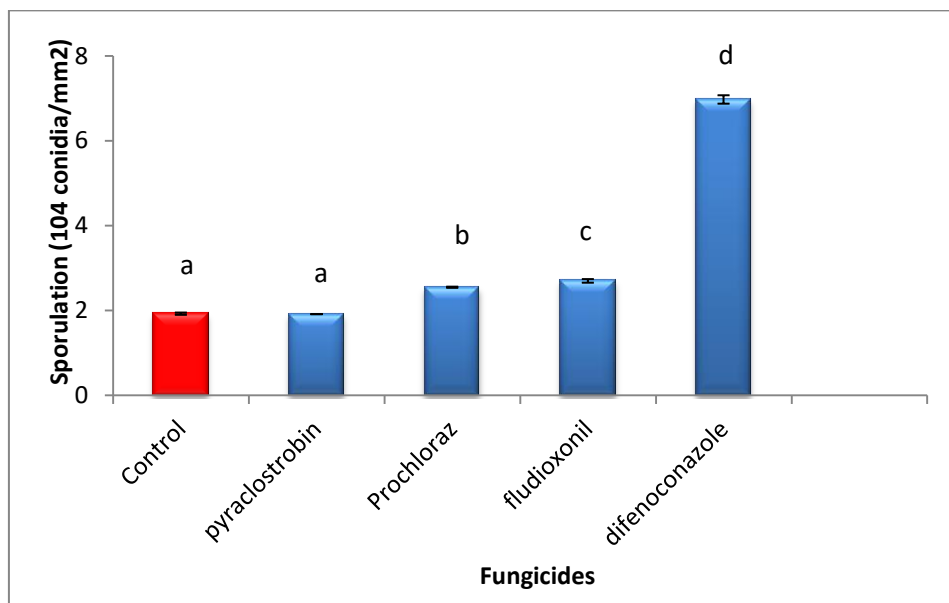




Εικόνα 16. Η ευαισθησία του FsK στα (a) fludioxonil, (b) prochloraz, (c) difenoconazole και (d) pyraclostrobin. Οι κατακόρυφες γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν το μέσο τυπικό σφάλμα.

Σε μία προσπάθεια να εκτιμηθεί η επίδραση των επιλεγμένων μυκητοκτόνων στην παραγωγή των κονιδίων, το FsK αναπτύχθηκε σε PDA που περιείχε τα μυκητοκτόνα, σε συγκεντρώσεις ίσες με τις

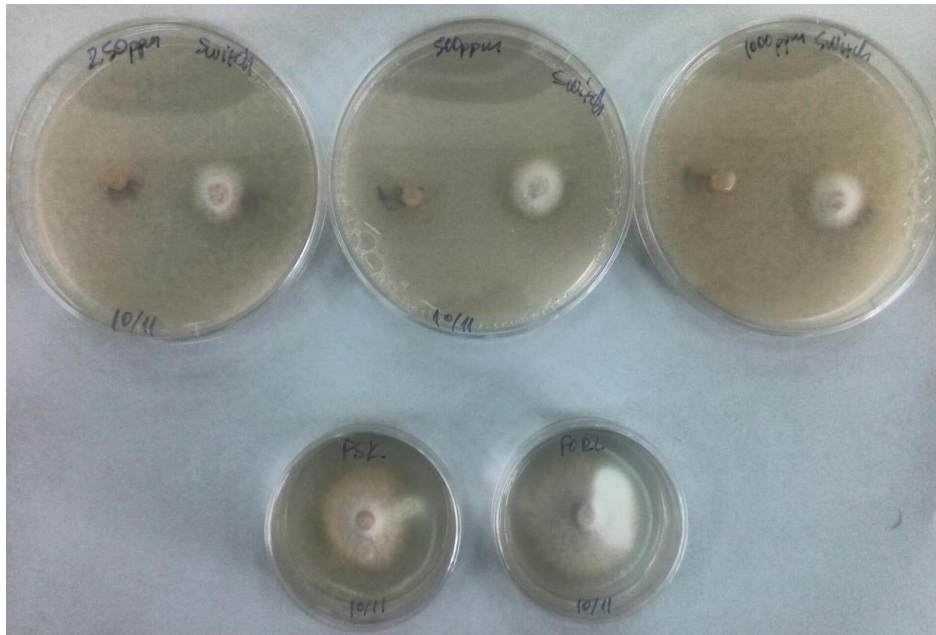
αντίστοιχες τιμές EC_{50} . Σε όλες τις περιπτώσεις, ο αριθμός των κονιδίων αυξήθηκε σημαντικά ή ήταν ίσος με το μάρτυρα (Εικόνα 17). Επομένως όλα τα παραπάνω μυκητοκτόνα δεν ασκούν αντισποριογόνο δράση ενάντια στο FsK.



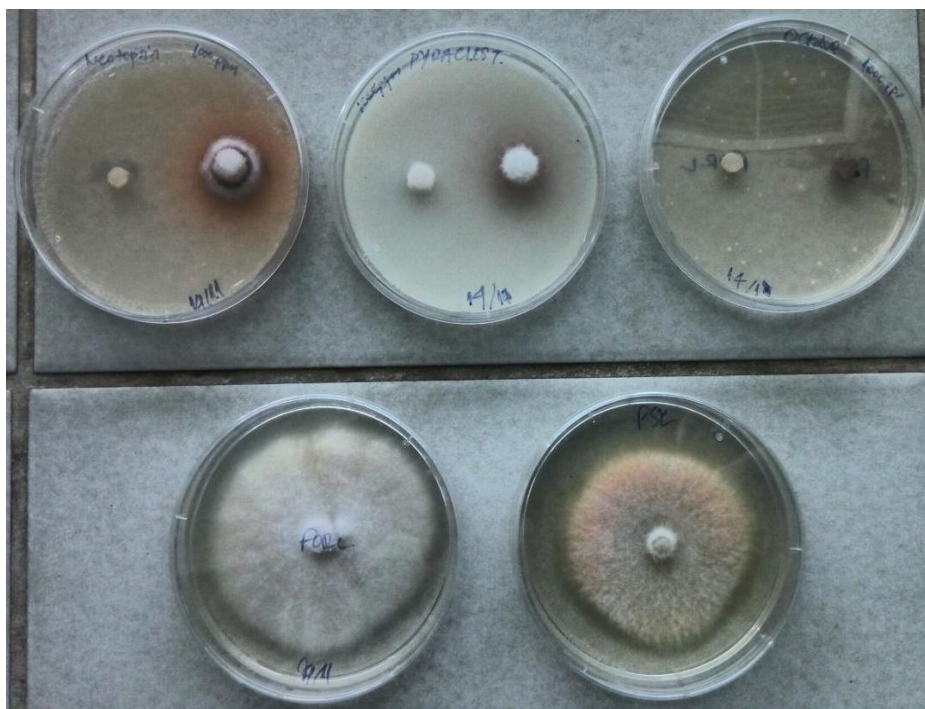
Εικόνα 17. Διάγραμμα αξιολόγησης της λιγότερο κρίσιμης ποσότητας των μυκητοκτόνων ως προς την παραγωγή κονιδίων σε θρεπτικό μέσο PDA. Οι κατακόρυφες γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν το μέσο τυπικό σφάλμα ($n=4$). Οι μπάρες που συνοδεύονται με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή πολλαπλής εμβέλειας Duncan ($P<0,05$).

