

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΑΣ

**Μοριακή και φαινοτυπική διερεύνηση πληθυσμών κόνυζας (*Conyza albida*  
Willd. ex Sprengel, *C. bonariensis* (L.) Cronq.) για ανθεκτικότητα στο  
ζιζανιοκτόνο glyphosate**

**ΦΙΛΙΠΠΟΣ Ν. ΜΥΛΩΝΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ 2016**



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΑΣ

**Μοριακή και φαινοτυπική διερεύνηση πληθυσμών κόνυζας (*Conyza albida*  
Willd. ex Sprengel, *C. bonariensis* (L.) Cronq.) για ανθεκτικότητα στο  
ζιζανιοκτόνο glyphosate**

**ΦΙΛΙΠΠΟΣ Ν. ΜΥΛΩΝΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ 2016**

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

- Παναγιώτης Ευθυμιάδης, Επιβλέπων Καθηγητής, Ομότιμος Καθηγητής Γ.Π.Α.
- Ηλίας Ελευθεροχωρινός, Ομότιμος Καθηγητής Α.Π.Θ.
- Γεώργιος Σκαράκης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

### **Εξεταστική Επιτροπή**

- Νικόλαος Δαναλάτος, Καθηγητής Π.Θ.
- Γαρυφαλιά Οικονόμου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α.
- Ελένη Τάνη, Λέκτορας Γ.Π.Α.
- Ανέστης Καρκάνης, Λέκτορας Π.Θ.

«Η έγκριση της παρούσας διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παρ. 2)».

*Στην οικογένειά μου*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γεωργίας του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής της Σχολής Αγροτικής Παραγωγής, Υποδομών και Περιβάλλοντος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γ.Π.Α.). Ένα μέρος της πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων (όπου εργάζομαι) του Τμήματος Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων και Φυτοφαρμακευτικής του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Μ.Φ.Ι.) και ένα μέρος της πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (Ε.Κ.Ε.Τ.Α.).

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής, θα ήθελα να εκφράσω ένα βαθύ και ολόψυχο ευχαριστώ σε όσους στάθηκαν δίπλα μου σ' αυτή τη δύσκολη, επίπονη και χρονοβόρα προσπάθεια και με βοήθησαν να τη φέρω εις πέρας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής, Ομότιμο Καθηγητή του Εργαστηρίου Γεωργίας του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γ.Π.Α.) κ. Παναγιώτη Ευθυμιάδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ιδιαίτερα τιμητική επιλογή του, αναθέτοντάς μου την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Τον ευχαριστώ επίσης για τη συμβολή του στην επιλογή του θέματος αλλά και για την κριτική ανάγνωση του κειμένου της διδακτορικής διατριβής και τις ουσιαστικές υποδείξεις του που συνέβαλαν στη βελτίωσή της.

Αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Ομότιμο Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Α.Π.Θ.) και μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής κ. Ηλία Ελευθεροχωρινό για την αμέριστη συμπαράσταση που μου προσέφερε με απεριόριστη υπομονή σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Ειδικότερα, τον ευχαριστώ για την επιλογή του θέματος, το σχεδιασμό και την εποπτεία των πειραμάτων, το ακαταπόνητο ενδιαφέρον, τη συνεχή καθοδήγηση και ενθάρρυνσή του, την πολύτιμη βοήθειά του στην ερμηνεία των δεδομένων, καθώς επίσης και για τις ουσιαστικές οδηγίες και υποδείξεις του κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διδακτορικής διατριβής που συνέβαλαν στην πληρότητά της ως προς το περιεχόμενο, τη δομή και την τελική παρουσίασή της.

Ευχαριστώ θερμά επίσης, τον Κοσμήτορα της σχολής Αγροτικής Παραγωγής, Υποδομών και Περιβάλλοντος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γ.Π.Α.) και

μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Καθηγητή κ. Γεώργιο Σκαράκη, ο οποίος αποδέχθηκε να αντικαταστήσει το προηγούμενο μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής κ. Κωνσταντίνο Γιαννοπολίτη, Δρ Ζιζανιολογίας, λόγω αφυπηρέτησής του. Τον ευχαριστώ επίσης για την κριτική ανάγνωση του κειμένου της διδακτορικής διατριβής και τις ουσιαστικές υποδείξεις του που συνέβαλαν στη βελτίωσή της.

Ευχαριστώ θερμά τον τέως Διευθυντή του πρώην Τμήματος Ζιζανιολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Μ.Φ.Ι.) και πρώην μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής κ. Κωνσταντίνο Γιαννοπολίτη για τη συμβολή του στην επιλογή του θέματος, το σχεδιασμό και την εποπτεία των πειραμάτων, καθώς και για την κριτική ανάγνωση του κειμένου της διδακτορικής διατριβής και τις ουσιαστικές υποδείξεις του που συνέβαλαν στη βελτίωσή της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Ερευνητή Γ΄ του Ινστιτούτου Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (Ε.Κ.Ε.Τ.Α.) κ. Παναγιώτη Μαδέση, Δρ Μοριακής Γενετικής, για την ουσιαστική συνδρομή του στην εκτέλεση των πειραμάτων μοριακής ταυτοποίησης των ειδών κόνυζας και μοριακής διερεύνησης της ανθεκτικότητάς τους στο glyphosate.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Α.Π.Θ.) κ. Γεώργιο Μενεξέ για την καθοριστική βοήθειά του στη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων αλλά και για τη συνδρομή του στην πληρέστερη δυνατή παρουσίασή τους.

Ευχαριστώ τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής και ειδικότερα, τον Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Π.Θ.) κ. Νικόλαο Δαναλάτο, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γ.Π.Α.) κ. Γαρυφαλιά Οικονόμου, τη Λέκτορα του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γ.Π.Α.) κ. Ελένη Τάνη και το Λέκτορα του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Π.Θ.) κ. Ανέστη Καρκάνη για την κριτική ανάγνωση του κειμένου της διδακτορικής διατριβής και τις ουσιαστικές υποδείξεις τους που συνέβαλαν στη βελτίωσή της.

Ευχαριστώ τις Προϊσταμένες του Εργαστηρίου Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων αλλά και τους Προϊσταμένους και Προϊσταμένες των



υπολοίπων Εργαστηρίων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Μ.Φ.Ι.) καθώς και τις Διευθύνσεις του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Μ.Φ.Ι.) για την ευγενική παραχώρηση των εργαστηρίων, των θερμοκηπίων και των εξωτερικών χώρων του Ινστιτούτου για την εκτέλεση μέρους των πειραμάτων καθώς και για τη στήριξη που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

Το μεγαλύτερο όφελος αυτής της επίπονης και πολυετούς προσπάθειας ήταν η συνεργασία με ανθρώπους με υψηλό επίπεδο γνώσης την οποία ανιδιοτελώς προσέφεραν σε μένα, αλλά ταυτόχρονα δαπάνησαν χρόνο, συνεισέφεραν σκέψεις-προτάσεις, διέθεσαν ανυστερόβουλα τις προσπάθειές τους με μοναδικό σκοπό μια άρτια και πληρέστερη όσο το δυνατόν διδακτορική διατριβή. Μοιράστηκαν την αγωνία μου και μαζί με τις ειλικρινείς τους ευχές, την αισιοδοξία τους, και την αυτοπροσφορά τους μετάγγισαν σε μένα τη σπάνια βεβαιότητα ότι δεν είναι όλα αποτέλεσμα συναλλαγής, ανταπόκρισης σε κοινά συμφέροντα, δεν οριοθετούνται και δεν χαρακτηρίζονται όλα αυστηρά από μια αμοιβαία επωφελή συνεργασία.

Αν και δεν μπορεί να εκφραστεί επαρκώς η ευγνωμοσύνη και η αγάπη προς την οικογένειά σου, ευχαριστώ τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την ανεξάντλητη βοήθεια, την αμέριστη συμπαράσταση, την κατανόηση και τη συνεχή ενθάρρυνσή τους καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας. Ως ένα ελάχιστο δείγμα ευγνωμοσύνης τους αφιερώνω τη διδακτορική μου διατριβή.

