

Τ.Ε.Ι. ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ  
ΚΑΙ  
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ  
*ALTERNARIA SOLANI*  
ΣΤΗΝ ΤΟΜΑΤΑ ΚΑΙ  
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ**

ΔΑΡΡΑΣ Ι. ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 1999

Τ.Ε.Ι. ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ  
ΚΑΙ  
ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ  
*ALTERNARIA SOLANI*  
ΣΤΗΝ ΤΟΜΑΤΑ ΚΑΙ  
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ**

ΔΑΡΡΑΣ Ι. ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 1999

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
<b>Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΣΤΗ ΧΩΡΑ ΜΑΣ.....</b>	<b>6</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. ΞΕΝΙΣΤΗΣ.....</b>	<b>8</b>
1.1.1. Ιστορικό .....	8
1.1.2. Κλιματολογικές-εδαφολογικές απαιτήσεις .....	8
<b>1.2. ΠΑΘΟΓΟΝΟ.....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Ταξινόμηση .....	9
1.2.2. Μορφολογία .....	9
1.2.3. Βλάστηση κονιδίων-Μόλυνση .....	11
1.2.4. Παραγωγή κονιδίων .....	12
1.2.5. Διασπορά κονιδίων .....	14
1.2.6. Διαχείμανση του μύκητα .....	15
1.2.7. Τοξίνες και ο ρόλος τους.....	17
1.2.8. Κύκλος ξενιστών .....	18
<b>1.3. ΑΣΘΕΝΕΙΑ.....</b>	<b>19</b>
1.3.1. Συμπτωματολογία .....	19
1.3.2. Συνθήκες που ευνοούν την εμφάνιση της ασθένειας .....	24
1.3.3. Αντιμετώπιση .....	28
α) Καλλιεργητικά μέτρα .....	28
β) Βιολογικά μέτρα .....	31
γ) Χημικά μέτρα.....	31
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>36</b>
2.1. Θρεπτικά υλικά ανάπτυξης .....	36
2.2. Υπόστρωμα ανάπτυξης φυτών .....	36
2.3. Ανάπτυξη φυτών .....	37
2.4. Απομονώσεις του μύκητα .....	38
2.5. Διατήρηση των απομονώσεων .....	38

2.6. Παραγωγή μολύσματος.....	40
2.7. Μόλυνση φυτών.....	41
2.8. Στατιστική ανάλυση.....	43
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΓΡΑΜΜΙΚΗ ΑΥΞΗΣΗ ΜΥΚΗΛΙΟΥ ΚΑΙ <i>IN VITRO</i></b>	
<b>ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΟΝΙΔΙΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ</b>	
<b>ΜΥΚΗΤΑ <i>A. SOLANI</i></b> .....	<b>44</b>
3.1. Σκοπός.....	44
3.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	44
3.3. Αποτελέσματα.....	46
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΔΟΚΙΜΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ</b>	
<b>ΜΥΚΗΤΑ <i>A. SOLANI</i></b> .....	<b>50</b>
4.1. Σκοπός.....	50
4.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	50
4.3. Αποτελέσματα.....	51
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ</b>	
<b><i>IN VITRO</i></b> .....	<b>59</b>
5.1. Σκοπός.....	59
5.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	59
5.3. Αποτελέσματα.....	62
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ</b>	
<b><i>IN VIVO</i></b> .....	<b>77</b>
6.1. Σκοπός.....	77
6.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	77
6.3. Αποτελέσματα.....	79
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>90</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>96</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....</b>	<b>105</b>

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο πρώιμος περονόσπορος (early blight) της τομάτας, που προκαλείται από το μύκητα *Alternaria solani* (Ell. et Mart.) Sorauer, είναι μια ασθένεια με μεγάλη γεωγραφική εξάπλωση. Παρόλο που στη χώρα μας δεν δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην ασθένεια, σε πολλές άλλες χώρες έχουν αναφερθεί ολοκληρωτικές απώλειες καλλιεργειών τομάτας ή σημαντικές μειώσεις παραγωγής καρπών με μεγάλες οικονομικές ζημιές για τους παραγωγούς. Έχει αναφερθεί ότι ο μύκητας *A. solani* προκαλεί σοβαρές ζημιές στο Ισραήλ, τις Η.Π.Α., την Ινδία, την Αυστραλία και την Αγγλία (Jones *et al.*, 1993) (Εικ.1). Στις Ηνωμένες Πολιτείες η ασθένεια προκαλεί σοβαρές ζημιές στην περιοχή της Νέας Αγγλίας, καθώς και σε περιοχές των Νοτιοανατολικών και Κεντρικών Πολιτειών (Jones *et al.*, 1993). Η ασθένεια έχει καταγραφεί σε όλες σχεδόν τις χώρες του κόσμου που καλλιεργούνται είδη της οικογένειας Solanaceae και μάλιστα σε χώρες που χαρακτηρίζονται από διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες, γεγονός που δείχνει τη μεγάλη προσαρμοστικότητα του παθογόνου σε ποικίλους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Rotem, 1994).

Σύμφωνα με τον Rotem (1994), οι απώλειες παραγωγής στην τομάτα επηρεάζονται άλλοτε έμμεσα και άλλοτε άμεσα από την ασθένεια' έμμεσα από τη μερική ή ολική καταστροφή του φυλλώματος, η οποία συνεπάγεται τη μείωση της φωτοσύνθεσης και άμεσα από την προσβολή ανθέων, καρπών ή σπόρων.



**Εικόνα 1.** Γεωγραφική εξάπλωση του μύκητα *A. solani* (Ell. & Mart.) Sorauner.  
(CMI Distribution Maps of Plant Diseases, Map No 89, Edition 5, 1983).

Ο συνδυασμός έμμεσης και άμεσης προσβολής δίνει στο μύκητα *A. solani* την ιδιότητα να προκαλεί μεγάλες απώλειες στις καλλιέργειες. Δυστυχώς δεν υπάρχουν διεθνώς αρκετά οικονομικά δεδομένα για τις απώλειες που προκαλεί η ασθένεια στις καλλιέργειες τομάτας, σύμφωνα όμως με τους Datar & Mayee (1980) και μετά από πειράματα που έγιναν μεταξύ 1978 και 1979 στην ποικιλία Marglobe, η προσβολή από το μύκητα σε ποσοστό 71,7% προκαλεί απώλειες στην παραγωγή καρπών τομάτας ύψους 78,5%. Αυτές οι μετρήσεις έγιναν σύμφωνα με το συντελεστή-δείκτη ασθένειας CODEX κατά τον οποίο σε κάθε 1% αύξηση της προσβολής προκαλείται 1,36% απώλεια παραγωγής.

Στην Ελλάδα η ασθένεια αναφέρθηκε για πρώτη φορά από το Σαρεγιάννη το 1936. Από το 1936 μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του '90 η ασθένεια εμφανιζόταν σποραδικά σε διάφορες περιοχές (Σκάλα Λακωνίας, Γύθειο, Καλαμάτα, Κώς, Πρέβεζα, κ.λ.π.) αλλά δεν αποτελούσε σοβαρό πρόβλημα για την καλλιέργεια της τομάτας (Χολέβας *et al.*, 1990). Τα τελευταία όμως χρόνια διαπιστώθηκε μια αύξηση τόσο στη συχνότητα εμφάνισης όσο και στην ένταση της ασθένειας σε περιοχές της Μεσσηνίας, Ηλείας, Πρέβεζας, Λαμίας και Αιτωλικού, προκαλώντας ιδιαίτερη ανησυχία στους παραγωγούς και τους γεωπόνους των περιοχών αυτών. Σε μερικές μάλιστα περιπτώσεις (Τραγανό Ηλείας) η ασθένεια προκάλεσε πλήρη καταστροφή θερμοκηπιακής καλλιέργειας τομάτας μέσα σε μια εβδομάδα από την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων (Ε. Βλουτόγλου, προσωπική επικοινωνία).

Ειδικότερα στην Κρήτη η ασθένεια εμφανίζει δύο φάσεις: α) τη σήψη

του λαιμού των νεαρών φυταρίων, που απαντάται πιο συχνά στις υπαίθριες καλλιέργειες των περιοχών Βιάννου και Ιεράπετρας, και β) την κηλίδωση των φύλλων, που είναι ενδημική στα θερμοκήπια και έχει τη μεγαλύτερη οικονομική σημασία (Βακαλουνάκης, 1987). Ωστόσο, οικονομικά στοιχεία για ζημιές που έχει κατά καιρούς προκαλέσει η ασθένεια σε καλλιέργειες τομάτας, δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα.

Σε άλλες χώρες για την αντιμετώπιση της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *A. solani* στις καλλιέργειες της τομάτας εφαρμόζονται κυρίως χημικά και καλλιεργητικά μέτρα. Στη χώρα μας μέχρι σήμερα, ενώ δεν εφαρμόζονταν μυκητοκτόνα για την προστασία της καλλιέργειας από την ασθένεια, μερικά από τα μυκητοκτόνα (mancozeb, chlorothalonil, iprodione) που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση άλλων σοβαρών ασθενειών της τομάτας, όπως του Περονόσπορου (*Phytophthora infestans*) και του Βοτρύτη (*Botrytis cinerea*), ήταν αποτελεσματικά και εναντίον του πρώιμου περονόσπορου (*A. solani*). Πιθανόν αυτός να είναι ο λόγος που η ασθένεια δεν αποτελούσε σοβαρό πρόβλημα τα προηγούμενα χρόνια στη χώρα μας. Οι λόγοι της επανεμφάνισης της ασθένειας δεν είναι γνωστοί. Πιθανόν αυτή να οφείλεται σε ένα από τους παρακάτω λόγους ή σε συνδυασμό αυτών:

α) Στη μείωση της αποτελεσματικότητας των ήδη χρησιμοποιούμενων μυκητοκτόνων, λόγω επιλογής και επικράτησης ανθεκτικών στελεχών στον πληθυσμό του παθογόνου.

β) Στη συνεχώς αυξανόμενη τάση καλλιέργειας νέων ποικιλιών και υβριδίων τομάτας, που ενώ εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε άλλες σοβαρές ασθένειες (π.χ. αδρομυκώσεις, ιώσεις, νηματώδεις), είναι πολύ ευπαθείς στις



προσβολές του μύκητα *A. solani* (Βλουτόγλου & Καλογεράκης, 1998), και γ) Στην είσοδο στη χώρα με το πολλαπλασιαστικό υλικό (σπόροι) στελεχών του μύκητα με ισχυρή παθογόνο δύναμη.

Στη Διεθνή Βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για την αποτελεσματικότητα διαφόρων μυκητοκτόνων στην αντιμετώπιση του μύκητα *A. solani*. Οι περισσότερες μελέτες όμως έχουν γίνει σε συνθήκες αγρού, όπου υπεισέρχονται πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες καθώς και οι αλληλεπιδράσεις τους. Επιπλέον, πρόσφατα ανακαλύφθηκε μια νέα ομάδα φυσικών ενώσεων με μυκητοκτόνες ιδιότητες που απαντούν στους ανώτερους Βασιδιομύκητες (π.χ. *Strobilurus tenacellus*) και είναι γνωστές ως στρομπιλουρίνες. Πολλά μέλη των στρομπιλουρινών που έχουν παραχθεί και συνθετικά σε μυκητοκτόνα (π.χ. azoxystrobin) παρουσιάζουν ευρύ φάσμα δράσης εναντίον διαφόρων φυτοπαθογόνων μυκήτων συμπεριλαμβανομένων και των μυκήτων του γένους *Alternaria*. Για την αποτελεσματικότητα όμως των ενώσεων αυτών στην αντιμετώπιση του πρώιμου περονόσπορου της τομάτας δεν υπάρχουν επαρκή πειραματικά δεδομένα. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη η μελέτη της αποτελεσματικότητας τόσο των ήδη χρησιμοποιούμενων στην πράξη μυκητοκτόνων (mancozeb, chlorothalonil, iprodione, prochloraz) όσο και των νέων της ομάδας των στρομπιλουρινών (azoxystrobin) στην αντιμετώπιση του μύκητα *A. solani* κάτω από ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Σκοποί της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθούν:

α) Οι καλλιεργητικοί χαρακτήρες και η ικανότητα παραγωγής κονιδίων *in vitro* ελληνικών απομονώσεων του μύκητα *A. solani*.

β) Η παθογένεια ελληνικών απομονώσεων του παθογόνου στην ποικιλία τομάτας Ace 55VF κάτω από ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες.

γ) Η επίδραση των μυκητοκτόνων mancozeb, chlorothalonil, iprodione, prochloraz και azoxystrobin στη γραμμική αύξηση του μυκηλίου του μύκητα *A. solani* και ο υπολογισμός των τιμών ED<sub>50</sub> για κάθε μυκητοκτόνο, και

δ) Η προστατευτική και θεραπευτική δράση των παραπάνω μυκητοκτόνων εναντίον του μύκητα *A. solani* σε πειράματα ελεγχόμενων περιβαλλοντικών συνθηκών.

### **Η ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΣΤΗ ΧΩΡΑ ΜΑΣ**

Σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Γεωργίας (Πίνακας 1) μεταξύ των κηπευτικών, η καλλιέργεια της τομάτας καταλαμβάνει τη δεύτερη μετά την πατάτα έκταση στη χώρα μας ανερχόμενη το 1997 σε 346.293 στρ. και παραγωγή που πλησιάζει τα 2 εκατ. τόνους ετησίως. Ένα μεγάλο μέρος της έκτασης (53%) καλλιεργείται με βιομηχανική τομάτα για την παραγωγή πολτού ή άλλων μεταποιημένων γεωργικών προϊόντων με εξαγωγικό κυρίως προορισμό. Από την υπόλοιπη με καλλιεργούμενη τομάτα έκταση, το 41% καταλαμβάνει η υπαίθρια επιτραπέζια και το 6% η υπό κάλυψη επιτραπέζια καλλιέργεια που διοχετεύεται στην εσωτερική και εξωτερική αγορά καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Ως εκ τούτου, η καλλιέργεια της τομάτας είναι μια από τις πλέον προσοδοφόρες όχι μόνο για τον Έλληνα αγρότη αλλά και για την εθνική οικονομία καθ' όσον τα βιομηχανικώς παραγόμενα προϊόντα (τοματοπολτός,

αποφλοιωμένοι καρποί σε κονσέρβα, τοματοχυμός, κ.λ.π.) προορίζονται κυρίως για τις διεθνείς αγορές.

**Πίνακας 1.** Στατιστικά στοιχεία του Υπουργείου Γεωργίας που αφορούν την καλλιέργεια της τομάτας στη Χώρα μας κατά τα έτη 1995, 1996 και 1997.

Ετος	Υπαίθρια καλλιέργεια				Υπό κάλυψη	
	Βιομηχανική		Επιτραπέζια		Επιτραπέζια	
	Εκταση (στρεμ.)	Παραγωγή (τόνοι)	Εκταση (στρεμ.)	Παραγωγή (τόνοι)	Εκταση (στρεμ.)	Παραγωγή (τόνοι)
<b>1995</b>	209.137	1.198.700	142.671	567.245	18.838	185.002
<b>1996</b>	214.860	1.238.610	143.434	539.197	20.598	207.060
<b>1997</b>	183.129	1.060.204	152.265	532.674	20.493	214.837

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

### 1.1. ΞΕΝΙΣΤΗΣ

#### 1.1.1. Ιστορικό

Η τομάτα (*Solanum lycopersicum* L. ή *Lycopersicon esculentum* Mill.) ανήκει στην Οικογένεια Solanaceae. Στην Ευρώπη μεταφέρθηκε τον 16<sup>ο</sup> αιώνα, αλλά μέχρι το 19<sup>ο</sup> αιώνα χρησιμοποιούνταν ως καλλωπιστικό και όχι ως εδώδιμο φυτό, επειδή οι Ευρωπαίοι θεωρούσαν ότι ο καρπός της τομάτας περιείχε τοξικές ουσίες, ανάλογες των δηλητηριωδών γλυκοζιτών που περιείχαν τα φύλλα ή οι καρποί άλλων ειδών της ίδιας οικογένειας. Στην Ελλάδα η τομάτα εισήχθη το 1818 (Κανάκης, 1997).

Είναι αυτογονιμοποιούμενο είδος αλλά μπορεί επίσης να διασταυρωθεί, με μικρή ή μεγάλη δυσκολία, με όλα τα είδη του ίδιου γένους για να δώσει υβρίδια. Η ιδιότητά της αυτή συνέτεινε ώστε τα τελευταία 50 χρόνια ένας μεγάλος αριθμός επιθυμητών χαρακτηριστικών (γόνοι) να μεταφερθεί και να ενσωματωθεί στις καλλιεργούμενες ποικιλίες και υβρίδια (Κανάκης, 1997).

#### 1.1.2. Κλιματολογικές-εδαφολογικές απαιτήσεις

Η τομάτα είναι φυτό θερμοαπαιτητικό και για να δώσει τον πρώτο καρπό χρειάζεται 3-4 μήνες από την εποχή σποράς. Ευδοκίμει όταν ο καιρός είναι ξηρός και αίθριος σε θερμοκρασία 18-30<sup>ο</sup>C, ενώ με συνεφιασμένες

ημέρες σε θερμοκρασία 19-21<sup>0</sup>C. Από πλευράς εδάφους η τομάτα ευδοκίμει σχεδόν σε όλους τους τύπους εδαφών, με μεγαλύτερη προτίμηση στα ελαφρά, ζεστά και καλά στραγγιζόμενα εδάφη. Τα πηλώδη βαριά εδάφη συγκρατούν περισσότερη υγρασία και προτιμώνται για μικρότερη περίοδο καλλιέργειας, μεγαλύτερες αποδόσεις αλλά όχι για πρώιμη παραγωγή. Από πλευράς οξύτητας του εδάφους η τομάτα ευδοκίμει σε pH 5,5-7,0 (Σπάρτσης, 1992).

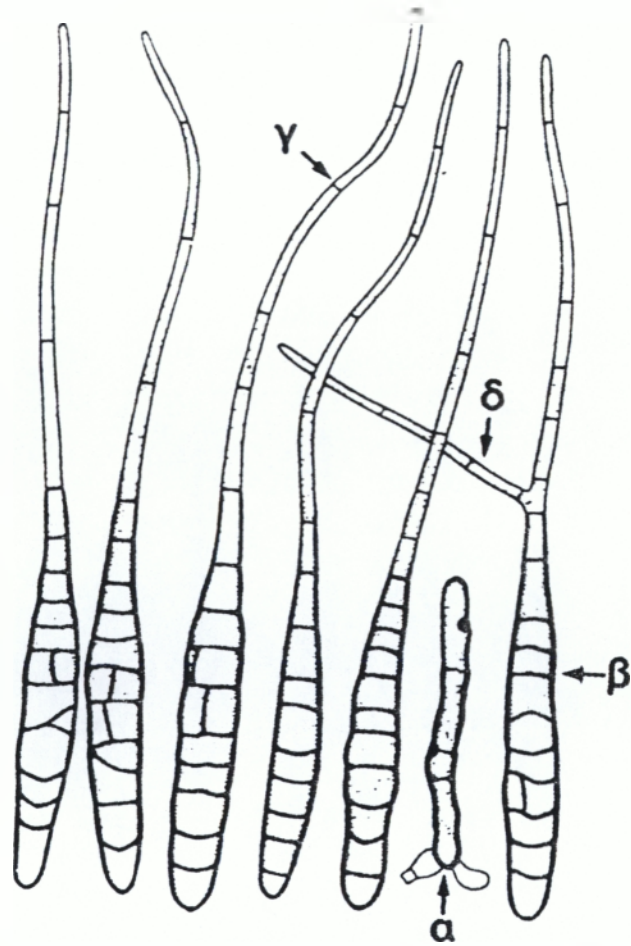
## 1.2. ΠΑΘΟΓΟΝΟ

### 1.2.1. Ταξινόμηση

Ο μύκητας *A. solani* ανήκει ταξινομικά στην οικογένεια Dematiaceae, στην τάξη Hyphomycetales, στην κλάση Hyphomycetes και στην υποδιαίρεση Deuteromycotina. Το είδος *A. solani* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1918.

### 1.2.2. Μορφολογία

Οι αποικίες του μύκητα *A. solani* σχηματίζουν εναέριο μυκήλιο χρώματος φαιοκάστανου έως μελανού (Ellis & Gibson, 1975). Οι κονιδιοφόροι εμφανίζονται μεμονωμένοι ή σε μικρές ομάδες, είναι ευθείς ή ελαφρώς κεκαμμένοι με διαφράγματα (septa) (Εικ. 2). Το χρώμα τους είναι ανοιχτό καστανό ή ελαιοκάστανο με μήκος μεγαλύτερο των 110 μm και πάχος 6-10 μm. Τα κονίδια απαντώνται συνήθως μεμονωμένα και σπάνια σε



**Εικόνα 2.** Κονιδιοφόρος (α), σώμα κονιδίου (β), ράμφος (beak) (γ) και διακλάδωση του ράμφους (δ) στο σημείο πρόσφυσής του με το κυρίως σώμα του κονιδίου του μύκητα *A. solani*. (*CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, No 475, Ellis & Gimbson, 1975).

κοντές, ευθείες ή κεκαμμένες αλυσίδες. Το κυρίως σώμα των κονιδίων έχει σχήμα ελλειψοειδές, επίμηκες και καταλήγει σε ράμφος, (beak) το οποίο είναι περίπου ίδιου μήκους ή μεγαλύτερο από το κυρίως σώμα των κονιδίων. Το χρώμα των κονιδίων είναι καστανό ή ελαιοκάστανο με συνολικό μήκος 150-300 μm και πάχος 15-19 μm στο φαρδύτερό τους σημείο. Έχουν 9-11 οριζόντια και λίγα ή καθόλου κάθετα διαφράγματα. Το ράμφος, που είναι κεκαμμένο μήκους 2,5-5 μm, στενεύει προς την άκρη του και σε μερικές περιπτώσεις διακλαδίζεται κοντά στο σημείο ένωσής του με το κυρίως σώμα του κονιδίου.

### **1.2.3. Βλάστηση κονιδίων-Μόλυνση**

Η βλάστηση των κονιδίων του μύκητα *A. solani* επιτυγχάνεται σε θερμοκρασίες που διαφέρουν ανάλογα με τον ερευνητή και τις συνθήκες κάτω από τις οποίες γίνεται η μελέτη. Έτσι σύμφωνα με τους Waggoner & Parlange (1975), η ελάχιστη, ιδανική και μέγιστη θερμοκρασία για τη βλάστηση των κονιδίων είναι αντίστοιχα 4°C, 28°C και <40°C. Αντίθετα σύμφωνα με τον Rotem (αδημοσίευτα αποτελέσματα), η ελάχιστη, ιδανική και μέγιστη θερμοκρασία βρέθηκε ότι είναι <5°C, 27°C και >35°C. Σε μεγάλες περιόδους σχετικής υγρασίας τα κονίδια του μύκητα μπορούν να βλαστήσουν ακόμη και σε θερμοκρασία 2°C, ενώ στους 20°C σχεδόν όλα τα κονίδια βλαστάνουν μετά από περίοδο σχετικής υγρασίας 2 ωρών, αλλά η επιμήκυνση των βλαστικών σωλήνων απαιτεί μεγαλύτερη διάρκεια σχετικής υγρασίας (Bashi & Rotem, 1974). Η βλάστηση των κονιδίων διευκολύνεται από την υψηλή σχετική υγρασία και έχει αναφερθεί ότι τις περισσότερες

φορές λαμβάνει χώρα υπό συνθήκες κορεσμένης σε υγρασία ατμόσφαιρας (Schein, 1964).

Η είσοδος του παθογόνου στον ξενιστή γίνεται είτε άμεσα με απευθείας διάτρηση των επιδερμικών κυττάρων από τους βλαστικούς σωλήνες, είτε έμμεσα διαμέσου των ανοιχτών στοματίων (Rotem, 1994). Οι Waggoner & Horsfall (1969) διαπίστωσαν ότι το ποσοστό μόλυνσης του φυλλώματος φυτών τομάτας από το μύκητα *A. solani* μετά από 3, 6, 9 και 12 ώρες υψηλής σχετικής υγρασίας ήταν 0, 13, 74 και 100% αντίστοιχα. Πειράματα σε θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών έδειξαν ότι τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται 1 ημέρα μετά τη μόλυνση των φυτών με το παθογόνο. Σε συνθήκες όμως αγρού, ο χρόνος επώασης (περίοδος μεταξύ της μόλυνσης και της εμφάνισης των πρώτων συμπτωμάτων) είναι πολύ μεγαλύτερος καθώς επηρεάζεται από τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας μεταξύ ημέρας και νύχτας, τις διακυμάνσεις της σχετικής υγρασίας και της ακτινοβολίας που συνήθως δεν παρατηρούνται στα πειράματα που γίνονται σε θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών. Επιπλέον, ο χρόνος επώασης επηρεάζεται και από την ηλικία των φυτικών ιστών και είναι μικρότερος σε παλαιά παρά σε νεαρά φύλλα στα οποία πολλές φορές δεν παρατηρείται εμφάνιση συμπτωμάτων (Rowell, 1953).

#### **1.2.4. Παραγωγή κονιδίων**

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι ο μύκητας *A. solani* μειώνει ή χάνει την ικανότητά του να παράγει κονίδια μετά από συνεχείς μεταφορές σε θρεπτικά υλικά. Όλα τα είδη του γένους *Alternaria* παράγουν περισσότερα



κονίδια *in vitro* καλύτερα σε θρεπτικά υλικά φτωχά σε ζάχαρη, όπως είναι το V-8 άγαρ (Rotem, 1994).

Εκθέτοντας την αποικία του μύκητα *A. solani* σε υπεριώδη ακτινοβολία (NUV-light), διευκολύνεται η παραγωγή κονιδίων σε καλλιέργεια *in vitro* (Rands 1917, Kunkel 1918, Dillon Weston, 1936, McCallan & Chan 1943, Charlton, 1953, Lukens 1960, 1963, 1966, Douglas 1972). Η έκθεση των κονιδιοφόρων σε υπεριώδη ακτινοβολία (NUV-light) προάγει την παραγωγή κονιδίων τα οποία στη συνέχεια μορφοποιούνται στο σκοτάδι (Lukens & Horsfall, 1969).

Εκτός από την *in vitro* και η *in vivo* παραγωγή κονιδίων επηρεάζεται από την ακτινοβολία. Πειράματα που έγιναν, έδειξαν ότι ο μύκητας *A. solani*, ενώ *in vitro* για να σχηματίσει κονίδια χρειάστηκε να εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, η παραγωγή κονιδίων *in vivo* έγινε μετά από έκθεση του μύκητα σε συνθήκες ασθενούς φωτισμού και μειωμένης υπεριώδους ακτινοβολίας (Bashi & Rotem, 1976). Εκτός από την ακτινοβολία, η *in vivo* παραγωγή κονιδίων του μύκητα εξαρτάται και από την κατάσταση του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των παραγομένων στους προσβεβλημένους φυτικούς ιστούς κονιδίων αυξάνεται όσο οι χλωρωτικές περιοχές μετατρέπονται σε νεκρωτικές (Bashi & Rotem, 1975a).

Αν και η παραγωγή κονιδίων του μύκητα *A. solani* στους προσβεβλημένους φυτικούς ιστούς απαιτεί μακρά περίοδο σχετικής υγρασίας, αυτή μπορεί επίσης να επιτευχθεί κατά τη διάρκεια μικρών διαστημάτων υγρασίας που διακόπτονται από σύντομες ξηρές περιόδους (Bashi & Rotem, 1975b). Σύμφωνα με τους Bashi & Rotem (1975b), η

παραγωγή κονιδίων στον αγρό χρειάζεται το λιγότερο δύο υγρές νύχτες. Οι κονιδιοφόροι του παθογόνου παράγονται κατά τη διάρκεια της πρώτης υγρής νύχτας, ενώ κατά τη διάρκεια της επόμενης ημέρας, το φως και η ξηρασία προάγει την παραγωγή κονιδίων, τα οποία εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της δεύτερης υγρής νύχτας. Η ελάχιστη, ιδανική και μέγιστη θερμοκρασία για την παραγωγή κονιδιοφόρων είναι αντίστοιχα 5, 27,5 και 35°C, ενώ για την παραγωγή κονιδίων είναι 10, 22,5 και 30°C αντίστοιχα (Bashi & Rotem, 1975b).

#### **1.2.5. Διασπορά κονιδίων**

Ο κυριότερος τρόπος διασποράς των κονιδίων του μύκητα *A. solani* επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του ανέμου (Rotem, 1994). Διασπορά μολύσματος μπορεί να γίνει επίσης και με τη βοήθεια σταγόνων νερού ή με τις εργασίες των παραγωγών αλλά σε μικρότερο βαθμό. Η ταχύτητα του ανέμου επιδρά άμεσα στη διασπορά του μολύσματος (Rotem, 1994). Η διασπορά των κονιδίων ελαχιστοποιείται κατά τη διάρκεια της νύχτας όπου επικρατούν συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας, χαμηλής θερμοκρασίας και απουσίας ανέμου, ενώ διευκολύνεται την ημέρα όταν επικρατούν συνθήκες ξηρασίας, υψηλότερης θερμοκρασίας και παρουσία ανέμου. Σύμφωνα με τον Rotem (1964), ο μέγιστος αριθμός διασπειρομένων κονιδίων του μύκητα *A. solani* παρατηρήθηκε 4,5 ώρες μετά την ανατολή του ηλίου, ενώ το 60% του συνόλου των κονιδίων που διασπάρθηκαν κατά τη διάρκεια της ημέρας, συγκεντρώθηκε το διάστημα από 10 π.μ. έως 2 μ.μ. Πειράματα που έγιναν από τον Rotem (1964) στην περιοχή Negev του Ισραήλ σε χειμωνιάτικη

καλλιέργεια τομάτας έδειξαν ότι μόνο ένας μικρός αριθμός κονιδίων του μύκητα *A. solani* παγιδεύτηκε κατά τη διάρκεια των πρώτων μηνών της καλλιεργητικής περιόδου (Οκτώβριος-Γενάρης). Σταδιακή αύξηση του αριθμού των διασπειρομένων κονιδίων παρατηρήθηκε το Φεβρουάριο, όταν τα φύλλα των φυτών τομάτας βρίσκονταν σε προχωρημένο στάδιο προσβολής και η παραγωγή κονιδίων από το μύκητα στους προσβεβλημένους ιστούς ήταν η μέγιστη. Αντίθετα, τον επόμενο μήνα δεν διαπιστώθηκαν αερομεταφερόμενα κονίδια του παθογόνου.