Έγιναν *in vitro* δοκιμές (Εικόνα 18) για τον έλεγχο της ικανότητα των συνιστώμενων εμπορικών σκευασμάτων (Octave[®], Switch[®], Comet[®]), που περιέχουν τα τρία πιο δραστικά μυκητοκτόνα (prochloraz, fludioxonil και pyraclostrobin) όπως και για το Neotopsin[®] (που περιέχει thiophanate-methyl), ενάντια στο FORL και το FsK. Η *in vitro* επί τις εκατό αναστολή της μυκηλιακής ανάπτυξης των FsK και FORL, από τα παραπάνω εμπορικά σκευάσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Το Octave αναστέλλει πλήρως και τα δύο στελέχη στη συνιστώμενη από τον κατασκευαστή δόση. Τα Neotopsin και Comet αναστέλλουν πλήρως την ανάπτυξη του FORL, ενώ έχουμε μερική αναστολή του FsK (60 και 58% αντιστοίχως). Αντίθετα, το Switch ασκεί πλήρη αναστολή της μυκηλιακής ανάπτυξης του FsK και μόνο ένα 54,8% στην περίπτωση του FORL.

A) Switch



B) Neotopsin – Pyraclostrobin – Octave

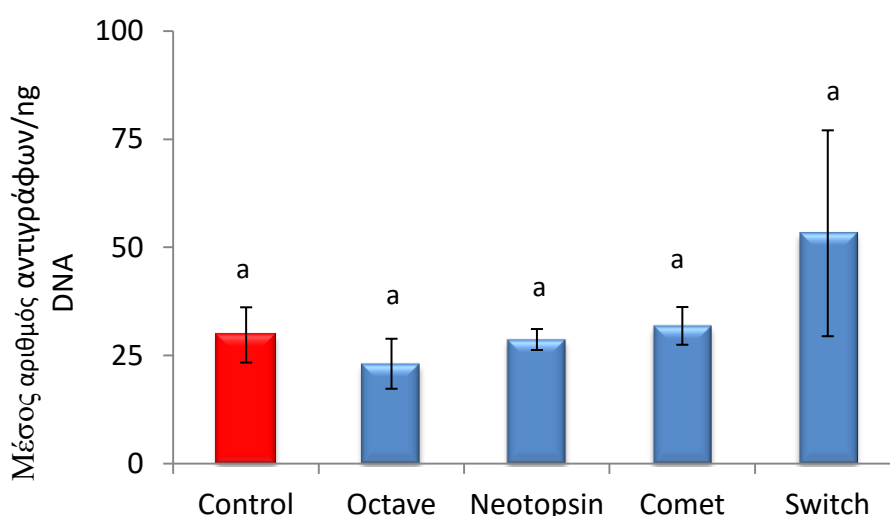


Εικόνα 18. Οι *in vitro* δοκιμασίες τοξικότητας α) Switch και β) Neotopsin – Pyraclostrobin – Octave ενάντια στα FSK α) αριστερά β) δεξιά και FORL α) δεξιά β) αριστερά.

3.2 Η επίδραση της εφαρμογής των μυκητοκτόνων στην επιβίωση του FsK και στον αποικισμό των ριζών τομάτας.

Σημείο κλειδί για την επιτυχή εγκατάσταση του ενδοφυτικού βιολογικού παράγοντα είναι η ικανότητα του να αποικίζει το φυτό ξενιστή. Σε μία προσπάθεια να αξιολογηθεί κάθε αρνητική επίδραση των επιλεγμένων μυκητοκτόνων στην αποίκηση των ριζών από τον ενδοφυτικό μύκητα, φυτά τομάτας που ήταν εμβολιασμένα με FsK, ριζοποτίθηκαν με νερό που περιείχε τα δραστικά συστατικά των εμπορικών συσκευασμάτων Octave[®], Switch[®], Comet[®], Neotopsin[®] στις ποσότητες που αναγράφονταν στις οδηγίες χρήσης. Δέκα ημέρες μετά από τη επέμβαση με τα μυκητοκτόνα, επαληθεύτηκε η επιβίωση του FsK σε όλες τις περιπτώσεις, καθώς το FsK απομονώθηκε επιτυχώς από όλες τις ρίζες τομάτας που είχαν και δεν είχαν υποστεί επέμβαση. Η ταυτοποίηση των απομονωμένων αποικιών FsK, πραγματοποιήθηκε και με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά μέσω μικροσκοπικών παρατηρήσεων, αλλά και μέσω ενίσχυσης και αλληλούχησης των ειδικών ITS περιοχών. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι κανένα από τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν δεν είναι θανατηφόρα *in planta*, τουλάχιστον στις συνιστώμενες δόσεις.

Η ποσοτικοποίηση της αποίκησης των ριζικών ιστών των φυτών που είχαν υποστεί την επέμβαση και των μαρτύρων, έγινε με Real Time PCR, όσον αφορά τον αριθμό των αντιγράφων τους ανά ng DNA FsK. Η στατιστική ανάλυση δεν εμφάνισε καμία αρνητική επίδραση των μυκητοκτόνων στην ποσότητα του DNA του FsK που υπήρχε στους φυτικούς ριζικούς ιστούς (Εικόνα 19). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι πιθανόν, μόλις γίνει η εγκατάσταση μέσα στις ρίζες, το FsK προστατεύεται ενάντια στα μυκητοκτόνα. Αυτό είναι ενδιαφέρον εάν λάβουμε υπόψη ότι τα μισά από αυτά τα μυκητοκτόνα περιέχουν δραστικά συστατικά (thiophanate-methyl και prochloraz) που παρουσιάζουν διασυστηματική δράση.



Εικόνα 19. Διάγραμμα ποσοτικοποίησης της αποίκησης των ριζών τομάτας από τον βιολογικό παράγοντα FSK 10 μέρες μετά από θεραπεία και σε φυτά control. Οι κατακόρυφες γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν το μέσο τυπικό σφάλμα ($n=4$). Οι μπάρες που συνοδεύονται με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή πολλαπλής εμβέλειας Duncan ($P<0,05$).

3.3 Η επίδραση των μυκητοκτόνων στις κατασταλτικές ιδιότητες του FsK ενάντια στο *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*.