Φίλιππος Ν. Μυλωνάς

Αθήνα, Μάιος 2016

Μελετήθηκαν 60 πληθυσμοί κόνυζας [32 πληθυσμοί *Conyza albida* (συν. *Conyza sumatrensis*) Willd. ex Sprengel και 28 πληθυσμοί *Conyza bonariensis* (L.) Cronq.], σε πείραμα φυτοδοχείων, για πιθανή ύπαρξη ανθεκτικότητας στο glyphosate. Οι πληθυσμοί προέρχονταν από δενδρώδεις καλλιέργειες (οπωρώνες και ελαιώνες) και αμπελώνες της Κεντρικής (Νομός Λάρισας) και Νότιας Ελλάδας (Νομοί Αργολίδας και Κορινθίας). Ακολούθως, προσδιορίστηκε η ένταση ανθεκτικότητας (R/S) πέντε (5) ανθεκτικών (R) πληθυσμών *C. albida* και τριών (3) ανθεκτικών (R) πληθυσμών *C. bonariensis* στο glyphosate. Επίσης, αξιολογήθηκε η επίδραση της εποχής εφαρμογής στη δράση του glyphosate εναντίον των ανθεκτικότερων (R) αλλά και των ευαίσθητων (S) πληθυσμών κόνυζας (*C. albida* και *C. bonariensis*). Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η επίδραση του χαρακτηριστικού της ανθεκτικότητας στην προσαρμοστικότητα (ρυθμός ανάπτυξης και φαινολογικά χαρακτηριστικά) πέντε (5) ανθεκτικών (R) πληθυσμών *C. albida*, τριών (3) ανθεκτικών (R) πληθυσμών *C. bonariensis*, ενός ευαίσθητου (S) πληθυσμού *C. albida* και ενός ευαίσθητου (S) πληθυσμού *C. bonariensis*. Τέλος, έγινε προσπάθεια μοριακής ταυτοποίησης δύο (2) πληθυσμών *C. albida* και δύο (2) πληθυσμών *C. bonariensis*, καθώς επίσης και αλληλούχηση τμήματος του γονιδίου *epsps* για πιθανή ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων που εξηγούν την ανθεκτικότητα του ενζύμου EPSPS στο glyphosate.

Το αρχικό πείραμα φυτοδοχείων έδειξε ότι 25 πληθυσμοί κόνυζας (18 πληθυσμοί *C. albida* και 7 πληθυσμοί *C. bonariensis*) χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικοί (R) στο glyphosate επειδή ποσοστό μεγαλύτερο από 50% (μέσος όρος > 2 φυτά/φυτοδοχείο) επιβίωσε τέσσερις εβδομάδες από την εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του glyphosate (63 g δ.ο./στρ.). Αντιθέτως, ως ευαίσθητοι (S) χαρακτηρίστηκαν οι πληθυσμοί που επιβίωσαν σε ποσοστό μικρότερο του 50% (μέσος όρος 0-2 φυτά/φυτοδοχείο) τέσσερις εβδομάδες από την εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του glyphosate (63 g δ.ο./στρ.).

Τα πειράματα προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας (R/S) των πληθυσμών στο glyphosate έδειξαν ότι οι οκτώ (8) ανθεκτικοί (R) πληθυσμοί κόνυζας [πέντε (5) ανθεκτικοί (R) πληθυσμοί *C. albida* και τρεις (3) ανθεκτικοί (R) πληθυσμοί *C. bonariensis*] διέφεραν σημαντικά ως προς το χαρακτηριστικό αυτό. Ειδικότερα, η δόση του glyphosate που μείωσε το νωπό βάρος των ανθεκτικών φυτών *C. albida* κατά 50% (GR<sub>50</sub> τιμή) κυμάνθηκε από 54 έως 261 g δ.ο./στρ., ενώ η

αντίστοιχη τιμή για τον ευαίσθητο πληθυσμό *C. albida* ήταν 7-8 g δ.ο./στρ.. Η δόση του glyphosate που ήταν αναγκαία για τη μείωση του νωπού βάρους των ανθεκτικών φυτών *C. bonariensis* κατά 50% (GR<sub>50</sub> τιμή) κυμάνθηκε από 17 έως 39 g δ.ο./στρ., ενώ η αντίστοιχη τιμή για τον ευαίσθητο πληθυσμό *C. bonariensis* ήταν 4-5 g δ.ο./στρ.. Η υπολογισθείσα ένταση ανθεκτικότητας των ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* ή *C. bonariensis* [R/S, όπου αριθμητής είναι η GR<sub>50</sub> τιμή του ανθεκτικού πληθυσμού κόνυζας (*C. albida* ή *C. bonariensis*) και παρονομαστής η GR<sub>50</sub> τιμή του ευαίσθητου πληθυσμού κόνυζας (S1 για την *C. albida* ή S2 για την *C. bonariensis*)], κυμάνθηκε από 7,7 έως 37,3 και από 3,4 έως 7,8 για τους ανθεκτικούς πληθυσμούς *C. albida* και *C. bonariensis*, αντίστοιχα.

Τα πειράματα φυτοδοχείων για τη μελέτη της επίδρασης της εποχής εφαρμογής στη δράση του glyphosate εναντίον των ανθεκτικότερων (R) αλλά και των ευαίσθητων (S) πληθυσμών κόνυζας (*C. albida* και *C. bonariensis*) έδειξαν μικρότερες GR<sub>50</sub> τιμές των ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* μετά από εφαρμογή του glyphosate το χειμώνα από ό,τι το καλοκαίρι, γεγονός που σημαίνει ότι όλοι οι πληθυσμοί *C. albida* και *C. bonariensis* είναι πιο ευαίσθητοι μετά από εφαρμογή του glyphosate το χειμώνα (θερμοκρασίες ψεκασμών 5-12 °C) από ό,τι το καλοκαίρι (θερμοκρασίες ψεκασμών 27-31 °C).

Τα πειράματα φυτοδοχείων για τη μελέτη της επίδρασης του χαρακτηριστικού της ανθεκτικότητας στην προσαρμοστικότητα (ρυθμός ανάπτυξης και φαινολογικά χαρακτηριστικά) πέντε (5) ανθεκτικών (R) πληθυσμών *C. albida*, τριών (3) ανθεκτικών (R) πληθυσμών *C. bonariensis*, ενός ευαίσθητου (S) πληθυσμού *C. albida* και ενός ευαίσθητου (S) πληθυσμού *C. bonariensis* έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών. Ειδικότερα, διαπιστώθηκε ότι οι πληθυσμοί *C. albida* και *C. bonariensis* διέφεραν μεταξύ τους ως προς το ξηρό βάρος και τα φαινολογικά χαρακτηριστικά αλλά και μεταξύ των ετών 2012 και 2014, γεγονός που υποδηλώνει ότι η προσαρμοστικότητα των πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* δεν σχετίζεται με το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητας, αλλά επηρεάζεται από την περιοχή προέλευσης των πληθυσμών και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την αξιολόγησή τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι σχετικές εργασίες όσον αφορά την *C. albida* δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα.

Η προσαρμογή μοριακής μεθόδου που βασίζεται στη χρήση των *ITS2* (Second internal transcribed spacer) και *rbcL* [Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco)] περιοχών του χλωροπλαστικού DNA (cpDNA)

συνέβαλε επιτυχώς στην ταυτοποίηση του ανθεκτικότερου (R) και του ευαίσθητου (S) πληθυσμού των *C. albida* και *C. bonariensis*. Η μοριακή ταυτοποίηση των ειδών *C. albida* και *C. bonariensis* αναφέρθηκε για πρώτη φορά παγκοσμίως.

Η αλληλούχηση τμήματος του γονιδίου *epsps* του ανθεκτικότερου (R) και του ευαίσθητου (S) πληθυσμού των *C. albida* και *C. bonariensis* έδειξε αντικατάσταση της ιστιδίνης (**His**) στη θέση **41** του ενζύμου EPSPS από αργινίνη (**Arg**), αλλά η αντικατάσταση αυτή δεν σχετίζεται με καταγραφείσες σημειακές μεταλλάξεις που καθιστούν ανθεκτικό το ένζυμο EPSPS στο glyphosate. Η διαπίστωση αυτή μας οδηγεί στην υπόθεση ότι ο πιθανότερος μηχανισμός ανθεκτικότητας των πληθυσμών κόνυζας (*C. albida* και *C. bonariensis*) σχετίζεται με τη μειωμένη μετακίνηση του glyphosate στο χώρο δράσης (χλωροπλάστης). Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας της *C. albida* στο glyphosate αναφέρθηκε για πρώτη φορά παγκοσμίως.

Τα αποτελέσματα της διδακτορικής αυτής διατριβής τεκμαίρουν ότι αρκετοί πληθυσμοί κόνυζας (*C. albida* και *C. bonariensis*) από δενδρώδεις καλλιέργειες (οπωρώνες και ελαιώνες) και αμπελώνες της Κεντρικής (Νομός Λάρισας) και Νότιας Ελλάδας (Νομοί Αργολίδας και Κορινθίας) έχουν ανθεκτικότητα στο glyphosate. Η αλληλούχηση περιοχών του χλωροπλαστικού DNA (cpDNA) συνέβαλε επιτυχώς στη μοριακή ταυτοποίηση των ειδών *C. albida* και *C. bonariensis*. Η αλληλούχηση τμήματος του γονιδίου *epsps* επιβεβαίωσε τη μη ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων που εξηγούν την ανθεκτικότητα των πληθυσμών λόγω τροποποίησης του ενζύμου EPSPS. Η προσαρμοστικότητα των πληθυσμών έδειξε ότι δεν επηρεάζεται από το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητας, αλλά από την περιοχή προέλευσης και τις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την αξιολόγησή τους. Τέλος, η μεγαλύτερη ευαισθησία όλων των πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* μετά από εφαρμογή του glyphosate το χειμώνα από ό,τι το καλοκαίρι οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κόνυζα (*Conyza* spp.) αντιμετωπίζεται αποτελεσματικότερα με χειμερινή παρά με θερινή εφαρμογή του glyphosate.