#### **1.2.6. Διαχείμανση του μύκητα**

Σύμφωνα με τον Rotem (1994), το μόλυσμα του μύκητα *A. solani* παραμένει ζωντανό στο έδαφος για αρκετά χρόνια. Η επιβίωση του παθογόνου γίνεται κυρίως στα μολυσμένα υπολείμματα της καλλιέργειας και τους σπόρους. Οι προσβεβλημένοι σπόροι μεταφέρουν το παθογόνο και σε νέες περιοχές. Η διαχείμανση στα υπολείμματα εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν στις διάφορες περιοχές (μετεωρολογικές, εδαφικές, βιοτικές). Για παράδειγμα στην Εσθονία η διαχείμανση του μύκητα παρεμποδίζεται, και τα μέσα διαχείμανσης καταστρέφονται όταν κατά το φθινόπωρο και την άνοιξη επικρατήσει υγρός και ζεστός καιρός (Kvasnyuk, 1986). Στη Νότια Ρωσία ο μύκητας *A. solani* διαχειμάζει με τη μορφή μυκηλίου στα υπολείμματα πατάτας και με τη μορφή χλαμυδοσπορίων και μυκηλίου στο έδαφος. Εντούτοις, χάνει την ικανότητα επιβίωσής του στις ακραίες θερμοκρασίες (-30°C) που επικρατούν κατά τη διάρκεια του Σιβηριακού χειμώνα (Burdukova, 1971). Στην έρημο Negev του Ισραήλ τέλος, όπου η

τομάτα καλλιεργείται κυρίως το χειμώνα, τα υπολείμματα της καλλιέργειας θάβονται ή αφήνονται στην επιφάνεια του εδάφους για τουλάχιστον 8 μήνες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού με σκοπό την καταστροφή του μολύσματος που επιτυγχάνεται με την έκθεσή τους στις υψηλές θερμοκρασίες (40-50°C) αέρα και εδάφους.

Εκτός όμως από τη θερμοκρασία, η επιβίωση του μύκητα καθορίζεται από την υγρασία και την ανταγωνιστική χλωρίδα (Rotem, 1968). Ο μύκητας *A. solani* επιβιώνει κυρίως με τη μορφή μυκηλίου αλλά και χλαμυδοσπορίων τα οποία όμως συναντώνται σπάνια (Rotem, 1994). Κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες σκότους και ξηρασίας το μυκήλιο του *A. solani* επέζησε για μια μέρα στους 88°C και πάνω από 10 χρόνια στους 5°C (Rotem, 1968). Η ποσότητα της υπεριώδους ηλιακής ακτινοβολίας περιορίζει την επιβίωση περισσότερο από τις δυσμενείς για την επιβίωση του παθογόνου θερμοκρασίες στο σκοτάδι. Η επιβίωση του παθογόνου στην έκθεση φωτός είναι περίπου 30 φορές μικρότερη από εκείνη σε συνθήκες σκότους (Rotem *et al.*, 1985). Στον αγρό βέβαια ο μύκητας προστατεύεται από τις υπεριώδεις ακτίνες στα υπολείμματα προσβεβλημένων ιστών στο έδαφος.

Το μυκήλιο του μύκητα βρέθηκε ότι επιζεί καλύτερα από τα κονιδιά του ακόμη και σε θερμοκρασία 40°C. Τα σκούρα καστανού χρώματος χλαμυδοσπόρια, που χαρακτηρίζονται από το μεγάλο πάχους κυτταρικό τοίχωμα, δίνουν τη δυνατότητα στο παθογόνο να επιζεί από καλλιέργεια σε καλλιέργεια (Basu, 1971; Dorozhkin & Ivanyuk, 1979; Patterson, 1991). Σε πείραμα του Patterson (1991), όπου εξετάστηκε η μακροβιότητα του μολύσματος στο έδαφος, διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό προσβολής φυτών

τομάτας τα οποία φυτεύτηκαν σε μολυσμένο με χλαμυδοσπόρια έδαφος, ήταν 100%. Διαπιστώθηκε επίσης ότι φυτά τομάτας που φυτεύτηκαν 6 και 12 μήνες μετά τη μόλυνση του εδάφους με χλαμυδοσπόρια εμφάνισαν ποσοστό προσβολής 98-100% και 56% αντίστοιχα. Τέλος όσον αφορά την επιβίωση του παθογόνου σε διάφορα βάθη στο έδαφος διαπιστώθηκε ότι όταν τα χλαμυδοσπόρια τοποθετήθηκαν σε βάθος 0-4 cm από την επιφάνεια του εδάφους, όλα τα φυτά παρουσίασαν συμπτώματα προσβολής από το παθογόνο ενώ αυξανόμενου του βάθους μειωνόταν η ικανότητα επιβίωσης του μύκητα *A. solani*. Τέλος, χλαμυδοσπόρια που τοποθετήθηκαν σε βάθος 16-20 cm δεν επιβίωσαν και δεν μπόρεσαν να μολύνουν τα φυτά τομάτας.

#### **1.2.7. Τοξίνες και ο ρόλος τους**

Η μόλυνση φυτών τομάτας από το μύκητα *A. solani*, όπως συμβαίνει και με άλλες ασθένειες που προκαλούνται από μύκητες του γένους *Alternaria*, διευκολύνεται από την παραγωγή τοξινών. Οι τοξίνες αυτές όταν εισαχθούν τεχνητά σε φυτά τομάτας ή πατάτας προκαλούν συμπτώματα παρόμοια με εκείνα της προσβολής των παραπάνω φυτών από το μύκητα *A. solani* (Pound & Stahmann, 1951). Ωστόσο δεν έχει βρεθεί συσχετισμός μεταξύ της παθογόνου δύναμης διαφόρων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* και της ικανότητάς τους να παράγουν τοξίνες (Brian *et al.*, 1952). Σε ορισμένες περιπτώσεις, μερικές απομονώσεις του παθογόνου βρέθηκε ότι παράγουν λίγες ή και καθόλου τοξίνες (Brian *et al.*, 1952). Ο ρόλος των φυτοτοξινών στην εμφάνιση και εξέλιξη της ασθένειας δεν έχει ερευνηθεί (Maiero *et al.*, 1991). Οι πιο γνωστές τοξίνες που έχουν βρεθεί από το διήθημα καλλιέργειας

του μύκητα *A. solani* είναι το αλτερναρικό οξύ και η ζιννιόλη (Brian *et al.*, 1949). Το αλτερναρικό οξύ είναι υπεύθυνο για τις χλωρώσεις και νεκρώσεις που εμφανίζονται στα προσβεβλημένα από το παθογόνο φύλλα τομάτας. Αντίθετα ο ρόλος της ζιννιόλης δεν είναι γνωστός, αν και η τεχνητή έγχυση της τοξίνης αυτής στα φυτά, προκαλεί σήψη του βλαστού και νεκρωτικές περιοχές στα φύλλα φυτών καρότου και ζίννιας (Barash *et al.*, 1981). Επιπλέον, αν και η δράση της ζιννιόλης δεν φαίνεται να επηρεάζεται από το είδος του ξενιστή (Barash *et al.*, 1981), η παραγωγή και η δράση του αλτερναρικού οξέος σχετίζεται με συγκεκριμένους ξενιστές (Langsdorf *et al.*, 1990). Ωστόσο η δράση των δύο αυτών τοξινών, όσον αφορά την εμφάνιση και εξέλιξη του πρώιμου περονόσπορου, θεωρείται δευτερεύουσας σημασίας (Maiero *et al.*, 1991).

#### 1.2.8. Κύκλος ξενιστών

Ο μύκητας *A. solani* προσβάλλει εκτός από την τομάτα (*Lycopersicon esculentum* Mill) και την πατάτα (*Solanum tuberosum* L.), την πιπεριά (*Capsicum annum* L.) και τη μελιτζάνα (*Solanum melangena* L.) αλλά σε μικρότερο βαθμό (Rotem, 1994). Επιπλέον έχει διαπιστωθεί ότι ξενιστές του παθογόνου είναι και άλλα είδη της οικογένειας Solanaceae όπως τα: *Atropa belladonna*, *Cyphomandra betacea*, *Hyoscyamus albus*, *H. niger*, *Lycopersicum glandulosum*, *L. hirsutum*, *Nicotiana affinis*, *N. tabacum*, *Solanum andigenum*, *S. aviculare*, *S. niger* *S. demissum* (Rotem, 1994). Τέλος έχει αναφερθεί ότι ο μύκητας προσβάλλει και είδη των οικογενειών Compositae και Moraceae.

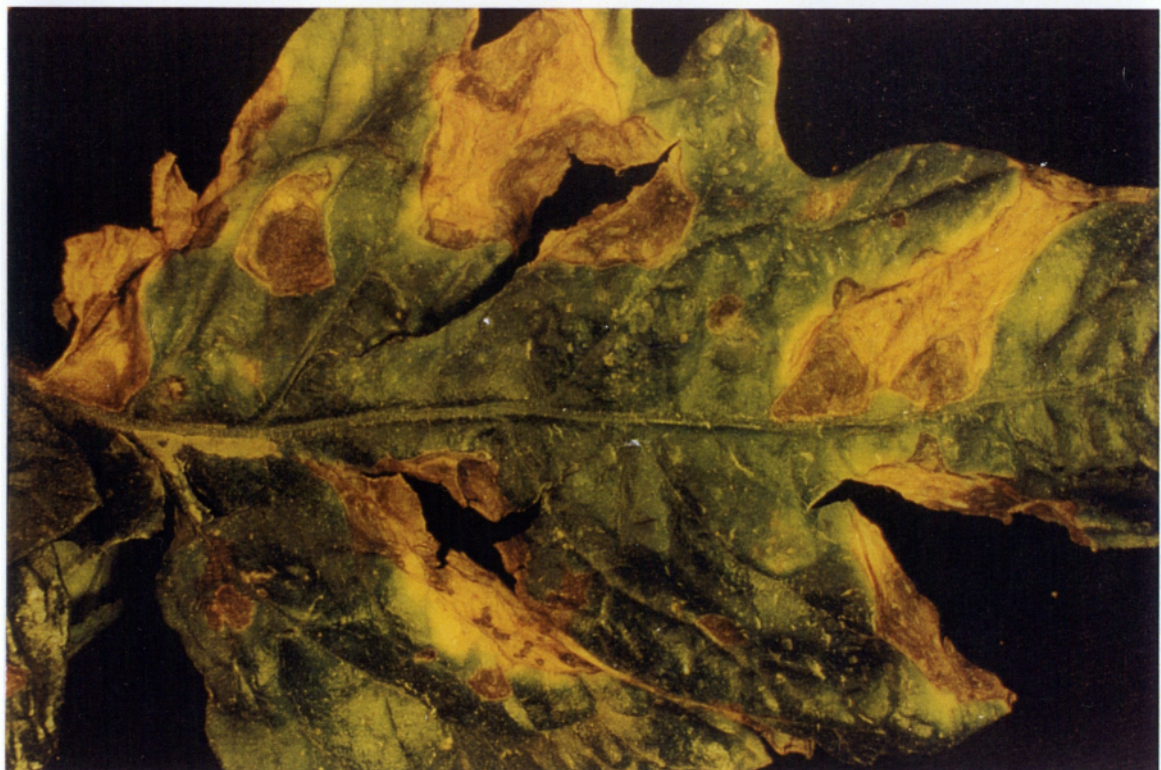
## 1.3. ΑΣΘΕΝΕΙΑ

### 1.3.1. Συμπτωματολογία

Όλα τα υπέργεια μέρη του φυτού τομάτας μπορεί να προσβληθούν από την ασθένεια και τα φυτά είναι ευπαθή σε όλα τα στάδια ανάπτυξής τους (Παναγόπουλος, 1995).

Στα σπορεία παρατηρούνται προφυτρωτικές και μεταφυτρωτικές τήξεις. Στα νεαρά φυτάρια (μικρότερα από τρεις εβδομάδες) εμφανίζονται σκοτεινές περιοχές στη βάση του στελέχους κοντά στην επιφάνεια του εδάφους. Αυτές εξελίσσονται προς τα πάνω και γύρω από το στέλεχος και προκαλούν την ξήρανση του φυτού.

Στα ανεπτυγμένα φυτά σχηματίζονται, πρώτα στα παλαιότερα φύλλα της βάσης, κυκλικές ή γωνιώδεις καστανές ή μελανές κηλίδες με συγκεντρικούς κύκλους (target spot) διαμέτρου 3-10 mm (Εικ. 3 & 4). Στα παλαιότερα ιδίως φύλλα οι κηλίδες συχνά περιβάλλονται από χλωρωτική ζώνη. Οι προσβεβλημένοι ιστοί γίνονται τελικά μελανοί, νεκρώνονται ενώ τα έντονα προσβεβλημένα φύλλα ξεραίνονται και πέφτουν. Παρόμοιες κηλίδες, που συνήθως μένουν μικρές με τη χαρακτηριστική ζωνωτή εμφάνιση σχηματίζονται στα στελέχη, τους μίσχους των φύλλων, τους ποδίσκους των άνθεων και τους καρπούς (Εικ. 5 & 6). Οι κηλίδες στα όργανα αυτά και ιδιαίτερα στους καρπούς είναι συχνά ελαφρά βυθισμένες. Στους καρπούς η προσβολή αρχίζει γύρω από τον κάλυκα ή από κάποιο μικρό τραύμα ή σχισμή, αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου σε μέγεθος και έχει δερματώδη υφή. Πάνω στις κηλίδες σχηματίζεται μαύρη εξάνθηση που είναι οι



Εικόνα 3. Συμπτώματα προσβολής φύλλων τομάτας από το μύκητα *A. solani* (φυσικές μολύνσεις).





**Εικόνα 4.** Συμπτώματα προσβολής φύλλων τομάτας από το μύκητα *A. solani*, 3 (α) και 7 (β) ημέρες μετά από τεχνητή μόλυνση των φυτών με αιώρημα κονιδίων συγκέντρωσης  $5 \times 10^4$  κονίδια/ml σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών.



**Εικόνα 5.** Συμπτώματα προσβολής στελεχών και μίσχων φύλλων φυτών τομάτας από το μύκητα *A. solani*, 7 ημέρες μετά τη τεχνητή μόλυνση των φυτών φυτών με αιώρημα κονιδίων συγκέντρωσης  $5 \times 10^4$  κονίδια/ml σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών.



**Εικόνα 6.** Συμπτώματα προσβολής ποδίσκων ανθέων και καρπών τομάτας από το μύκητα *A. solani*, 10 ημέρες μετά τη τεχνητή μόλυνση των φυτών φυτών με αιώρημα κονιδίων συγκέντρωσης  $5 \times 10^4$  κονίδια/ml σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών.

κονιδιοφόροι και τα κονίδια του μύκητα (Εικ. 7). Οι προσβεβλημένοι καρποί συνήθως πέφτουν.

### 1.3.2. Συνθήκες που ευνοούν την εμφάνιση της ασθένειας

#### α) Περιβαλλοντικές

Όλα τα είδη του γένους *Alternaria* παράγουν σπόρια και μολύνουν καλύτερα σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (Jones *et al.*, 1993). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί εμφάνιση και εξάπλωση παθογόνων ειδών και σε περιοχές με ψυχρότερο κλίμα (Βόρεια Ευρώπη). Η μεγάλη προσαρμοστικότητα των ειδών του γένους *Alternaria* σε διαφορετικές θερμοκρασίες σημαίνει ότι ο παράγοντας θερμοκρασία δεν έχει καθοριστική και πρωτεύουσα σημασία στην εμφάνιση και εξέλιξη της ασθένειας (Rotem, 1994). Έχει αναφερθεί ότι οι ασυνήθιστα υψηλές θερμοκρασίες που επικράτησαν κατά τη διάρκεια του χειμώνα του 1937 επηρέασαν θετικά την εμφάνιση του πρώιμου περονόσπορου σε χειμερινές καλλιέργειες τομάτας στο Μαρόκο (Berger, 1937). Στις περισσότερες περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκε μεγάλης έντασης προσβολή από παθογόνα είδη του γένους *Alternaria*, επικρατούσαν στην περιοχή υψηλές θερμοκρασίες (μέγιστες 28-32°C). Το είδος *A. solani* αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα παθογόνου που δεν έχει συγκεκριμένα όρια θερμοκρασίας στα οποία να αναπτύσσεται καλύτερα (Strandberg, 1992). Έχει αναφερθεί ότι ο πρώιμος περονόσπορος στην τομάτα ευνοείται από ζεστό και υγρό καιρό (Round, 1951). Παρόλα αυτά ενώ σε καλλιέργεια *in vitro* η θερμοκρασία κοντά στους 28°C ήταν η ιδανική για την ανάπτυξη του μύκητα, σε πειράματα στο θερμοκήπιο η ανάπτυξη της ασθένειας ήταν



**Εικόνα 7.** Συμπτώματα προσβολής καρπών τομάτας από το μύκητα *A. solani* (φυσικές μολύνσεις).

γρηγορότερη στους 16°C. Σε περιβάλλον ελεγχόμενων συνθηκών ο μύκητας *A. solani* αναπτύσσεται το ίδιο καλά σε θερμοκρασίες από 4-36°C (Pound, 1951).

Η παρουσία ελεύθερης υγρασίας στα φύλλα είναι απαραίτητη για τη βλάστηση, τη μόλυνση και την παραγωγή κονιδίων του μύκητα *A. solani* (Rotem, 1994). Για τα περισσότερα είδη του γένους *Alternaria* οι παραπάνω διεργασίες ολοκληρώνονται σε σχετικά μικρές περιόδους υγρασίας 6-12 ωρών, όταν άλλα παθογόνα είδη χρειάζονται μεγαλύτερες περιόδους υγρασίας (48-72 ώρες). Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι στις γεωγραφικές και τοπογραφικές περιοχές όπου απαντώνται ασθένειες οφειλόμενες σε είδη του γένους *Alternaria* δεν υπάρχουν μεγάλες περίοδοι υγρασίας. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το παθογόνο αρχίζει την μόλυνση κατά τη διάρκεια της πρώτης σύντομης περιόδου υγρασίας, επιβιώνει κατά τη διάρκεια της επόμενης ξηρής ημέρας και ολοκληρώνει τη μόλυνση τη δεύτερη υγρή περίοδο (Rotem, 1994).

**β) Η ηλικία της τομάτας ως παράγοντας ευπάθειας στις μολύνσεις από το παθογόνο**

Ανάμεσα σε όλους τους παράγοντες που προκαλούν προδιάθεση του ξενιστή στην ασθένεια, ο γνωστότερος και σημαντικότερος είναι η ηλικία του φυτού (Rotem, 1994). Οι φυτοπαθολόγοι που ασχολούνται με την εμφάνιση του πρώιμου περονόσπορου στο χωράφι χαρακτηρίζουν την ασθένεια ως ασθένεια των ώριμων, γηραιών φυτών. Στην περίπτωση αυτή η ασθένεια εμφανίζεται κατά την περίοδο της ανθοφορίας του φυτού και εντείνεται στα

γηρασμένα φυτά. Αντίθετα, οι φυτοπαθολόγοι που ασχολούνται με την παθολογία των σπόρων αναφέρονται στον πρώιμο περονόσπορο ως ασθένεια των νεαρών φυταρίων. Σε πολλές περιπτώσεις όμως, η προσβολή των σπόρων ή και των σποροφύτων τομάτας από το μύκητα *A. solani* παραβλέπεται. Αυτό συμβαίνει είτε γιατί οι τήξεις των σπόρων (προφυτρωτικές τήξεις) ή των νεαρών φυταρίων (μεταφυτρωτικές τήξεις) μπορεί να οφείλονται σε προσβολές από άλλους μύκητες είτε γιατί είναι δύσκολο να εκτιμηθεί το ποσοστό των προσβεβλημένων φυταρίων, τα οποία δεν αναδύονται από το έδαφος και εξαφανίζονται από το χωράφι (Rotem, 1994). Στη Βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν και τις δύο απόψεις (Rotem, 1994). Επιπλέον, η ευπάθεια μεμονωμένων φύλλων ενός φυτού σε μολύνσεις μυκήτων του γένους *Alternaria* εξαρτάται από την ηλικία του φυτού. Για παράδειγμα η ευπάθεια του κρεμμυδιού στο είδος *A. porri* (Miller, 1983) και του ηλίανθου στο είδος *A. helianthi* (Godoy & Fernandes, 1985) είναι μεγαλύτερη στα γηραιότερα παρά στα νεαρά φυτά, ενώ μεταξύ φύλλων της ίδιας ηλικίας, αυτά των γηραιότερων φυτών είναι περισσότερο ευπαθή από τα φύλλα των νεαρότερων φυτών.

Γενικά, οι περισσότεροι ξενιστές των ειδών του γένους *Alternaria* είναι ευπαθείς σε δύο στάδια ανάπτυξης: το πρώτο μέγιστο της ευπάθειας απαντάται στο νεανικό στάδιο (σπορόφυτο) και το δεύτερο στο ώριμο στάδιο του φυτού (περίοδος μετά την άνθηση). Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση ευπάθειας των φυτών τομάτας στις μολύνσεις του μύκητα *A. solani*, όπου ο μύκητας προκαλεί σήψη λαιμού στα νεαρά φυτάρια. Μετά από αυτό το ευαίσθητο στάδιο τα φυτά εμφανίζουν σχετική ανθεκτικότητα στην ασθένεια.

Με την πάροδο του χρόνου όμως και καθώς τα φυτά ωριμάζουν (περίοδος ανθοφορίας και σχηματισμού καρπών) παρουσιάζουν και πάλι μεγάλη ευπάθεια στις μολύνσεις του παθογόνου (Rotem, 1994).

### 1.3.3. Αντιμετώπιση

Για την αντιμετώπιση της ασθένειας του πρώιμου περονόσπορου στην τομάτα εφαρμόζονται μέτρα καλλιεργητικά, βιολογικά και χημικά.

#### α) Καλλιεργητικά μέτρα

Τα καλλιεργητικά μέτρα που λαμβάνει ο παραγωγός πριν την έναρξη, ή κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου έχουν σκοπό να μειώσουν τις πηγές πρωτογενών μολυσμάτων (σπόρος, υπολείμματα καλλιέργειας, ζιζάνια), και να περιορίσουν την εξάπλωση της ασθένειας. Ένα βασικό χαρακτηριστικό των ειδών του γένους *Alternaria* είναι η ικανότητά τους να επιβιώνουν στο έδαφος για μεγάλα χρονικά διαστήματα ακόμα και απουσία κατάλληλου ξενιστή (Strandberg, 1992). Σύμφωνα με τον Rotem (1994), ο μύκητας *A. solani* έχει τη δυνατότητα να επιβιώνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο έδαφος με τη βοήθεια κατάλληλων μυκηλιακών κατασκευών (μυκήλιο, κονίδια, χλαμυδοσπόρια), για πολλά χρόνια (μέχρι και 10 χρόνια) απουσία ξενιστή και κάτω από αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον όλα σχεδόν τα είδη του γένους *Alternaria* έχουν την ικανότητα να μολύνουν καλλιέργειες σε μακρινές αποστάσεις στις οποίες μεταφέρονται μέσα ή πάνω στο σπόρο (Strandberg, 1992). Στη Φιλανδία (Valkonen & Koronen, 1990) η ζημιά που προκαλούν τα είδη *A. brassicae* και *A. brassicicola* σε νεαρά φυτάρια *Brassica* spp. οδήγησε στην εφαρμογή αυστηρών ελέγχων στους



σπόρους των παραπάνω φυτών με σκοπό τον εντοπισμό και την απόρριψη των προσβεβλημένων σπόρων. Στην περίπτωση του πρώιμου περονόσπορου, η πιστοποίηση του υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού (σπόρων τομάτας) έχει σκοπό τον περιορισμό του πρωτογενούς μολύσματος του παθογόνου. Έχει παρατηρηθεί ότι η επικάλυψη του σπόρου με μυκητοκτόνα όπως, thiram, benomyl ή iprodione, ή η επέμβαση με υγρή θερμότητα περιορίζουν την εξάπλωση της ασθένειας και μειώνουν το ποσοστό προσβολής σε χαμηλά επίπεδα (Strandberg, 1992). Γενικότερα στη Βιβλιογραφία αναφέρεται ότι τα καλώς ανεπτυγμένα φυτά παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανεκτικότητα σε ασθένειες που προκαλούνται από είδη του γένους *Alternaria*, σε σχέση με φυτά των οποίων η ανάπτυξη δεν είναι ικανοποιητική (Rotem, 1994). Ειδικότερα όσον αφορά το μύκητα *A. solani*, η αζωτούχος λίπανση αυξάνει την ανεκτικότητα των φυτών σε μολύνσεις του μύκητα και μπορεί να μειώσει τις εφαρμογές με μυκητοκτόνα (Barklay *et al.*, 1973). Η μέθοδος αυτή δεν εφαρμόζεται στην πράξη κυρίως λόγω των δυσμενών επιπτώσεων του αζώτου στα υπόγεια νερά (Blachinski *et al.*, 1996).

Χρησιμοποιώντας ειδικά υλικά κάλυψης σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες παρατηρήθηκε μείωση της έντασης προσβολής φυτών τομάτας από το μύκητα *A. solani* (Vakalounakis, 1991). Σύμφωνα με τα πειράματα αυτά η ποικιλία τομάτας Early Pak No7 καλλιεργήθηκε χωρίς μυκητοκτόνα τις περιόδους 1984-1985 και 1985-1986 σε πειραματικό θερμοκήπιο καλυμμένο με ειδικό πλαστικό κάλυψης (UVA-vinyl film) και σε θερμοκήπιο με απλό πλαστικό κάλυψης (CA-vinyl film). Στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου

διαπιστώθηκε ότι στο θερμοκήπιο με UVA-vinyl film το ποσοστό μόλυνσης μειώθηκε κατά 50% σε σχέση με το ποσοστό προσβολής στο απλό θερμοκήπιο (Vakalounakis, 1991).

Σύμφωνα με τους Παναγόπουλο (1995) και Jones *et al.*, (1993), η απολύμανση του εδαφικού υποστρώματος που χρησιμοποιείται στα σπορεία τομάτας με ένα απολυμαντικό εδάφους μπορεί να προστατεύσει τα νεαρά φυτάρια από μολύνσεις του μύκητα *A. solani*.

Η χρησιμοποίηση ανεκτικών ποικιλιών μπορεί επίσης να περιορίσει την ένταση της ασθένειας (Rotem, 1994). Τα άγρια είδη τομάτας αποτελούν τη μεγαλύτερη πηγή ανεκτικότητας στο μύκητα *A. solani*, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις το άγριο πρωτότυπο μιας ποικιλίας και οι αρχικοί γενότυποι των γονέων έχουν ξεχαστεί. Σε πρόσφατες μελέτες (Καλογεράκης, 1998, Βλουτογιου, 1999) όπου δοκιμάστηκαν ποικιλίες και υβρίδια τομάτας που καλλιεργούνται τα τελευταία χρόνια στην Ελλάδα, ως προς την αντοχή τους στην προσβολή από το μύκητα *A. solani*, διαπιστώθηκε ότι όλες οι ποικιλίες και τα υβρίδια ήταν ευπαθή στο παθογόνο. Δυστυχώς δεν υπάρχουν άλλες μελέτες στην Ελλάδα που να δίνουν στοιχεία ως προς το βαθμό ανθεκτικότητας των ποικιλιών ή υβριδίων τομάτας στις μολύνσεις του μύκητα *A. solani*. Ωστόσο διεθνώς έχουν παρατηρηθεί διαφορές μεταξύ διαφόρων ποικιλιών ως προς το βαθμό ανθεκτικότητάς τους στον πρώιμο περονόσπορο (Horsfall & Heuberger, 1942, Douglas & Pavek, 1972). Γενικά όμως έχει διαπιστωθεί ότι οι ποικιλίες και τα υβρίδια τομάτας που ωριμάζουν όψιμα είναι πιο ανεκτικά από τα πρώιμα.

### β) Βιολογικά μέτρα

Το στέλεχος 679-2 του βακτηρίου *Pseudomonas* sp. είναι ένας μοναδικός και υψηλά ανταγωνιστικός μικροοργανισμός που απομονώνεται συνήθως από το έδαφος. Εισαγωγή των κυττάρων του σε φυτά τομάτας, προκάλεσε μείωση στην ένταση του πρώιμου περονόσπορου που προκαλείται από το μύκητα *A. solani*. Επιπλέον η εφαρμογή του δεν είχε αρνητικές επιπτώσεις στα φυτά (Casida & Lukezic, 1992).

Εχει διαπιστωθεί επίσης ότι διηθήματα καλλιεργειών των βακτηρίων *Streptomyces pulcher* και *S. canescens* παρεμποδίζουν την *in vitro* βλάστηση των κονιδίων, την αύξηση του μυκηλίου και την παραγωγή κονιδίων του μύκητα *A. solani* (El-Abyad *et al.*, 1993). Οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι όταν τα παραπάνω είδη βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν ως επενδυτικά σπόρων τομάτας προστάτευσαν τα νεαρά φυτάρια από μολύνσεις του μύκητα *A. solani*.

### γ) Χημικά μέτρα

Οι τήξεις των φυταρίων που προκαλούνται από παθογόνα είδη του γένους *Alternaria* μπορεί να περιοριστούν με την επικάλυψη των σπόρων των φυτών με τα κατάλληλα μυκητοκτόνα (benomyl, iprodione, thiram) ή με χειρισμούς με υγρή θερμότητα πριν από τη φύτευσή τους. Επικάλυψη των σπόρων με iprodione βρέθηκε ότι περιορίζει την ένταση της ασθένειας σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Strandberg, 1992). Σε πειράματα κατά τα οποία έγινε επικάλυψη σπόρων λάχανου με το μυκητοκτόνο iprodione διαπιστώθηκε αύξηση της βλαστικότητας των σπόρων κατά 55% καθώς και του μεγέθους και του βάρους των παραγόμενων σπόρων (Maude & Humpherson-Jones,

1982).

Όσον αφορά τις εφαρμογές μυκητοκτόνων στο χωράφι, έχει διαπιστωθεί ότι αυτές δεν είναι απαραίτητες σε φυτά τα οποία διανύουν το στάδιο της καρποφορίας, επειδή σ' αυτό το στάδιο ανάπτυξής τους τα φυτά είναι σχετικώς ανεκτικά στην ασθένεια (Shtienberg *et al.*, 1995). Έτσι, η εφαρμογή του μυκητοκτόνου θα πρέπει να λαμβάνει χώρα μόνο κατά την είσοδο του φυτού στο στάδιο της ανθοφορίας όπου αυξάνεται η ευαισθησία του. Η συχνότητα των ψεκασμών μετά το στάδιο αυτό, θα πρέπει να προσδιορίζεται σύμφωνα με την ανθεκτικότητα του γονότυπου της ποικιλίας και την αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου σε συνδυασμό με το βαθμό ευπάθειας του φυτού σε κάθε στάδιο ανάπτυξής του (Shtienberg *et al.*, 1995).