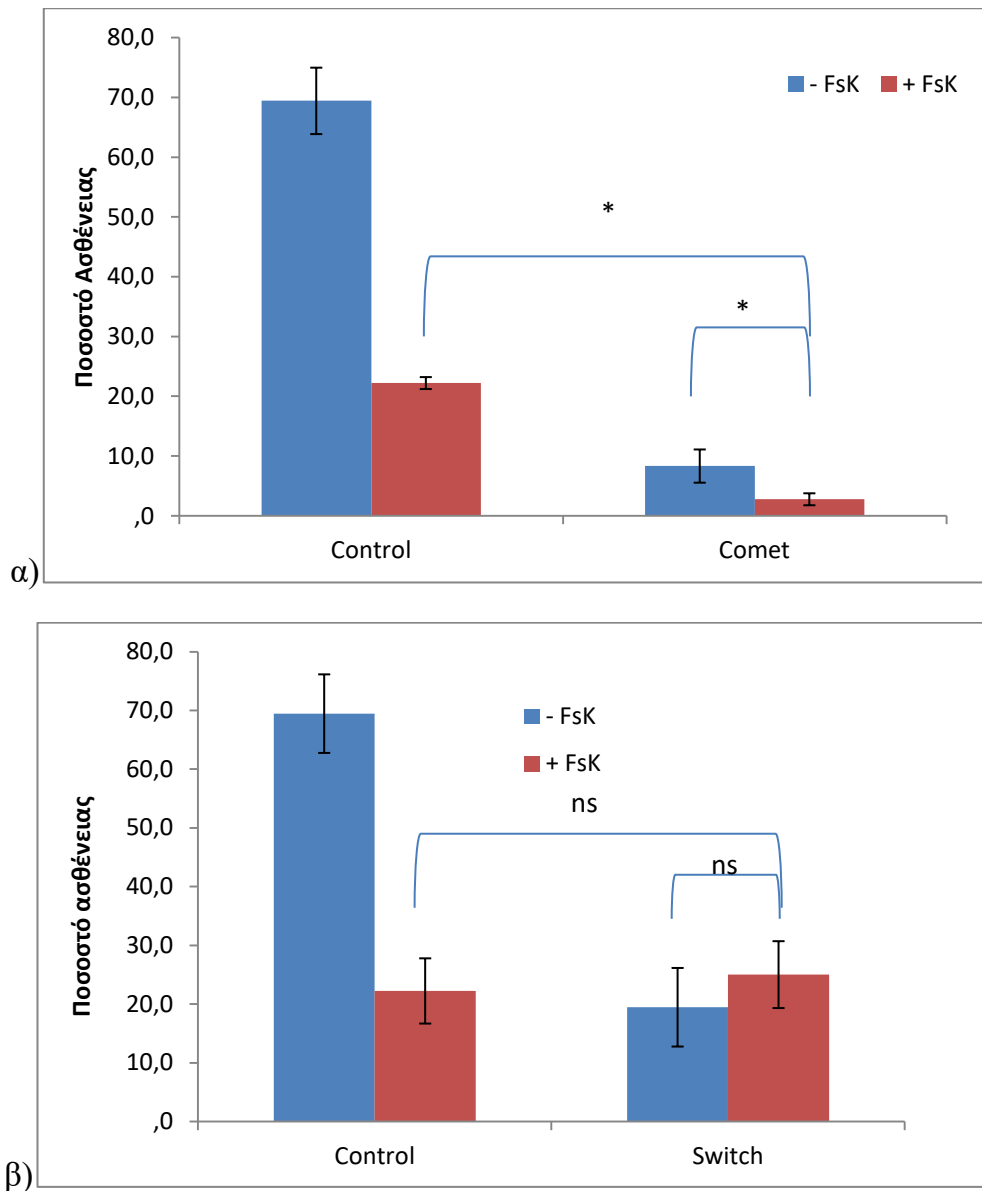
Η στατιστική ανάλυση της ασθένειας που προκλήθηκε από το FORL αποκάλυψε σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του FsK και των επεμβάσεων με τα μυκητοκτόνα ($p < 0,001$). Οι επιπτώσεις της ασθένειας του FORL στα φυτά τομάτας που είχαν δεχθεί τη επέμβαση με το FsK, με τα μυκητοκτόνα και με το συνδυασμό αυτών των δύο, φαίνεται στον Πίνακα 5.

Μυκητοκτόνα	% εμφάνιση της ασθένειας	
	-FsK	+FsK
Control	69,44±6,69 a ^b	22,22 ± 5,55 a
Octave	0,00c	0,00b
Comet	8,33± 3,73bc	2,77 ± 2,77 b
Switch	19,44 ± 6,69 b	25,00 ± 5,50 a
Neotopsin	0,00c	0,00b

a: σταθερά απόκλισης του μέσου όρου. **b:** Εντός των στείλων, οι αριθμοί που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμή πολλαπλού εύρους Duncan ($p > 0,05$)

Πίνακας 5. Η εμφάνιση των συμπτωμάτων της ασθένειας του FORL σε φυτά τομάτας που έχουν δεχθεί επέμβαση από μυκητοκτόνα παρουσία/απουσία του *Fusarium solani* strain K (FsK).

Όλα τα μυκητοκτόνα που ελέγχθηκαν, μείωσαν σημαντικά το ποσό της ασθένειας, σε σύγκριση με τα φυτά control, που δεν είχαν υποστεί κάποιου είδους επέμβασης, παρ' όλο που τα περισσότερα από αυτά δεν συνίστανται για την αντιμετώπιση του FORL στα φυτά τομάτας. Το FsK μείωσε κατά 47% τις επιπτώσεις της ασθένειας που προκάλεσε το FORL, επιβεβαιώνοντας προηγούμενες μελέτες που είχαν αναφερθεί στις κατασταλτικές ιδιότητες του FsK ενάντια στον εδαφικό αυτό φυτοπαθογόνο μύκητα (Kavroulakis et al., 2007). Τα Octave και Neotopsin ανέστειλαν τα συμπτώματα της ασθένειας του FORL και στα φυτά τομάτας που είχαν εμβολιαστεί με το FsK αλλά και στα μη εμβολιασμένα με το FsK. Το Comet μείωσε κατά 60% τις επιπτώσεις της ασθένειας στα μη εμβολιασμένα φυτά με FsK και κατά 66% στα φυτά που είχαν δεχθεί την επέμβαση με το FsK σε συνδυασμό με το μυκητοκτόνο. Αυτή η αύξηση της κατασταλτικής ικανότητας του FsK, φαίνεται στην Εικόνα 20α, και υποδεικνύει μια ελαφριά αλλά σημαντική συνεργιστική δράση μεταξύ του pyraclostrobin (Comet) και του FsK. Δεν βρέθηκαν σημαντικές στατιστικές διαφορές στις επιπτώσεις της ασθένειας μεταξύ των εφαρμογών του FsK και του Switch όταν χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά ή σε συνδυασμό (Εικόνα 20β).



Εικόνα 20. Διάγραμμα ένδειξης της αύξησης της κατασταλτικής ικανότητας του FSK υπό την επίδραση του α) Comet και β) Switch. Οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το μέσο τυπικό σφάλμα (n=6). (*)= υποδεικνύει σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων που υπολογίστηκαν με το Student t-test ($\alpha=0,05$). (ns)= μη σημαντική διαφορά.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι βιολογικοί παράγοντες αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι τόσο της βιολογικής όσο και της ολοκληρωμένης διαχείρισης ασθενειών, επιδεικνύοντας ένα επιτυχημένο παράδειγμα εναλλακτικού φιλικού προς το περιβάλλον τρόπου καταπολέμησης, έναντι των συμβατικών μυκητοκτόνων. Η επιτυχημένη επίδοση των ευεργετικών μικροοργανισμών εναντίον των παθογόνων των φυτών, συχνά εξαρτάται από την ικανότητα τους να αντιπαρέχονται τις αρνητικές επιδράσεις ορισμένων αγροχημικών προϊόντων που επηρεάζουν την ικανότητα της επιβίωσης ή της προστασίας τους (Lima et al., 2008). Το στέλεχος του *F. solani*, FSK είναι ένας ενδοφυτικός μύκητας που αποικίζει τις ρίζες της ντομάτας, και φαίνεται να ευθύνεται για την αντίσταση που εμφανίζουν τα φυτά ντομάτας, ενάντια στον εδαφικό παθογόνο μύκητα FORL (Καντουλάκης et al., 2007). Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκε η δυνατότητα του FSK να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με εννέα μυκητοκτόνα, που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση παθογόνων της τομάτας.