Τα ευρήματα αυτά καθιστούν αναγκαία την εναλλαγή ζιζανιοκτόνων με διαφορετικό τρόπο δράσης σε συνδυασμό με τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης της κόνυζας (*Conyza* spp.) προκειμένου να μειωθεί η πίεση επιλογής και η ως εκ τούτου δυνατότητα επικράτησης νέων ανθεκτικών πληθυσμών στο glyphosate ή σε άλλα ζιζανιοκτόνα.

## SUMMARY

---

Sixty (60) *Conyza* spp. populations [32 *Conyza albida* (syn. *Conyza sumatrensis*) Willd. ex Sprengel populations and 28 *Conyza bonariensis* (L.) Cronq. populations] were evaluated in pot experiment for possible existence of resistance to glyphosate. The populations originated from orchards, olive groves and vineyards located in the central (Larissa) and southern (Argolida, Korinthia) Greece. In addition, pot dose response experiments were also conducted to study the levels of resistance (R/S) of five (5) resistant (R) *C. albida* populations and three (3) resistant (R) *C. bonariensis* populations to glyphosate. Moreover, pot experiments were carried out to investigate the influence of the glyphosate season application on its efficacy against the most resistant (R) and susceptible (S) *C. albida* and *C. bonariensis* populations. Furthermore, pot experiments were also conducted to study the effect of the resistant trait on fitness (growth rate and phenological characteristics) of five (5) resistant (R) *C. albida* populations, three (3) resistant (R) *C. bonariensis* populations, one susceptible (S) *C. albida* population and one susceptible (S) *C. bonariensis* population. Effort was also made to identify molecularly two (2) *C. albida* populations and two (2) *C. bonariensis* populations. Finally, *epsps* gene fragment was sequenced to detect possible existence of point mutations that explain the resistance of EPSPS enzyme to glyphosate.

The initial screening experiment indicated that 25 *Conyza* spp. populations (18 *C. albida* and 7 *C. bonariensis* populations) were resistant (R) to glyphosate since they survived at a percentage higher than 50% (average > 2 plants/pot) at four weeks after treatment of the recommended glyphosate rate (0.63 kgr a.i./ha). On the other hand, the rest of the populations that survived at a percentage lower than 50% (average 0-2 plants/pot) at four weeks after treatment of the recommended glyphosate rate (0.63 kgr a.i./ha) were characterized as susceptible (S).

The dose response experiments indicated that the levels of resistance (R/S) varied significantly among the eight resistant (R) *Conyza* spp. populations [five (5) resistant (R) *C. albida* populations and three (3) resistant (R) *C. bonariensis* populations]. More specifically, the dose of glyphosate needed for 50% reduction of the resistant *C. albida* plant's fresh weight (GR<sub>50</sub> value) ranged from 0.54 to 2.61 kg a.i./ha, while the respective value for the susceptible *C. albida* population was 0.07-0.08 kg a.i./ha. The dose of glyphosate needed for 50% reduction of the resistant *C.*

*bonariensis* plant's fresh weight (GR<sub>50</sub> value) ranged from 0.17 to 0.39 kg a.i./ha, while the respective value for the susceptible *C. bonariensis* population was 0.04-0.05 kg a.i./ha. The calculated levels of resistance [determined by the resistance ratio (R/S), where R is the GR<sub>50</sub> value of the resistant *C. albida* or *C. bonariensis* population and S the GR<sub>50</sub> value of the susceptible population S1 for *C. albida* or S2 for *C. bonariensis*] ranged from 7.7-37.3 and 3.4-7.8 for the resistant *C. albida* and *C. bonariensis* populations, respectively.

The conducted pot experiments to investigate the effect of the glyphosate season application on its efficacy against the most resistant (R) and the susceptible (S) *C. albida* and *C. bonariensis* populations indicated lower GR<sub>50</sub> values for both resistant and susceptible *C. albida* and *C. bonariensis* populations after glyphosate application in winter than in summer, suggesting that all *C. albida* and *C. bonariensis* populations were more susceptible to glyphosate applied in winter (temperatures during the applications 5-12 °C) than in summer (temperatures during the applications 27-31 °C).

The carried out pot experiments to study the effect of the resistant trait on the fitness (growth rate and phenological characteristics) of five (5) resistant (R) *C. albida* populations, three (3) resistant (R) *C. bonariensis* populations, one susceptible (S) *C. albida* population and one susceptible (S) *C. bonariensis* population showed significant differences among populations. More specifically, differences were revealed between the dry weight and the phenological characteristics of *C. albida* and *C. bonariensis* populations and between the two experiments (2012 and 2014), suggesting that fitness is not correlated with the resistant trait of *C. albida* and *C. bonariensis* populations, but it is affected by the origin of populations and the prevailing conditions during their evaluation. It is worth noting that similar studies on *C. albida* are not reported earlier.

Adjustment of molecular method by using the *ITS2* (Second internal transcribed spacer) and *rbcL* [Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco)] regions of cpDNA identified with success the most resistant (R) *C. albida* and *C. bonariensis* population, one susceptible (S) *C. albida* and one susceptible (S) *C. bonariensis* population. The molecular identification of the species *C. albida* and *C. bonariensis* was reported for first time worldwide.

Sequence of *epsps* gene fragment of the most resistant (R) *C. albida* and *C. bonariensis* population, one susceptible (S) *C. albida* and one susceptible (S) *C.*

*bonariensis* population showed substitution of histidine (**His**) at the position **41** of the EPSPS enzyme to arginine (**Arg**), which is not related with the known point mutations that confer resistance to glyphosate. This fact leads to the hypothesis that the existed resistance could be attributed to reduced translocation of glyphosate to its place of action (chloroplast). The molecular basis of resistance to glyphosate for *C. albida* was reported for first time worldwide.

The results of this PhD thesis indicate that many *Conyza* spp. populations (*C. albida* and *C. bonariensis*) originating from orchards, olive groves and vineyards located in the central (Larissa) and southern (Argolida, Korinthia) Greece are already resistant to glyphosate. The sequence of cpDNA fragments indicated that this method is reliable and can be used for the molecular identification of the species *C. aldidia* and *C. bonariensis*. However, the sequence of *epsps* gene fragment from the resistant populations did not indicate any point mutation explaining their resistance due to altered EPSPS enzyme. The resistance trait of populations was not related with their fitness, whereas all *C. albida* and *C. bonariensis* populations were controlled better with winter than summer application of glyphosate.

These findings lead to the conclusion that herbicide rotation with different modes of action in combination with the use of alternative methods is needed for *Conyza* spp. control in order to reduce the selection pressure and consequently the dominance of new glyphosate/any herbicide resistant populations.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	v
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	viii
<b>SUMMARY</b> .....	xi
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	xiv
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b> .....	1
<b>Εισαγωγή</b>	
1.1. Γενική εισαγωγή.....	1
1.2. Αναγκαιότητα διερεύνησης του προβλήματος .....	3
1.3. Σκοπός της διδακτορικής διατριβής .....	4
1.4. Πρωτοτυπία της διδακτορικής διατριβής .....	4
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b> .....	6
<b>Διερεύνηση ανθεκτικότητας πληθυσμών κόνυζας (<i>Conyza albida</i> και <i>C. bonariensis</i>) σε πειράματα φυτοδοχείων</b>	
2.1. Εισαγωγή.....	6
2.1.1. Ορισμοί.....	6
2.1.2. Βιολογία του ζιζανίου κόνυζα ( <i>Conyza</i> spp. Less.).....	8
2.1.3. Αντιμετώπιση του ζιζανίου κόνυζα ( <i>Conyza</i> spp.).....	13
2.1.3.1. Ζιζανιοκτόνα-αναστολείς βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων (ένζυμο EPSPS).....	18
2.1.4. Διεθνής κατάσταση ανθεκτικότητας ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα.....	20
2.1.4.1. Ανθεκτικά είδη ζιζανίων στην Ελλάδα.....	23
2.1.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανθεκτικότητα των ζιζανίων.....	29
2.1.4.3. Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου EPSPS (glyphosate).....	31