Προστατευτικές (7 ημέρες πριν τη μόλυνση) και θεραπευτικές (1 ημέρα μετά τη μόλυνση) εφαρμογές με το μυκητοκτόνο difenoconazole σε φυτά τομάτας προκάλεσαν περιορισμό της μόλυνσης περίπου κατά 100% (Dahmen & Staub, 1992). Όταν η εφαρμογή του μυκητοκτόνου γινόταν 14 ημέρες πριν τη μόλυνση ο περιορισμός της ασθένειας δεν ήταν τόσο αποτελεσματικός όσο όταν η εφαρμογή γινόταν 7 ημέρες πριν. Εφαρμογή των μυκητοκτόνων δύο ημέρες μετά τη μόλυνση σταμάτησε την εξάπλωση της ασθένειας. Αντίθετα, εφαρμογές με mancozeb δεν είχαν αποτέλεσμα σε ήδη υπάρχουσες πληγές (Dahmen & Staub, 1992). Γενικά η προστατευτική δράση του difenoconazole εναντίον του μύκητα *A. solani* ήταν υψηλότερη από αυτή του mancozeb.

Ψεκασμοί καλλιέργειας πατάτας με το μυκητοκτόνο mancozeb για την

καταπολέμηση του πρώιμου περονόσπορου στην περιοχή της Πενσυλβάνια έδειξαν ότι τόσο το ποσοστό προσβεβλημένων φυτών, όσο και ο αριθμός των νεκρωτικών περιοχών ήταν μικρότερος όταν το μυκητοκτόνο εφαρμόστηκε πριν την ανθοφορία των φυτών (Christ & Maczuga, 1989).

Δοκιμές μυκητοκτόνων για την αντιμετώπιση του πρώιμου περονόσπορου της τομάτας έχουν γίνει και στην Ελλάδα. Σε πείραμα του Βακαλουνάκη (1987) διαπιστώθηκε ότι το chlorothalonil, το dichlofluanid καθώς και τα διθειοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα συμπεριλαμβανομένου του mancozeb, ήταν πιο αποτελεσματικά έναντι των λοιπών μυκητοκτόνων που δοκιμάστηκαν. Αντίθετα το iprodione δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Επίσης η εφαρμογή εβδομαδιαίων προληπτικών εφαρμογών κυρίως με διθειοκαρβαμιδικά ή φθαλιμίδια ή σουλφαμίδια ή chlorothalonil μόνα τους ή σε μείγματα με δικαρβοξιμιδικά ή βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, αντιμετώπισαν αποτελεσματικά τον πρώιμο περονόσπορο της τομάτας (Βακαλουνάκης, 1987).

Τα μυκητοκτόνα chlorothalonil και mancozeb δοκιμάστηκαν για την καταπολέμηση του πρώιμου περονόσπορου στην τομάτα και σε δύο άλλα πειράματα που έγιναν από τους Μαλαθράκης *et al.*, (1987). Στο πρώτο πείραμα διαπιστώθηκε ότι τα μυκητοκτόνα maneb, propineb και vinclozalin, όταν εφαρμόζονταν ανά 15 ημέρες, ήταν πιο αποτελεσματικά από τα chlorothalonil και mancozeb. Στο δεύτερο πείραμα μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων chlorothalonil, folpet, mancozeb, maneb, propineb και zineb, σε ψεκασμούς ανά 7ήμερο και ανά 15ήμερο. Όλα ήταν πιο αποτελεσματικά όταν εφαρμόζονταν ανά 7ήμερο. Κανένα από τα

χρησιμοποιούμενα μυκητοκτόνα δεν αύξησε την παραγωγή.

Σε πείραμα του Malathrakis (1983) εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα 12 μυκητοκτόνων για την αντιμετώπιση του μύκητα *A. alternata* f. sp. *lycopersici*. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων, τα οποία διεξήχθησαν τόσο σε συνθήκες αγρού, όσο και σε ελεγχόμενες συνθήκες, έδειξαν ότι κανένα από τα χρησιμοποιούμενα μυκητοκτόνα δεν περιόρισε την ασθένεια. Μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα μεταξύ των μυκητοκτόνων εμφάνισαν το dichlofluanid καθώς και το μίγμα 24% captafol και 56% folpet με εφαρμογή στο έδαφος σε ποσότητα 0,75 gr ανά φυτό. Αντίθετα το chlorothalonil και mancozeb δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα στον περιορισμό της εξάπλωσης της ασθένειας (Malathrakis, 1983).

Συστήματα προειδοποιήσεων χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση του μύκητα *A. solani* (Madden *et al.*, 1978). Ένα μοντέλο τέτοιου συστήματος το FAST (Forecasting Alternaria solani on Tomatoes) προβλέπει τις περιόδους εκείνες που είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη της ασθένειας του πρώιμου περονόσπορου. Οι παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη από το παραπάνω σύστημα είναι: α) κλιματολογικοί όπως π.χ η θερμοκρασία της ατμόσφαιρας, η ελεύθερη υγρασία που υπάρχει στα φύλλα των φυτών της καλλιέργειας, οι ώρες κατά τις οποίες η σχετική υγρασία της ατμόσφαιρας φτάνει σε τιμές μεγαλύτερες από 90% και η βροχόπτωση και β) η βιολογία του παθογόνου και η επιδημιολογία της ασθένειας. Ο συσχετισμός των παραπάνω παραγόντων και η ηλεκτρονική επεξεργασία τους, μπορεί να προσδιορίσει τις περιόδους εκείνες που οι συνθήκες είναι ευνοϊκές για την εμφάνιση και εξάπλωση της ασθένειας, καθώς και να καθορίσει τον

κατάλληλο χρόνο έναρξης των ψεκασμών (Madden *et al.*, 1978).

Σύμφωνα με τη διεθνή Βιβλιογραφία δεν έχει παρατηρηθεί ανθεκτικότητα του μύκητα *A. solani* σε κανένα από τα χρησιμοποιούμενα στην πράξη μυκητοκτόνα (mancozeb, iprodione, chlorothalonil, prochloraz). Αντίθετα σε περιπτώσεις άλλων ειδών του γένους *Alternaria* έχει αναφερθεί εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών μετά από συνεχή χρήση μυκητοκτόνων. Οι Huang & Levy (1995) σε πειράματα *in vitro* διαπίστωσαν εμφάνιση ανθεκτικών στο iprodione απομονώσεων του μύκητα *A. brassicicola*. Επίσης σε πειράματα του McPhee (1980) παρατηρήθηκαν ανθεκτικοί γόνοι του μύκητα *A. alternata* στο μυκητοκτόνο iprodione .

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Θρεπτικά υλικά ανάπτυξης

#### 1) V-8 άγαρ (χυμός οκτώ λαχανικών με άγαρ)

- V-8 juice ..... 165 ml
- CaCO<sub>3</sub> ..... 1 g
- Άγαρ (Difco) ..... 20 gr
- Απεσταγμένο νερό ..... 810 ml

Το pH του παραπάνω διαλύματος ρυθμιζόταν σε 6,5-7 με προσθήκη 0,1M KOH (12,5 ml/lit υλικού) πριν από την αποστείρωση του υλικού.

#### 2) PDA (Potato Dextrose Agar)

- PDA (Difco) ..... 39 gr
- Απεσταγμένο νερό ..... 1 lt

Τα παραπάνω θρεπτικά υλικά αποστειρώνονταν για 30' σε ειδικό κλίβανο αποστείρωσης (1,05 kg/cm<sup>2</sup>) και σε θερμοκρασία 120°C.

### 2.2. Υπόστρωμα ανάπτυξης φυτών

Το εδαφικό υπόστρωμα Klasmann Potgrond P (Germany) που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των φυτών τομάτας είχε την παρακάτω σύνθεση:



- N ..... 160-260 mg
- P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ..... 180-280 mg
- K<sub>2</sub>O ..... 200-300 mg
- MgO ..... 80-150 mg

Το pH του υποστρώματος ήταν 5,5-6,0.

### 2.3. Ανάπτυξη φυτών

Τα φυτά τομάτας που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανήκαν στην ποικιλία Ace 55VF. Για την ταχύτερη βλάστηση των σπόρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της προβλάστησης σε υγρό θάλαμο ως εξής: στη βάση γυάλινων τριβλίων (διάμετρος 9 mm) τοποθετήθηκαν 3 διηθητικά φίλτρα Whatman No1 εμποτισμένα με απεσταγμένο νερό. Ακολούθως στα τριβλία τοποθετήθηκαν οι σπόροι τομάτας, τα τριβλία σφραγίστηκαν με Parafilm και επωάστηκαν σε θερμοκρασία 25<sup>0</sup>C για 4 ημέρες. Κατόπιν, οι προβλαστημένοι σπόροι μεταφτεύτηκαν σε γλαστράκια διαστάσεων 9x11,5 cm (διάμετρος x ύψος). Τα γλαστράκια, τα οποία περιείχαν κομπόστα εδάφους (Klasmann Potgrond P), τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας (21±2<sup>0</sup>C) σχετικής υγρασίας (60-70%) και φωτισμού (12 ώρες φωτοπερίοδος). Η έξοδος των νεαρών φυταρίων από την επιφάνεια του εδάφους έγινε 3 περίπου ημέρες μετά τη φύτευση των προβλαστημένων σπόρων. Για τον εμπλουτισμό του υποστρώματος με στοιχεία κατάλληλα για τη θρέψη των φυτών προσθέταμε μια φορά κάθε εβδομάδα με το νερό του ποτίσματος, ποσότητα υγρού λιπάσματος Complesal 12-4-6 (περίπου 5 ml

ανά 5 lt νερού).

#### **2.4. Απομονώσεις του μύκητα**

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι μονόσπορες απομονώσεις AL24, AL25, AL29, AL61 και AL62 του μύκητα *A. solani*. Οι παραπάνω απομονώσεις προέρχονταν από φυσικά προσβεβλημένα φυτά τομάτας από τις περιοχές Τραγανό Ηλείας (AL24, AL61 και AL62,), Λογγά Μεσσηνίας (AL25) και Πρέβεζα (AL29) και απομονώθηκαν κατά τα έτη 1997 και 1998 σύμφωνα με την παρακάτω μέθοδο: τα φύλλα που παρουσίαζαν τυπικά συμπτώματα της ασθένειας (κηλιδώσεις), τοποθετήθηκαν σε υγρό θάλαμο (γυάλινα τριβλία στη βάση των οποίων υπήρχαν τρία φύλλα διηθητικό χαρτί Whatman No1 εμποτισμένο με απεσταγμένο νερό). Τα τριβλία σφραγίστηκαν με Parafilm για την αποφυγή απώλειας της υγρασίας και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας 21°C για 24 ώρες με σκοπό την παραγωγή κονιδίων από το μύκητα. Ακολούθως, οι κηλίδες εξετάστηκαν στο στερεοσκόπιο και κόνidia του μύκητα μεταφέρθηκαν, υπό ασηπτικές συνθήκες με τη βοήθεια μικροβιολογικής βελόνας, σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικό υλικό PDA (βλέπε παράγραφο 2.1.). Οι σωλήνες επωάστηκαν στους 21°C με σκοπό την περαιτέρω ανάπτυξη του μύκητα.

#### **2.5. Διατήρηση των απομονώσεων**

Είναι γνωστό από τη Βιβλιογραφία ότι ο μύκητας *A. solani* χάνει την ικανότητά του να παράγει κόνidia όταν μεταφέρεται διαδοχικά σε θρεπτικό

υλικό. Ως εκ τούτου, για τη διατήρηση των απομονώσεων του μύκητα εκμεταλλευτήκαμε την ικανότητά του να διαχειμάζει με τη μορφή μυκηλίου και κονιδίων στο έδαφος. Η διατήρηση των απομονώσεων για μεγάλο χρονικό διάστημα έγινε με την παρακάτω μέθοδο: μπουκαλάκια McCartney συμπληρώθηκαν κατά τα 2/3 του όγκου τους με μίγμα αργιλώδους εδάφους, κομπόστας και άμμου σε αναλογία 1:2:1. Σε κάθε μπουκαλάκι McCartney προστέθηκαν 4 ml απεσταγμένου νερού και ακολούθησε διπλή αποστείρωση (διάστημα μεταξύ των δύο αποστειρώσεων 24 ώρες) σε θερμοκρασία 120°C για 30 λεπτά κάθε φορά. Μετά από 24 ώρες από την τελευταία αποστείρωση σε κάθε McCartney τοποθετήθηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες δυο μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 5 mm ο καθένας. Οι μυκηλιακοί δίσκοι είχαν κοπεί με τη βοήθεια φελλοτρυπητή από την περιφέρεια της αποικίας της κάθε απομόνωσης. Όλες οι απομονώσεις είχαν αναπτυχθεί προηγουμένως σε τριβλία Petri με θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ σε θερμοκρασία 21°C και συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας και σκότους (12h NUV-light/12h σκότος). Κατόπιν έγινε επώαση των μπουκαλιών McCartney για περίπου 4 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τον πλήρη εποικισμό του εδαφικού μίγματος από το μυκήλιο της κάθε απομόνωσης. Αμέσως μετά τα μπουκαλάκια τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C όπου και διατηρήθηκαν μέχρι να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα για την παραγωγή μολυσμάτων του παθογόνου.

Η αναβίωση του μύκητα από τα μπουκαλάκια McCartney με τις καλλιέργειες των απομονώσεων γινόταν ως εξής: μια μικρή ποσότητα μολυσμένου χώματος απλωνόταν υπό ασηπτικές συνθήκες στην επιφάνεια

των τριβλίων που περιείχαν θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ. Αφού τα τριβλία σφραγίζονταν με Parafilm τοποθετούντο για επώαση σε θερμοκρασία 21°C και συνθήκες εναλλαγής σκότους με υπεριώδη ακτινοβολία (12h NUV-light/12h σκότος) για περίπου 4 ημέρες μέχρι την ικανοποιητική ανάπτυξη του μυκηλίου.

## 2.6. Παραγωγή μολύσματος

Για την παραγωγή μολύσματος ικανής ποσότητας για τις τεχνητές μολύνσεις των φυτών τομάτας ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: μικρή ποσότητα μολυσμένου χώματος διασκορπίστηκε υπό ασηπτικές συνθήκες από τα μπουκαλάκια McCartney σε τριβλία Petri και στη συνέχεια τα τριβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο υπεριώδους ακτινοβολίας (12h NUV-light/12h σκότος) σε θερμοκρασία 21°C για 4 ημέρες. Ακολούθως, από κάθε τριβλίο και απομόνωση, κόπηκαν με τη βοήθεια φελλοτρυπητή από την περιφέρεια της αποικίας, μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 5 mm. Στη συνέχεια οι δίσκοι τοποθετήθηκαν ανεστραμμένοι σε άλλα τριβλία με θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τριβλία σφραγίστηκαν με Parafilm και τοποθετήθηκαν για 9 περίπου ημέρες σε θάλαμο υπεριώδους ακτινοβολίας (12h NUV-light/12h σκότος) σε θερμοκρασία 21°C. Για την απελευθέρωση και παραλαβή των κονιδίων της κάθε απομόνωσης, σε κάθε τριβλίο τοποθετήθηκε ποσότητα περίπου 10 ml αποστειρωμένου νερού που περιείχε τον διαβρεχτικό παράγοντα Tween 80 (0,01%). Ακολούθως, με τη βοήθεια αποστειρωμένης μικροβιολογικής βελόνας, τρίφτηκε απαλά η επιφάνεια της

αποικίας του μύκητα ώστε να ελευθερωθούν τα κονίδια. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για το σύνολο των τριβλίων-επαναλήψεων και το αιώρημα κονιδίων της κάθε απομόνωσης συγκεντρώθηκε σε κωνική φιάλη. Στη συνέχεια το αιώρημα διηθήθηκε με τη βοήθεια τουλουπτανιού με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν μυκηλιακών υφών. Η συγκέντρωση των κονιδίων στο αιώρημα που προέκυψε μετρήθηκε με τη βοήθεια αιματοκυττομέτρου και αραιώθηκε με προσθήκη ποσότητας αποστειρωμένου-απιονισμένου νερού ώστε να προκύψει η επιθυμητή για κάθε απομόνωση συγκέντρωση κονιδίων ανά ml .

## **2.7. Μόλυνση φυτών**

Η τεχνητή μόλυνση των φυτών τομάτας γινόταν με ψεκάσμό των φυτών με αιώρημα κονιδίων του μύκητα, μέχρι πλήρους διαβροχής του φυλλώματος των φυτών. Τα φυτά ψεκάζονταν τόσο στην κάτω όσο και στην πάνω επιφάνεια των φύλλων. Η παραγωγή του μολύσματος γινόταν σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.6. Η συγκέντρωση του μολύσματος που χρησιμοποιείται κάθε φορά αναφέρεται στα επιμέρους πειράματα. Τα φυτά ψεκάζονταν με τη βοήθεια ψεκαστήρων χωρητικότητας 250 ml. Στη συνέχεια τα φυτά καλύπτονταν με διαφανείς πλαστικές σακούλες οι οποίες είχαν εσωτερικά ψεκαστεί με απεσταγμένο νερό έτσι ώστε να εξασφαλιστούν οι κατάλληλες συνθήκες υγρασίας για την μόλυνση (RH 100%) (Εικ. 8). Στη συνέχεια τα καλυμμένα φυτά τοποθετούντο



**Εικόνα 8.** Μέθοδος επώασης των φυτών τομάτας σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας (RH=100%) αμέσως μετά την τεχνητή μόλυνσή τους με αιώρημα κονιδίων του μύκητα *A. solani*.

σε δωμάτιο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας 21°C, σχετικής υγρασίας 60-70% και φωτισμού (12 ώρες φωτοπερίοδος). Μετά από 48 ή 72 ώρες, ανάλογα με το πείραμα, τα φυτά ξεσκεπάζονταν και παρέμεναν στο θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών μέχρι τη λήψη των αποτελεσμάτων.

## **2.8. Στατιστική ανάλυση**

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος για Η/Υ Statgraphics 5.2 Plus εφαρμόζοντας ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) και διαχωρισμό των μέσων με τη δοκιμή κατά Duncan.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΓΡΑΜΜΙΚΗ ΑΥΞΗΣΗ ΜΥΚΗΛΙΟΥ  
ΚΑΙ *IN VITRO* ΠΑΡΑΓΩΓΗ  
ΚΟΝΙΔΙΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ  
ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *A. SOLANI***

### **3.1. Σκοπός**

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη πέντε μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* ως προς την *in vitro* γραμμική αύξηση του μυκηλίου τους και την παραγωγή κονιδίων.

### **3.2. Υλικά και Μέθοδοι**

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι μονόσπορες απομονώσεις AI24, AI25, AI29, AI61 και AI62, του μύκητα *A. solani*. Για τη μελέτη της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου τους χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω μέθοδος: αρχικά οι απομονώσεις μεταφέρθηκαν από τη συλλογή (μπουκαλάκια McCartney) σε τριβλία Petri με θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ (βλέπε Γενικά Υλικά και Μέθοδοι παράγραφος 2.6.), τα οποία ακολούθως επώαστηκαν σε θερμοκρασία 21°C και σε συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος) για 4 ημέρες. Ακολούθως, από την περιφέρεια της αναπτυσσόμενης αποικίας της κάθε απομόνωσης κόπηκαν με τη βοήθεια φελλοτρυπητή μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 5 mm οι οποίοι τοποθετήθηκαν



ανεστραμμένοι (το μυκήλιο σε επαφή με την επιφάνεια του υλικού) και κάτω από ασηπτικές συνθήκες στο κέντρο τριβλίων Petri που περιείχαν θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ (20ml/τριβλίο). Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν πέντε τριβλία (επαναλήψεις). Τα τριβλία κλείστηκαν με Parafilm και επωάστηκαν σε θερμοκρασία 21°C και σε συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος). Η μέτρηση της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου της κάθε απομόνωσης άρχισε 24 ώρες μετά τη μόλυνση των τριβλίων και συνολικά έγιναν 8 μετρήσεις σε διάστημα 10 ημερών. Ο υπολογισμός της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου γινόταν με μέτρηση της διαμέτρου της αποικίας σε cm και σε δύο κατευθύνσεις, εύρεση του μέσου όρου των δύο αυτών τιμών και αφαίρεση της σταθεράς τιμής 0,5 cm (διάμετρος του δίσκου του αρχικού μολύσματος) σύμφωνα με τον τύπο:

$$x = [(\delta_1 + \delta_2) / 2] - y$$

Όπου: x = γραμμική αύξηση μυκηλίου (cm),

$\delta_1$  &  $\delta_2$  = κάθετοι διάμετροι αποικίας (cm), και

y = σταθερά ίση με τη διάμετρο του δίσκου του αρχικού μολύσματος.

Ακολούθως τα παραπάνω τριβλία χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της *in vitro* παραγωγής κονιδίων από τις απομονώσεις AI24, AI25, AI29, AI61 και AI62 του μύκητα *A. solani*. Η μέτρηση του αριθμού των παραγόμενων κονιδίων ανά μονάδα επιφάνειας (cm<sup>2</sup>) της αποικίας της κάθε απομόνωσης του μύκητα έγινε 21 ημέρες μετά τη μόλυνση των τριβλίων. Κατά το διάστημα αυτό τα τριβλία επωάζονταν σε θερμοκρασία 21°C και σε συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος).

Από κάθε τριβλίο και απομόνωση (σύνολο πέντε τριβλίων ανά απομόνωση) κόπηκαν με τη βοήθεια φελλοτρυπητή και κάτω από ασηπτικές συνθήκες δύο μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 1,6 cm έκαστος. Στη συνέχεια οι δύο δίσκοι της κάθε απομόνωσης τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα μπουκαλάκια McCartney που περιείχαν 10 ml αποστειρωμένο-απιονισμένο νερό στο οποίο είχαν προστεθεί 0,01 ml του διαβρεκτικού παράγοντα Tween 80 (0,01%). Τα μπουκαλάκια ανακινήθηκαν πολύ καλά με σκοπό την απελευθέρωση των κονιδίων του μύκητα από τους μυκηλιακούς δίσκους και η συγκέντρωση των κονιδίων στο κάθε αιώρημα μετρήθηκε με τη βοήθεια αιματοκυτόμετρου. Κατόπιν, έγινε αναγωγή της συγκέντρωσης κονιδίων/ml του κάθε αιωρήματος στη μονάδα επιφανείας της αποικίας από την οποία προήλθαν τα κονίδια σύμφωνα με τον τύπο:

$$x = y z / 2\alpha$$

Όπου: x = αριθμός παραγόμενων κονιδίων ανά cm<sup>2</sup> επιφανείας της αποικίας,

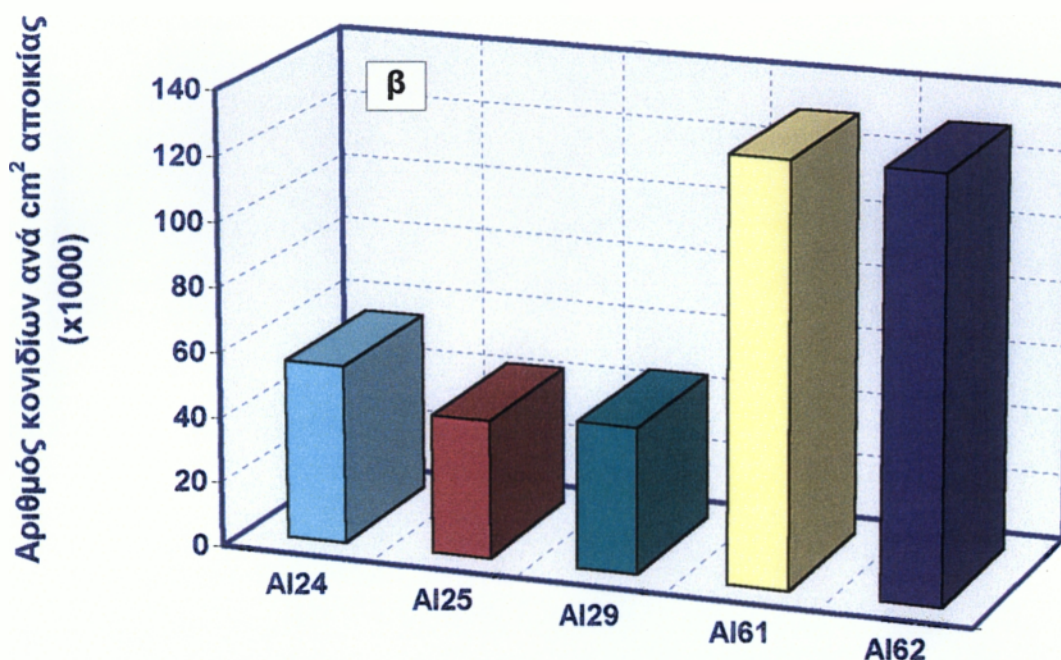
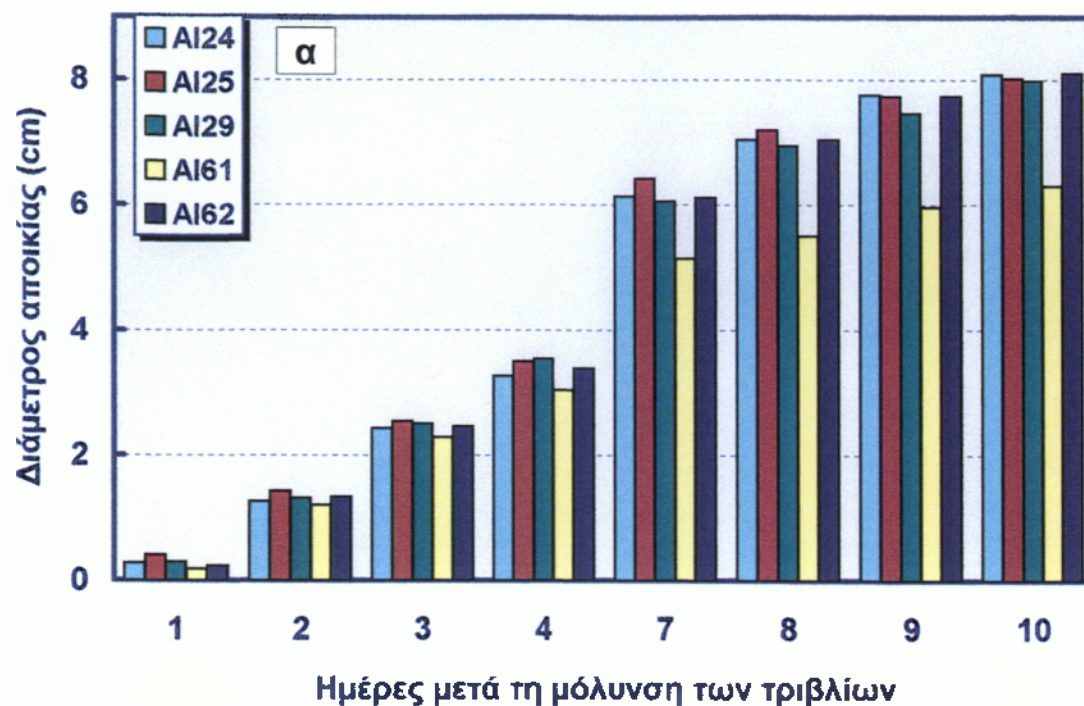
y = αριθμός κονιδίων/ml αιωρήματος,

z = όγκος αιωρήματος (ml), και

α = εμβαδό μυκηλιακού δίσκου (cm<sup>2</sup>)

### 3.3. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι τόσο η γραμμική αύξηση του μυκηλίου όσο και η παραγωγή κονιδίων *in vitro* των απομονώσεων του μύκητα *A. solani* εξαρτιόταν από την απομόνωση (Εικ. 9). Πιο συγκεκριμένα,



**Εικόνα 9.** Γραμμική αύξηση μυκηλίου (cm) σε θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ (α) και αριθμός παραγομένων κονιδίων ανά cm<sup>2</sup> αποικίας (β) πέντε μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* μετά από επώαση σε θερμοκρασία 21<sup>0</sup>C και συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος). Η μέτρηση του αριθμού των παραγομένων κονιδίων έγινε μετά από 10 ημέρες επώασής τους στις παραπάνω συνθήκες. Γραμμική αύξηση μυκηλίου: SED (184 d.f.)=0,31. Αριθμός παραγομένων κονιδίων: SED (16 d.f.)=1,81.

διαπιστώθηκε ότι η *in vitro* γραμμική αύξηση του μυκηλίου όλων των απομονώσεων, αυξανόταν αυξανόμενου του χρόνου επώασης από 1 έως 10 ημέρες μετά τη μόλυνση των τριβλίων (Εικ. 9α). Εντούτοις, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0,05$ ) όσον αφορά τη γραμμική αύξηση του μυκηλίου 9 και 10 ημέρες μετά τη μόλυνση των τριβλίων. Η απομόνωση AL61 είχε για όλες τις μετρήσεις τη μικρότερη ανάπτυξη στο θρεπτικό υλικό από όλες τις άλλες απομονώσεις που δοκιμάστηκαν και η διάμετρος της αποικίας της κυμάνθηκε από 0,68 cm (1 ημέρα μετά τη μόλυνση), έως 6,8 cm (10 ημέρες μετά τη μόλυνση). Η απομόνωση AL25 παρουσίασε την μεγαλύτερη ανάπτυξη σε σχέση με όλες τις άλλες απομονώσεις. Έτσι οι τιμές των μετρήσεων της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου της απομόνωσης AL25 κυμάνθηκαν από 0,91 cm (1 ημέρα μετά τη μόλυνση) έως 8,52 cm 10 ημέρες μετά τη μόλυνση. Οι απομονώσεις AL24, AL29 και AL62 δεν παρουσίασαν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικές ( $P > 0,05$ ) διαφορές ως προς τη γραμμική αύξησή του μυκηλίου τους η οποία κυμαινόταν ανάλογα με την απομόνωση από 0,73-0,8 cm (1 ημέρα μετά τη μόλυνση), έως 8,48-8,6 cm (10 ημέρες μετά τη μόλυνση) (Εικ. 9α).