Τα *in vitro* μυκητοτοξικά πειράματα αποκάλυψαν ότι το fludioxonil και το prochloraz ήταν τα πιο τοξικά στο FsK, και μετά ακολουθούσαν τα μυκητοκτόνα pyraclostrobin και το difenoconazole, τα οποία είχαν χαμηλή ανασταλτική επίδραση στην μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα. Το FsK εμφάνισε μέτρια ευαισθησία σε *in vitro* δοκιμές στα μυκητοκτόνα : thiophanate-methyl, fenhexamid, cyprodinil, boscalid και mancozeb. Αξιολογήθηκε τόσο *in vitro* όσο και σε αντίστοιχες μελέτες η ευαισθησία των ειδών *Fusarium*, συμπεριλαμβανομένου και του *F. solani* στα διάφορα μυκητοκτόνα. Τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, όπως τα carbendazim, benomyl, thiophanate-methyl και thiabendazole, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την μυκηλιακή ανάπτυξη σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις αν και προβλήματα ανθεκτικότητας που έχουν εμφανιστεί έχουν μειώσει σημαντικά την ευαισθησία των υποπληθυσμών του *Fusarium* σε αυτά τα χημικά (Amini & Sidovich, 2010; Daami-Remadi & Mahjoub, 2006; Perez- Hernandez et al., 2017). Τα μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος fludioxonil, prochloraz και difenoconazole, βρέθηκαν να έχουν υψηλή αποτελεσματικότητα ενάντια στα *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. solani* f. sp. *cucurbitae*, (Amini and Sidovitch, 2010; Broders et al., 2007; Gachango et al., 2012; McGovern, 2015; Nan et al., 1992; Perez- Hernandez et al., 2017; Ramusi et al., 2017). Τα μυκητοκτόνα της ομάδας των στρομπιλουρινών όπως τα azoxystrobin, trifloxystrobin, kresoxim-methyl, fluoxastrobin και pyraclostrobin, είναι μυκητοκτόνα μεγάλης οικονομικής σημασίας και χρησιμοποιούνται ενάντια ενός μεγάλου φάσματος ασθενειών σε ένα σημαντικό αριθμό φυτών ξενιστών (Bartlett et al., 2002). Τα επίπεδα της τοξικότητάς τους, προς τα παθογόνα *Fusarium* διαφέρουν από υψηλής έως και χαμηλής μυκητοτοξικότητας και γενικά θεωρούνται ειδο-εξαπτόμενα (Broders et al., 2007; Gullino et al., 2002; Sevastos et al., 2017).

Επειδή τα pyraclostrobin, prochloraz, fludioxonil και difenoconazole εμφανίζουν τη μεγαλύτερη *in vitro* μυκητοτοξικότητα, επιλέχθηκαν για περαιτέρω δοκιμές για άλλες πιθανές επιδράσεις στην επιβίωση του FsK. Η παραγωγή των κονιδίων παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και στη διάδοση των ειδών του μύκητα και, κατά συνέπεια, μία πιθανή αναστολή της διαδικασίας της σπορογενεσης από τα μυκητοκτόνα θα πρέπει να εξετάζεται σε πειράματα συμβατότητας. Η καλλιέργεια του στελέχους FsK σε θρεπτικό μέσο που περιέχει pyraclostrobin, prochloraz, fludioxonil ή difenoconazole, σε μη θανατηφόρες συγκεντρώσεις οι οποίες συμπίπτουν με τις αναμενόμενες τιμές της EC50, δεν είχαν καμία δυσμενή ποσοτική επίπτωση στην παραγωγή κονιδίων από τον μύκητα. Αυτός ο παράγοντας, υποδηλώνει ότι ακόμα και τα πιο τοξικά μυκητοκτόνα που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη δεν εμφάνισαν σοβαρές αντι-σποριογόνες ιδιότητες στο FsK. Αντιθέτως βρέθηκε ότι το fludioxonil ασκεί αντισποριακή δράση ενάντια στο *B. cinerea*, ενώ τα difenoconazole και pyraclostrobin εμφάνισαν υψηλή αντι-σποριακή δράση ενάντια στο *Cercospora beticola* (Anesiadis et al., 2003; Karadimos et al., 2005; Palou et al., 2007).

Μετά τον εμβολιασμό με ριζοπότισμα των φυτών τομάτας, με τα εμπορικά σκευάσματα των επιλεγμένων μυκητοκτόνων, δεν προκλήθηκε θανάτωση του FsK, όπως αποκαλύφθηκε από την επιτυχή απομόνωσή του από τους ιστούς της ρίζας. Επιπλέον δεν παρατηρήθηκε καμία δυσμενή επίπτωση στην ικανότητα αποίκισης της ρίζας του FsK σύμφωνα με την ποσοτική ανάλυση του DNA του FsK με Real Time PCR. Το DNA του FsK είχε απομονωθεί από τις ρίζες των φυτών τομάτας που είχαν δεχθεί τη επέμβαση με τα μυκητοκτόνα και συγκρίθηκε με τις ρίζες τομάτας που δεν είχαν υποστεί επέμβαση. Το γεγονός ότι τα μυκητοκτόνα όπως το prochloraz, fludioxonil και pyraclostrobin έδειξαν υψηλή προς μέτρια *in vitro* και όχι *in planta* τοξική δράση ενάντια στο FsK, επισημάνει την αναγκαιότητα να συμπεριληφθούν βιοαναλύσεις *in planta* σε πειράματα συμβατότητας. Έχουν καταγραφεί διαφορετικές αντιδράσεις του *F. oxysporum* στέλεχος CS-20 στο azoxystrobin και στο chlorothalonil σε *in vitro* και θερμοκηπιακές δοκιμές από τον Fravel και τους συνεργάτες του το 2003 και συσχετίστηκαν με έναν χωρικό και χρονικό διαχωρισμό μεταξύ του βιολογικού παράγοντα και των μυκητοκτόνων. Τα μυκητοκτόνα, fludioxonil και

pyraclostrobin έχουν περιορισμένη ή καθόλου συστηματική δράση, μία ικανότητα που πιθανώς ευθύνεται για την ανικανότητά τους να αναστείλουν την ανάπτυξη/αποίκιση του FsK in planta. Αντιθέτως, τα prochloraz και difenoconazole είναι συστηματικά μυκητοκτόνα με την ικανότητα να εισέρχονται τον ριζικό ιστό και να μετακινούνται διαμέσου του ξυλώματος του φυτού. Σε αυτήν την περίπτωση, η αποτελεσματικότητα του FsK να αποικίζει εύκολα το φλοιόωμα της ρίζας πριν από την εφαρμογή της επέμβασης με τα μυκητοκτόνα, ίσως να προστατεύει τον μύκητα από την τοξική δράση αυτών των μυκητοκτόνων, μειώνοντας το χρόνο και την ποσότητα της δραστικής ουσίας που έρχεται σε επαφή με τις μυκηλιακές υφές, πριν την ταχύτατη ανοδική μεταφορά του μέσω του ξυλώματος.