2.1.4.3.1. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα- αναστολείς της δράσης του ενζύμου EPSPS (glyphosate).....	33
2.1.4.3.2. Παράγοντες επικράτησης ανθεκτικών πληθυσμών κόνυζας ( <i>Conyza</i> spp.) σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου EPSPS (glyphosate).....	37
2.2. Σκοπός της εργασίας.....	39
2.3. Υλικά και μέθοδοι.....	39
2.3.1. Συλλογή φυτικού υλικού.....	39
2.3.2. Διερεύνηση ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών.....	41
2.3.3. Προσδιορισμός της έντασης ανθεκτικότητας.....	43
2.4. Στατιστική ανάλυση.....	45
2.5. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	47
2.5.1. Διερεύνηση ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών.....	47
2.5.2. Προσδιορισμός της έντασης ανθεκτικότητας.....	52

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....57**

#### **Επίδραση της εποχής εφαρμογής στη δράση του glyphosate εναντίον πληθυσμών *Conyza albida* και *C. bonariensis***

3.1. Εισαγωγή.....	57
3.2. Σκοπός της εργασίας.....	57
3.3. Υλικά και μέθοδοι.....	57
3.4. Στατιστική ανάλυση.....	59
3.5. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	61

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....70**

#### **Προσαρμοστικότητα ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών *Conyza albida* και *C. bonariensis* στο glyphosate**

4.1. Εισαγωγή.....	70
4.2. Σκοπός της εργασίας.....	73
4.3. Υλικά και μέθοδοι.....	73

4.3.1. Προετοιμασία, φύτευμα, μεταφύτευση και ανάπτυξη των φυτών.....	74
4.4. Στατιστική ανάλυση.....	75
4.5. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	76
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....</b>	<b>92</b>
<b>Μοριακή ταυτοποίηση των ειδών <i>Conyza albida</i> και <i>C. bonariensis</i></b>	
5.1. Εισαγωγή.....	92
5.2. Σκοπός της εργασίας.....	93
5.3. Υλικά και μέθοδοι.....	93
5.3.1. Προέλευση σπόρων και παραγωγή φυτικού υλικού.....	93
5.3.2. Διαδικασία μοριακής ταυτοποίησης ειδών του γένους <i>Conyza</i> .....	94
5.4. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	95
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....</b>	<b>98</b>
<b>Μοριακή βάση της ανθεκτικότητας πληθυσμών <i>Conyza albida</i> και <i>C. bonariensis</i> στο glyphosate</b>	
6.1. Εισαγωγή.....	98
6.1.1. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας της κόνυζας ( <i>Conyza</i> spp.) στο glyphosate..	98
6.2. Σκοπός της εργασίας.....	102
6.3. Υλικά και μέθοδοι.....	102
6.3.1. Προέλευση σπόρων και παραγωγή φυτικού υλικού.....	102
6.3.2. Ενίσχυση και αλληλούχηση τμήματος του γονιδίου <i>epsps</i> .....	103
6.4. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	105
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>108</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>130</b>

### 1.1. Γενική εισαγωγή

Το γένος *Conyza* (κόνυζα) της οικογένειας Compositae (Asteraceae) περιλαμβάνει 50-80 είδη που αναπτύσσονται στις εύκρατες και υποτροπικές περιοχές της Αμερικής, ενώ πολλά από αυτά τα είδη έχουν εισαχθεί και εγκατασταθεί πλήρως στις περισσότερες χώρες του κόσμου (Sansom et al., 2013). Ορισμένα είδη του γένους *Conyza* απαντώνται ως ζιζάνια σε περισσότερες από 40 καλλιέργειες σε 70 χώρες (González-Torralva et al., 2010, 2012b; Holm et al., 1997; Sansom et al., 2013). Ειδικότερα στην Ελλάδα, τα τρία είδη του γένους *Conyza*, τα οποία θεωρούνται ως τα πιο σημαντικά ζιζάνια κατά τα τελευταία χρόνια σε δενδρώδεις καλλιέργειες (οπωρώνες και ελαιώνες) και σε αμπελώνες είναι τα *Conyza albida* (συν. *Conyza sumatrensis*) Willd. ex Sprengel (Fleabane ή Sumatran fleabane), *Conyza bonariensis* (L.) Cronq. (Hairy fleabane) και *Conyza canadensis* (L.) Cronq. (Horseweed) (Mylonas et al., 2014). Το είδος *C. albida* εικάζεται ότι έχει εισαχθεί στην Ελλάδα το 1976, ενώ τα άλλα δύο είδη είναι γνωστά από τον προπερασμένο αιώνα (Γιαννίτσaros, 1997). Γενικώς, τα τρία είδη απαντώνται συχνά στην ίδια περιοχή και αναπτύσσονται σε μεικτούς πληθυσμούς.

Τα τρία είδη *C. canadensis*, *C. bonariensis* και *C. albida* (συν. *C. sumatrensis*) έχουν εισαχθεί πιθανώς στην Ευρώπη πριν 350 χρόνια και τώρα συγκαταλέγονται στα πιο άφθονα είδη που απαντώνται στην Ευρώπη (Thébaud and Abbott, 1995). Τα είδη του γένους *Conyza*, εκτός από τις καλλιεργούμενες εκτάσεις, απαντώνται συχνά σε περιθώρια δρόμων, ακαλλιεργητες εκτάσεις, όχθες ποταμών και μη καλλιεργούμενες εκτάσεις (Holm et al., 1997; Γιαννίτσaros, 1997).

Ορισμένα βιολογικά χαρακτηριστικά της κόνυζας (*Conyza* spp.) και ειδικότερα, η μακρά περίοδος φυτρώματος των σπόρων (φθινόπωρο/άνοιξη) (Buhler and Owen, 1997; Regehr and Bazzaz, 1979; Sansom et al., 2013; Tozzi et al., 2014; Weaver, 2001; Wu et al., 2007), η παραγωγή σπόρων που δεν έχουν λήθαργο (Buhler and Owen; 1997; Karlsson and Milberg, 2007; Sansom et al., 2013; Tozzi et al., 2014; Weaver, 2001) και μπορούν να φυτρώσουν/βλαστήσουν στο έδαφος αμέσως μετά την ωρίμανση (Buhler and Owen, 1997; Nandula et al., 2006; Sansom et al., 2013; Weaver, 2001; Wu et al., 2007), η μεγάλη ευκολία διασποράς των σπόρων με τη

βοήθεια του ανέμου (έως 500 km για την *C. canadensis*) (Sansom et al., 2013; Shields et al., 2006; Wu et al., 2007) και οι τεράστιες ποσότητες σπόρου που μπορεί να παράγει ένα φυτό (έως 200.000 σπόρους για την *C. canadensis*) (Sansom et al., 2013; Weaver, 2001; Wu et al., 2007) το καθιστούν προβληματικό ζιζάνιο σε καλλιέργειες όπου δεν γίνεται κατεργασία του εδάφους ή γίνεται ελάχιστη (Buhler and Owen, 1997; Davis and Johnson, 2008; Kruger et al., 2009; Weaver, 2001; Wu et al., 2007). Οι Bruce and Kells (1990) αναφέρουν ότι 100-200 φυτά *C. canadensis*/m<sup>2</sup> μείωσαν την απόδοση της σόγιας έως 90%. Τα όσα προαναφέρθηκαν δείχνουν ότι η αντιμετώπιση των ειδών του γένους *Conyza* πρέπει να είναι ολοκληρωμένη (επέκταση σε ολόκληρες περιοχές) και να μην περιορίζεται μεμονωμένα σε έναν αγρό.

Η κόνυζα (*Conyza* spp.), πριν τη χρήση των συστημάτων ελάχιστης ή μη κατεργασίας του εδάφους που χρησιμοποιούνται ευρέως στις δενδρώδεις καλλιέργειες (οπωρώνες και ελαιώνες) και στους αμπελώνες, αντιμετωπιζόταν με κατεργασία του εδάφους (Brown and Whitwell, 1988; Kapusta, 1979; Sansom et al., 2013). Βεβαίως, με την υιοθέτηση των συστημάτων ελάχιστης ή μη κατεργασίας του εδάφους, η αντιμετώπιση της κόνυζας (*Conyza* spp.) στις δενδρώδεις καλλιέργειες (οπωρώνες και ελαιώνες) και στους αμπελώνες στηρίζεται σχεδόν αποκλειστικά στη χρήση ζιζανιοκτόνων (Sansom et al., 2013). Οι ανακλήσεις όμως των εγκρίσεων πολλών υπολειμματικών προφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων είχαν ως συνέπεια την αναγκαιότητα για εφαρμογή επαναλαμβανόμενων μεταφυτρωτικών εφαρμογών για την αντιμετώπισή της (Mylonas et al., 2014; Nol et al., 2012). Το glyphosate [N-(phosphonomethyl)-glycine] είναι το ευρέως χρησιμοποιούμενο ζιζανιοκτόνο (μόνο του ή σε μίγματα με άλλα ζιζανιοκτόνα) για την αντιμετώπισή της (Sansom et al., 2013).