Όσον αφορά την *in vitro* παραγωγή κονιδίων 21 ημέρες μετά τη μόλυνση των τριβλίων και επώασής τους σε συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος), διαπιστώθηκε ότι οι απομονώσεις AL24, AL25 και AL29 δεν είχαν μεταξύ τους σημαντική ( $P > 0,05$ ) διαφορά στον αριθμό των παραγομένων κονιδίων (Εικ. 9β). Ο αριθμός των κονιδίων για αυτές τις απομονώσεις ήταν  $55 \times 10^3$ ,  $42,5 \times 10^3$  και  $45 \times 10^3$  κονίδια/cm<sup>2</sup> αποικίας αντίστοιχα. Αντίθετα, οι απομονώσεις AL61 και AL62 παρήγαγαν πολύ μεγαλύτερο αριθμό κονιδίων

( $13 \times 10^4$  κόνιδια/cm<sup>2</sup> αποικίας) και διέφεραν στατιστικά σημαντικά ( $P > 0,05$ ) από τις υπόλοιπες απομονώσεις του μύκητα (Εικ. 9β).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΔΟΚΙΜΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *A. SOLANI*

### 4.1. Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες της παθογένειας πέντε μονόσπορων απομονώσεων (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62) του μύκητα *A. solani* σε φυτά τομάτας της ποικιλίας Ace 55VF.

### 4.2. Υλικά και Μέθοδοι

Η ανάπτυξη των φυτών (cv. Ace 55VF) έγινε σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ , σχετικής υγρασίας 60-70% και φωτοπεριόδου 12 ωρών, μέχρι το στάδιο των επτά πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων (ηλικία φυτών 40 ημέρες), σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στα Γενικά Υλικά και Μέθοδοι (παράγραφος 2.3.).

Η προετοιμασία του μολύσματος έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται στην παράγραφο 2.6. (Γενικά Υλικά και Μέθοδοι) και η τελική συγκέντρωση του αιωρήματος κονιδίων της κάθε απομόνωσης υπολογίστηκε με τη βοήθεια αιματοκυτομέτρου και μετά από διαδοχικές αραιώσεις σε  $5 \times 10^3$  κονίδια/ml. Η τεχνητή μόλυνση των φυτών έγινε με ψεκασμό τόσο της πάνω όσο και της κάτω επιφάνειας των φύλλων με αιώρημα κονιδίων της κάθε

απομόνωσης. Ο όγκος του αιωρήματος κονιδίων που χρησιμοποιήθηκε για κάθε φυτό ξεχωριστά ήταν 25 ml και για κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν 5 φυτά (επαναλήψεις). Τα φυτά-μάρτυρες ψεκάστηκαν με απεσταγμένο νερό. Αμέσως μετά τη μόλυνση, όλα τα φυτά καλύφθηκαν για 48 ώρες με διαφανείς πλαστικές σακούλες που είχαν ψεκαστεί εσωτερικά με απεσταγμένο νερό για τη δημιουργία συνθηκών ευνοϊκών (RH 100%) για τη μόλυνση και παρέμειναν στο θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών μέχρι τη λήψη των αποτελεσμάτων.

Η λήψη των αποτελεσμάτων έγινε 2, 5, 8, 13, 16, 20 και 23 ημέρες μετά τη μόλυνση. Εκτιμήθηκε: α) το ποσοστό των φυτών με συμπτώματα (συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας), β) το συνολικό ποσοστό της επιφάνειας κάθε φύλλου (σύνολο 7 φύλλων ανά φυτό) που παρουσίαζε συμπτώματα (ένταση ασθένειας), γ) το ποσοστό των φυτών που εμφάνιζαν συμπτώματα στο βλαστό, τους μίσχους των φύλλων και τα άνθη και δ) το ποσοστό της φυλλόπτωσης ανά φυτό υπολογιζόμενο σε σχέση με τον αριθμό των φύλλων που είχαν μολυνθεί αρχικά (7 φύλλα ανά φυτό).

### **4.3. Αποτελέσματα**

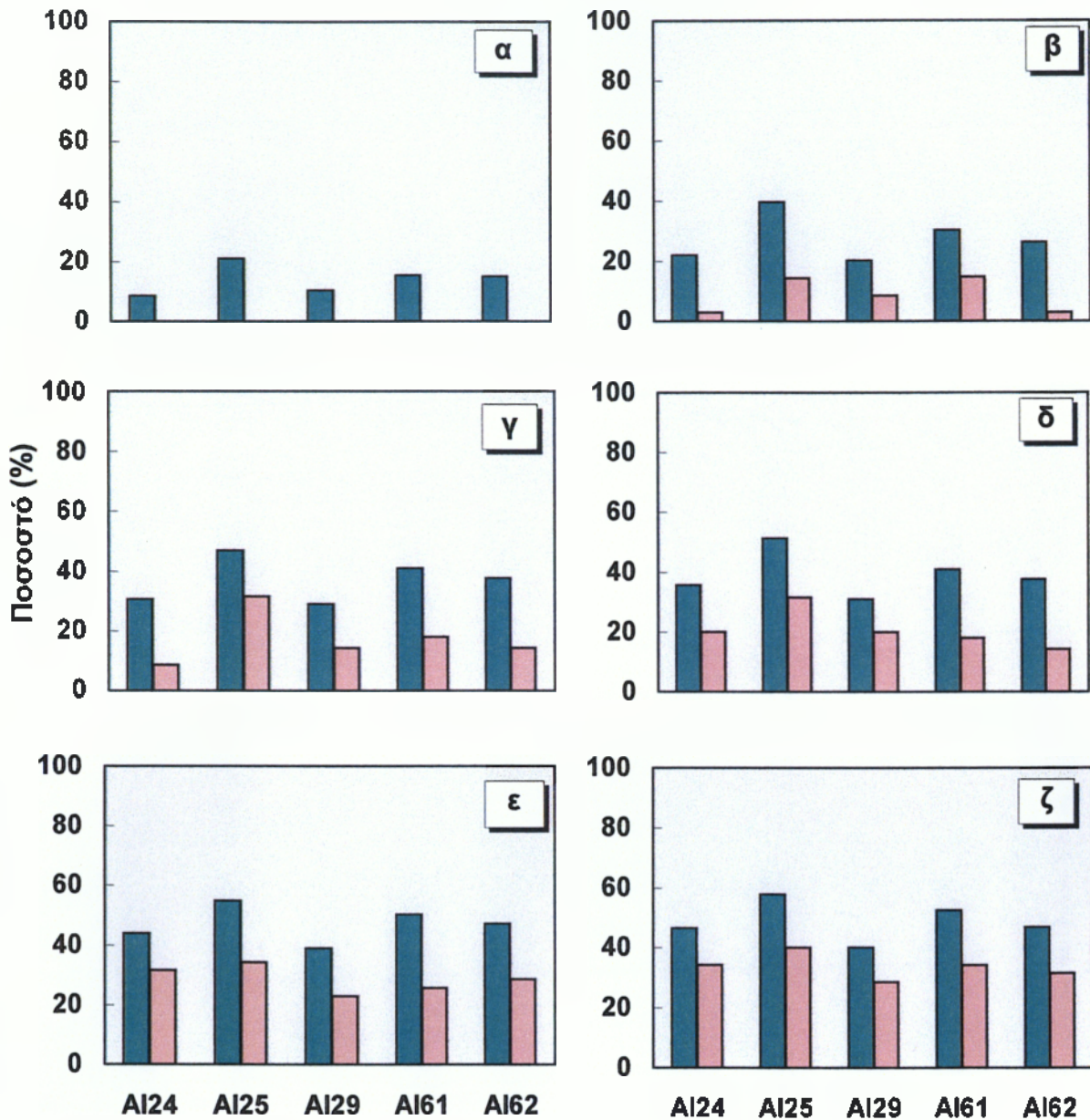
Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι η μόλυνση φυτών τομάτας (cv. Ace 55VF) σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών εξαρτάται από την απομόνωση του μύκητα. Στις παραπάνω συνθήκες, τα πρώτα συμπτώματα της προσβολής φυτών από το παθογόνο εμφανίστηκαν 3 ημέρες μετά τη μόλυνση. Το ποσοστό των

προσβεβλημένων φυτών (συχνότητα ασθένειας) ήταν 100% στα φυτά που μολύνθηκαν με τις απομονώσεις AL25, AL61 και AL62 και 0% στα φυτά που μολύνθηκαν με τις απομονώσεις AL24 και AL29 (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται σε γραφική παράσταση). Με την πάροδο του χρόνου όμως και 5 ημέρες μετά τη μόλυνση όλα τα φυτά (ποσοστό 100%) εμφάνιζαν συμπτώματα της ασθένειας, ανεξάρτητα από την απομόνωση με την οποία μολύνθηκαν.

Όσον αφορά την ένταση της ασθένειας (ποσοστό προσβεβλημένης φυλλικής επιφάνειας), διαπιστώθηκε ότι αυτή αυξανόταν με την πάροδο του χρόνου από τη μόλυνση των φυτών και ανεξάρτητα από την απομόνωση που χρησιμοποιήθηκε (Εικ. 10). Πιο συγκεκριμένα, ενώ το ποσοστό της προσβεβλημένης φυλλικής επιφάνειας 5 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών, κυμαινόταν από 8,5-21% (ανάλογα με την απομόνωση), 23 ημέρες μετά τη μόλυνση κυμαινόταν, από 40-58% (Εικ. 10). Εικοσιπέντε ημέρες μετά τη μόλυνση, το μεγαλύτερο ποσοστό (58%) φυλλικής επιφάνειας με συμπτώματα παρουσίαζαν τα φυτά που μολύνθηκαν με την απομόνωση AL25 και το μικρότερο (40%), τα φυτά που μολύνθηκαν με την απομόνωση AL29. Οι εντάσεις της ασθένειας στα φυτά που μολύνθηκαν με τις απομονώσεις AL24, AL61 και AL62 κυμαίνονταν από 46% έως 53% και δεν διέφεραν σημαντικά ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους.

Η στατιστική επεξεργασία που έγινε για το σύνολο των μετρήσεων (5, 8, 13, 16, 20 και 23 ημέρες μετά τη μόλυνση) έδειξε ότι την μεγαλύτερη ένταση προσβολής προκάλεσε η απομόνωση AL25 και τη μικρότερη η απομόνωση AL29. Επιπλέον η ένταση προσβολής των φυτών που



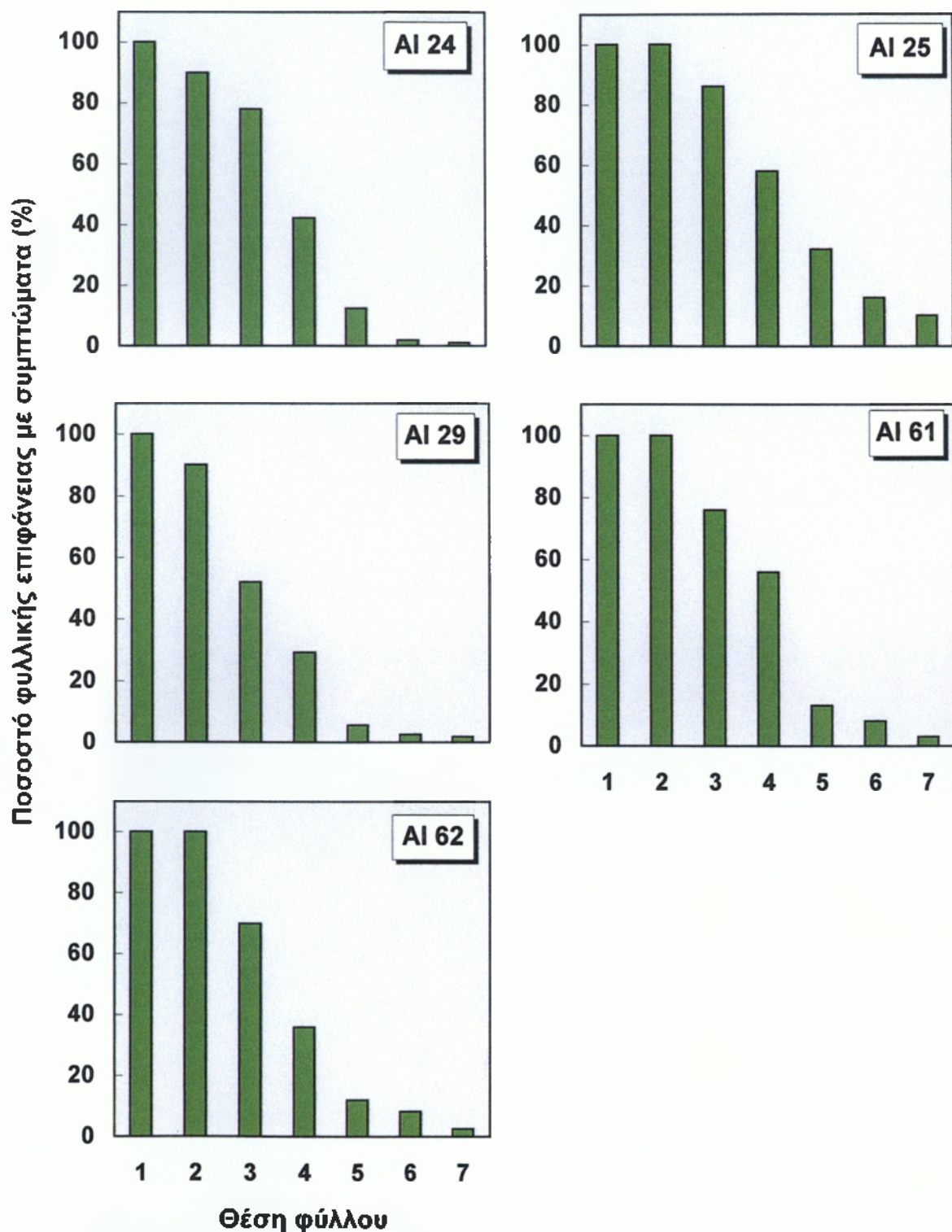


**Εικόνα 10.** Ποσοστό φυλλικής επιφάνειας με συμπτώματα (ένταση της ασθένειας) (■) και ποσοστό φυλλόπτωσης (■) σε φυτά τομάτας (ποικ. Ace 55VF), 5 (α), 8 (β), 13 (γ), 16 (δ), 20 (ε) και 23 (ζ) ημέρες μετά τη μόλυσή τους με αιώρημα κονιδίων συγκέντρωσης  $5 \times 10^3$  κονίδια/ml πέντε μονόσπορων απομονώσεων (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62) του μύκητα *A. solani* σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών. Ένταση ασθένειας: SED (1024 d.f.)=11,26. Φυλλόπτωσηση: SED (112 d.f.)=6,17.

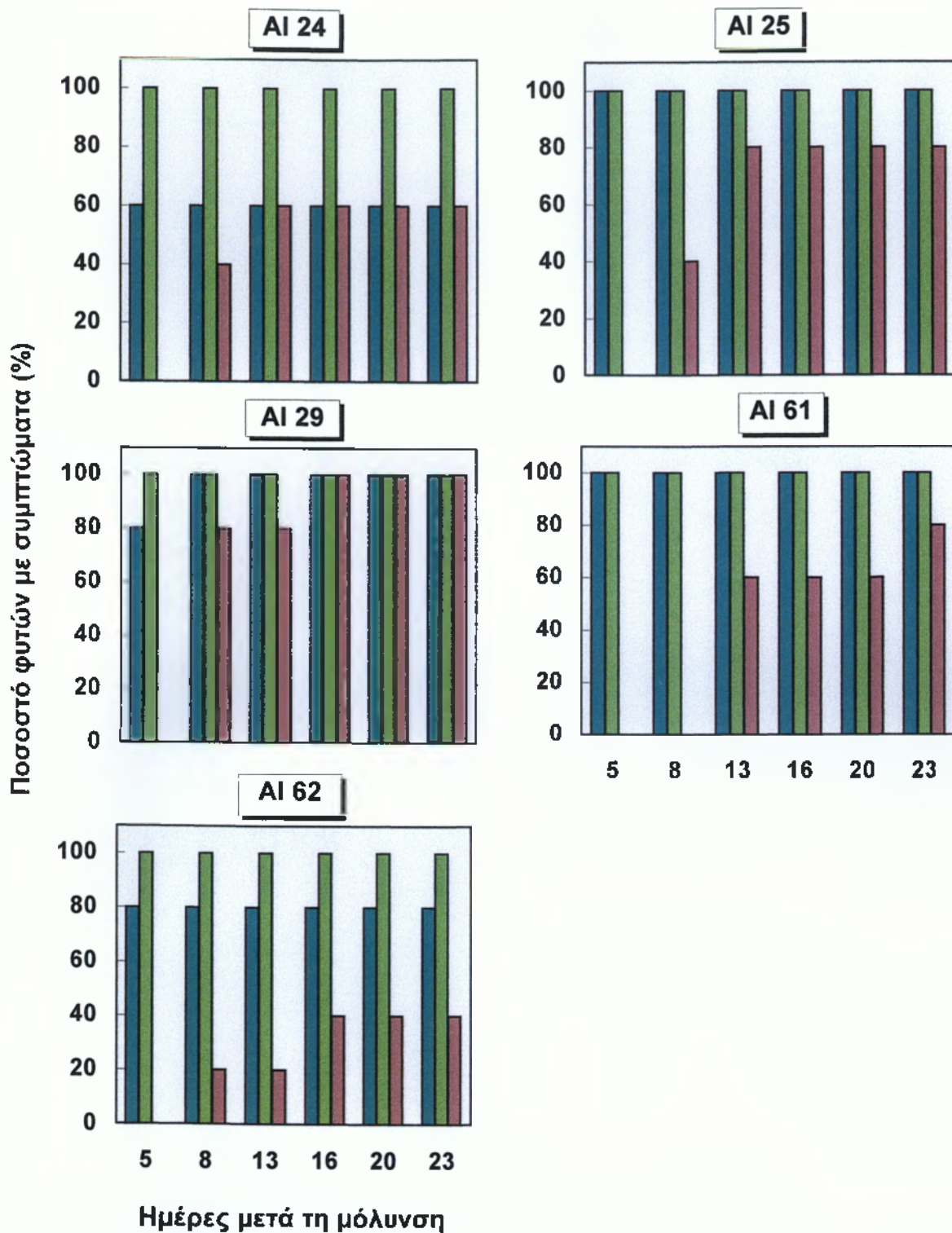
μολύνθηκαν με την απομόνωση AL24 ενώ ήταν μεγαλύτερη, εντούτοις δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά ( $P > 0,05$ ) από εκείνη των φυτών που μολύνθηκαν με την απομόνωση AL29. Τέλος οι εντάσεις της ασθένειας στα φυτά που μολύνθηκαν με τις απομονώσεις AL61 και AL62 δεν διέφεραν σημαντικά στατιστικά μεταξύ τους ( $P > 0,05$ ).

Η προσβολή των φύλλων των φυτών παρουσίαζε διαφορές όχι μόνο ανάλογα με την απομόνωση του μύκητα αλλά και με τη θέση του φύλλου (ηλικία φύλλου) πάνω στο φυτό (Εικ. 11). Στα κατώτερα, γηραιότερα φύλλα οι κηλίδες λόγω προσβολής ήταν μεγαλύτερες τόσο σε αριθμό όσο και σε μέγεθος. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για όλες τις μετρήσεις (5, 8, 13, 16, 20 και 23 ημέρες) έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής (75-82%) παρουσίαζαν τα δύο πρώτα φύλλα (μετρώντας από τη βάση του φυτού) (Εικ. 11). Τα ποσοστά προσβολής του 3<sup>ου</sup>, 4<sup>ου</sup> και 5<sup>ου</sup> φύλλου ήταν 47%, 27,5% και 10% αντίστοιχα και διέφεραν στατιστικά ( $P > 0,05$ ) όχι μόνο μεταξύ τους αλλά και από τα ποσοστά προσβολής των δύο πρώτων φύλλων. Τέλος, τα ποσοστά προσβολής του 6<sup>ου</sup> και 7<sup>ου</sup> φύλλου ήταν περίπου 6% και 3% αντίστοιχα και ενώ δεν διέφεραν μεταξύ τους, διέφεραν σημαντικά ( $P > 0,05$ ) από τα ποσοστά προσβολής των υπόλοιπων φύλλων (Εικ. 11).

Πέντε ημέρες μετά τη μόλυνση συμπτώματα εμφανίστηκαν στους βλαστούς και στους μίσχους των φυτών, ενώ σε κανένα από τα φυτά δεν διαπιστώθηκαν συμπτώματα στα άνθη (Εικ. 12). Το ποσοστό προσβολής των μίσχων ήταν 100% ανεξάρτητα από την απομόνωση. Αντίθετα το ποσοστό προσβολής των βλαστών των φυτών εξαρτάτο από την



**Εικόνα 11.** Ποσοστό φυλλικής επιφάνειας με συμπτώματα ανάλογα με τη θέση (ηλικία) των φύλλων φυτών τομάτας (ποικ. Ace 55VF), 23 ημέρες μετά τη μόλυνσή τους με αιώρημα κονιδίων συγκέντρωσης  $5 \times 10^3$  κονίδια/ml πέντε μονόσπορων απομονώσεων (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62) του μύκητα *A. solani* σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών. 1: γηραιότερο, 7: νεότερο φύλλο. SED (159 d.f.)=9,58.



**Εικόνα 12.** Ποσοστό φυτών τομάτας (ποικ. Ace 55VF) με συμπτώματα προσβολής από το μύκητα *A. solani* σε βλαστούς (■), μίσχους φύλλων (■) και άνθη (■). Τα φυτά είχαν μολυνθεί τεχνητά με αιώρημα κονιδίων συγκέντρωσης  $5 \times 10^3$  κονίδια/ml πέντε μονόσπορων απομονώσεων (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62) του μύκητα *A. solani* σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών. SED (159 d.f.)=9,58.

απομόνωση και ήταν 60% (AL24), 80% (AL29, AL62) και 100% (AL25, AL61). Τα πρώτα συμπτώματα στα άνθη εμφανίστηκαν 8 ημέρες μετά τη μόλυνση στα φυτά που είχαν μολυνθεί τεχνητά με τις απομονώσεις AL24, AL25, AL29 και AL62. Αντίθετα, στα φυτά που μολύνθηκαν με την απομόνωση AL61 τα πρώτα συμπτώματα προσβολής των ανθέων εμφανίστηκαν 13 ημέρες μετά μόλυνση. Με την πάροδο του χρόνου τα ποσοστά των φυτών που εμφάνιζαν συμπτώματα στους βλαστούς, τους μίσχους των φύλλων και τα άνθη αυξάνονταν και 23 ημέρες μετά τη μόλυνση τα ποσοστά αυτά ήταν (ανάλογα με την απομόνωση) 60-100%, 100% και 40-100%, αντίστοιχα (Εικ. 12).

Όσον αφορά το ποσοστό φυλλόπτωσης διαπιστώθηκε ότι εξαρτάτο από την απομόνωση και ήταν ανάλογο με την ένταση της ασθένειας (ποσοστό προσβεβλημένης φυλλικής επιφάνειας) (Εικ. 10). Πιο συγκεκριμένα, φυλλόπτωση άρχισε να εμφανίζεται 8 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών και το ποσοστό των πεσμένων φύλλων κυμαινόταν από 3% (φυτά που μολύνθηκαν με τις απομονώσεις AL24 και AL62) έως 15% (φυτά που μολύνθηκαν με την απομόνωση AL61). Με την πάροδο του χρόνου και αυξανόμενη της έντασης της ασθένειας, αυξανόταν και το ποσοστό φυλλόπτωσης. Εικοσιπέντε ημέρες μετά τη μόλυνση το μεγαλύτερο ποσοστό φυλλόπτωσης (40%) εμφάνισαν τα φυτά που μολύνθηκαν με την απομόνωση AL25 και το μικρότερο (29%) τα φυτά που μολύνθηκαν με την απομόνωση AL29 (Εικ. 10).

Εντούτοις η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων όλων των μετρήσεων (5, 8, 13, 16, 20 και 23 ημέρες) έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό

φυλλόπτωσης εμφάνισαν τα φυτά που μολύνθηκαν με την απομόνωση AL25. Το ποσοστό αυτό διέφερε σημαντικά ( $P > 0,05$ ) από εκείνα των φυτών που μολύνθηκαν με τις υπόλοιπες απομονώσεις. Επιπλέον, τα ποσοστά φυλλόπτωσης των φυτών που μολύνθηκαν με τις απομονώσεις AL24, AL29, AL61 και AL62 δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ *IN VITRO*

### 5.1. Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν ο έλεγχος του βαθμού ευαισθησίας των πέντε μονόσπορων απομονώσεων AL24, AL25, AL29, AL61, AL62 του μύκητα *A. solani* στα μυκητοκτόνα mancozeb, chlorothalonil, iprodione, prochloraz και azoxystrobin, με βάση τον προσδιορισμό της τιμής ED<sub>50</sub> της συγκέντρωσης δηλαδή του κάθε μυκητοκτόνου που παρεμποδίζει κατά 50% τη γραμμική αύξηση του μυκηλίου του μύκητα.

### 5.2. Υλικά και Μέθοδοι

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι μονόσπορες απομονώσεις AL24, AL25, AL29, AL61, AL62 του μύκητα *A. solani*. Οι απομονώσεις μεταφέρθηκαν από τη συλλογή (μπουκαλάκια McCartney) σε τριβλία Petri με θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ (βλέπε Γενικά Υλικά και Μέθοδοι, παράγραφος 2.6.), τα οποία ακολούθως επώαστηκαν σε θερμοκρασία 21<sup>o</sup>C και σε συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος) για 4 ημέρες. Ακολούθως, από την περιφέρεια της αναπτυσσόμενης αποικίας της κάθε απομόνωσης κόπηκαν με τη βοήθεια φελλοτρυπητή μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 5 mm οι οποίοι τοποθετήθηκαν ανεστραμμένοι

(το μυκήλιο σε επαφή με την επιφάνεια του υλικού) και κάτω από ασηπτικές συνθήκες στο κέντρο τριβλίων Petri που περιείχαν θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ (20ml/τριβλίο). Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν πέντε τριβλία (επαναλήψεις). Τα τριβλία κλείστηκαν με Parafilm και επωάστηκαν σε θερμοκρασία 21°C και σε συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας με σκότος (12h NUV-light/12h σκότος). Μετά την πάροδο 7 ημερών και την πλήρη ανάπτυξη της αποικίας του μύκητα στα τριβλία, κόπηκαν από την περιφέρεια της αποικίας της κάθε απομόνωσης με τη βοήθεια φελλοτρυπητή μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 5 mm οι οποίοι τοποθετήθηκαν ανεστραμμένοι σε νέα τριβλία Petri τα οποία περιείχαν θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ στο οποίο προηγουμένως είχαν προστεθεί τα μυκητοκτόνα mancozeb, chlorothalonil, iprodione, prochloraz και azoxystrobin (Πίνακας 2) στις παρακάτω συγκεντρώσεις:

- α) mancozeb (Trimanoc 75 WG): 5, 10, 20, 40 και 80 ppm.
- β) mancozeb (Pennfluid 42 SC): 5, 10, 20, 40 και 80 ppm.
- γ) chlorothalonil (Daconil 75 WP): 0,1, 1, 10, 100 και 1000 ppm.
- δ) iprodione (Rovral 50 WP): 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, και 1 ppm.
- ε) prochloraz (Octave 50 WP): 0,001, 0,01, 0,02, 0,04 και 0,08 ppm.
- ζ) azoxystrobin (Quadris 25 SC): 0,1, 1, 10, 100 και 1000 ppm.

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα τριβλία (επαναλήψεις) ανά συγκέντρωση μυκητοκτόνου. Τα τριβλία-μάρτυρες περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό V-8 άγαρ. Τα τριβλία στη συνέχεια κλείστηκαν με Parafilm και επωάστηκαν σε θερμοκρασία 21°C στο σκοτάδι. Η μέτρηση της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου των απομονώσεων έγινε 3 ημέρες μετά τη μόλυνση



των τριβλίων και βασίστηκε στη μέτρηση της διαμέτρου των αποικιών σε cm. Ακολούθως από την κάθε τιμή αφαιρέθηκε η σταθερά 0,5 cm που αντιστοι-

**Πίνακας 2:** Μυκητοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της αποτελεσματικότητάς τους εναντίον του μύκητα *A. solani*.

Δραστική ουσία	Εμπορικό όνομα	Τρόπος δράσης*	Αντιπρόσωπος	Συνιστώμενη δόση
<b>chlorothalonil</b> (φαινυλική ένωση)	Daconil 2787 75WP	Π	Zeneca Hellas A.E.	200-250 gr/100 lt
<b>mancozeb</b> (διθειοκαρβαμιδικό)	α)Pennfluid 42SC β)Trimanoc 75WG	Π	ΑΛΦΑ ΑΛΦΑ	350-450 cm <sup>3</sup> /100 lt 180-250 gr/100 lt
<b>prochloraz</b> (ιμιδαζολικό)	Octave 50WP	Δ	AgriEvo Ελλάς ΑΒΕΕ	50-100 gr/100 lt
<b>iprodione</b> (δικαρβοξιμιδικό)	Rovral 50WP	Π	Phone-Poulenc	150 gr/100 lt
<b>azoxystrobin</b> (στρομπιλουρίνη)	Quadris 25SC	Π	Zeneca Hellas A.E.	1 cm <sup>3</sup> /lt

\* Π : προστατευτικό, Δ : διασυστηματικό μυκητοκτόνο.