Οι θερμοκηπιακές δοκιμές στα φυτά τομάτας, διεξήχθησαν για να εξετασθεί το ερώτημα, κατά πόσο τα επιλεγμένα μυκητοκτόνα μπορούν να επηρεάσουν τις κατασταλτικές ιδιότητες του FsK ενάντια στην ασθένεια που προκαλεί ο εδαφογόνος μύκητας FORL. Το FsK διατηρεί την προστατευτική του δράση – μία ικανότητα που αποδείχθηκε πρόσφατα – ενάντια στο FORL με παρουσία και απουσία των μυκητοκτόνων Switch και Comet στο χώμα της γλάστρας (Kavroulakis et al., 2007). Τα Neotopsin και Octave στις συνιστώμενες δόσεις αναστέλλουν πλήρως τα συμπτώματα της ασθένειας που προκαλεί το *Fusarium* στα φυτά τομάτας που έχουν ή όχι δεχθεί επέμβαση με FsK και έτσι, κάθε καταστολή της ασθένειας που ασκείται από τον βιολογικό παράγοντα συσχετίζεται με την υψηλή αποδοτικότητα των μυκητοκτόνων in planta. Στην περίπτωση του Comet, το οποίο είναι ένα μυκητοκτόνο που περιέχει ως δραστική ουσία pyraclostrobin, παρατηρείται μία επιπλέον συνεργιστική δράση στην καταστολή των συμπτωμάτων της ασθένειας, όταν εφαρμόστηκε στα φυτά που είχαν δεχθεί τη επέμβαση με το FsK. Η μείωση των δόσεων των μυκητοκτόνων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των παθογόνων των φυτών, αποτελεί μία κυρίαρχη παγκόσμια τάση κυρίως λόγω των περιβαλλοντικών προβλημάτων. Μία αποτελεσματική μέθοδος που χρησιμοποιείται σε αυτήν την κατεύθυνση είναι ο συνδυασμός του βιολογικού παράγοντα με μυκητοκτόνα, αλλά σε μικρότερες ποσότητες. Έχουν δημοσιευθεί αρκετές μελέτες επιτυχημένων συνδυασμών που οδηγούν σε πρόσθετες ή συνεργιστικές δράσεις και συγκρίθηκαν με την αποκλειστική χρήση μεγάλων ποσοτήτων μυκητοκτόνων (Elshahawy et al 2016; Lima et al., 2008; McGovern, 2015; Shah et al., 2018). Μία εφαρμογή του *Bacillus subtilis* σε συνδυασμό με το hymexazol είχε σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερη αντιμετώπιση της αδροφουζαρίωσης σε σύγκριση με άλλες μεμονωμένες θεραπείες (Myresiotis et al, 2012). Τα μυκητοκτόνα pyraclostrobin, azoxystrobin και trifloxystrobin σε συνδυασμό με την εφαρμογή με τον *B. subtilis* H158, παρουσίασε συνεργιστική δράση ενάντια στη μάρανση του κολεού στο ρύζι (Liu, et al., 2018). Ένα πείραμα που διεξήχθη από τον Lal και τους συνεργάτες του το 2017, και περιελάμβανε σπορόφυτα τα οποία είχαν βυθιστεί σε οξυχλωριούχο χαλκό μεταφυτεύτηκαν σε ένα είδος κοπριάς- neem cake- αποικίστηκαν από το *Trichoderma harzianum* και είχε ως αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση του μαρασμού της μελιτζάνας, σε συνδυασμό με έναν αριθμό μυκητοκτόνων ή βιολογικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν χωριστά. Παρομοίως, ο συνδυασμός με ένα procymidone- *C. minitans* ήταν πιο αποτελεσματική στην καταστολή της ασθένειας-λευκής σήψης στα φασόλια από τις εκάστοτε θεραπείες (Elsheshatawi et al., 2017).

Η προσθήκη του Switch δεν αύξησε δραματικά τις κατασταλτικές ιδιότητες του FsK, αν και οι δύο θεραπείες είχαν ως αποτέλεσμα τη σημαντική καταστολή των επιπέδων της ασθένειας, όταν εφαρμόστηκαν μεμονωμένα. Μία πιθανή εξήγηση για την έλλειψη της οποιαδήποτε πρόσθετης ή συνεργιστικής δράσης θα μπορούσε να οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, από το Switch, το οποίο επιδρά στην ικανότητα του FsK να επάγει τους μηχανισμούς άμυνας του φυτού, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η καταστολή για να εξισορροπηθεί με την μυκητοτοξική δράση του Switch που ασκεί προς το FORL. Πράγματι, το Switch περιέχει fludioxonil, μία δραστική ουσία με βιολογική δράση, που παρεμβαίνει στην σωστή λειτουργία της ώσμωσης και είναι στενά συγγενικό με την επαγωγή

μονοπατιών stress (Malandrakis et al. 2013). Παρομοίως, η διασυστηματική επαγωγή της άμυνας του φυτού από το FsK έχει συσχετιστεί από τον Καβρουλάκη και τους συνεργάτες του το 2007 με τα μονοπάτια απόκρισης του αιθυλενίου, τα οποία συσχετίζονται επίσης με τα μονοπάτια απόκρισης του stress (Klay et al., 2018). Σε κάθε περίπτωση, το συνολικό αποτέλεσμα του συνδυασμού του Switch με το FsK, δεν διακινδυνεύει την καταστολή της ασθένειας του FORL και συνεπώς ο συνδυασμός θεωρείται αποδεκτός.

Καταλήγοντας, βρέθηκε ότι ο *F. solani* βιολογικός παράγοντας FsK, δεν ήταν ευαίσθητος στα μυκητοκτόνα thiophanate-methyl, fenhexamid, cyprodinil, boscalid και mancozeb, όταν εφαρμόστηκαν in vitro. Τα υπόλοιπα μυκητοκτόνα που δοκιμάστηκαν (fludioxonil, procloraz, pyraclostrobin, difenoconazole), αν και ήταν μυκητοτοξικά, δεν επηρέασαν αρνητικά την επιβίωση, την αποίκιση ή τις κατασταλτικές ιδιότητες του στελέχους FsK, ενάντια στην ασθένεια του FORL, όταν εφαρμόστηκε σε πειράματα θερμοκηπίου με ριζοπότισμα του χώματος με αυτά, και έτσι είναι συμβατά με το FsK για τη χρήση τους σε ολοκληρωμένα προγράμματα διαχείρισης ασθενειών. Επιπλέον, η πιθανή συνεργιστική δράση μεταξύ του Comet και του FsK θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση της χρήσης ή/και της ενίσχυσης της καταπολέμησης της ασθένειας της αδροφουζαρίωσης και σήψης της ρίζας και του λαιμού στην τομάτα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ackrell, B., Johnson, M., Gunsalus, R., & Ceccini, G. (1992). Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes. *CRC Press* (III), 229-297.
- Alabouvette, C., Olivain, C., & Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases: The European situation. *European Journal of Plant Pathology* (114), σσ. 329-341.
- Alexopoulos, C., Mims, C., & Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology*. New York: 4th edn. Wiley.
- Alga Zuccaro, U. L.-H. (2011). Endophytic Life Strategies Decoded by Genome and Transcriptome Analyses of the Mutualistic Root Symbiont *Piriformospora indica*. *PLoS Pathogens* (7).
- Amini, J., & Sidovich, D. (2010). The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with fusarium wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research* (50), σσ. 172-178.
- Ammermann, E., Stierl, R., Hanke, W., Scherer, M., Ypema, H., & Berdinelli, T. (2002). Nicobifen* – The foundation of a new fungicide family. *Phytopathology* (92).
- Anesiadis, T., Karaoglanidis, G., & Tzavella-Klona, K. (2003). Protective, curative and eradicator activity of the strobilurin fungicide azoxystrobin against *Cercospora beticola* and *Erysiphe betae*. *J. Phytopathol.* (151), σσ. 647-651.
- Anke, T., Oberwinkler, F., Steglich, W., & Schramm, G. (1977). The strobilurins: new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. *Antibiot* (10), σσ. 806-810.
- Arima, K., Imanaka, H., Kousaka, M., Fukuda, A., & Tamura, G. (1964). Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance produced by *Pseudomonas*. *Agricultural and Biological Chemistry* (28), σ. 575.
- Baker, R. (1968). Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Phytopathology* (6), σσ. 263-294.
- Barlett, D., Clough, J., Godwin, J., Hall, A., Hamer, M., & Parr-Dobrzanski. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* (58), σσ. 649-662.
- Bishop, C., & Cooper, R. (1983). An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiological Plant Pathology* (22), σσ. 15-27.
- Brandt, U. (1996). Bifurcated ubiquinol oxidation in the cytochrome bc₁ complex by proton-gated charge transfer. *FEBS Letter* (387), σσ. 1-6.
- Broders, K., Lipps, P., Paul, P., & Dorrance, A. (2007). Evaluation of *Fusarium graminearum* associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. *Plant Disease* (91), σσ. 1155-1160.
- Bruehl, G. (1987). *Soilborne plant pathogens*. Macmillan, NY.
- Charest, P., Quéllet, G., & Pauzé, F. (1984). Cytological observations of early infection process by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants. *Canadian Journal of Botany* (62), σσ. 1232-1244.