Ο **μηχανισμός δράσης** του ζιζανιοκτόνου glyphosate σχετίζεται με την αναστολή της δράσης του ενζύμου **συνθάση του 5-ενολοπυροσταφυλο-φωσφο-σικιμικού οξέος (EPSPS, 5-enolpyruvylshikimate-3-phospahte synthase)**, το οποίο είναι ένζυμο κλειδί κατά τη **βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη** (Duke and Powles, 2008b; Ελευθεροχωρινός, 2014; Hermann and Weaver, 1999; Steinrücken and Amrhein, 1980).

## 1.2. Αναγκαιότητα διερεύνησης του προβλήματος

Η εξέλιξη πληθυσμών ζιζανίων με ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα θεωρείται πλέον ένα από τα σοβαρότερα ζιζανιολογικά προβλήματα, αφού η ύπαρξη τέτοιων πληθυσμών περιορίζει την επιλογή ζιζανιοκτόνων για την αντιμετώπισή τους. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις, η απώλεια ενός ζιζανιοκτόνου λόγω εμφάνισης ανθεκτικών πληθυσμών ζιζανίων και η ως εκ τούτου αναγκαστική επιλογή κάποιου άλλου ζιζανιοκτόνου ή λιγότερο αποτελεσματικών μεθόδων από τα ήδη χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα μπορεί να συνεπάγεται αρνητικές οικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Ελευθεροχωρινός, 2014; Monaco et al., 2002).

Η αντιμετώπιση των ανθεκτικών πληθυσμών, αλλά και η μείωση της δυνατότητας επικράτησης νέων πληθυσμών με ανθεκτικότητα σε νέα ζιζανιοκτόνα δεν είναι εύκολη, αφού προϋποθέτει άριστη γνώση των φυσιολογικών και βιοχημικών μηχανισμών της ανθεκτικότητας, των παραγόντων που επηρεάζουν την εξέλιξή της, των μεθόδων διάγνωσης και ταυτοποίησης των ανθεκτικών πληθυσμών, αλλά και των μέτρων/μεθόδων αποτελεσματικής διαχείρισής τους. Ειδικότερα, η διάγνωση και ταυτοποίηση της ανθεκτικότητας των πληθυσμών ενός ζιζανίου σε ένα ή περισσότερα ζιζανιοκτόνα είναι μία διαδικασία αρκετά χρονοβόρα, επίπονη, συχνά δαπανηρή και απαιτεί ειδικές γνώσεις. Αυτό εξηγείται από το ότι η διαπίστωσή της προϋποθέτει συλλογή σπόρων από καλλιέργειες, στοιχείων από παραγωγούς, αλλά και διεξαγωγή πειραμάτων σε ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκήπιο, θάλαμοι ανάπτυξης φυτών, καλυμμένοι υπαίθριοι χώροι), εργαστήριο (μοριακό επίπεδο) και αγρό (συνθήκες γεωργού) (Ελευθεροχωρινός, 2014).

Ορισμένοι παραγωγοί δενδρωδών καλλιεργειών (οπωρώνων και ελαιώνων) και αμπελώνων σε περιοχές της Κεντρικής (Νομός Λάρισας) και Νότιας Ελλάδας (Νομοί Αργολίδας και Κορινθίας) εξέφρασαν παράπονα κατά τα έτη 2008-2009 για μη ικανοποιητική αντιμετώπιση της κόνυζας (*Conyza* spp.) με glyphosate. Η μη επιτυχής χημική αντιμετώπιση της κόνυζας (*Conyza* spp.) σε συνδυασμό με τη συνεχώς διευρυνόμενη εμφάνιση του προβλήματος οδήγησε στην υπόθεση της πιθανής ύπαρξης ανθεκτικότητας της κόνυζας (*Conyza* spp.) στο glyphosate και στην ως εκ τούτου αναγκαιότητα διερεύνησής της.

### 1.3. Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν:

- 1) Η διερεύνηση εξήντα (60) πληθυσμών κόνυζας (32 *C. albida* και 28 *C. bonariensis*) για πιθανή ύπαρξη ανθεκτικότητας στο glyphosate.
- 2) Ο προσδιορισμός της έντασης ανθεκτικότητας (R/S) πέντε (5) ανθεκτικών (R) πληθυσμών *C. albida* και τριών (3) ανθεκτικών (R) πληθυσμών *C. bonariensis*.
- 3) Η μελέτη της επίδρασης της εποχής εφαρμογής στη δράση του glyphosate εναντίον των ανθεκτικότερων (R) αλλά και των ευαίσθητων (S) πληθυσμών κόνυζας (*C. albida* και *C. bonariensis*).
- 4) Ο προσδιορισμός της προσαρμοστικότητας (ρυθμός ανάπτυξης και φαινολογικά χαρακτηριστικά) πέντε (5) ανθεκτικών (R) πληθυσμών *C. albida*, τριών (3) ανθεκτικών (R) πληθυσμών *C. bonariensis*, ενός ευαίσθητου (S) πληθυσμού *C. albida* και ενός ευαίσθητου (S) πληθυσμού *C. bonariensis*.
- 5) Η μοριακή ταυτοποίηση δύο (2) πληθυσμών *C. albida* και δύο (2) πληθυσμών *C. bonariensis* μέσω της χρήσης των *ITS2* και *rbcL* περιοχών του χλωροπλαστικού DNA (cpDNA).
- 6) Η αλληλούχηση τμήματος του γονιδίου *epsps* από δύο (2) ανθεκτικούς (R) και δυο ευαίσθητους (S) πληθυσμούς *C. albida* και *C. bonariensis* για πιθανή ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων που εξηγούν την ανθεκτικότητα του ενζύμου EPSPS στο glyphosate.

### 1.4. Πρωτοτυπία της διδακτορικής διατριβής

Η πρωτοτυπία της παρούσας διδακτορικής διατριβής εστιάζεται στα εξής σημεία:

1. Παροχή ερευνητικών δεδομένων για 25 πληθυσμούς της κόνυζας (18 πληθυσμοί *C. albida* και 7 πληθυσμοί *C. bonariensis*) με ανθεκτικότητα στο glyphosate. Ειδικότερα, τα δεδομένα για την *C. albida* είναι σημαντικά για την ελληνική και τη διεθνή βιβλιογραφία διότι αποτελούν νέα στοιχεία για την ανθεκτικότητά της στο glyphosate.
2. Παροχή σημαντικών δεδομένων για την ελληνική και διεθνή γεωργική πρακτική, τα οποία επιβεβαιώνουν την ύπαρξη πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* στην Ελλάδα με ανθεκτικότητα στο glyphosate.
3. Παροχή χρήσιμων δεδομένων για την επίδραση της εποχής εφαρμογής στη δράση του glyphosate εναντίον ανθεκτικών (R) αλλά και ευαίσθητων (S) πληθυσμών κόνυζας (*C. albida* και *C. bonariensis*).

4. Παροχή δεδομένων σχετικά με την προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών (R) πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis*. Παρόμοια δεδομένα για την *C. albida* δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα.
5. Προσαρμογή μοριακής μεθόδου [χρήση των *ITS2* και *rbcL* περιοχών του χλωροπλαστικού DNA (cpDNA)] για την ταυτοποίηση των ειδών *C. albida* και *C. bonariensis*. Η μοριακή ταυτοποίηση των ειδών *C. albida* και *C. bonariensis* αναφέρθηκε για πρώτη φορά παγκοσμίως.
6. Παροχή δεδομένων μοριακής βάσης (αλληλούχηση τμήματος του γονιδίου *epsps*) της ανθεκτικότητας τεσσάρων (4) πληθυσμών κόνυζας (2 πληθυσμοί *C. albida* και 2 πληθυσμοί *C. bonariensis*) στο glyphosate. Συγκεκριμένα, η αλληλούχηση τμήματος του γονιδίου *epsps* έδειξε σημειακή μετάλλαξη που δεν εξηγεί την ανθεκτικότητα των πληθυσμών στο glyphosate. Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας της *C. albida* στο glyphosate αναφέρθηκε για πρώτη φορά παγκοσμίως.