-χούσε στη διάμετρο του μολύσματος (μυκηλιακού δίσκου) και υπολογίστηκε το ποσοστό παρεμπόδισης της αύξησης του μυκηλίου σε σχέση με το μάρτυρα, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$y = 100 - (a/c) \times 100$$

όπου: y = ποσοστό παρεμπόδισης (%)

$a$  = ανάπτυξη αποικίας στο μυκητοκτόνο (cm)

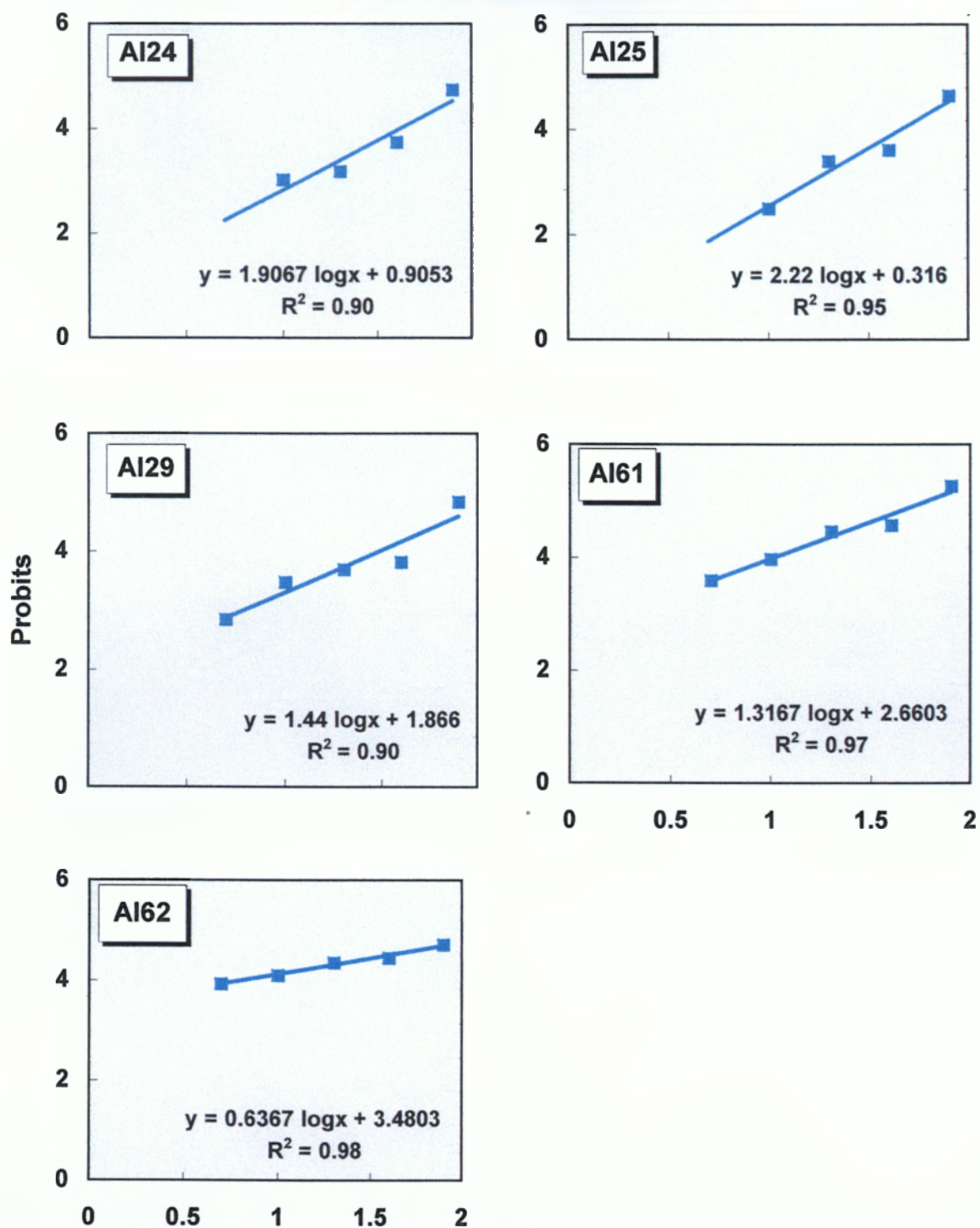
$c$  = ανάπτυξη αποικίας στο μάρτυρα (cm)

Κατόπιν, έγινε μετατροπή των ποσοστών παρεμπόδισης σε τιμές probits. Για την εύρεση της τιμής  $ED_{50}$  του κάθε μυκητοκτόνου, τοποθετήσαμε στον άξονα των  $x$  τον δεκαδικό λογάριθμο των συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου και στον άξονα των  $y$  τα ποσοστά παρεμπόδισης σε probits. Ακολούθως, υπολογίστηκε σε ηλεκτρονικό υπολογιστή η ευθεία της παλινδρόμησης (regression line) των σημείων με τη βοήθεια του προγράμματος Excel 5.0. Τέλος, με τη βοήθεια της ευθείας παλινδρόμησης υπολογίστηκε η συγκέντρωση του κάθε μυκητοκτόνου που παρεμποδίζει κατά 50% τη γραμμική αύξηση του μυκηλίου της κάθε απομόνωσης ( $ED_{50}$ ).

### 5.3. Αποτελέσματα

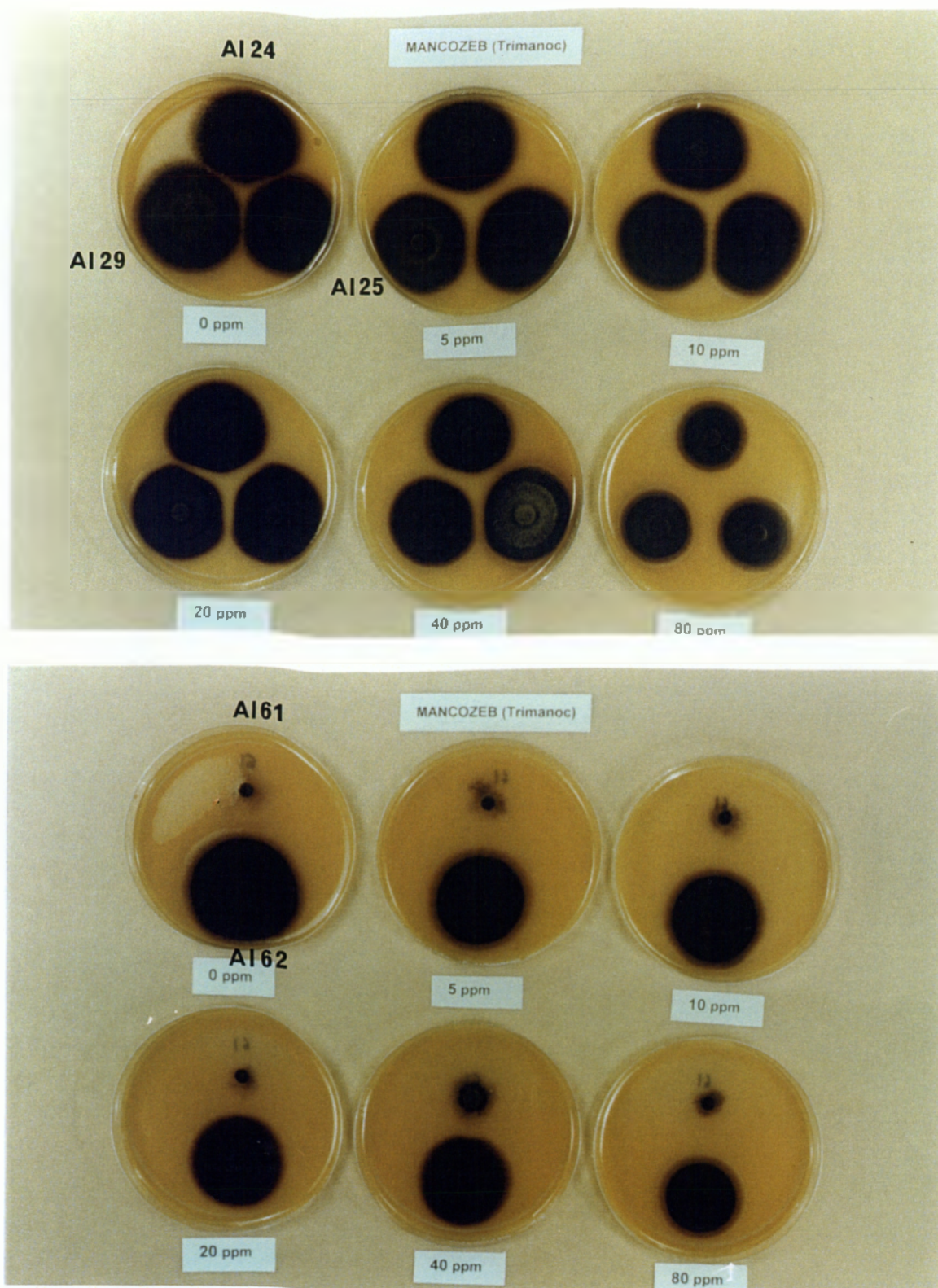
Οι τιμές  $ED_{50}$  των μυκητοκτόνων mancozeb (Trimanoc), mancozeb (Pennfluid), chlorothalonil (Daconil), iprodione (Rovral), prochloraz (Octave) και azoxystrobin (Quadris) που δοκιμάστηκαν *in vitro* ως προς την αποτελεσματικότητά τους εναντίον πέντε απομονώσεων του μύκητα *A. solani* παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 και στις Εικόνες 13-24. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *in vitro* αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων εξαρτάτο από την απομόνωση του μύκητα. Πιο συγκεκριμένα, το μυκητοκτόνο mancozeb σε μορφή βρέξιμων κόκκων (Trimanoc) παρουσίασε τη μικρότερη τιμή  $ED_{50}$  (60 ppm) στην απομόνωση AL61 και τη μεγαλύτερη (244 ppm) στην απομόνωση AL62 (Πίνακας 3 & Εικ. 13 & 14). Οι  $ED_{50}$  για τις υπόλοιπες

## Mancozeb (Trimanoc)



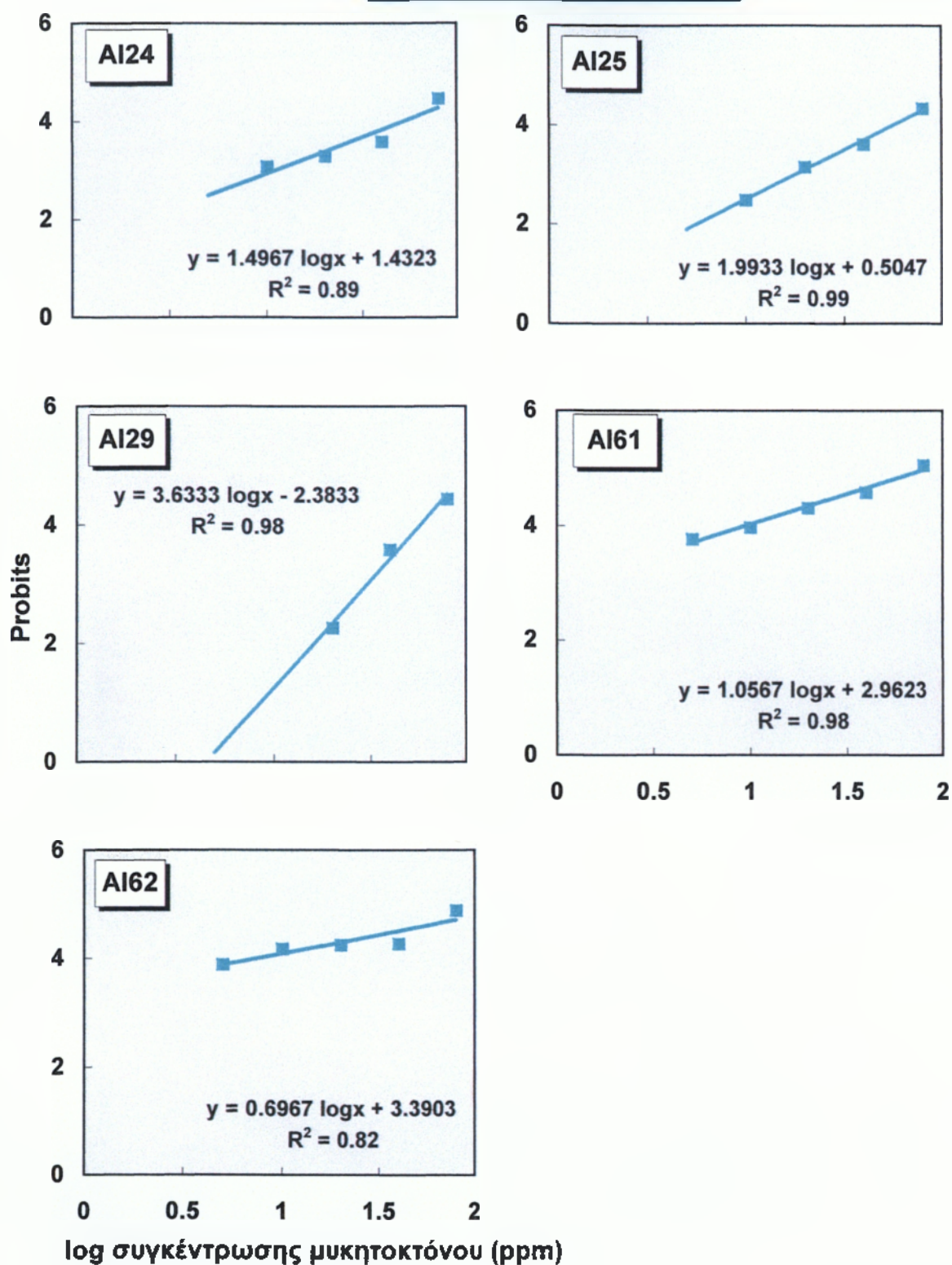
**log συγκέντρωσης μυκητοκτόνου (ppm)**

**Εικόνα 13.** *In vitro* αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου mancozeb (Trimanoc) εναντίον πέντε μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62).

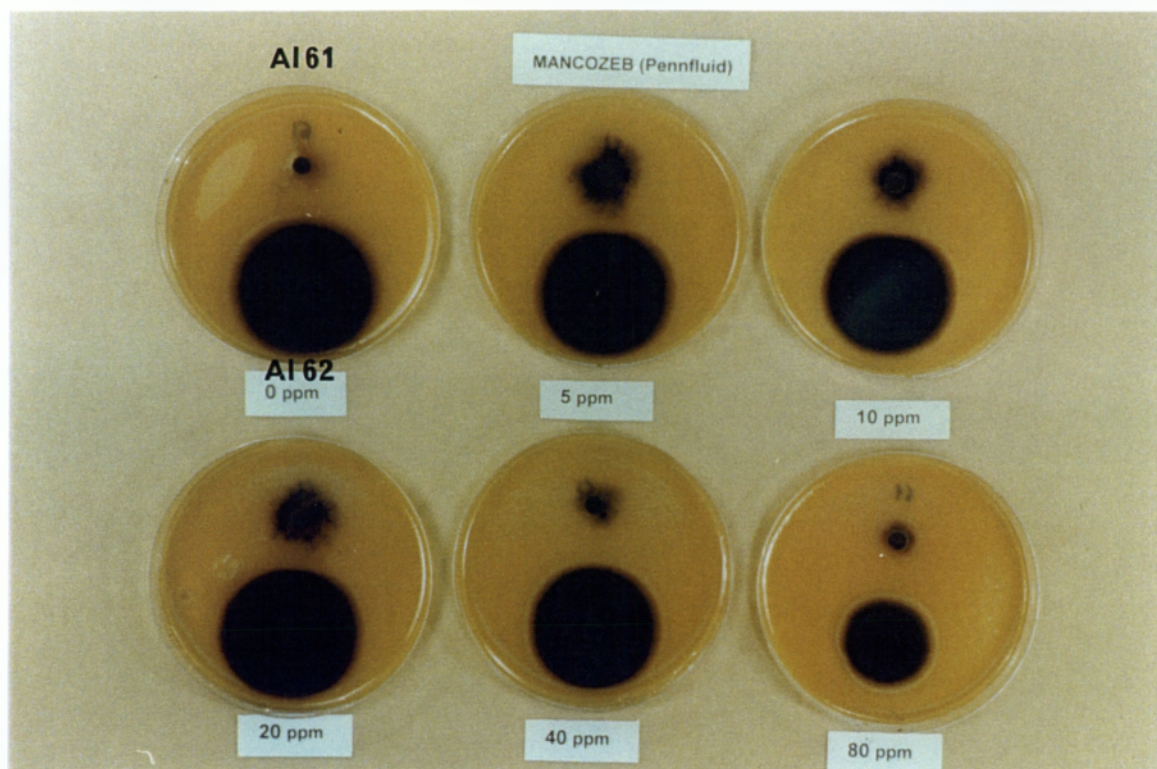
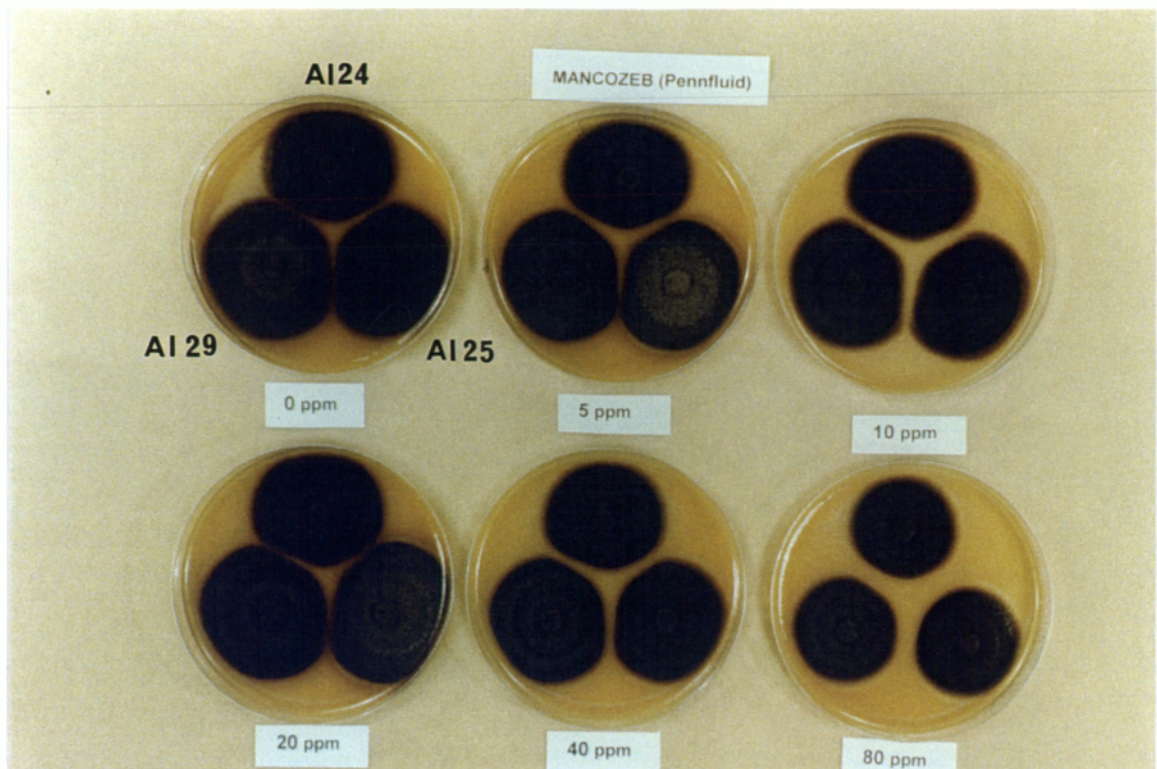


**Εικόνα 14.** *In vitro* αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου mancozeb (Trimanoc) εναντίον πέντε μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62).

## Mancozeb (Pennfluid)

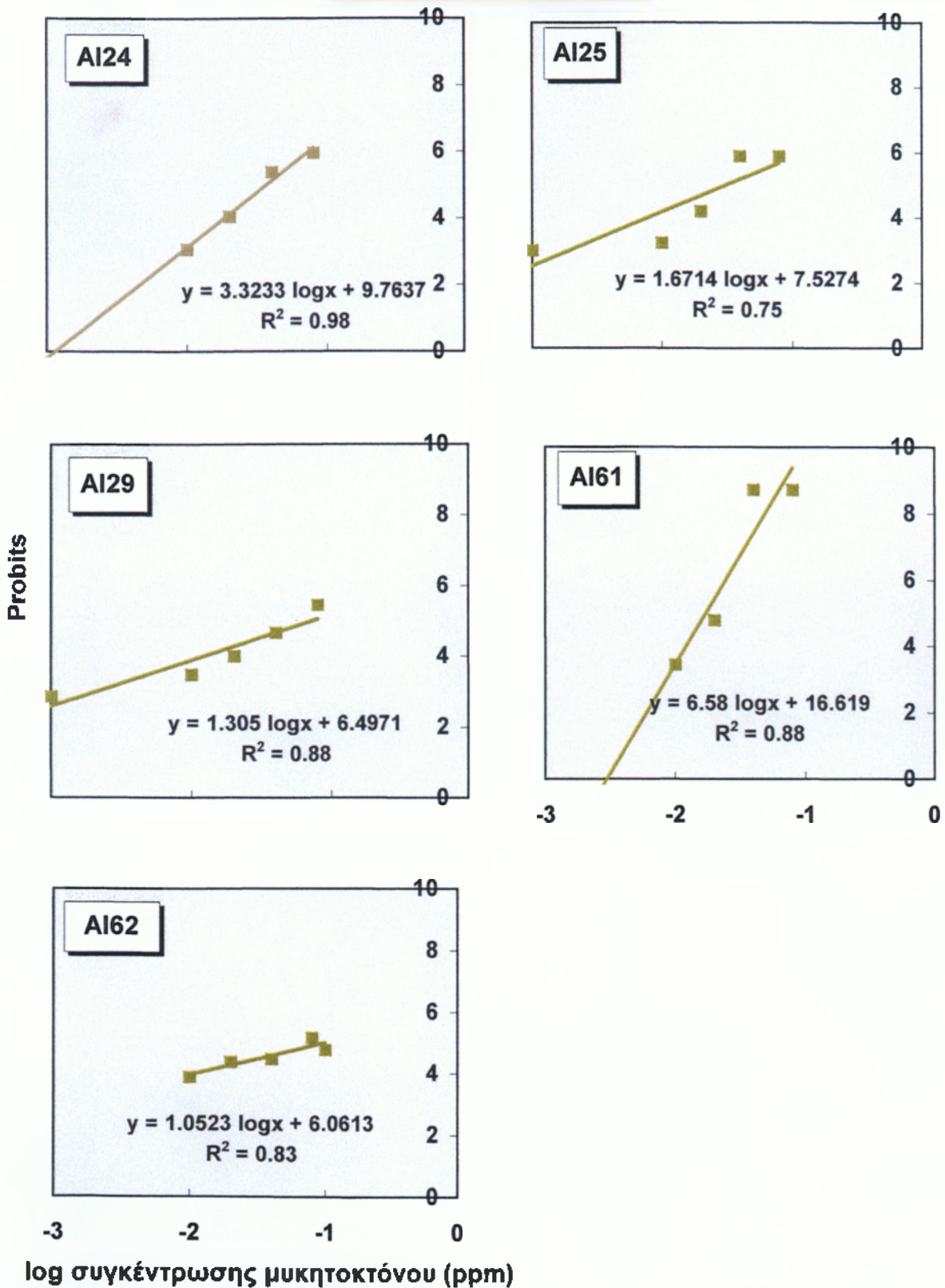


**Εικόνα 15.** *In vitro* αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου mancozeb (Pennfluid) εναντίον πέντε μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62).

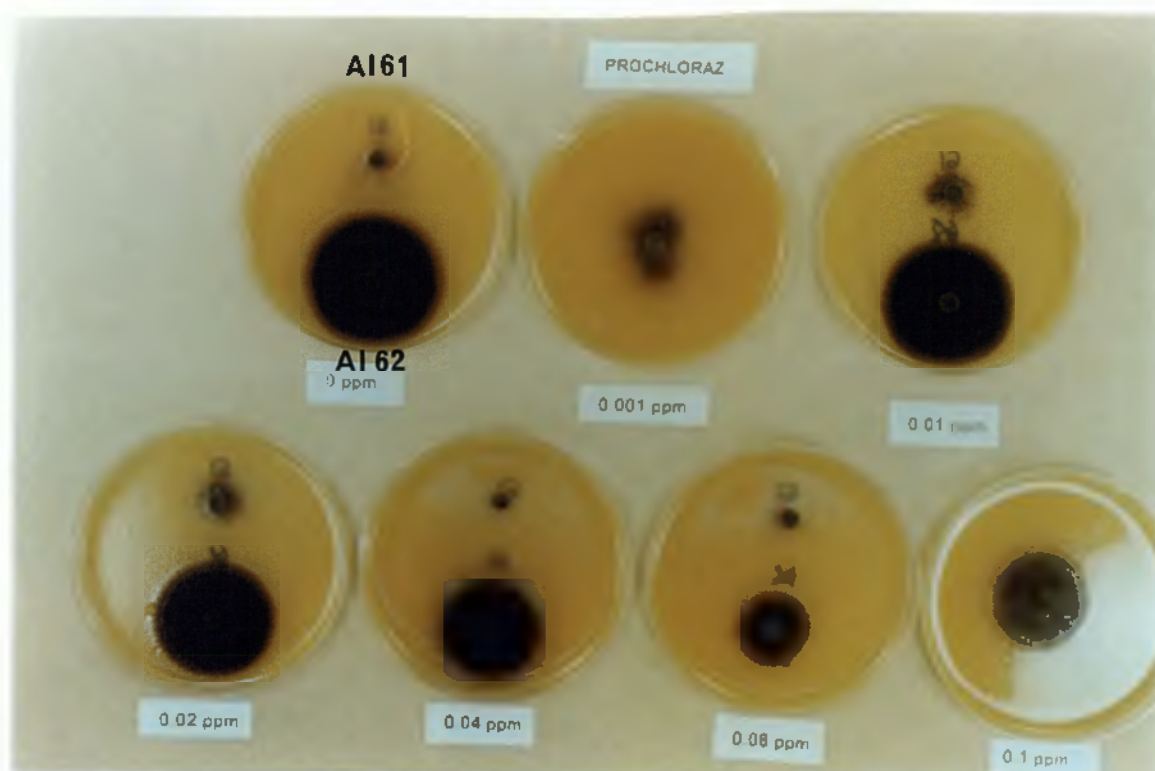
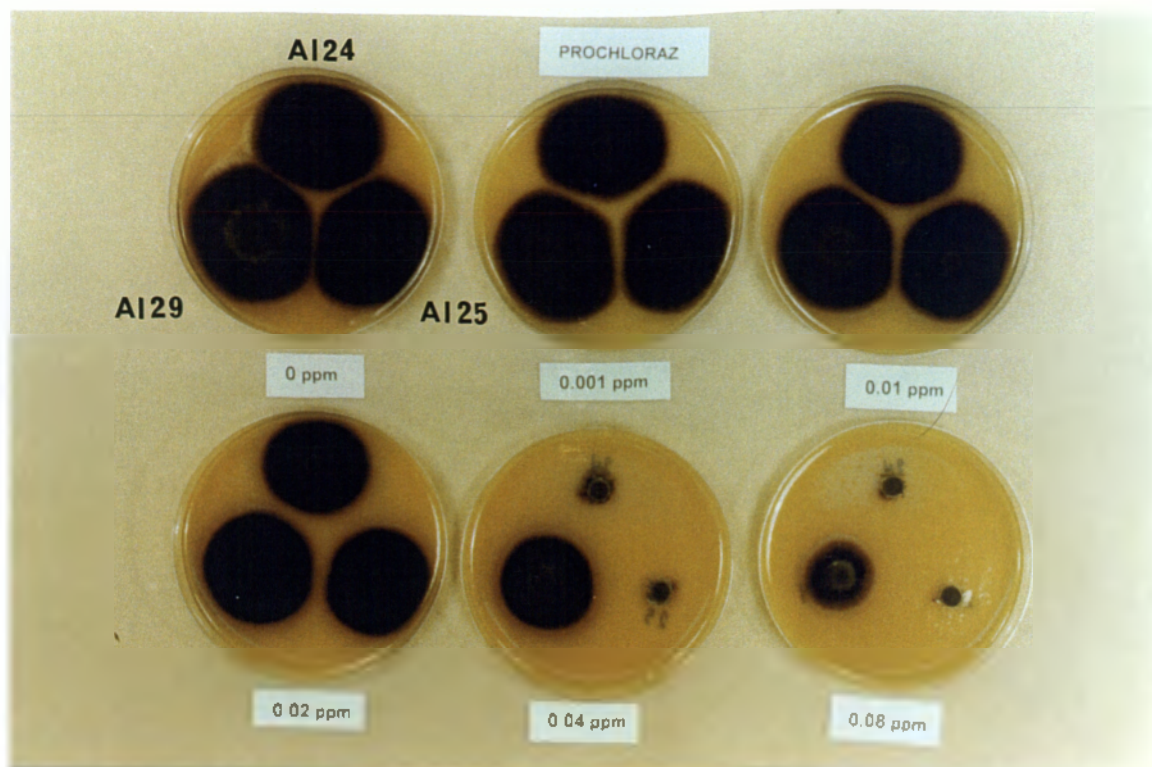


**Εικόνα 16.** *In vitro* αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου mancozeb (Pennfluid) εναντίον πέντε μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62).

## Prochloraz (Octave)



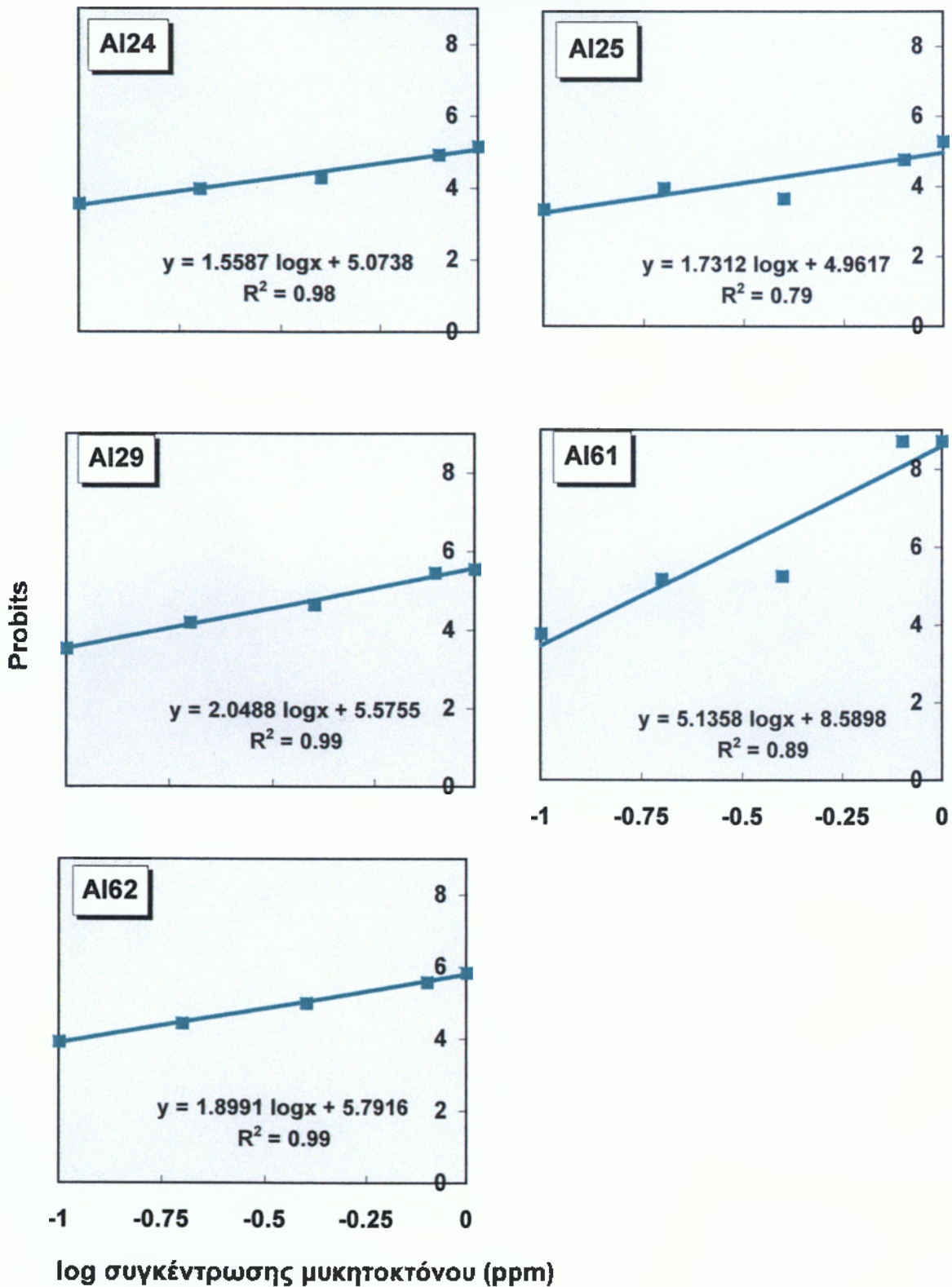
Εικόνα 17. *In vitro* αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου prochloraz (Octave) εναντίον πέντε μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62).