- Coleman, J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Mol. Plant Pathol.* (17), σσ. 146-158.
- Coleman, J., Rounsley, S., Rodriguez-Carres, M., Kuo, A., Wasmann, C., Grimwood, J., και συν. (2009). The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. *PLoS Genet* (5).
- Cook, J. R., & Baker, R. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. *American Phytopathology Society St. Paul* , 539.
- Correll, J., & Jones, J. (2014). Fusarium wilt. Στο J. Jones, T. Zitter, T. Momol, & S. Miller, *Compendium of Tomato Disease and Pests* (2 εκδ.). 3340 pilot knolo Road, St, Poul, Minnesota, USA: APS.
- Crofts, A., & Berry, E. (1998). Structure and function of the cytochrome bc l complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. *Current Opinion in Structural Biology* (8), σσ. 501-509.
- Daami-Remadi, M., & Mahjoub, M. (2006). Presence in Tunisia of *Fusarium* isolates *sambucinum* resistant to benzimidazoles: in vitro development and aggressiveness on potato tubers. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* (10), σσ. 7-16.
- de Figueirêdo, L., Daam, M., Mainardi, G., Mariën, J., Espíndola, E., van Gestel, C., και συν. (2019). The use of gene expression to unravel the single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole on survival and reproduction of the springtail *Folsomia candida*. *Environmental Pollution* (244), σσ. 342-350.
- de Weger, L. A., van der Vlugt, C. M., Wijfjes, A., Bakker, P., Schippers, B., & Lugtenberg, B. (1987). Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol* (169), σσ. 2769-2773.
- Desbarats-Schöbaum, M. L., Endrenyi, L., Koves, E., Schönbaum, E., & Sellers, E. (1972). On the action and kinetics of propylthiouracil. *European Journal of Pharmacology* (19), σσ. 104-111.
- Deshmukh, S., Hückelhoven, R., Schäfer, P., Imani, J., Sharma, M., Weiss, M., και συν. (2006). The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *PNAS* (103), σσ. 18450-18457.
- Di Pietro, A., Lorito, M., Hayes, C., Broadway, R., & Harman, G. (1993). Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology* (83), σσ. 308-313.
- Ding, H., Moser, C., Robertson, D., Tokito, M., Daldal, F., & Dutton, P. (1995). Ubiquinone Pair in the Q0 Site Central to the Primary Energy Conversion Reactions of Cytochrome bc1 Complex. *Biochemistry* (34), σσ. 15979-15996.
- Elad, Y., Zimand, G., Zaqs, Y., Zuriel, S., & Chet, I. (1993). Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathol.* (42), σσ. 324-332.

Elshahawy, I., Haggag, K., & Abd-El-Khaira, H. (2016). Compatibility of *Trichoderma* spp. with seven chemical fungicides used in the control of soil borne plant pathogens. *Res. J. Pharm. Biol.Chem. Sci.* (7), σσ. 1772-1785.

Elsheshtawi, M., Maged, T., Shaban, R., Ali, H., Arif, A., Dikshit, G., και συν. (2017). Integrated control of white rot disease on beans caused by *Sclerotinia sclerotiorum* using Contans® and reduced fungicides application. *Saudi J. Biol. Sci.* (24), σσ. 405-409.

Fesel, P., & Zuccaro, A. (2016). Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Microbiology* (32), σσ. 103-112.

FRAC- Fungicide Resistance Action Committee. (n.d.). Ανάκτηση από <https://www.frac.info/working-group/ap-fungicides/introduction-and-general-information>

Fravel, D., Olivain, C., & Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytol.* (157), σσ. 493-502.

Fritz, R., Lanen, C., Colas, V., & Leroux, P. (1997). Inhibition of methionine biosynthesis in *Botrytis cinerea* by the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. *Pesticide Science* (49), σσ. 40-46.

Gachango, E., Hanson, L., Rojas, A., Hao, J., & Kirk, W. (2012). *Fusarium* spp. causing dry rot of seed potato tubers in Michigan and their sensitivity to fungicides. *Plant Disease* (96), σσ. 1767-1774.

Garantonakis, N., Pappas, M., Varikou, K., Skiada, V., Broufas, G., Kavroulakis, N., και συν. (2018). Tomato inoculation with the endophytic strain *Fusarium solani* K results in reduced feeding damage by the zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis*. *Front. Ecol. Evol.* (6).

Gehman, K., Nyfeler, R., Leadbeater, A., Nevill, D., & Sozzi, D. (1990). CGA 173506: a new phenylpyrrole fungicide for broad-spectrum disease control. *Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases* (2), σσ. 399-406.

GN, A. (2005). *Plant pathology*. New York: 5th edn. Elsevier.

Gullino, M., Minuto, A., Gilard, G., & Garibaldi, A. (2002). Efficacy of azoxystrobin and other strobilurins against *Fusarium* wilts of carnation, cyclamen and Paris daisy. *Crop Protect.* (21), σσ. 57-61.

Gullino, M., Tinivella, F., Garibaldi, A., & Sheppard, B. (2010). Mancozeb: Past, Present, and Future. *Plant Disease* 94 (9), σσ. 1076-1087.

Hägerhäll, C. (1997, June 13). Succinate: quinone oxidoreductases: Variations on a conserved theme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (1320), σσ. 107-141.

Hägerhäll, C., & Hederstedt, L. (1996, June 24). A structural moDAL for the membrane-integral domain of succinate:quinone oxidoreductases. *FEBS Letters* (389), σσ. 25-31.

Hamada, M., Yin, Y., & Ma, Z. (2011). Sensitivity to iprodione, difenoconazole and fludioxonil of *Rhizoctonia cerealis* isolates collected from wheat in China. *Crop Protection* (30), σσ. 1028-1033.

Handlman, J., & Stabb, E. (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* (8), σσ. 1855-1869.

- Heye, U., Speich, J., Siegle, H., Steinemann, A., Forster, B., & Knauf-Beiter, G. (1994). CGA 219417: a novel broad-spectrum fungicide. *Crop Protection* (13), σσ. 541-549.
- Imanaka, H., Kousaka, M., Tamura, G., & Arima, K. (1965). Studies on pyrrolnitrin, a new antibiotic. II. Taxonomic studies on pyrrolnitrin-producing strain. *Journal of Antibiotics* (18), σσ. 205-206.
- J.R. Godwin, V. A. (1992). ICIA5504: a novel, broad spectrum, systemic beta-methoxyacrylate fungicide. *Crop. Prot. Conf.: Pests and Diseases, BCPC* , σσ. 435-442.
- Jacobs, S., Zechmann, B., Molitor, A., Trujillo, M., & Petutschnig, E. (2011). Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of Arabidopsis roots by the fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiology* (156), σσ. 726-740.
- Jarvis, W. (1988). Fusarium crown and root rot of tomatoes. *Phytoprotection* (69), σσ. 49-64.
- Jendoubi, W., Bouhadida, M., Boukteb, A., Béji, M., & Kharrat, M. (2017). Fusarium Wilt Affecting Chickpea Crop. *Agriculture* (7).
- Jesper, A. B., & De Waard, M. (1995). Effect of fenpiclonil on phosphorylation of glucose in *Fusarium sulphureum*. *Pesticide Science* (44), σσ. 167-175.
- Jordan, D. L.-S. (1999). Mode of action of famoxadone. *Pesticide Science* (55), σσ. 105-118.
- Josheph-Horne, T., Hollomon, D., & Wood, P. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics* (1504), σσ. 179-195.
- Kang, S., Demers, J., del Mar Jimenez-Gasco, M., & Rep, M. (2014). *Fusarium oxysporum*. Στο *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens* (σσ. 99-119). Springer.
- Karadimos, D., Karaoglanidis, G., & Tzavella-Klonari, K. (2005). Biological activity and physical modes of action of the Qo inhibitor fungicides trifloxystrobin and pyraclostrobin against *Cercospora beticola*. *Crop Protect.* (24), σσ. 23-29.
- Kavroulakis, N., Doupis, G., Papadakis, I., & Papadopoulou, K. (2018). Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rezosphere* (6), σσ. 77-85.
- Kavroulakis, N., Ntougias, S., Zervakis, G., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., & Papadopoulou, K. (2007). Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *Journal of Experimental Botany* (58), σσ. 3853-3864.
- Keon, J., White, G., & Hargreaves, J. (n.d.). Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Current Genetics* (19), σσ. 475-481.
- Klay, I., Gouia, S., Liu, M., Mila, I., Khoudi, H., Bernadac, A., και συν. (2018). Ethylene Response Factors (ERF) are differentially regulated by different abiotic stress types in tomato plants. *Plant Sci.* (274), σσ. 137-145.
- Koch, E., & Leadbeater, A. (1992). Phenylpyrroles: a new class of fungicides for seed treatment. *Brighton Crop Protection Conference, Pest and Diseases* (3), σσ. 1137-1146.