### Διερεύνηση ανθεκτικότητας πληθυσμών κόνυζας (*Conyza albida* και *C. bonariensis*) σε πειράματα φυτοδοχείων

#### 2.1. Εισαγωγή

##### 2.1.1. Ορισμοί

Ο όρος **ανθεκτικότητα (resistance)** ζιζανίου σε ζιζανιοκτόνο, κατά την επικρατέστερη άποψη διεθνώς, ορίζεται ως «η κληρονομούμενη ικανότητα **μερικών φυτών** ενός είδους ζιζανίου να επιβιώνουν και να αναπαράγονται μετά από εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του ζιζανιοκτόνου, στο οποίο τα περισσότερα φυτά του αρχικού πληθυσμού ήταν ευαίσθητα» (De Prado and Franco, 2004; Ελευθεροχωρινός, 2014; HRAC, 2016; WSSA, 2016). Σύμφωνα με τον ορισμό αυτό, τα **ανθεκτικά φυτά** δεν δημιουργούνται από επαγόμενη μετάλλαξη του ζιζανιοκτόνου αλλά **προϋπάρχουν** στον αρχικό πληθυσμό του ζιζανίου και **επιλέγονται**, ως συνέπεια της συνεχούς πίεσης επιλογής (selection pressure), που ασκείται από την επαναλαμβανόμενη χρήση του ίδιου **ζιζανιοκτόνου** (Ελευθεροχωρινός, 2014). Επομένως, η πίεση επιλογής που ασκείται από τις επαναλαμβανόμενες επεμβάσεις ενός ζιζανιοκτόνου δεν προκαλεί την εκδήλωση ανθεκτικότητας αλλά επιλέγει (ευνοεί) την ήδη υπάρχουσα ανθεκτικότητα. Η ευαισθησία του αρχικού πληθυσμού του ζιζανίου, μέσα από τον οποίο επιλέχθηκαν τα πρώτα ανθεκτικά φυτά και ακολούθως εξελίχθηκαν σε ανθεκτικό βιότυπο/πληθυσμό, αποδεικνύεται από την ετικέτα της πρώτης έγκρισης του ζιζανιοκτόνου, όπου το ζιζάνιο χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητο, αλλά και παραμένει ευαίσθητο σε χρήσεις του ίδιου ζιζανιοκτόνου σε αγρούς της ίδιας ή άλλων περιοχών (Ελευθεροχωρινός, 2014).

Ο όρος **αντοχή (tolerance)** ζιζανίου σε ζιζανιοκτόνο διαφέρει από την ανθεκτικότητα αφού χαρακτηρίζει «την κληρονομούμενη ικανότητα **όλων των φυτών** του αρχικού πληθυσμού ενός ζιζανίου να επιβιώνουν και να αναπαράγονται στην **εξ αρχής εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του ζιζανιοκτόνου**». Επομένως, σύμφωνα με τον ορισμό, **όλα τα φυτά** του πληθυσμού με αντοχή ήταν **μη ευαίσθητα** πριν από την έναρξη χρήσης ενός ζιζανιοκτόνου και το είδος αυτό, στην ετικέτα της πρώτης έγκρισης του ζιζανιοκτόνου, κατατάσσονταν στα μη ευαίσθητα είδη (Ελευθεροχωρινός, 2014). Ο πληθυσμός του ζιζανίου με αντοχή δεν προκύπτει ως



αποτέλεσμα επιλογής της συνεχούς χρήσης ενός ζιζανιοκτόνου (όπως συμβαίνει με την ανθεκτικότητα), αλλά είναι μη ευαίσθητος πληθυσμός από την αρχή της χρήσης του ζιζανιοκτόνου.

Η **διασταυρωτή ανθεκτικότητα ή σταυρανθεκτικότητα (cross resistance)** ορίζεται ως «η ανθεκτικότητα ενός πληθυσμού ζιζανίου σε δυο ή περισσότερα ζιζανιοκτόνα, τα οποία έχουν **ίδιο μηχανισμό δράσης** και ανήκουν στην ίδια ή σε διαφορετικές χημικές οικογένειες» (Ελευθεροχωρινός, 2014; Rubin, 1996). Για παράδειγμα, πολλοί πληθυσμοί *Echinochloa oryzicola* (Vasing.) στην Ελλάδα έχουν ήδη διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα που ανήκουν στις οικογένειες των σουλφονουλουριών, ιμιδαζολινονών, πυριμιδινυλ(θειο)βενζοϊκών και τριαζολοπυριμιδινών, τα οποία χαρακτηρίζονται από τον ίδιο μηχανισμό δράσης [αναστολείς της δράσης του ενζύμου οξικογαλακτική συνθάση (ALS ή AHAS)] (Καλίτσου κ.ά., 2015; Καλούμενος και Ελευθεροχωρινός, 2010; Kaloumenos et al., 2013b; Παπαπαναγιώτου κ.ά., 2015). Οι Καλίτσου κ.ά. (2015) και Kaloumenos et al. (2013b) αναφέρουν ότι η ανθεκτικότητα αυτής της μορφής ελέγχεται από το ίδιο γονίδιο, αφού ο μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι ίδιος για τα προαναφερθέντα ζιζανιοκτόνα. Βέβαια, σύμφωνα με τον Gasquez (1997), η διασταυρωτή ανθεκτικότητα μπορεί να ελέγχεται από περισσότερα γονίδια, όταν ένας πληθυσμός ζιζανίου είναι ανθεκτικός λόγω μεταβολισμού (ένα γονίδιο) ενός ζιζανιοκτόνου και ανθεκτικός, λόγω ανθεκτικού ενζύμου (δεύτερο γονίδιο), σε άλλο ζιζανιοκτόνο με τον ίδιο μηχανισμό δράσης.

Η **πολλαπλή ανθεκτικότητα (multiple resistance)** ορίζεται ως «η ανθεκτικότητα ενός πληθυσμού ζιζανίου σε δυο ή περισσότερα ζιζανιοκτόνα, τα οποία έχουν **διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης** και ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες» (Ελευθεροχωρινός, 2014; Rubin, 1996). Η ανθεκτικότητα αυτής της μορφής ελέγχεται από τουλάχιστον δύο γονίδια. Το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα πολλαπλής ανθεκτικότητας αφορά στην περίπτωση ενός πληθυσμού λεπτής ήρας (*Lolium rigidum* Gaudin) προερχόμενου από την Αυστραλία, που ήταν πολλαπλώς ανθεκτικός σε ζιζανιοκτόνα οκτώ οικογενειών με τέσσερις διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης: 1) αναστολείς λειτουργίας φωτοσυστήματος II (PS II) (τα παράγωγα ουρίας-τριαζίνες-τριαζινονές), 2) οι αναστολείς της δράσης του ενζύμου οξικογαλακτική συνθάση (ALS ή AHAS) (σουλφονουλουρίες-ιμιδαζολινονές), 3) οι αναστολείς της δράσης του ενζύμου καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA (ACCase) (τα αρυλοξυφαινοξυπροπιοικά και οι κυκλοεξανδιόνες), 4) οι αναστολείς βιοσύνθεσης

λιπαρών οξέων (ένζυμα elongases) (τα χλωρακεταμίδια). Είναι προφανές ότι η πολλαπλή ανθεκτικότητα είναι η σοβαρότερη μορφή ανθεκτικότητας, αφού καθιστά πολλά ζιζανιοκτόνα που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες μη χρήσιμα να αντιμετωπίσουν αποτελεσματικά τους ανθεκτικούς πληθυσμούς και δημιουργεί, ως εκ τούτου, οξύτατα προβλήματα χημικής αντιμετώπισης των ζιζανίων (Owen et al., 2007; Παπαπαναγιώτου, 2013; Patzoldt et al., 2005).

### 2.1.2. Βιολογία του ζιζανίου κόνυζα (*Conyza* spp. Less.)

Η οικογένεια Compositae (Asteraceae) είναι μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες των Αγγειοσπέρμων, η οποία περιλαμβάνει περίπου 1.100 γένη και 25.000 είδη (Heywood, 1993). Το γένος *Conyza* Less., το οποίο ανήκει στην υποοικογένεια Asteroideae και στην ομάδα Astereae, θεωρείται ως ένα από τα πιο διαδεδομένα κοσμοπολίτικα γένη διεθνώς (Πίνακας 2.1). Περιλαμβάνει 50-80 είδη, πολλά από τα οποία έχουν εισαχθεί και εγκατασταθεί πλήρως στις περισσότερες χώρες του κόσμου (Sansom et al., 2013). Τα είδη του γένους *Conyza* απαντώνται ως ζιζάνια σε περισσότερες από 40 καλλιέργειες σε 70 χώρες (González-Torralva et al., 2010, 2012b; Holm et al., 1997; Sansom et al., 2013).

**Πίνακας 2.1.** Βοτανική κατάταξη του ζιζανίου κόνυζα (*Conyza* spp. Less.).

<b>Βασίλειο:</b>	Plantae
<b>Υποβασίλειο:</b>	Tracheobionta
<b>Υπερδιαίρεση:</b>	Spermatophyta
<b>Διαίρεση:</b>	Magnoliophyta
<b>Κλάση:</b>	Magnoliopsida
<b>Τάξη:</b>	Asterales
<b>Οικογένεια:</b>	Compositae (Asteraceae)
<b>Υποοικογένεια:</b>	Asteroideae
<b>Γένος:</b>	<i>Conyza</i>
<b>Είδος:</b>	<i>Conyza albida</i> Willd. ex Sprengel, <i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronq.