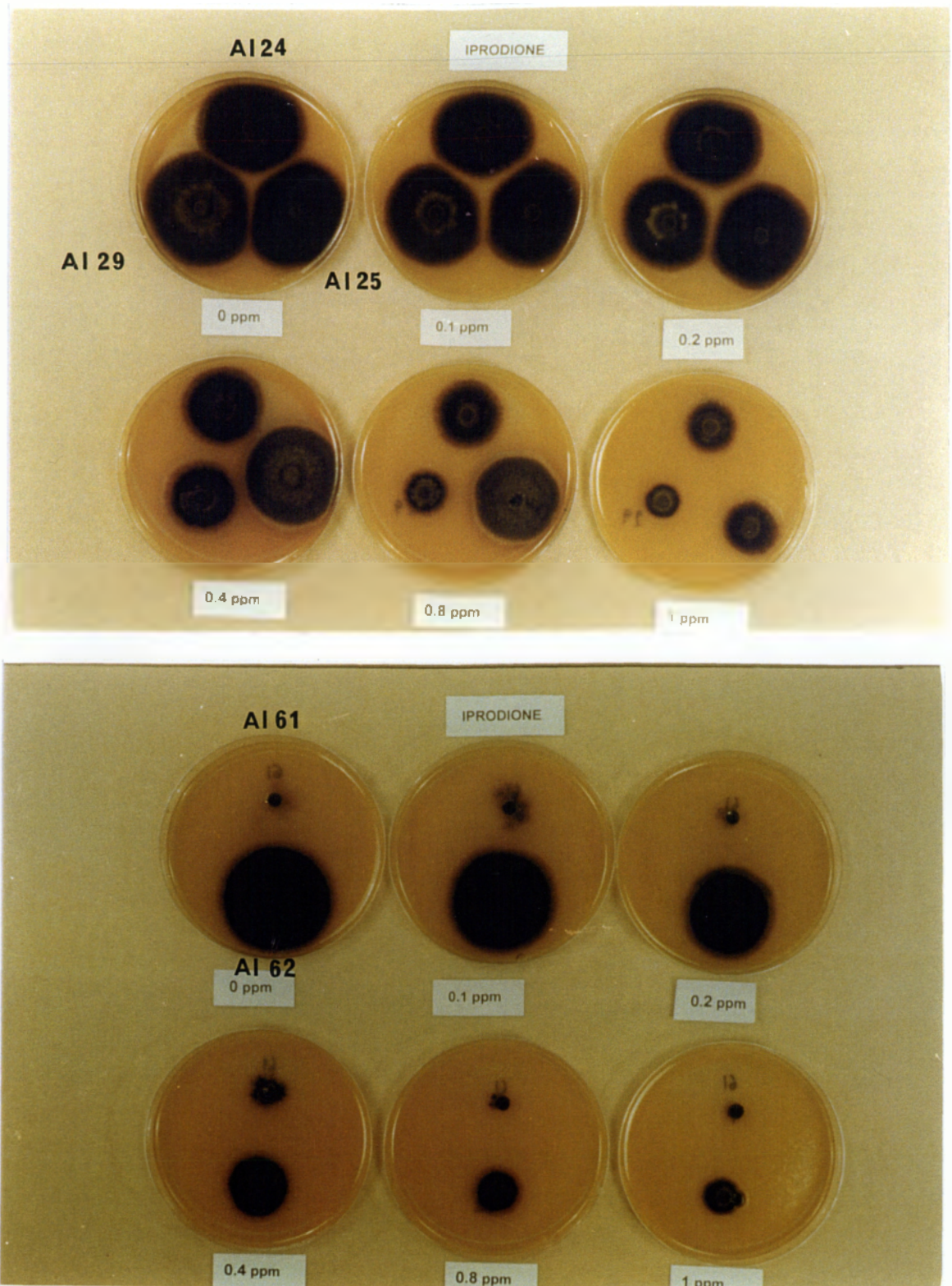
**Εικόνα 18.** *In vitro* αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου prochloraz (Octave) εναντίον πέντε μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62).



## Iprodione (Rovral)

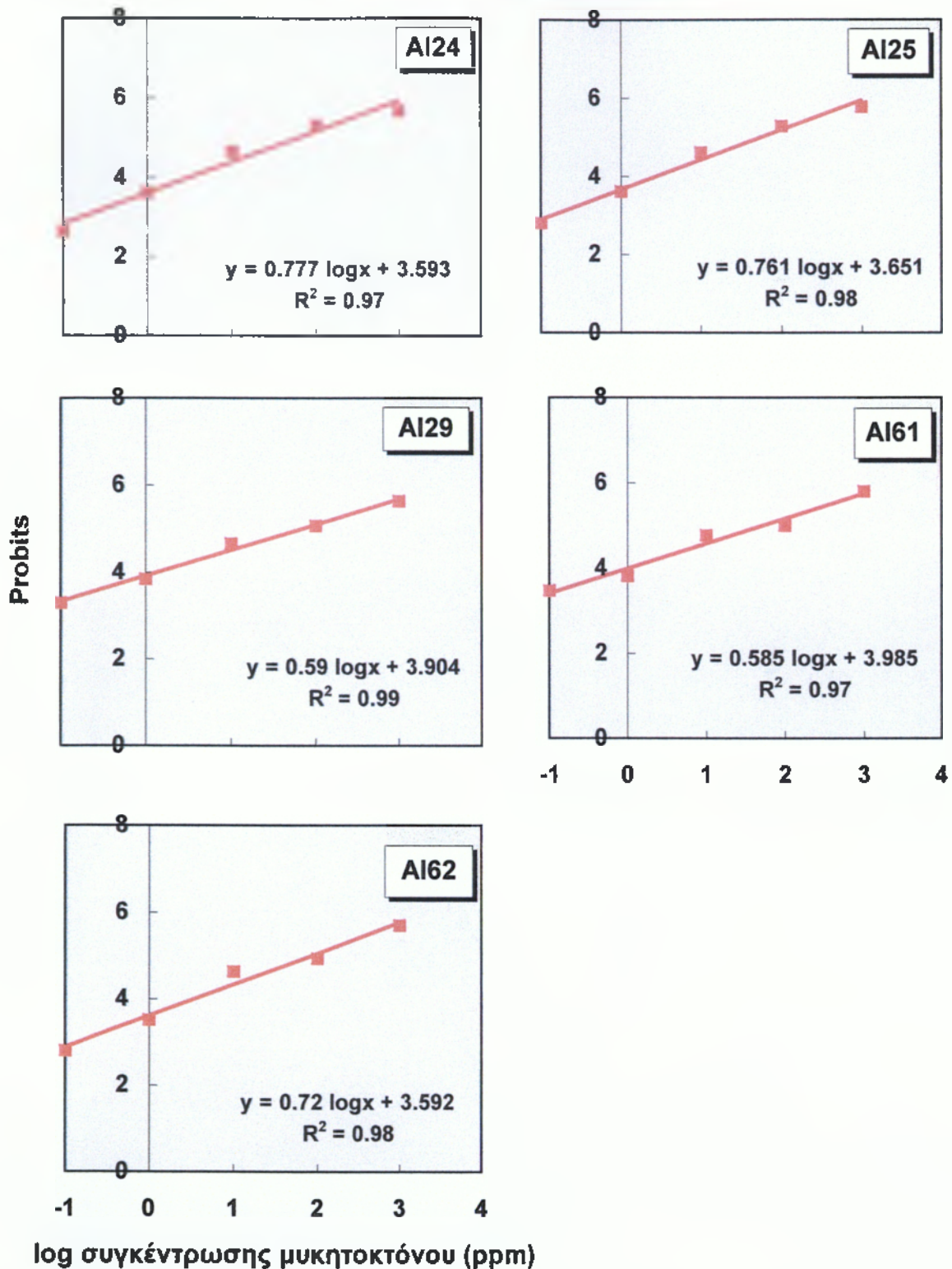


**Εικόνα 19.** *In vitro* αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου iprodione (Rovral) εναντίον πέντε μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62).

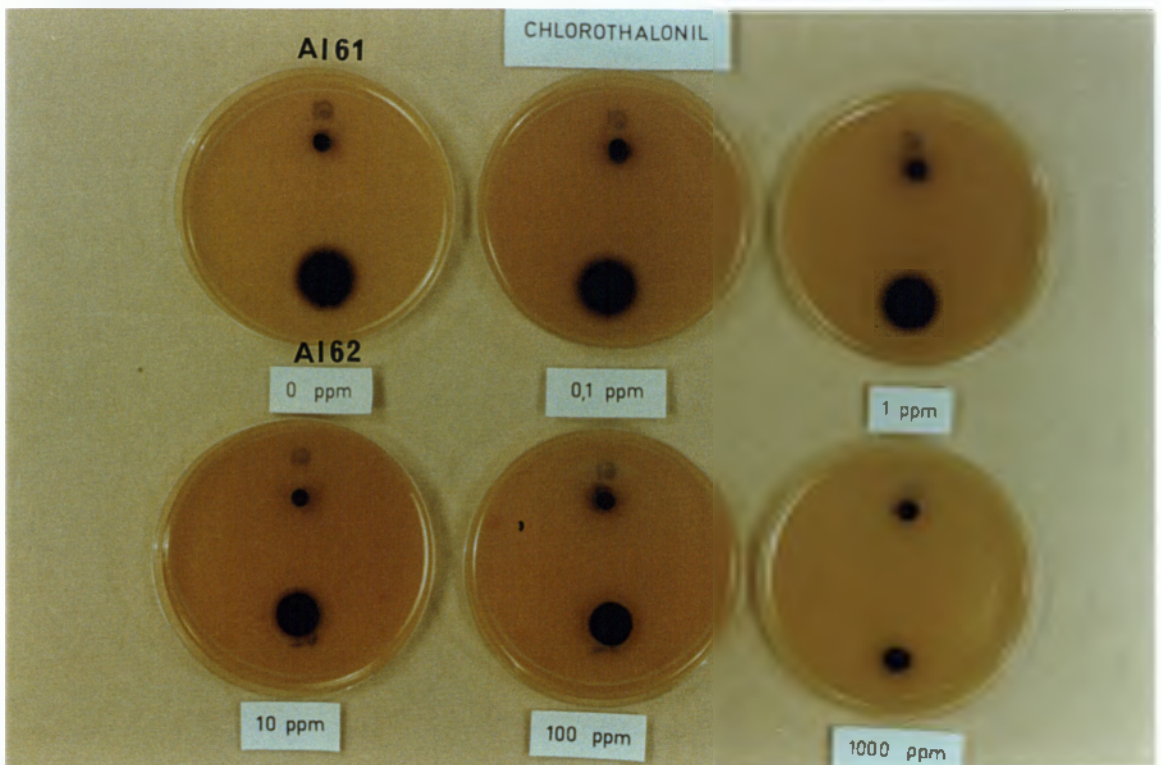
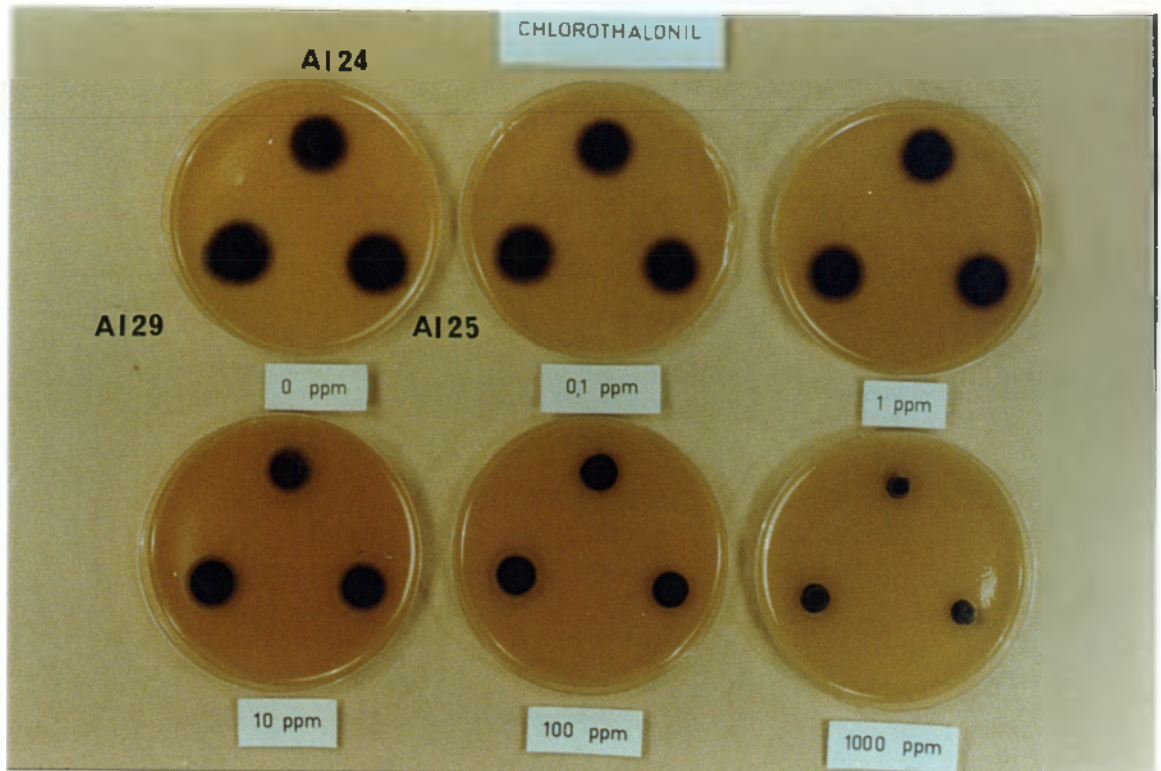


**Εικόνα 20.** *In vitro* αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου iprodione (Rovral) εναντίον πέντε μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62).

## Chlorothalonil

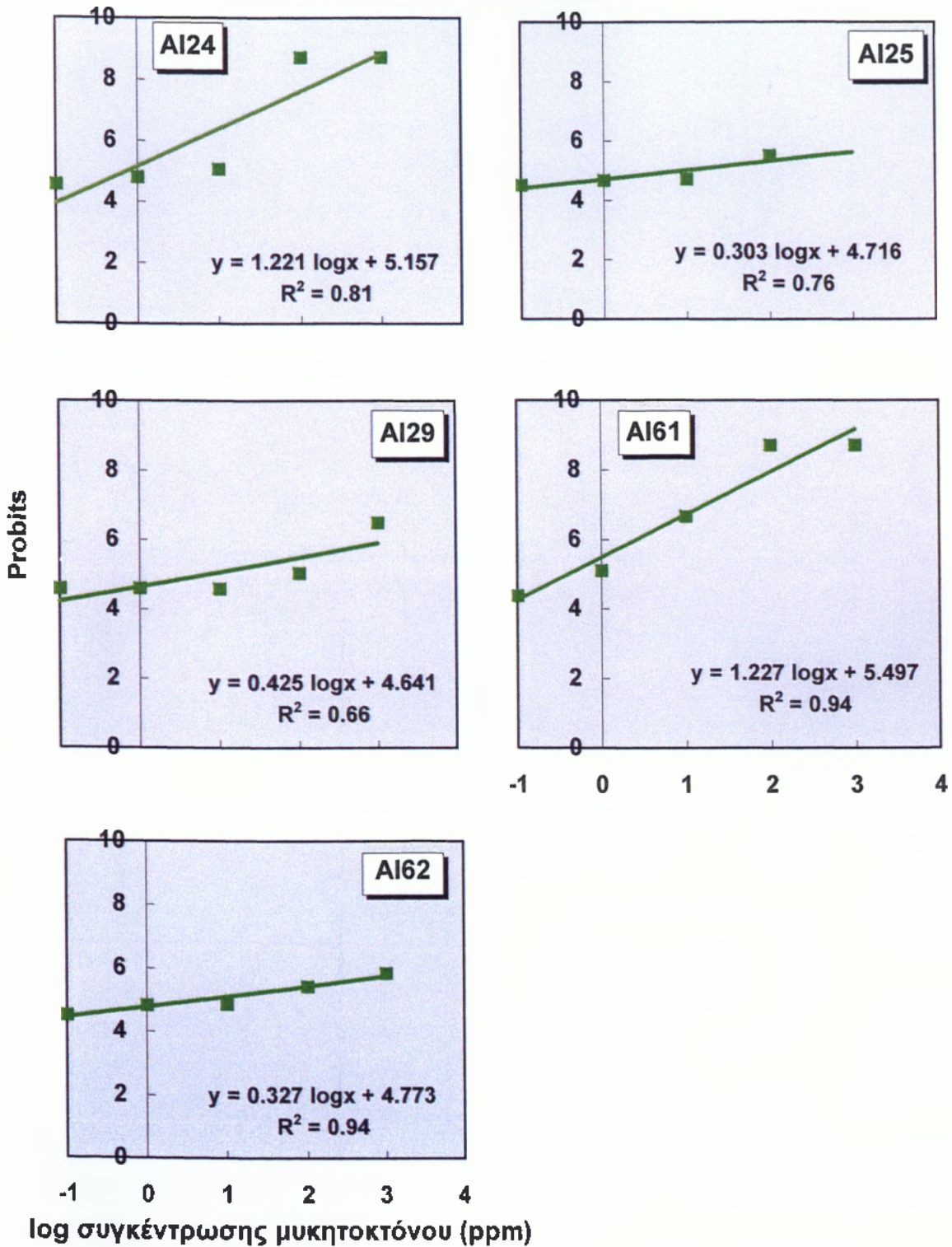


Εικόνα 21. *In vitro* αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου chlorothalonil (Daconil) εναντίον πέντε μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62).

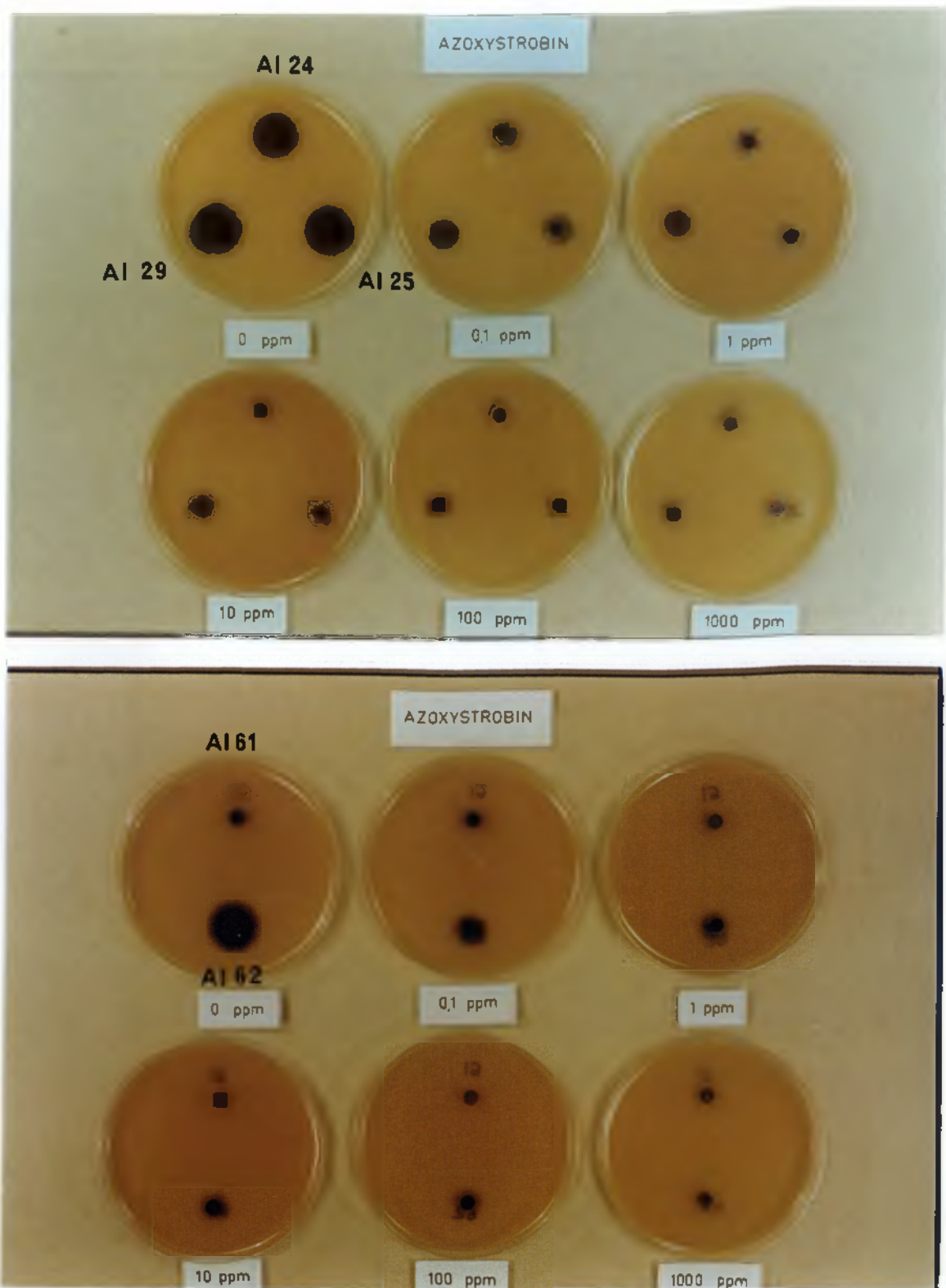


**Εικόνα 22.** *In vitro* αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου chlorothalonil (Daconil) εναντίον πέντε μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62).

## Azoxystrobin



**Εικόνα 23.** *In vitro* αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου azoxystrobin (Quadris) εναντίον πέντε μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62).



**Εικόνα 24.** *In vitro* αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου azoxystrobin (Quadris) εναντίον πέντε μονόσπορων απομονώσεων του μύκητα *A. solani* (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62).

απομονώσεις κυμάνθηκαν από 129-150 ppm. Αντίθετα, το ίδιο μυκητοκτόνο σε μορφή εναιωρήματος (Pennfluid) ενώ παρουσίασε τη μικρότερη τιμή ED<sub>50</sub> (85 ppm) πάλι στην απομόνωση AL61, εμφάνισε τη μεγαλύτερη (240 ppm) στην απομόνωση AL24. Οι ED<sub>50</sub> του μυκητοκτόνου για τις υπόλοιπες απομονώσεις κυμάνθηκαν από 107-204 ppm (Εικ. 15 & 16). Στο μυκητοκτόνο prochloraz (Octave) η τιμή της ED<sub>50</sub> για την απομόνωση AL62 ήταν 0,1 ppm και ήταν η μεγαλύτερη, ενώ για τις υπόλοιπες απομονώσεις οι τιμές ED<sub>50</sub> κυμάνθηκαν μεταξύ 0,02 ppm και 0,07 ppm (Πίνακας 3 & Εικ. 17 & 18). Στο μυκητοκτόνο iprodione (Rovral) η απομόνωση AL25 είχε τη μεγαλύτερη τιμή ED<sub>50</sub> (1,05 ppm), ενώ η απομόνωση AL61 τη μικρότερη (2 ppm) (Πίνακας 3 & Εικ. 19 & 20). Οι ED<sub>50</sub> για τις υπόλοιπες απομονώσεις κυμάνθηκαν από 0,38 ppm (AL62) έως 0,9 ppm (AL24). Οσον αφορά το μυκητοκτόνο chlorothalonil (Daconil) οι τιμές των ED<sub>50</sub> κυμάνθηκαν από 55 ppm (AL61) έως 91 ppm (AL62) (Πίνακας 3 & Εικ. 21 & 22). Τέλος για το μυκητοκτόνο azoxystrobin (Quadris) η μεγαλύτερη τιμή της ED<sub>50</sub> αφορούσε την απομόνωση AL25 (9 ppm), ενώ η μικρότερη την απομόνωση AL61 (0,4 ppm) (Πίνακας 3 & Εικ. 23 & 24). Οι τιμές ED<sub>50</sub> του μυκητοκτόνου για τις απομονώσεις AL25 και AL62 ήταν 8 ppm και 5 ppm αντίστοιχα.

**Πίνακας 3.** Τιμές ED<sub>50</sub> των μυκητοκτόνων που δοκιμάστηκαν για την *in vitro* αποτελεσματικότητά τους εναντίον πέντε απομονώσεων του μύκητα *A. solani*.

<b>Μυκητοκτόνο δραστική ουσία (σκεύασμα)</b>	<b>Απομόνωση</b>	<b>ED<sub>50</sub> (ppm)<sup>‡</sup></b>
<b>mancozeb</b> (Trimanos)	AI 24	141,3 <sup>‡</sup>
	AI 25	128,8
	AI 29	150,1
	AI 61	59,8
	AI 62	243,7
<b>mancozeb</b> (Pennfluid)	AI 24	239,9
	AI 25	179,7
	AI 29	107
	AI 61	85,1
	AI 62	204,2
<b>prochloraz</b> (Octave)	AI 24	0,04
	AI 25	0,03
	AI 29	0,07
	AI 61	0,02
	AI 62	0,1
<b>iprodione</b> (Rovral)	AI 24	0,9
	AI 25	1,05
	AI 29	0,5
	AI 61	0,2
	AI 62	0,38
<b>chlorothalonil</b> (Daconil)	AI 24	64,6
	AI 25	58,9
	AI 29	72,4
	AI 61	54,9
	AI 62	91,2
<b>azoxystrobin</b> (Quadris)	AI 24	0,7
	AI 25	8,7
	AI 29	6,9
	AI 61	0,4
	AI 62	4,9

<sup>†</sup> Συγκέντρωση του μυκητοκτόνου που παρεμποδίζει κατά 50% τη γραμμική αύξηση του μυκηλίου σε σχέση με το μάρτυρα. Η λήψη των αποτελεσμάτων έγινε μετά από 3 ημέρες επώασης σε θερμοκρασία 21<sup>0</sup>C και συνθήκες εναλλαγής υπεριώδους ακτινοβολίας και σκότους (12h NUV-light/12 h σκότος).

<sup>‡</sup> Μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ *IN VIVO*

### 6.1. Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη σε θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών της αποτελεσματικότητας των μυκητοκτόνων mancozeb, chlorothalonil, iprodione, prochloraz και azoxystrobin όταν εφαρμόζονται προστατευτικά ή θεραπευτικά στην αντιμετώπιση του πρώιμου περονόσπορου της τομάτας.

### 6.2. Υλικά και Μέθοδοι

Φυτά τομάτας (cv. Ace 55VF) αναπτύχθηκαν με τη μέθοδο που αναφέρεται στα Γενικά Υλικά και Μέθοδοι (παράγραφος 2.3.) μέχρι του σταδίου του 5ου πραγματικού φύλλου (φυτά ηλικίας 40 ημερών). Η τεχνητή μόλυνση των φυτών έγινε μέχρι πλήρους διαβροχής του φυλλώματος με μίγμα πέντε μονόσπορων (AI24, AI25, AI29, AI61, AI62) απομονώσεων του μύκητα *A. solani* συγκέντρωσης  $3 \times 10^4$  κονίδια/ml. Η παραγωγή του μολύσματος της κάθε απομόνωσης (συγκέντρωση  $3 \times 10^4$  κονίδια/ml ) έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στα Γενικά Υλικά και Μέθοδοι (παράγραφος 2.6.). Ακολούθως, έγινε ανάμειξη ίσων όγκων (500 ml) αιωρημάτων κονιδίων των πέντε απομονώσεων.

Αμέσως μετά τη μόλυνση τα φυτά καλύφθηκαν για 72 ώρες με διαφανείς πλαστικές σακούλες για τη δημιουργία συνθηκών υγρασίας (RH 100%) ευνοϊκών για τη μόλυνση και επωάστηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας 21°C και φωτισμού (12h NUV-light/12h σκότος). Δοκιμάστηκαν τα μυκητοκτόνα: mancozeb (0,14% δ.ο., Trimanoc 75 WG), mancozeb (0,15% δ.ο., Pennfluid 42 SC), chlorothalonil (0,15% δ.ο., Daconil 75 WP), prochloraz (0,025% δ.ο., Octave 50 WP), iprodione (0,075% δ.ο., Rovral 50 WP) και azoxystrobin (0,025% δ.ο., Quadris 25 SC) (Πίνακας 2). Οι ψεκασμοί των φυτών με τα παραπάνω μυκητοκτόνα έγιναν: α) προστατευτικά, 1 ημέρα μετά τη μόλυνση των φυτών και β) θεραπευτικά 1 και 2 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών. Για κάθε μυκητοκτόνο και χρόνο επέμβασης χρησιμοποιήθηκαν πέντε φυτά (επαναλήψεις). Υπήρχαν επίσης και δύο είδη φυτών-μαρτύρων: α) φυτά που μολύνθηκαν τεχνητά με το παθογόνο αλλά δεν ψεκάστηκαν με μυκητοκτόνο (θετικοί μάρτυρες) και β) φυτά που δεν μολύνθηκαν τεχνητά με το παθογόνο και δεν ψεκάστηκαν με μυκητοκτόνο (αρνητικοί μάρτυρες). Τα φυτά αυτά ψεκάστηκαν μόνο με απεσταγμένο νερό.