- Koehle H, G. K. (2002). Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III* .
- Köehle, H., Grossmann, K., Jabs, T., Gerhard, M., Kaiser, W., Glaab, J., και συν. (2003). Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. *Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng., Ponta Grossa* (9), σσ. 59-68.
- Kuc, J. (1995). Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants. *Annu Rev Phytopathol* (33), σσ. 275-279.
- Lahrmann, U., Ding, Y., Banhara, A., Rath, M., Hajirezaei, M., Döhlemann, S., και συν. (2013). Host-related metabolic cues affect colonization strategies of a root endophyte. *PNAS* (34), σσ. 13965-13970.
- Lal, H., Mohan, R., Kumar, P., Ekka, S., & Kumar, N. (2017). Management of wilt complex in brinjal using chemical, biocontrol agent and soil amendment alone and in combinations. *Indian Phytopathol.* (70), σσ. 220-223.
- Lemos, R., Fernandes, A., Pereira, M., Gomes, C., & Teixeira, M. (2002). Quinol:fumarate oxidoreductases and succinate:quinone oxidoreductases: phylogenetic relationships, metal centres and membrane attachment. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* (1553), σσ. 158-170.
- Leroux, P., Lanen, C., & Fritz, R. (1992). Similarities in the antifungal activities of fenpiclonil, iprodione and tolclofos-methyl against *Botrytis cinerea* and *Fusarium nivale*. *Pesticid Science* (37), σσ. 225-261.
- Lewis, J., Lumsden, R., & Locke, J. (1996). Biological control of damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* with various food bases. *Biol. Sci. Technol.* (6), σσ. 163-173.
- Lima, G., De Curtis, F., & De Cicco, V. (2008). Interaction of microbial biocontrol agents and fungicides in the control of postharvest diseases. *Steward Postharvest Review* (4), σσ. 1-7.
- Liu, L., Liang, M., Li, L., Sun, L., Xu, Y., Gao, J., και συν. (2018). Synergistic effects of the combined application of *Bacillus subtilis* H158 and strobilurins for rice sheath blight control. *Biol. Control* (117), σσ. 182-187.
- Lorito, M., Harman, G., Hayes, C., Broadway, R., Tronsmo, A., Woo, S., και συν. (1993a). Chitinolytic enzymes produced by *Ficoiderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* (83), σσ. 302-307.
- Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C., & Harman, G. (1994). Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology* (140), σσ. 623-629.
- Lyr, H. (1995). Modern Selective Fungicides. Στο G. Fischer.
- Maeno, S., Miura, I., Masuda, K., & Nagata, T. (1990). Mepanipyrim (KIF-3535), a new pyrimidine fungicide. Στο *Brighton Crop Protection Conference* (σσ. 415-422).

- Malandrakis, A., Vattis, K., Doukas, E., & Markoglou, A. (2013). Effect of phenylpyrrole-resistance on fitness parameters and ochratoxin production in *Aspergillus carbonarius*. *Int. J. Food Microb.* (165), σσ. 287-294.
- Masner, P., Muster, P., & Schmid, J. (1994). Possible methionine biosynthesis inhibition by pyrimidinamine fungicides. *Pesticide Science* (42), σσ. 163-166.
- Mattson, M., & Hederstedt, L. (2001). The carboxin-binding site on *Paracoccus denitrificans* succinate:quinone reductase identified by mutations. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (33), σσ. 99-105.
- McGovern, R. (2015). Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection* (73), σσ. 78-92.
- Mijatović, M., Obradović, A., & Ivanović, M. (2007). *Zaštita povrća*. . Smederevska Palanka: AgroMivas.
- Milling, R. J., & Richardson, C. J. (1995). Mode of action of the anilino-pyrimidine fungicide pyrimethanil. 2. Effects on enzyme secretion in *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science* (45), σσ. 43-48.
- Mitchell, P. (1976). Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *Journal of Theoretical Biology* (62), σσ. 327-367.
- Miura, I., Kamakura, T., Maeno, S., Hayashi, S., & Yamaguchi, I. (1994). Inhibition of enzyme secretion in plant pathogens by mepanipyrim, a novel fungicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology* (48), σσ. 222-228.
- Moore, A., & Siedow, J. (1991). The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* (1059), σσ. 121-140.
- Moore, D., Robson, G. D., & Trinci, A. (2019). 14.10 Necrotrophic and biotrophic pathogens of plants. Στο *21st Century Guidebook to Fungi* (2 εκδ.).
- Myresiotis, C., Karaoglanidis, G., Vryzas, Z., & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2012). Evaluation of plant-growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl and hymexazol for integrated control of *Fusarium* crown and root rot on tomato. *Pest Manag. Sci.* (68), σσ. 404-411.
- Nan, Z., Long, P., & Skipp, R. (1992). Use of prochloraz and benomyl drenches to assess the effects of fungal root pathogens on growth of red clover under field. *Australas. Plant Pathol.* (21), σσ. 98-103.
- Neilands, J. (1981). Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem* (50), σσ. 715-731.
- Neillands, J., & Nakamura, K. (1991). Detection, determination, isolation, characterization and regulation of microbial iron chelates. *CRC Press Handbook of Microbial Iron Chelates* , 1-14.
- Nelson, D., & Cox, M. (2008). Principles of Bioenergetics. Στο *Lehninger- Principles of Biochemistry* (4 εκδ., σσ. 490-518). New York: W.H. Freeman and Company.
- Nelson, P. (1981). Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Wilt Diseases of Plants* , 51-80.