### Βοτανική Περιγραφή

Τα φυτά του γένους *Conyza* είναι πόες (σπάνια θάμνοι) με φύλλα απλά κατ' εναλλαγή. Τα βράκτια είναι τοποθετημένα κεραμιδωτά, ενώ η ανθοδόχη είναι επίπεδη, χωρίς λέπια. Τα θηλυκά ανθίδια είναι πολυάριθμα σε αρκετές σειρές, με

λεπτή σωληνόμορφη στεφάνη, η οποία στα ευρωπαϊκά μέλη, σχηματίζει στην άκρη ένα πολύ κοντό, στενό, λευκό ή σπάνια ροδόχρουν γλωσσίδιο μέχρι 1 mm. Τα ερμαφρόδιτα ανθίδια είναι λίγα, ενώ τα γόνιμα είναι κυρίως κίτρινου χρώματος. Τα αχάινια είναι πλατειά με 0-2 νεύρα, ενώ ο πάππος φέρει τρίχες (Cronquist, 1976) (Εικόνες 2.1 και 2.2).



**Εικόνα 2.1.** *Conyza albida* A: σπόρος, B: κοτυληδόνες, Γ: ρόδακας, Δ: επιμήκυνση του στελέχους, E: άνθιση, ΣΤ: σποροποίηση (Πηγή: προσωπικό αρχείο Φ. Μυλωνά).



**Εικόνα 2.2.** *Conyza bonariensis* A: σπόρος, B: κοτυληδόνες, Γ: ρόδακας, Δ: επιμήκυνση του στελέχους, E: άνθιση, ΣΤ: σποροποίηση (Πηγή: προσωπικό αρχείο Φ. Μυλωνά).

Το γένος *Conyza*, αντιπροσωπεύεται στην Ελλάδα με τα είδη *C. albida* Willd. ex Sprengel, *C. bonariensis* (L.) Cronq. και *C. canadensis* (L.) Cronq.. Πρόκειται για επιγενή είδη αμερικάνικης προέλευσης (Danin, 1976a; Danin 1976b; Γιαννίτσαρος, 1997), τα οποία είναι γνωστά κυρίως ως ζιζάνια καλλιεργειών, αλλά απαντώνται συχνά και σε περιθώρια δρόμων, ακαλλιέργητες εκτάσεις, όχθες ποταμών και μη καλλιεργούμενες εκτάσεις (Holm et al., 1997; Γιαννίτσαρος, 1997).

Η εισαγωγή στην Ελλάδα της *C. albida* είναι σχετικά πρόσφατη (1976), ενώ τα άλλα δύο είδη είναι γνωστά από τον 19<sup>ο</sup> αιώνα. Τα τρία είδη, τα οποία έχουν ευρεία εξάπλωση στην Ελλάδα, παράγουν μεγάλες ποσότητες σπόρων (αχαινίων με πάππο), τα οποία διασπείρονται εύκολα με αποτέλεσμα την ταχύτατη εμφάνιση σε πολλές περιοχές μεγάλων πληθυσμών. Η *C. albida* και η *C. bonariensis* είναι αρκετά ανθεκτικές στην ξηρασία, ενώ η *C. canadensis* έχει μεγαλύτερες απαιτήσεις σε νερό και δείχνει κάποια προτίμηση σε δροσερότερες και υγρότερες περιοχές (Γιαννίτσαρος, 1997).

Η *C. albida* έχει πλήρως εγκλιματισθεί σε πολλές περιοχές της Ελλάδας και τα τελευταία χρόνια προκαλεί προβλήματα κυρίως σε δενδρώδεις καλλιέργειες (οπωρώνες και ελαιώνες) και αμπελώνες (Economou et al., 2002).

Η μακροσκοπική διάκριση των τριών ειδών, αν και υπάρχουν ορισμένα μορφολογικά γνωρίσματα, παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες. Ειδικότερα, τα γνωρίσματα που διευκολύνουν την αναγνώριση των ειδών είναι ευδιάκριτα στο στάδιο της άνθισης και της σποροποίησης. Οι διαφορές αναφέρονται στο τρίχωμα των φύλλων και των βρακτίων, το ύψος του φυτού και ο τρόπος διακλάδωσης-έκφυσης των βλαστών, το μήκος του πάππου, τη διάμετρο των κεφαλίων και το χρώμα του φυτού (Πίνακας 2.2) (Danin, 1976a; Γκανή, 2000).

**Πίνακας 2.2.** Τα κυριότερα ταξινομικά γνωρίσματα ειδών του γένους *Conyza* Less. (Γκανή, 2000).

Ταξινομικό γνωρίσμα	<i>C. albida</i> Willd. ex Sprengel	<i>C. bonariensis</i> (L.) Cronq.	<i>C. canadensis</i> (L.) Cronq.
Φύλλα	Εντελώς τριχωτά	Εντελώς τριχωτά	Τριχωτά μόνο στα κράσπεδα και το μέσο νεύρο
Βράκτια κεφαλίου	Τριχωτά	Τριχωτά	Λεία ή σχεδόν λεία
Ύψος φυτού	Συνήθως 150-200 cm (έως 250 cm)	Συνήθως έως 50 cm	Συνήθως έως 150 cm
Κύριος άξονας	Μακρύς καταλήγων σε πυραμοειδή ή ρομβοειδή ταξιανθία	Συνήθως βραχύτερος των πλευρικών κλάδων ή ίσος με αυτούς	Μακρύς καταλήγων συνήθως σε κυλινδρική ταξιανθία
Μήκος πάππου	4-5 mm	4-5 mm	3-3,5 mm
Διάμετρος ανθισμένων κεφαλίων	2-5 mm	5-7 mm	2-4 mm
Χρώμα φυτού	Ανοικτό πράσινο λευκοπράσινο	Γκριζοπράσινο	Σκούρο πράσινο

Η κόνυζα (*Conyza* spp.) είναι ετήσιο χειμερινό ζιζάνιο, το οποίο φυτρώνει το φθινόπωρο, παραμένει στο στάδιο του ρόδακα κατά τη διάρκεια του χειμώνα και παράγει σπόρους το επόμενο καλοκαίρι (Buhler and Owen; 1997; Regehr and Bazzaz,

1979; Sansom et al., 2013; Weaver, 2001; Wu et al., 2007). Η κόνυζα (*Conyza* spp.) μπορεί να φυτρώσει και την άνοιξη αλλά σε μικρότερο ποσοστό. Ωστόσο, οι Norsworthy et al. (2009) ανέφεραν ότι η *C. canadensis* μπορεί να φυτρώνει όλο το χρόνο, αλλά οι κύριες περιόδους φυτρώματος είναι το φθινόπωρο (Σεπτέμβριος-Οκτώβριος) και την άνοιξη (Απρίλιος-Μάιος). Το χειμώνα αναγνωρίζεται από τη χαρακτηριστική μορφή ρόδακα που σχηματίζει, με φύλλα έμμισχα, ελλειψοειδή, ακέραια ή ελαφρά οδοντωτά και με άφθονο τρίχωμα. Η διάκριση των ειδών στο στάδιο αυτό είναι πολύ δύσκολη (Γιαννοπολίτης, 2003). Αργά την άνοιξη, τα φύλλα του ρόδακα συνήθως ξηραίνονται και τα φυτά φέρουν στέλεχος που έχει όρθια ανάπτυξη και είναι τριχωτό. Αυτό φέρει γραμμοειδή φύλλα των οποίων το μέγεθος μικραίνει προς την κορυφή. Το στέλεχος, στην κορυφή, έχει πολλές πλάγιες διακλαδώσεις με επάκριες ταξιανθίες μικρών κεφαλίων. Ανθίζει κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και παράγει μεγάλες ποσότητες σπόρων (αχαίνια), οι οποίοι φέρουν πάππο που διευκολύνει τη διασπορά τους με τον άνεμο σε μεγάλες αποστάσεις (έως 500 km για την *C. canadensis*) (Sansom et al., 2013; Shields et al., 2006; Wu et al., 2007). Είναι φυτό κυρίως αυτογόνιμο (έχει αναφερθεί σταυρογονιμοποίηση με τη βοήθεια των εντόμων σε ποσοστό 4%) και πολλαπλασιάζεται αποκλειστικά με σπόρους (Γιαννοπολίτης, 2003; Sansom et al., 2013; Weaver, 2001; Wu et al., 2007).

Οι σπόροι της κόνυζας (*Conyza* spp.) δεν έχουν λήθαργο (Buhler and Owen; 1997; Karlsson and Milberg, 2007; Sansom et al., 2013; Tozzi et al., 2014; Weaver, 2001) και μπορούν να φυτρώσουν/βλαστήσουν στο έδαφος αμέσως μετά την ωρίμανση (Buhler and Owen, 1997; Nandula et al., 2006; Sansom et al., 2013; Weaver, 2001; Wu et al., 2007). Οι θερμοκρασίες φυτρώματος κυμαίνονται από 10 °C έως 25 °C (Zinzolker et al., 1985).