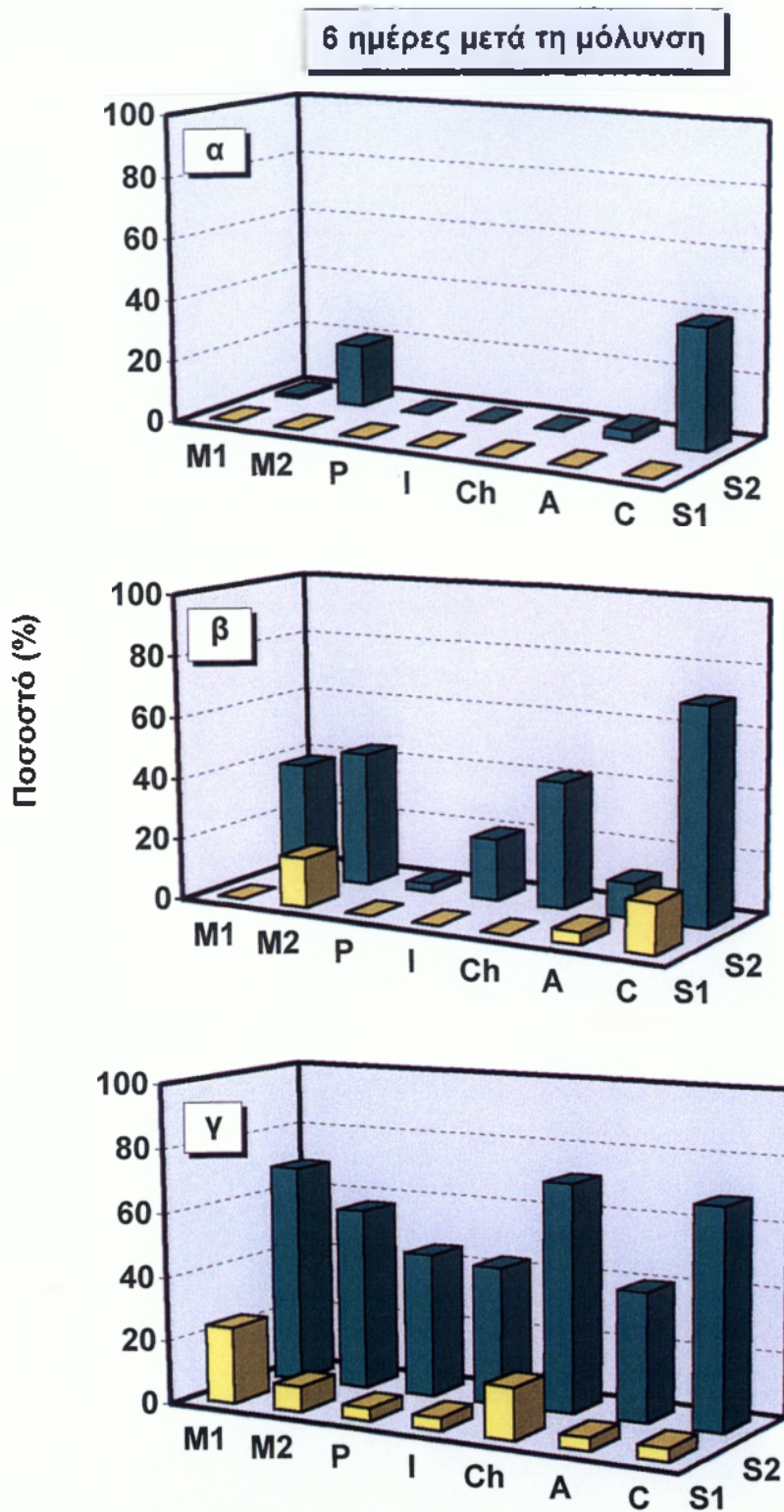
Εβδομήντα-δύο ώρες μετά τη μόλυνση τα φυτά ξεσκεπάστηκαν και παρέμειναν στο θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών μέχρι τη λήψη των αποτελεσμάτων, που έγινε 6, 13 και 19 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών.

Για κάθε μυκητοκτόνο και χρόνο επέμβασης εκτιμήθηκε: α) το ποσοστό των προσβεβλημένων φυτών (συχνότητα της ασθένειας), β) το ποσοστό της φυλλικής επιφάνειας με συμπτώματα (ένταση ασθένειας) γ) το ποσοστό των φυτών με συμπτώματα στο βλαστό και στους μίσχους των

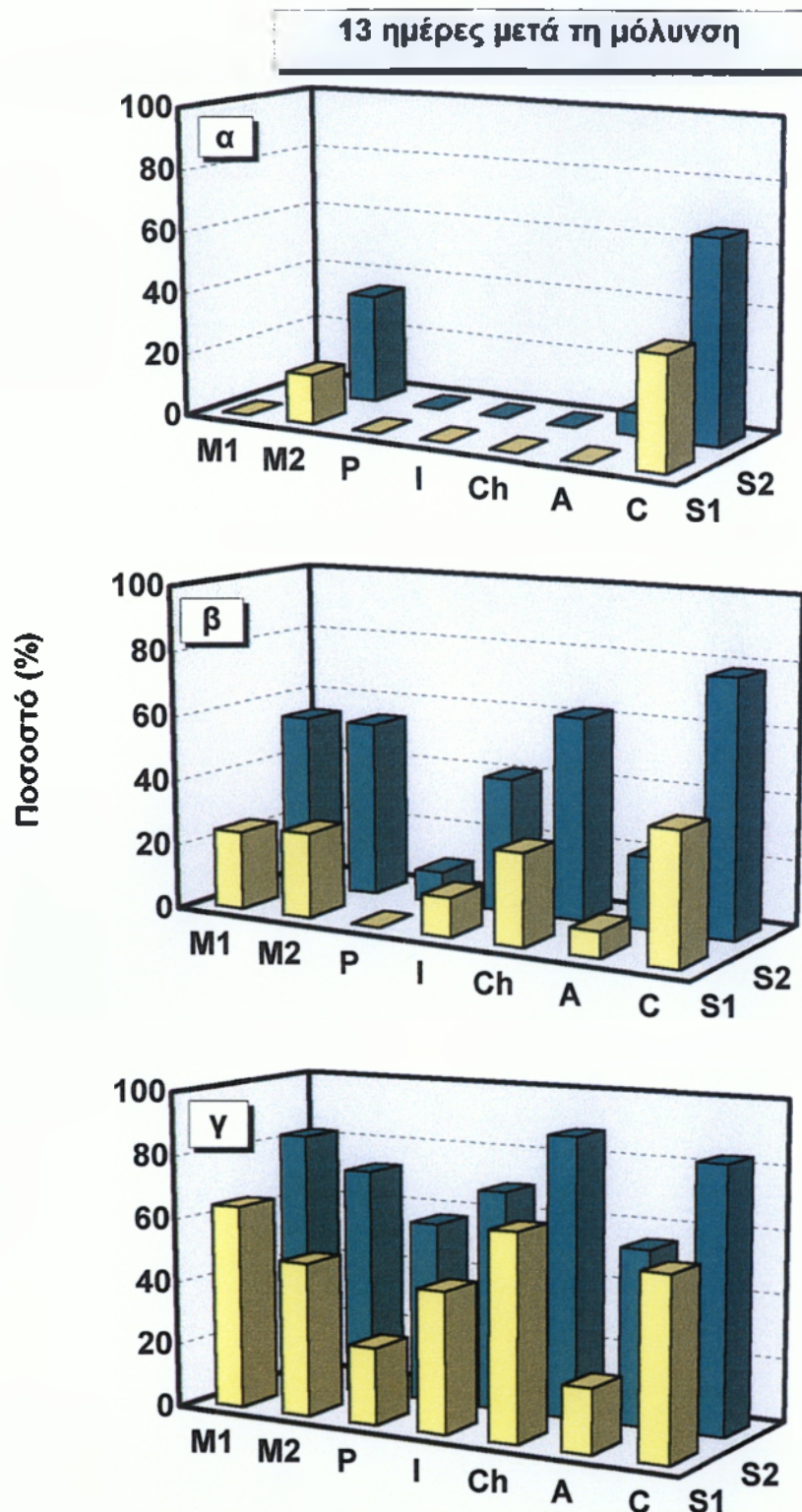
φύλλων και δ) το ποσοστό φυλλόπτωσης σε σχέση με τον αρχικό αριθμό φύλλων που μολύνθηκαν (πέντε φύλλα ανά φυτό).

### 6.3. Αποτελέσματα

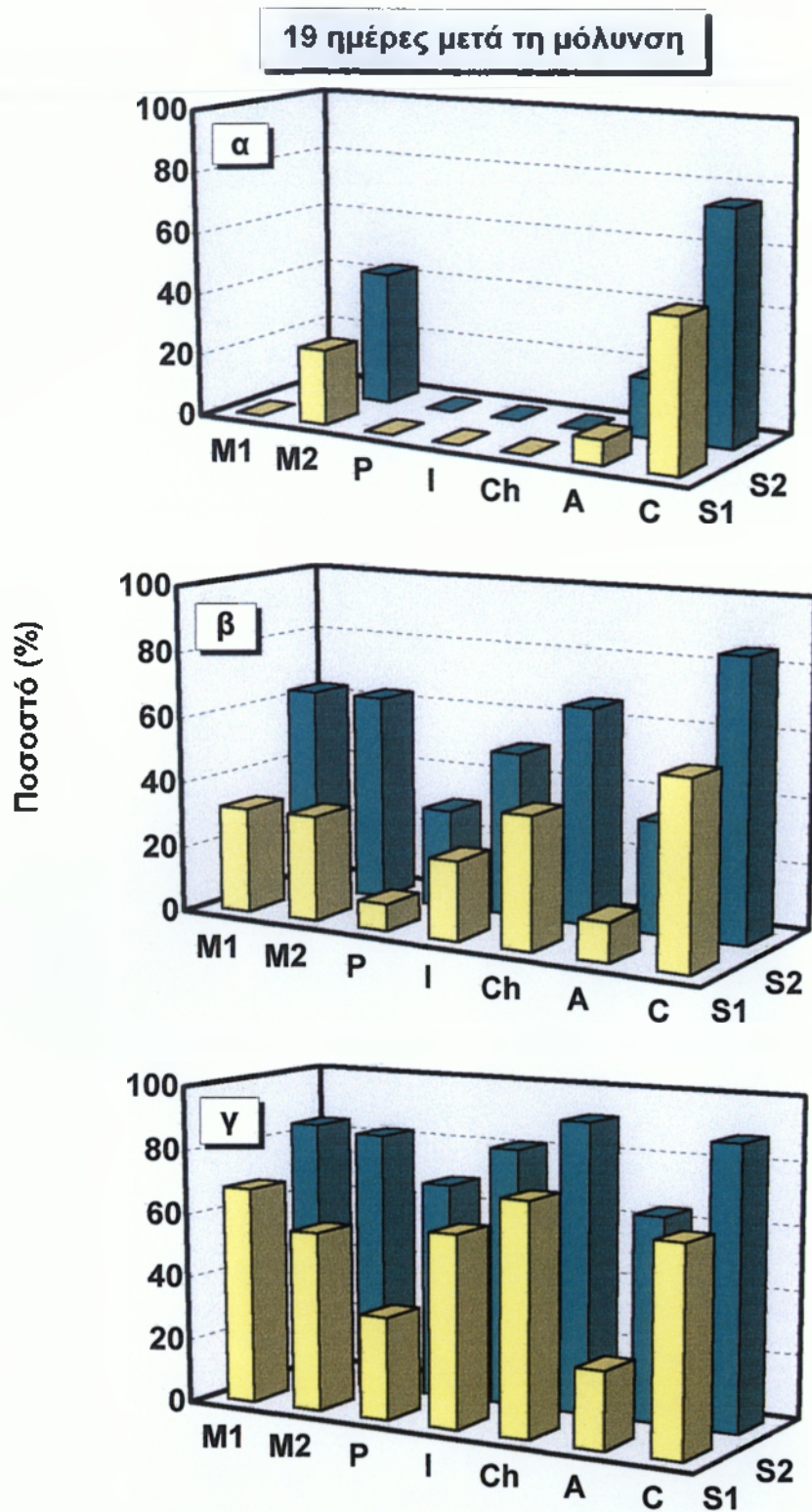
Η *in vivo* αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων mancozeb, chlorothalonil, iprodione, prochloraz και azoxystrobin εναντίον του μύκητα *A. solani* εξαρτάτο από το χρόνο εφαρμογής τους (προστατευτικά ή θεραπευτικά) (Εικ. 25-30). Ανεξάρτητα από τον τρόπο δράσης τους, όλα τα μυκητοκτόνα εμφάνισαν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα όταν εφαρμόστηκαν προστατευτικά (1 ημέρα πριν από τη μόλυνση) παρά θεραπευτικά (1 ή 2 ημέρες μετά τη μόλυνση) (Εικ. 25-30). Στην περίπτωση αυτή τόσο η ένταση της ασθένειας (ποσοστό φυλλικής επιφάνειας με συμπτώματα), όσο και το ποσοστό φυλλόπτωσης ήταν πολύ μικρότερο από τα αντίστοιχα στον αφέκαστο μάρτυρα. Επιπλέον θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι κηλίδες που εμφανίστηκαν στα φυτά που ψεκάστηκαν προστατευτικά ή θεραπευτικά με τα μυκητοκτόνα azoxystrobin και prochloraz ήταν πολύ μικρότερες όχι μόνο από εκείνες των αφέκαστων μαρτύρων αλλά και από εκείνες των φυτών που ψεκάστηκαν με τα υπόλοιπα μυκητοκτόνα (Εικ. 31). Κανένα από τα φυτά που ψεκάστηκαν προστατευτικά (1 ημέρα πριν τη μόλυνση) με τα μυκητοκτόνα prochloraz, iprodione, chlorothalonil, δεν εμφάνισε συμπτώματα ακόμη και 19 ημέρες μετά τη μόλυνση όταν η ένταση της ασθένειας στον αφέκαστο μάρτυρα ήταν 75% και το ποσοστό φυλλόπτωσης 48% (Εικ. 25-30). Το ποσοστό φυλλικής επιφάνειας με



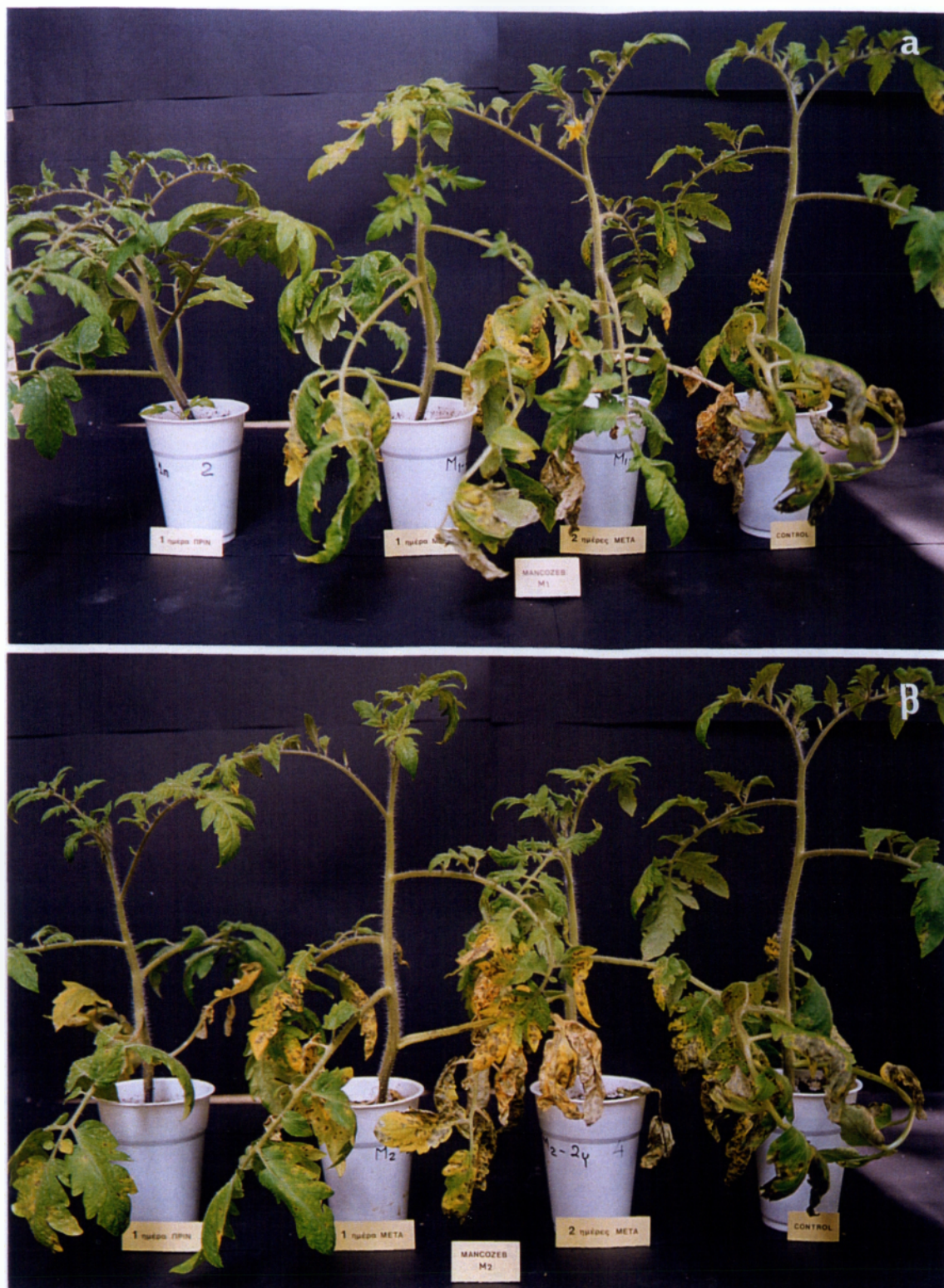
**Εικόνα 25.** Προστατευτική [1 ημέρα πριν τη μόλυνση, (α)] και θεραπευτική [1 ημέρα (β) και 2 ημέρες (γ) μετά τη μόλυνση] δράση των μυκητοκτόνων mancozeb (M1, Trimanoc & M2, Pennfluid), prochloraz (P), iprodione (I), chlorothalonil (Ch) και azoxystrobin (A) εναντίον του μύκητα *A. solani*, 6 ημέρες μετά τη μόλυνση. Τα φυτά τομάτας (ποικ. Ace 55VF) επωάστηκαν αμέσως μετά τη μόλυνση σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών. (C): αφέκαστα φυτά (μάρτυρες). Ποσοστό φυλλικής επιφάνειας με συμπτώματα (S<sub>2</sub>) SED (300 d.f.)=10,1. Ποσοστό φυλλόπτωσης (S<sub>1</sub>) SED (300 d.f.)=10,6.



**Εικόνα 26.** Προστατευτική [1 ημέρα πριν τη μόλυνση, (α)] και θεραπευτική [1 ημέρα (β) και 2 ημέρες (γ) μετά τη μόλυνση] δράση των μυκητοκτόνων mancozeb (M1, Trimanos & M2, Pennfluid), prochloraz (P), iprodione (I), chlorothalonil (Ch) και azoxystrobin (A) εναντίον του μύκητα *A. solani*, 13 ημέρες μετά τη μόλυνση. Τα φυτά τομάτας (ποικ. Ace 55VF) επωάστηκαν αμέσως μετά τη μόλυνση σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών. (C): απέκαστα φυτά (μάρτυρες). Ποσοστό φυλλικής επιφάνειας με συμπτώματα (S<sub>2</sub>) SED (300 d.f.)=10,1. Ποσοστό φυλλόπτωσης (S<sub>1</sub>) SED (300 d.f.)=10,6



**Εικόνα 27.** Προστατευτική [1 ημέρα πριν τη μόλυνση, (α)] και θεραπευτική [1 ημέρα (β) και 2 ημέρες (γ) μετά τη μόλυνση] δράση των μυκητοκτόνων mancozeb (M1, Trimanoc & M2, Pennfluid), prochloraz (P), iprodione (I), chlorothalonil (Ch) και azoxystrobin (A) εναντίον του μύκητα *A. solani*, 19 ημέρες μετά τη μόλυνση. Τα φυτά τομάτας (ποικ. Ace 55VF) επωάστηκαν αμέσως μετά τη μόλυνση σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών. (C): απέκαστα φυτά (μάρτυρες). Ποσοστό φυλλικής επιφάνειας με συμπτώματα (S<sub>2</sub>) SED (300 d.f.)=10,1. Ποσοστό φυλλόπτωσης (S<sub>1</sub>) SED (300 d.f.)=10,6.

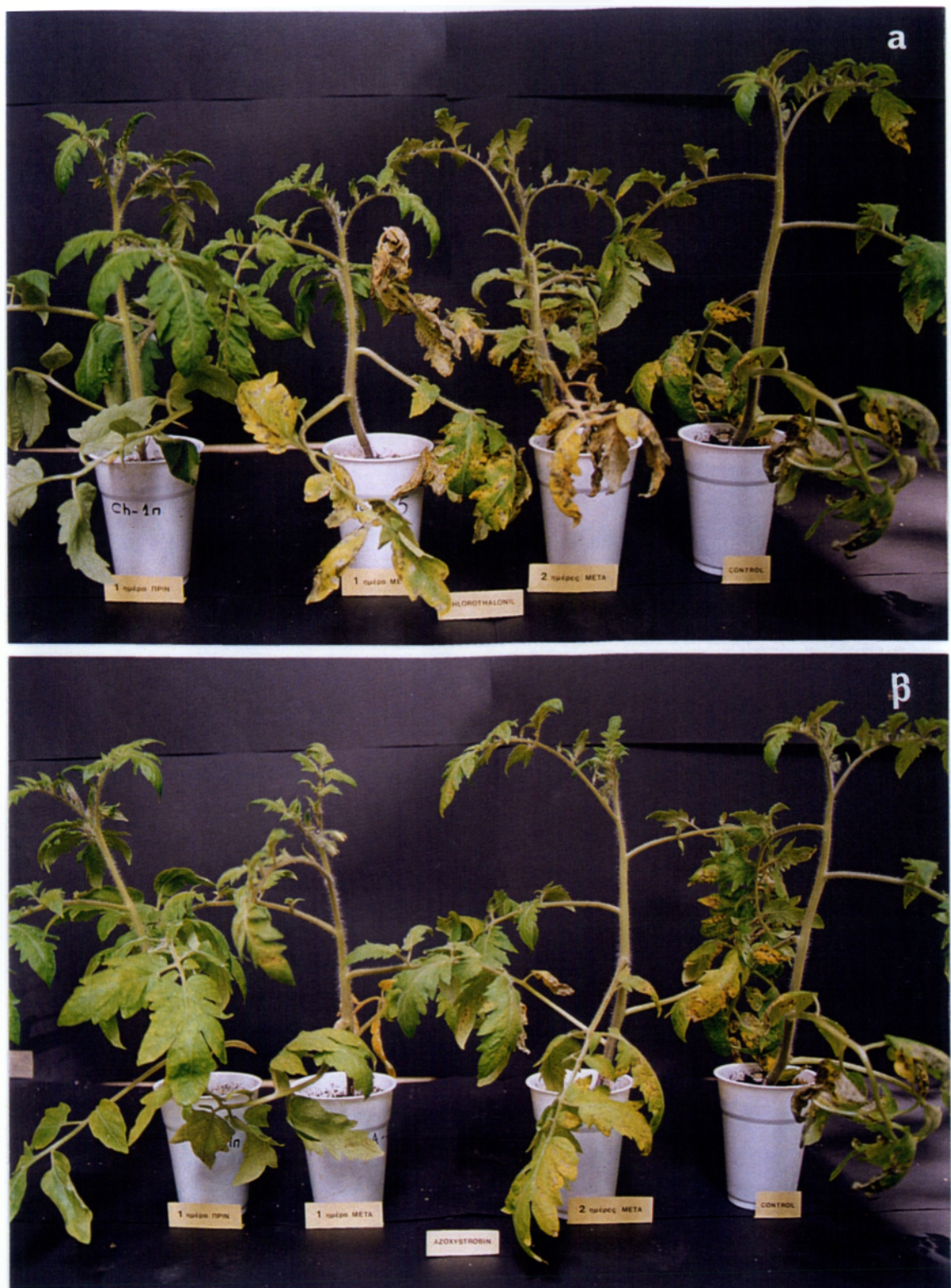


**Εικόνα 28.** Προστατευτική (1 ημέρα πριν τη μόλυνση) και θεραπευτική (1 ημέρα και 2 ημέρες μετά τη μόλυνση) δράση δύο σκευασμάτων του μυκητοκτόνου mancozeb: (α): Trimanos και (β): Pennfluid, εναντίον του μύκητα *A. solani*, 19 ημέρες μετά τη μόλυνση. Τα φυτά τομάτας (ποικ. Ace 55VF) επωάστηκαν αμέσως μετά τη μόλυνση σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών.

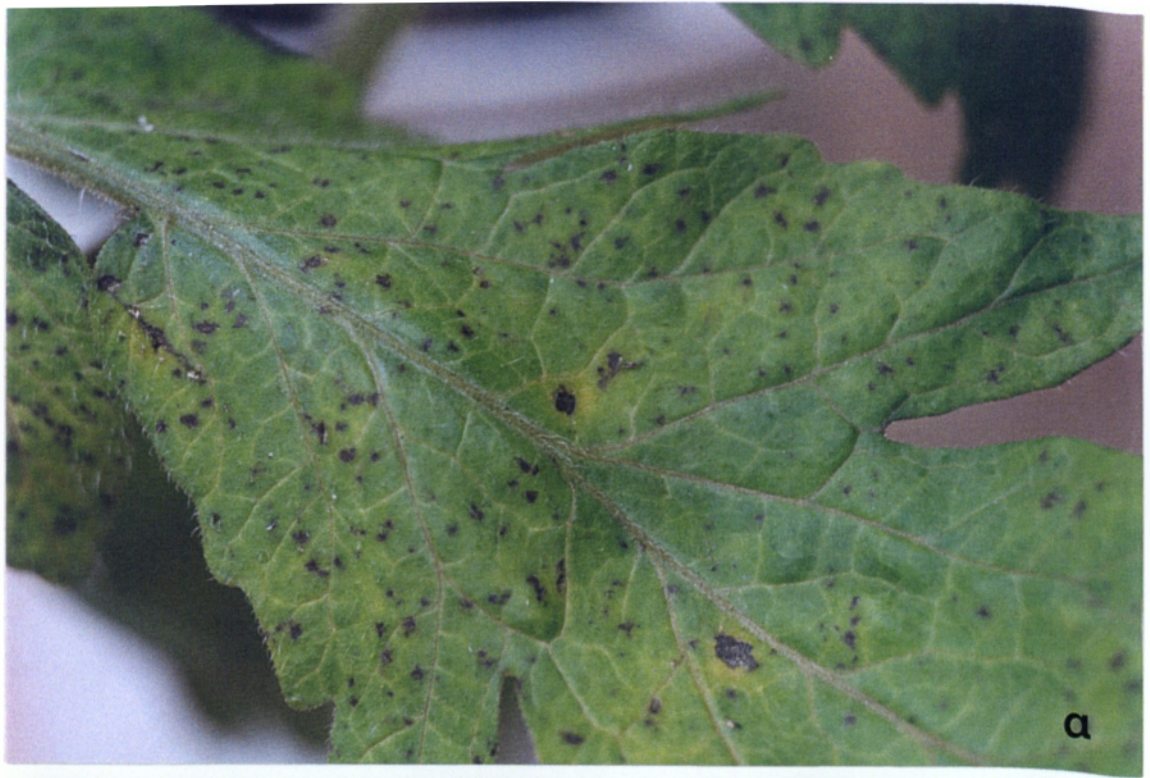


**Εικόνα 29.** Προστατευτική (1 ημέρα πριν τη μόλυνση) και θεραπευτική (1 ημέρα και 2 ημέρες μετά τη μόλυνση) δράση των μυκητοκτόνων prochloraz (α) και iprodione (β) εναντίον του μύκητα *A. solani*, 19 ημέρες μετά τη μόλυνση. Τα φυτά τομάτας (ποικ. Ace 55VF) επωάστηκαν αμέσως μετά τη μόλυνση σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών.





**Εικόνα 30.** Προστατευτική (1 ημέρα πριν τη μόλυνση) και θεραπευτική (1 ημέρα και 2 ημέρες μετά τη μόλυνση) δράση των μυκητοκτόνων chlorothalonil (α) και azoxystrobin (β) εναντίον του μύκητα *A. solani*, 19 ημέρες μετά τη μόλυνση. Τα φυτά τομάτας (ποικ. Ace 55VF) επωάστηκαν αμέσως μετά τη μόλυνση σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών.



**Εικόνα 31.** Συμπτώματα προσβολής φύλλων τομάτας (ποικ. Ace 55VF) από το μύκητα *A. solani*, 19 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με αιώρημα κονιδίων του μύκητα συγκέντρωσης  $3 \times 10^4$  κονίδια/ml και επώασής τους σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών. (α): φύλλο που είχε ψεκάσει 1 ημέρα μετά τη μόλυνσή του (θεραπευτικά) με το μυκητοκτόνο azoxystrobin, και (β): φύλλο που είχε ψεκάσει 1 ημέρα μετά τη μόλυνσή του (θεραπευτικά) με το μυκητοκτόνο mancozeb (Trimanoc).

συμπτώματα και το ποσοστό φυλλόπτωσης στα φυτά που ψεκάστηκαν προστατευτικά με το μυκητοκτόνο azoxystrobin ήταν περίπου 3% και 0% αντίστοιχα, 6 ημέρες μετά τη μόλυνση και δεν ξεπέρασε το 19% και 8% αντίστοιχα, 19 ημέρες μετά τη μόλυνση. Τέλος, όσον αφορά την προστατευτική δράση των δύο σκευασμάτων του μυκητοκτόνου mancozeb που δοκιμάστηκαν, διαπιστώθηκε ότι 19 ημέρες μετά τη μόλυνση τόσο η ένταση της ασθένειας όσο και το ποσοστό φυλλόπτωσης ήταν μεγαλύτερο στα φυτά που ψεκάστηκαν με το σκεύασμα Penhfluid (43 και 24% αντίστοιχα) από ότι με το σκεύασμα Trimanos (11% και 0% αντίστοιχα) (Εικ. 27). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι δεν διαπιστώθηκε φυλλόπτωση ακόμη και 19 ημέρες μετά τη μόλυνση στα φυτά που ψεκάστηκαν προστατευτικά με το σκεύασμα Trimanos παρόλο που η ένταση της ασθένειας ήταν 11% (Εικ. 27).