- Neumann, G., Winter, E., & Pittis, G. (1992). Pyrimethanil: A new fungicide. Στο *Brighton Crop Protection Conference — Pests and Diseases* (1 εκδ., σσ. 395-402).
- O' Reilly, P., Kobayashi, S., Yamane, S., Phillips, W., Raymond, P., & Castanho, B. (1992). MON 24000: a novel fungicide with broad-spectrum disease control. *Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases*, 1, σσ. 427-434.
- Palou, L., Crisosto, C., & Garner, D. (2007). Combination of postharvest antifungal chemical treatments and controlled atmosphere storage to control gray mold and improve storability of 'Wonderful' pomegranates. *Postharvest Biol. Technol.* (43), σσ. 133-142.
- Pantelides, I., Tjamos, S., Striglis, I., Chatzipavlidis, I., & Paplomatas, E. (2009). Mode of action of a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain against *Verticillium dahliae* using Real Time QPCR analysis and biomarker transformation. *Biological Control* (50), σσ. 30-36.
- Pappa, M., Liapoura, M., Papantoniou, D., Avramidou, M., Kavroulakis, N., Weinhold, A., και συν. (2018). The Beneficial Endophytic Fungus *Fusarium solani* Strain K Alters Tomato Responses Against Spider Mites to the Benefit of the Plant. *Front. Plant Sci.* (9).
- Parke, J. (1991). Root colonization by indigenous and introduced. Στο D. Keister, & P. Cregan, *The Rhizosphere and Plant Growth* (σσ. 33-42). Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Perez-Hernandez, A., Porcel-Rodríguez, E., & Gomez-Vazquez, J. (2017). Survival of *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* and fungicide application, soil solarization, and biosolarization for control of crown and foot rot of Zucchini Squash. *Plant Disease* (101), σσ. 1507-1514.
- Peškan-Berghöfer, T., Shahollari, B., Giong, P., Hehl, S., Markert, C., Blanke, V., και συν. (2004). *Physiologia Plantarum* (122), σσ. 465-477.
- Pillonel, C., & Meyer, T. (1997). Effect of Phenylpyrroles on Glycerol Accumulation and Protein Kinase Activity of *Neurospora crassa*. *Pesticide Management* (49), σσ. 229-236.
- Qiang, X., Zechmann, B., Reitz, M., Kogel, K., & Schäfer, P. (2012). The mutualistic fungus *Piriformospora indica* colonizes *Arabidopsis* roots by inducing an endoplasmic reticulum stress-triggered caspase-dependent cell death. *Plant Cell* (24), σσ. 794-809.
- Raaijmakers, J., Paulitz, T., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moënné-Loccoz, Y. (2008). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* (321), σσ. 341-361.
- Ramusi, T., van der Waals, J., Labuschagne, N., & Aveling, T. (2017). Evaluation of mefenoxam and fludioxonil for control of *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* and *Fusarium solani* on cowpea. *S. Afr. J. Plant Soil* (34), σσ. 27-33.
- Rodrigues, R., White, J., Arnold, A., & Redman, R. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* (182), σσ. 314-330.
- Rodriguez, R., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., και συν. (2008). Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *International Society of Microbial Ecology* (2), σσ. 404-416.

- Sauter, H., Steglich, W., & Anke, T. (1999). Strobilurins: Evolution of a new class of active substances. *Angewandte Chemie International Edition* (38), σσ. 1328-1349.
- Sevastos, A., Markoglou, A., Labrou, N., Flouri, F., & Malandrakis, A. (2017). Molecular characterization, fitness and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* laboratory strains resistant to benzimidazoles. *Pestic. Biochem. Physiol.* (128), σσ. 1-9.
- Shah, M.-U.-D., Ahmad, M., Sagar, V., Padder, B., Ahanger, F., Sofi, T., και συν. (2018). In vitro evaluation of bioagents and fungitoxicants against *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* causing corm rot of saffron (*Crocus sativus*) in Kashmir, India. *Acta Horti* (1200), σσ. 124-131.
- Shenoy, S., Yu, L., & Yu, C.-A. (1997). The smallest membrane anchoring subunit (QPs3) of bovine heart mitochondrial succinate-ubiquinone reductase: Cloning, sequencing, topology, and Q-binding domain. *Journal of Biological Chemistry* (272), σσ. 17867-17872.
- Shweta, S., Zuehlke, S., Ramesha, B., Priti, V., Mohana Kumar, P., Ravikanth, G., και συν. (2010). Endophytic fungal strains of *Fusarium solani* from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochemistry* (71), σσ. 117-122.
- Siedow, J., & Bickett, D. (1981). Structural Features Required for Inhibition of Cyanide-insensitive Electron Transfer by Propyl Gallate. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* (207), σσ. 32-39.
- Siedow, J., & Umbach, A. (1995). Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell* (7), σσ. 821-831.
- Smith, J. (1998). Secret lif of cytochrome bc1. *Science* (281), σσ. 58-59.
- Stammler, G., & Speakman, J. (2006). Microtiter Method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to boscalid. *Journal of Phytopathology* (154), σσ. 508-510.
- Stammler, G., Benzinger, G., & Speakman, J. (2007). A rapid and reliable method for monitoring the sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to boscalid. *Journal of Phytopathology* (155), σσ. 746-748.
- Stone, J., Polishook, J., & White, J. (2004). Endophytic fungi. Στο G. e. Mueller, *Biodiversity of Fung: Inventory and Monitoring Methods* (σσ. 241-270). New York, USA: Elsevier Academic Press.
- Sun, F., Huo, X., Zhai, A., Wang, A., Xu, J., Su, D., και συν. (2005, July 1). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* (121), σσ. 1043-1057.
- Tjamos, E. (n.d.). Ανάκτηση από http://efe.aua.gr/gallery_fungal.php
- Tomlin, C. (2004-05). Mancozeb (8018-01-7). British Crop Protection Council. Στο B. C. Council (Επιμ.), *The e-Pesticide Manual* (13 εκδ.). British, Surrey UK.
- Trumpower, B. (1990). Cytochrome bc1 complexes of microorganisms. *Microbiological Reviews* (54), σσ. 101-129.

- Uesugi, Y. (1998). Fungicide classes: chemistry, uses and mode of action. Στο *Fungicide Activity: Chemical and Biological Approaches to Plant Protection* (σσ. 23-56). New York, USA: David H. Hutson, Junshi Miyamoto.
- Van Loon, L., Bakker, P., & Pieterse, C. (1998). Systemic resistance induced by rizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 36, σσ. 453-483.
- Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Butehorn, B., & Franken, P. (1999). Piriformospora indica, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (65), σσ. 2741-2744.
- Von Jagow, G., & Link, T. (1986). Use of specific inhibitors on the mitochondrial bc1 complex. *Methods Enzymol* (126), σσ. 253-271.
- Weber W., A. T. (1990b). Antibiotics from basidiomycetes. XXXIV . Strobilurin D and strobilurin F: Two new cytostatic and antifungal (E)-β-methoxyacrylate antibiotics from Cyphellopsis anomala. *Sing. Planta Med.* (56), σσ. 446-450.
- Weber, W., Anke, T., Steffan, B., & Steglich, W. (1990a). Antibiotics from basidiomycetes. X X X II. Strobilurin E: a new cytostatic and antifungal (E)-β-methoxyacrylate antibiotic from Crepidotus fulvotomentosus Peck. *Antibiotics* (43), σσ. 207-212.
- Weller, D. M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Rev Phytopathol* (26), σσ. 379-407.
- Weller, D. M. (1983). Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology* (73), σσ. 1548-1553.
- White, T., Marr, K., & Bowden, R. (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology* (11), σσ. 382-402.
- Wikipedia. (n.d.). Ανάκτηση από https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Complex_III.png
- Wikipedia Free Encyclopedia. (n.d.). Ανάκτηση από [en.wikipedia.org/Succubate_dehydrogenase](https://en.wikipedia.org/wiki/Succubate_dehydrogenase): https://en.wikipedia.org/wiki/Succinate_dehydrogenase#/media/File:SuccDeh.svg
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Tornroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Leger, C., και συν. (2003). Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, 299, σσ. 700-704.
- Zhang, N., Donnell, K., Sutton, D., Nalim, F., Summerbell, R., Padhye, A., και συν. (2006). Members of the Fusarium solani Species Complex That Cause Infections in Both Humans and Plants Are Common in the Environment. *J. Clin. Microbiol.* (44), σσ. 2186-2190.
- Ziogas, B., & Kalamarakis, A. (2001). Phenylpyrrole Fungicides: Mitotic Instability in Aspergillus nidulans and Resistance in Botrytis cinerea. *Journal of Phytopathology* (149), σσ. 301-308.
- Δημητράκης, Κ. (1988). *Λαχανοκομεία*. ΑγρόΤυπος ΑΕ.
- Ζιώγας, Β., & Μαρκόγλου, Α. (2010). Μυκητοκτόνα-Βακτηριοκτόνα. Στο *Γεωργική Φαρμακολογία* (σσ. 109-247).

Υπουργίο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. (n.d.). Ανάκτηση από minagric.gr:
http://www.minagric.gr/syspest/syspest_crops.aspx