Όσον αφορά τη θεραπευτική δράση των μυκητοκτόνων που δοκιμάστηκαν, αυτή ήταν μεγαλύτερη όταν η εφαρμογή τους γινόταν 1 ημέρα από ότι 2 ημέρες μετά τη μόλυνση (Εικ. 25-30)

Όταν ο ψεκασμός των φυτών με τα μυκητοκτόνα έγινε 1 ημέρα μετά τη μόλυνση, τη μικρότερη ένταση της ασθένειας, ακόμη και 19 ημέρες μετά τη μόλυνση, εμφάνισαν τα φυτά που ψεκάστηκαν με τα μυκητοκτόνα prochloraz (30%) και azoxystrobin (34%) (Εικ. 25-30). Τα ποσοστά αυτά δεν διέφεραν σημαντικά ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους, αλλά διέφεραν από τα αντίστοιχα ποσοστά των φυτών που ψεκάστηκαν με τα υπόλοιπα μυκητοκτόνα. Επιπλέον, τα φυτά αυτά παρουσίασαν και τα μικρότερα ποσοστά φυλλόπτωσης (8% και 12% αντίστοιχα). Τα ποσοστά αυτά ενώ δεν διέφεραν μεταξύ τους ( $P > 0,05$ ), διέφεραν από τα αντίστοιχα των φυτών που ψεκάστηκαν με τα άλλα

μυκητοκτόνα (Εικ. 25-30).

Η ένταση της ασθένειας και το ποσοστό φυλλόπτωσης στα φυτά που ψεκάστηκαν με το μυκητοκτόνο iprodione, ήταν αντίστοιχα 50% και 24% και διέφεραν σημαντικά ( $P > 0,05$ ) από τα αντίστοιχα ποσοστά των φυτών που ψεκάστηκαν με τα υπόλοιπα μυκητοκτόνα (Εικ. 25-30).

Τέλος, τα φυτά που ψεκάστηκαν 1 ημέρα μετά τη μόλυνση με το μυκητοκτόνο chlorothalonil και τα σκευάσματα Pennfluid και Trimanos του μυκητοκτόνου mancozeb παρουσίασαν 19 ημέρες μετά τη μόλυνση τα μεγαλύτερα ποσοστά τόσο της φυλλικής επιφάνειας με συμπτώματα (66%, 63% και 63% αντίστοιχα) όσο και φυλλόπτωσης (40%, 32% και 32% αντίστοιχα) (Εικ. 27). Τα ποσοστά αυτά δεν διέφεραν σημαντικά ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους, αλλά διέφεραν από εκείνα του αφέκαστου μάρτυρα (ποσοστό φυλλικής επιφάνειας με συμπτώματα 85% και φυλλόπτωσης 56%) (Εικ. 27).

Όταν η εφαρμογή των μυκητοκτόνων έγινε 2 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το παθογόνο, διαπιστώθηκε ότι ακόμη και 19 ημέρες μετά τη μόλυνση τα μικρότερα ποσοστά φυλλικής επιφάνειας με συμπτώματα εμφάνισαν τα φυτά που ψεκάστηκαν με τα μυκητοκτόνα azoxystrobin (64%) και prochloraz (68%) (Εικ. 25-30). Τα ποσοστά αυτά δεν διέφεραν σημαντικά ( $P > 0,05$ ) μεταξύ τους αλλά διέφεραν από τα αντίστοιχα των υπολοίπων μυκητοκτόνων και του αφέκαστου μάρτυρα. Παρόμοια, τα ποσοστά φυλλόπτωσης στα φυτά αυτά ήταν επίσης τα μικρότερα (24% και 32%, αντίστοιχα) σε σχέση με τα αντίστοιχα των άλλων μυκητοκτόνων.

Η ένταση της ασθένειας και το ποσοστό φυλλόπτωσης στα φυτά που ψεκάστηκαν με το μυκητοκτόνο iprodione ήταν 19 ημέρες μετά τη μόλυνση

81% και 60% αντίστοιχα και δεν διέφεραν σημαντικά ( $P > 0,05$ ) από τα αντίστοιχα ποσοστά των φυτών που ψεκάστηκαν με τα σκευάσματα Pennfluid (82% και 56%, αντίστοιχα) και Tripanoc (84% και 68%, αντίστοιχα) του μυκητοκτόνου mancozeb (Εικ. 25-30).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι τα φυτά που ψεκάστηκαν 2 ημέρες μετά τη μόλυνση με το μυκητοκτόνο chlorothalonil εμφάνισαν τα μεγαλύτερα ποσοστά φυλλικής επιφάνειας με συμπτώματα (91%) και φυλλόπτωση (72%). Τα ποσοστά αυτά ήταν μεγαλύτερα, αλλά δεν διέφεραν σημαντικά ( $P > 0,05$ ) από τα αντίστοιχα του αφέκαστου μάρτυρα (88% και 64%, αντίστοιχα) (Εικ. 25-30).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι ο ρυθμός γραμμικής αύξησης του μυκηλίου του μύκητα *A. solani* εξαρτάται από την απομόνωση του μύκητα. Πιο συγκεκριμένα, η απομόνωση AI 61 παρουσίασε τη μικρότερη ανάπτυξη μυκηλίου από όλες τις άλλες απομονώσεις που μελετήθηκαν, ενώ το μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης εμφάνισε η απομόνωση AI 25. Όσον αφορά την *in vitro* παραγωγή κονιδίων διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός των σχηματιζομένων κονιδίων εξαρτάται από την ηλικία της απομόνωσης και είναι ανεξάρτητος από την ταχύτητα αύξησης του μυκηλίου του μύκητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στις συνθήκες του πειράματος η απομόνωση AI 61, που είχε το μικρότερο ρυθμό αύξησης, καθώς και η AI 62 παρήγαγαν *in vitro* το μεγαλύτερο ( $13 \times 10^4$  κονίδια/ml) αριθμό κονιδίων σε σχέση με τις υπόλοιπες απομονώσεις (AI 24, AI 25, AI 29) που δοκιμάστηκαν ( $42,5-55 \times 10^3$  κονίδια/ml). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι απομονώσεις AL 61 και AL 62 είχαν απομονωθεί από προσβεβλημένους ιστούς φυτών τομάτας πιο πρόσφατα (1998) από ότι οι υπόλοιπες απομονώσεις (1997). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα άλλων ερευνητών σύμφωνα με τα οποία οι απομονώσεις διαφόρων μυκήτων του γένους *Alternaria* διαφέρουν ως προς τον αριθμό των παραγομένων *in vitro* κονιδίων (Rotem, 1994). Μερικές απομονώσεις διατηρούν την ικανότητα σχηματισμού κονιδίων για μεγάλα χρονικά διαστήματα, ενώ άλλες σταματούν να παράγουν κονίδια μετά από συνεχείς μεταφορές σε διάφορα θρεπτικά

υλικά ανάπτυξης (Rotem, 1994).

Η παρούσα εργασία έδειξε επίσης ότι, σε θερμοκρασία  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , σχετική υγρασία 60-70% και φωτοπερίοδο 12 ωρών, ο μύκητας *A. solani* είναι πολύ παθογόνος στα φυτά της τομάτας και ότι ο βαθμός παθογένειας εξαρτάται από την απομόνωση του μύκητα. Στις παραπάνω συνθήκες τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίστηκαν 24 ώρες μετά τη μόλυνση με τη μορφή μικρών, νεκρωτικών κηλίδων στα φύλλα των μολυσμένων φυτών. Από τις πέντε απομονώσεις του μύκητα που δοκιμάστηκαν διαπιστώθηκε ότι 23 ημέρες μετά τη μόλυνση τη μεγαλύτερη ένταση της ασθένειας (58%) εμφάνισαν τα φυτά που μολύνθηκαν με την απομόνωση AI 25. Η ένταση της προσβολής στα φύλλα των φυτών εξαρτάτο εκτός από την απομόνωση του μύκητα και από την θέση (ηλικία) του φύλλου πάνω στο φυτό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κατώτερα και επομένως γηραιότερα φύλλα ήταν πιο ευπαθή από τα νεότερα φύλλα της κορυφής. Αποτέλεσμα της προσβολής των φύλλων της τομάτας από το μύκητα *A. solani* ήταν η πρόωρη φυλλόπτωση, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις (φυτά που μολύνθηκαν με την ισχυρά παθογόνο απομόνωση AI 25) έφτασε το 40%, 23 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών. Σύμφωνα με το Rotem (1994), η ευπάθεια φύλλων φυτών πατάτας στις μολύνσεις του μύκητα *A. solani* είναι επίσης ανάλογη της ηλικίας του φύλλου. Αυξημένη ευπάθεια των γηραιότερων φύλλων σε σχέση με τα νεότερα έχει διαπιστωθεί και σε άλλες ασθένειες που προκαλούνται από μύκητες του γένους *Alternaria* (Babadoost & Gabrielson, 1979, Kohle & Hoffmann, 1989). Στις συνθήκες των πειραμάτων της παρούσας εργασίας (θερμοκρασία  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , σχετική υγρασία

60-70%, φωτοπερίοδο 12 ωρών), συμπτώματα της ασθένειας εμφανίστηκαν και στους βλαστούς, τους μίσχους των φύλλων, τα άνθη και τους καρπούς φυτών τομάτας αλλά πολύ αργότερα από ότι στα φύλλα. Πιο συγκεκριμένα τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν με τη μορφή κηλίδων στους βλαστούς και στους μίσχους των φύλλων πέντε ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών, ενώ τα πρώτα συμπτώματα στα άνθη και τους καρπούς εμφανίστηκαν οκτώ ημέρες μετά τη μόλυνση. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η περίοδος επώασης του πρώιμου περονόσπορου εξαρτάται εκτός των άλλων από το είδος του φυτικού οργάνου και την ηλικία του. Η συντομότερη περίοδος επώασης παρατηρήθηκε στα φύλλα των φυτών τομάτας και μάλιστα στα γηραιότερα, ενώ η μεγαλύτερη περίοδος επώασης διαπιστώθηκε στα άνθη και τους καρπούς. Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και από τους Pelletier & Fry (1989) μετά από μολύνσεις φυτών πατάτας με το μύκητα *A. solani*.

Όταν εξετάστηκε η *in vitro* αποτελεσματικότητα διαφόρων μυκητοκτόνων εναντίον πέντε απομονώσεων του μύκητα *A. solani*, διαπιστώθηκε ότι οι δόσεις των μυκητοκτόνων που παρεμποδίζουν κατά 50% τη γραμμική αύξηση του μυκηλίου των απομονώσεων ( $ED_{50}$ ) ήταν ανάλογες με την απομόνωση του μύκητα και το μυκητοκτόνο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι απομονώσεις ήταν ευαίσθητες στα μυκητοκτόνα iprodione, prochloraz και chlorothalonil. Αντίθετα, διαπιστώθηκε μειωμένη ευαισθησία των απομονώσεων AI 24, AI 25, AI 29 και AI 62 στο μυκητοκτόνο mancozeb καθώς και των απομονώσεων AI 25 και AI 29 στο νέο μυκητοκτόνο azoxystrobin. Δυστυχώς δεν υπάρχουν στη Βιβλιογραφία άλλες μελέτες που



να αφορούν την *in vitro* αποτελεσματικότητα των παραπάνω μυκητοκτόνων εναντίον του μύκητα *A. solani*.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν επίσης ότι οι ψεκασμοί των φυτών τομάτας με τα παραπάνω μυκητοκτόνα ήταν πιο αποτελεσματικοί όταν γίνονταν προστατευτικά (1 ημέρα πριν από τη μόλυνση) παρά θεραπευτικά (1 ή 2 ημέρες μετά τη μόλυνση). Από τα μυκητοκτόνα που δοκιμάστηκαν (mancozeb, prochloraz, iprodione, chlorothalonil και azoxystrobin), μεγαλύτερη δράση εναντίον του μύκητα *A. solani* εμφάνισαν τα prochloraz, iprodione, chlorothalonil, azoxystrobin καθώς και το σκεύασμα Trimanos του μυκητοκτόνου mancozeb όταν εφαρμόστηκαν 1 ημέρα πριν από τη τεχνητή μόλυνση των φυτών. Αντίθετα, όταν η επέμβαση έγινε θεραπευτικά 1 ημέρα μετά τη μόλυνση, μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα εμφάνισαν μόνο τα prochloraz και azoxystrobin. Τέλος, η εφαρμογή των μυκητοκτόνων θεραπευτικά 2 ημέρες μετά τη μόλυνση δεν είχε σχεδόν καμιά αποτελεσματικότητα εναντίον του παθογόνου με μόνη εξαίρεση τα μυκητοκτόνα prochloraz και azoxystrobin, που έδωσαν τη μικρότερη ένταση ασθένειας και το μικρότερο ποσοστό φυλλόπτωσης. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο χρόνος εφαρμογής των διαφόρων μυκητοκτόνων για την καταπολέμηση του πρώιμου περονόσπορου της τομάτας έχει μεγάλη σημασία και έχει επισημανθεί από πολλούς ερευνητές. Σε πειράματα του Rands (1917), οι εφαρμογές μυκητοκτόνων για τον περιορισμό του μύκητα *A. solani* στην τομάτα ξεκινούσαν όταν τα φυτά έφταναν σε ύψος 15-20 εκατοστά. Σύμφωνα με τους Dahmen & Staub (1992), προστατευτική εφαρμογή 7

ημέρες πριν τη μόλυνση με το μυκητοκτόνο difenoconazole, περιόρισε κατά 83-100% την ανάπτυξη του μύκητα *A. solani* σε φυτά τομάτας. Αντίθετα, εφαρμογή με το ίδιο μυκητοκτόνο 2 ημέρες μετά τη μόλυνση δεν περιόρισε την ασθένεια.

Αξιζει επίσης να σημειωθεί ότι στην παρούσα εργασία τα φυτά που ψεκάστηκαν με τα μυκητοκτόνα prochloraz ή azoxystrobin εμφάνισαν κηλίδες μικρότερες από τα φυτά που ψεκάστηκαν με τα υπόλοιπα μυκητοκτόνα και οι κηλίδες αυτές δεν αυξήθηκαν σε μέγεθος ακόμη και 19 ημέρες μετά τη μόλυνση. Αυτή η διαφορά στο μέγεθος των κηλίδων, φαίνεται ότι οφείλεται στη θεραπευτική δράση των δύο αυτών μυκητοκτόνων εναντίον του μύκητα *A. solani*. Τα μυκητοκτόνα αυτά περιόρισαν εκτός από την ένταση της ασθένειας και την πρόωρη φυλλόπτωση.

Επιπλέον με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας διαπιστώθηκε ότι η ένταση της ασθένειας και το ποσοστό φυλλόπτωσης στα φυτά που ψεκάστηκαν προστατευτικά ή θεραπευτικά με το μυκητοκτόνο chlorothalonil ήταν ίδιο ή και σε μερικές περιπτώσεις μεγαλύτερο από το αντίστοιχο στα αψέκαστα φυτά (μάρτυρες). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι το μυκητοκτόνο chlorothalonil περιόρισε την ανταγωνιστική μικροχλωρίδα στην επιφάνεια των φύλλων με αποτέλεσμα να ευνοηθεί η βλάστηση των κονιδίων και η μόλυνση των φυτών από το μύκητα *A. solani*. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών σύμφωνα με τα οποία το μυκητοκτόνο chlorothalonil είναι πολύ αποτελεσματικό εναντίον μυκήτων του γένους *Alternaria* (Maude &

Humpherson-Jones, 1980, Tu, 1983, Vakalounakis & Malathrakis, 1988). Εντούτοις, σε πειράματα αγρού που έγιναν για την αντιμετώπιση του μύκητα *A. linicola* στο λινάρι, διαπιστώθηκε ότι το μυκητοκτόνο chlorothalonil όχι μόνο δεν ήταν αποτελεσματικό αλλά επιπλέον ευνόησε την ασθένεια (η ένταση της προσβολής ήταν μεγαλύτερη από εκείνη στον αφέκαστο μάρτυρα) (Vloutoglou, 1994).

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι παραπάνω δοκιμές των μυκητοκτόνων έγιναν σε θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας, σχετικής υγρασίας και φωτισμού. Σε συνθήκες αγρού όμως όπου παρατηρείται διακύμανση της θερμοκρασίας, της υγρασίας και του φωτισμού τα αποτελέσματα πιθανόν να είναι διαφορετικά. Ως εκ τούτου είναι απαραίτητη η μελέτη της αποτελεσματικότητας των παραπάνω μυκητοκτόνων σε φυσικές συνθήκες.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Babadoost, M. and Gabrielson, R.L. 1979.** Pathogens causing *Alternaria* diseases of *Brassica* seed crops in western Washington. *Plant Disease Reporter* **63**: 815-820.

**Βακαλουνάκης, Ι.Δ. 1987.** Αξιολόγηση διάφορων μυκητοκτόνων εναντίον της αλτερναρίωσης της τομάτας (*Alternaria solani*). *Γεωργική Έρευνα* **11**: 195-204.

**Barash, I., Mor, H., Netzer, D. and Kashman, Y. 1981.** Production of zinniol by *Alternaria dauci* and its phytotoxic effect on carrot. *Physiological Plant Pathology* **19**: 7-16.

**Barklay, G.M., Murphy ,H.J., Manzer, F.E. and Hutchinson, F.E. 1973.** Effects of differential rates of nitrogen and phosphorus on early blight in potatoes. *American Potato Journal* **50**: 42-48.

**Bashi, E. and Rotem, J. 1974.** Adaptation of four pathogens to semi-arid habitats as conditioned by penetration rate and germinating spore survival. *Phytopathology* **64**:1035-1039

**Bashi, E. and Rotem, J. 1975a.** Host and biotic factors affecting sporulation of *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici* on tomatoes and of *Alternaria porri* f. sp. *solani* on potatoes. *Phytoparasitica* **3**: 27-38.

**Bashi, E. and Rotem, J. 1975b.** Sporulation of *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici* on tomatoes and of *Alternaria porri* f. sp. *solani* in potatoes under alternating wet-dry regimes. *Phytopathology* **65**: 532-535.

**Bashi, E. and Rotem, J. 1976.** Induction of sporulation of *Alternaria porri* f.

*sp. solani in vivo. Physiological Plant Pathology* **8**: 83-90.

**Basu, P.K. 1971.** Existence of chlamydospores of *Alternaria porri* f. *sp. solani* as overwintering propagules in soil. *Phytopathology* **61**: 1347-1350.

**Berger, G. 1937.** Une maladie de la tomate; La necrose du collet due a l'*Alternaria solani* Sorauer dans la region de Casablanca et de Fedala. *Ann. Epiphyt. N.S.* **3**: 225-230.

**Blachinski, D., Shtienberg, D., Dinoor, A., Kafkasi, U., Sujkowski, L.S., Zitter, T.A. and Fry, W.E. 1996.** Influence of foliar application of nitrogen and potassium on *Alternaria* diseases in potato, tomato and cotton. *Phytoparasitica* **24**: 281-292.

**Burdukova, M.V. 1971.** Infection of tubers by *Alternaria solani*. *Zashch. Rast.* **16**: 47-48.

**Brian, P.W., Curtis, P.J., Hemming, H.G., Jeffreys, E.G., Urwin, C.H. and Wright, J.M. 1949.** Alternaric acid, a biologically active metabolic product of the fungus *Alternaria solani*. *Nature* **164**: 534.

**Brian, P.W., Elson, G.W., Hemming, H.G. and Wright, J.M. 1952.** The phytotoxic properties of alternaric acid in relation to the etiology of plant diseases caused by *Alternaria solani*. *Annals of Applied Biology* **39**: 308-321.

**Casida, L.E. and Lukezic, F.L. 1992.** Control of leaf spot of alfalfa and tomato with applications of the bacterial predator *Pseudomonas* strain 679-2. *Plant Disease* **76**: 1217-1220.

**Charlton, K.M. 1953.** The sporulation of *Alternaria solani* in culture. *Transactions of the British Mycological Society* **36**: 349-355.

**Christ, B.J. and Maczuga, S.A. 1989.** The effect of fungicide schedules and inoculum levels on early blight severity and yield of potato. *Plant Disease* **73**: 695-698.

**Dahmen, H. and Staub, T. 1992.** Protective, curative and eradicator activity of difenoconazole against *Venturia inaequalis*, *Cercospora arachidicola*, and *Alternaria solani*. *Plant Disease* **76**: 774-777.

**Datar, V.V. and Mayee, C.D. 1980.** Assessment of losses in tomato yield due to early blight. *Indian Phytopathology* **34**: 191-195.

**Dillon Weston, W.A.R. 1936.** The sporulation of *Helminthosporium avenae* and *Alternaria solani* in artificial culture. *Transactions of the British Mycological Society* **20**: 112-115.

**Dorozhkin, N.A. and Ivanyuk, V.G. 1979.** Epiphytotics of dry leaf spot of potato and tomato. *Mikol. Fitopatol.* **13**: 314-321.

**Douglas, D.R. and Pavek, J.J. 1972.** Screening potatoes for field resistance to early blight. *American Potato Journal* **49**: 1-6.

**Douglas, D.R. 1972.** The effect of light and temperature on the sporulation of different isolates of *Alternaria solani*. *Canadian Journal of Botany* **50**: 629-634.

**El-Abyad, M.S., El-Sayed, M.A., El-Shanshoury, A.R. and El-Sabbagh, S.M. , 1993.** Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. *Plant and Soil* **149**: 185-195.

**Ellis, M.B. and Gibson, I.A.S. 1975.** *Alternaria solani*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria **No 475**. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, UK.

**Godoy, J. R. de. and Fernandes, N.G. 1985.** *Alternaria helianthi* (Hansf.) Tubaki & Nishihara em girassol (*Helianthus annuus* L.): Influencia de idade da planta na susceptibilidade e na infeçao das sementes. *Summa Phytopathologica* **11**: 186-197.

**Horsfall, J.G. and Heuberger, J.W. 1942.** Causes, effects and control of defoliation on tomatoes. *Connecticut Agricultural Experimental Station Bulletin* **456**: 184-223.

**Huang, R. and Levy, Y. 1995.** Characterization of iprodione-resistance isolates of *Alternaria brassicicola*. *Plant Disease* **79**: 828-833.

**Jones, J.B, Stall, R.E. and Zitter, T.A. 1993.** Compendium of tomato diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minesota, p. 13-14.

**Καλογεράκης, Σ.Ν. 1998.** Αξιολόγηση ποικιλιών και υβριδίων τομάτας ως προς την αντοχή τους σε μολύνσεις από το μύκητα *Alternaria solani*. Πτυχιακή εργασία, Αθήνα 1998, 99 σελ.

**Κανάκης, Α. 1997.** Μαθήματα Λαχανοκομίας II. Θερμοκηπιακή καλλιέργεια τομάτας. Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας.

**Kohle, H. and Hoffmann, G.M. 1989.** Untersuchungen zur Physiologie des Alternaria-Befalls von Raps. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* **96**: 225-238.

**Kunkel, L.O. 1918.** A method of obtaining abundant sporulation in cultures of *Macrosporium solani* E.&M. *Brooklyn Bot. Gard. Mem.* **1**: 306

**Kvasnyuk, N.Y. 1986.** Effect of ecological factors on the overwintering of *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Sor. *Mikol. Fitopatol.* **20**: 60-63.

**Langsdorf, G., Furuichi, N., Doke N. and Nishimura, S. 1990.** Investigations on *Alternaria solani* infections; Detection of alternaric acid and a susceptibility-inducing factor in the spore-germination fluid of *Alternaria solani*. *Journal of Phytopathology* **128**: 271-282.

**Lukens, R.J. 1960.** Conidia production from filter paper cultures of *Helminthosporium uagans* and *Alternaria solani*. *Phytopathology* **50**: 867-868.

**Lukens, R.J. 1963.** Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. *American Journal of Botany* **50**: 720-724.

**Lukens, R.J. 1966.** Interference of low temperature with the control of tomato early blight through use of nocturnal illumination. *Phytopathology* **56**: 1430-1431.

**Lukens, R.J. and Horsfall, J.G. 1969.** Spore initiation in *Alternaria solani*. (Abstr.) *Phytopathology* **59**: 1039.

**McCallan, S.E.A. and Chan, S.Y. 1943.** Inducing sporulation of *Alternaria solani* in culture. *Contributions Boyce Thompson Institute for Plant Research* **13**: 323-335.

**McPhee, W.J. 1980.** Some characteristics of *Alternaria alternata* strains resistant to iprodione. *Plant Disease* **64**: 847-849.

**Madden, L., Pennypaker, S.P. and Macnab, A.A. 1978.** FAST, a forecast system for *Alternaria solani* on tomato. *Phytopathology* **68**: 1354-1358.

**Μαλαθράκης, Ν.Ε., Καπετανάκης, Γ.Ε. και Λιναρδάκης, Δ.Κ. 1987.** Χημική καταπολέμηση της αλτερναρίωσης της τομάτας *Alternaria solani* (E. & M.) Jones & Grout σε θερμοκήπια στην Κρήτη. Επιπτώσεις στην παραγωγή.



Γεωργική Έρευνα 11: 205-216.

**Malathrakis, N.E. 1983.** *Alternaria* stem canker of tomato in Greece. *Phytopathologia Mediterranea* 22: 33-38.

**Maiero, M., Bean, G.A. and Ng, T.J. 1991.** Toxin production by *Alternaria solani* and its related phytotoxicity to tomato breeding lines. *Phytopathology* 81: 1030-1033.

**Maude, R.B. and Humpherson-Jones, F.M. 1980.** The effect of iprodione on the seed-borne phase of *Alternaria brassicicola*. *Annals of Applied Biology* 95: 321-327.

**Maude, R.B. and Humpherson-Jones, F.M. 1982.** Control of dark leaf spot *Alternaria brassicicola* of *Brassica oleracea* seed production with iprodione. *Annals of Applied Biology* 100: 94-105.

**Miller, M.E. 1983.** Relationships between onion leaf age and susceptibility to *Alternaria porri*. *Plant Disease* 67:284-286.

**Παναγόπουλος, Χ.Γ. 1995.** Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα. σελ. 35-38.

**Patterson, C.L. 1991.** Importance of chlamydospores as primary inoculum for *Alternaria solani*, incitant of collar rot and early blight on tomato. *Plant Disease* 75:274-278.

**Pelletier, J.R. and Fry, W.E. 1989.** Characterization of resistance to early blight in three potato cultivars: Incubation period, lesion expansion rate, and spore production. *Phytopathology* 79: 511-517.

**Pound, G.S. 1951.** Effect of air temperature on incidence and development

of the early blight disease of tomato. *Phytopathology* **41**: 127-135.

**Pound, G.S. and Stahmann, M.A. 1951.** The production of a toxic material by *Alternaria solani* and its relation to the early blight disease of tomato. *Phytopathology* **41**: 1104-1114.

**Rands, R.D. 1917.** The production of spores by *Alternaria solani* in pure culture. *Phytopathology* **7**:316-317.

**Rotem, J. B. 1964.** The effect of weather on the dispersal of *Alternaria* spores in a semi-arid region of Israel. *Phytopathology* **54**: 628-632.

**Rotem, J. B. 1968.** Thermoxerophytic properties of *Alternaria porri* f. sp. *solani*. *Phytopathology* **58**: 1284-1287.

**Rotem, J., Wooding B., and Aylor, D.E. 1985.** The role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores. *Phytopathology* **75**: 510-514.

**Rotem, J.B. 1994.** The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 313 pp.

**Rowell, J.B. 1953.** Leaf blight of tomato and potato plants. Factors affecting the degree of injury incited by *Alternaria dauci* f. *solani*. *Univ. R.I. Agric. Exp. Stn. Bull.* p. 320.

**Saregianni, J.A. 1936.** Liste (II) des maladies des plantes cultivees et autres de la Grece. *Annals Institute Phytopathologique Benaki* **2**: 8-12.

**Schein, R.D. 1964.** Comments on the moisture requirements of fungus germination. *Phytopathology* **54**:1427.

**Shtienberg, D., Blachinsky, D., Kremer, Y., Ben-Hador, G. and Dinoor, A. 1995.** Integration of genotype and age-related resistances to reduce fungicide use in management of *Alternaria* diseases of cotton and potato. *Phytopathology* **85**: 995-1002.

**Σπάρτσης, Ι.Ν. 1992.** Γενική και ειδική λαχανοκομία. Ο.Ε.Δ.Β., Αθήνα.

**Strandberg, J.O. 1992.** *Alternaria* diseases that attack vegetable crops: biology and options for disease management. In: *Alternaria: Plant Diseases and Metabolites* (Eds. J. Chhelkowski & A. Visconti), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 175-208.

**Tu, J.C. 1983.** Efficacy of iprodione against alternaria black pod and white mold of white beans. *Canadian Journal of Plant Pathology* **5**: 133-135.

**Vakalounakis, D.J. and Malathrakis, N.E. 1988.** A cucumber disease caused by *Alternaria alternata* and its control. *Journal of Phytopathology* **121**: 325-336.

**Valkonen, J.P.T. and Koponen, H. 1990.** The seed-borne fungi in chinese cabbage (*Brassica pekinensis*), their pathogenicity and control. *Plant Pathology* **39**: 510-516.

**Vloutoglou, I. 1994.** Epidemiology of *Alternaria linicola* on linseed (*Linum usitatissimum* L.). Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK, 378 pp.

**Vloutoglou, I. 1999.** Evaluation of tomato cultivars and hybrids for resistance to *Alternaria solani* infection. *Tests of Agrochemicals and Cultivars (Annals of Applied Biology* **134**, Supplement) **20**: 48-49.

**Waggoner, P.E. and Horsfall, J. G. 1969.** EPIDEM: A simulator of plant disease written for a computer. *Conn. Agric. Exp. Stn. Bull.* p. 698.

**Waggoner, P.E. and Parlange, J.Y. 1975.** Slowing of spore germination with changes between moderately warm and cool temperatures. *Phytopathology* **65**:551-553

**Χολέβας, Κ.Δ., Γαβαλάς, Ν.Α., Χιτζανίδου, Α., Κουγέα, Η., Τζάμος, Ε.Κ., Παππάς, Α.Χ., Έλενα, Κ., Θεοχάρη, Ι., Κορνάρου, Ε., Παναγόπουλος, Χ.Γ., Ψαλλίδας, Π.Γ., Αλιβιζάτος, Α.Σ., Κυριακοπούλου, Π. και Μπέμ, Φ. 1990.** Ασθένειες καλλιεργουμένων φυτών που παρατηρήθηκαν στην Ελλάδα κατά την περίοδο 1970-1980. *Χρονικά Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Ν.Σ.)* **16**: 1-82.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθ. κ. Δ. Βελισσαρίου που ανέλαβε την εποπτεία της παρούσας μελέτης.*

*Ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στη Δρα Ε. Βλουτόγλου, Ερευνήτρια του Μπεννακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, για τις οδηγίες που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων καθώς και για τις απαραίτητες διορθώσεις του τελικού κειμένου.*