Η *C. albida* προτιμά εγκαταλελειμμένα εδάφη (Sansom et al., 2013), ενώ η *C. bonariensis* προτιμά ελαφριά εδάφη αλλά μπορεί να φυτρώσει και σε βαριά εδάφη (Wu et al., 2007). Τέλος, η *C. canadensis* προτιμά πετρώδη, αμμώδη ή εύφορα εδάφη (Weaver, 2001). Τα είδη του γένους *Conyza* είναι ιδιαίτερα ανταγωνιστικά για τα καλλιεργούμενα φυτά σε συνθήκες έλλειψης εδαφικής υγρασίας. Επίσης, ανταγωνίζονται τις καλλιέργειες για θρεπτικά στοιχεία, τα οποία αφαιρούν από το έδαφος με αποτέλεσμα να αυξάνεται η βιομάζα τους (Γιαννοπολίτης, 2003). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η *C. albida* αλλά και η *C. canadensis* ελευθερώνουν στο έδαφος ουσίες που μειώνουν το φύτευμα-βλάστηση και ανάπτυξη άλλων φυτών

(αλληλοπάθεια) (Economou et al., 2002; Γιαννοπολίτης, 2003; Sansom et al., 2013; Tzakou et al., 2004; Weaver, 2001).

### **2.1.3. Αντιμετώπιση του ζιζανίου κόνυζα (*Conyza* spp.)**

Η κόνυζα (*Conyza* spp.) αποτελεί μεγάλο πρόβλημα σε δενδρώδεις καλλιέργειες (οπωρώνες και ελαιώνες) και σε αμπελώνες (ιδιαίτερα σε αγρούς όπου δεν γίνεται κατεργασία του εδάφους ή γίνεται ελάχιστη) (Buhler and Owen, 1997; Davis and Johnson, 2008; Kruger et al., 2009; Weaver, 2001; Wu et al., 2007). Η μακρά περίοδος φυτρώματος των σπόρων (φθινόπωρο/άνοιξη) (Buhler and Owen, 1997; Regehr and Bazzaz, 1979; Sansom et al., 2013; Tozzi et al., 2014; Weaver, 2001; Wu et al., 2007), η απουσία ληθάργου των σπόρων (Buhler and Owen; 1997; Karlsson and Milberg, 2007; Sansom et al., 2013; Tozzi et al., 2014; Weaver, 2001) οι οποίοι μπορούν να φυτρώσουν/βλαστήσουν στο έδαφος αμέσως μετά την ωρίμανση (Buhler and Owen, 1997; Nandula et al., 2006; Sansom et al., 2013; Weaver, 2001; Wu et al., 2007) και οι τεράστιες ποσότητες σπόρου που μπορεί να παράγει ένα φυτό (έως 200.000 σπόρους για την *C. canadensis*) (Sansom et al., 2013; Weaver, 2001; Wu et al., 2007) είναι παράγοντες που το καθιστούν πολύ προβληματικό ζιζάνιο. Επιπλέον, η μεγάλη ευκολία διασποράς των παραγόμενων σπόρων με τη βοήθεια του ανέμου (έως 500 km για την *C. canadensis*) (Sansom et al., 2013; Shields et al., 2006; Wu et al., 2007) διευκολύνει την είσοδο και εγκατάσταση αυτών των ζιζανίων σε πολλές περιοχές.

Η δυσκολία αντιμετώπισης της κόνυζας (*Conyza* spp.) οφείλεται στους εξής λόγους:

1) Είναι ευαίσθητο μόνο στα αρχικά στάδια ανάπτυξής του (όταν βρίσκεται στο στάδιο του ρόδακα) και αρχίζει να γίνεται πιο δύσκολη η αντιμετώπισή του από την εμφάνιση του κεντρικού στελέχους (bolting stage) (González-Torralva et al., 2010; Shrestha et al., 2007; Urbano et al., 2007; VanGessel et al., 2009; Weaver, 2001). Αυτό συμβαίνει διότι το φυτό αναπτύσσει στο στάδιο αυτό μια βαθιά πασσαλώδη ρίζα, η οποία παρέχει πρόσθετη αντοχή, ενώ η ξυλοποιημένη βάση του στελέχους παρέχει δυνατότητα αναβλάστησης μετά από καταστροφή του υπέργειου τμήματος (Γιαννοπολίτης, 2015; Wu et al., 2007).

2) Έχει μακρά περίοδο φθινοπωρινού φυτρώματος των σπόρων, η οποία διακόπτεται με την έλευση των χαμηλών θερμοκρασιών του χειμώνα (Buhler and Owen, 1997; Regehr and Bazzaz, 1979; Sansom et al., 2013; Tozzi et al., 2014; Weaver, 2001; Wu



et al., 2007). Ακολουθεί η δεύτερη περίοδος φυτρώματος κατά την επόμενη άνοιξη με την άνοδο των θερμοκρασιών (Buhler and Owen, 1997; Regehr and Bazzaz, 1979; Sansom et al., 2013; Tozzi et al., 2014; Weaver, 2001; Wu et al., 2007). Τα φυτά από το φθινοπωρινό φύτεμα παραμένουν στο στάδιο του ρόδακα κατά το χειμώνα, αλλά συνεχίζουν να αναπτύσσουν τη βαθιά πασσαλώδη ρίζα εντός του εδάφους. Έτσι, τα φυτά αυτά την επόμενη άνοιξη δύσκολα αντιμετωπίζονται παρά το γεγονός ότι δείχνουν να βρίσκονται σε ευαίσθητο στάδιο (Buhler and Owen, 1997; Γιαννοπολίτης, 2015; Wu et al., 2007).

3) Η αντιμετώπισή του είναι πιο δύσκολη όταν επικρατούν συνθήκες καταπόνησης, όπως ξηρασία ή υψηλές θερμοκρασίες (Ge et al., 2011; Γιαννοπολίτης, 2015; Moretti et al., 2013; Sansom et al., 2013).

4) Οδηγεί ταχύτατα σε επικράτηση ανθεκτικών πληθυσμών σε ζιζανιοκτόνα που χρησιμοποιούνται επανειλημμένα (Davis et al., 2008; Hear, 2014; Owen and Zelaya, 2005; Urbano et al., 2007). Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός της ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών στο glyphosate [αναστολέας βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων (αναστέλλει τη δράση του ενζύμου συνθάση του 5-ενολοπυροσταφυλοφωφο-σικιμικού οξέος (EPSPS))] σε πολλές περιοχές του κόσμου καθώς και στην Ελλάδα (Γιαννοπολίτης κ.ά., 2008; Μυλωνάς κ.ά., 2012; Mylonas et al., 2014; Nol et al., 2012; Travlos and Chachalis, 2010; Τραυλός και Χάχαλης, 2012; Travlos and Chachalis, 2013b), αλλά και σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς λειτουργίας φωτοσυστήματος II (PS II), σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς λειτουργίας φωτοσυστήματος I (PS I) και σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου οξικογαλακτική συνθάση (ALS ή AHAS) (Hear, 2016; Koger et al., 2004; Kruger et al., 2010; Santos et al., 2014; VanGessel et al., 2009; Weaver et al., 2004; Zelaya et al., 2004; Zelaya et al., 2007).

Η αντιμετώπισή του ζιζανίου αυτού πρέπει να γίνεται όταν τα φυτά βρίσκονται στο νεαρό στάδιο ανάπτυξης (μέχρι το στάδιο του ρόδακα) διότι είναι πιο ευαίσθητα σε ζιζανιοκτόνα (González-Torralva et al., 2010; Shrestha et al., 2007; Urbano et al., 2007; VanGessel et al., 2009; Weaver, 2001) και σε μηχανικά μέσα. Δεδομένου ότι οι σπόροι της κόνυζας (*Conyza* spp.) είναι βιώσιμοι στο έδαφος για λιγότερο από τρία χρόνια (González-Torralva et al., 2010; Weaver, 2001; Wu et al., 2007), η αντιμετώπιση μπορεί να είναι πιο εφικτή με την εφαρμογή, σε ευρεία κλίμακα, ενός προγράμματος που περιορίζει δραστικά την παραγωγή νέων σπόρων που επαναμολύνουν το έδαφος (Γιαννοπολίτης, 2015).



Οι ανακλήσεις των εγκρίσεων πολλών υπολειμματικών προφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων συνέβαλαν στην αύξηση των μεταφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων για την αντιμετώπισή της (Mylonas et al., 2014; Nol et al., 2012). Το glyphosate χρησιμοποιείται κατά κόρον μόνο του ή σε μίγματα με άλλα ζιζανιοκτόνα για την αντιμετώπισή της (Sansom et al., 2013).

Τα ζιζανιοκτόνα που χρησιμοποιούνται σε δενδρώδεις καλλιέργειες (οπωρώνες και ελαιώνες) και αμπελώνες για την αντιμετώπιση της κόνυζας (*Coryza* spp.), εκτός του glyphosate [αναστολέας βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων (ένζυμο EPSPS)], είναι αυτά που ανήκουν στις οικογένειες/ομάδες των φαινυλοφθαλιμιδίων (flumioxazin), διφαινυλικών αιθέρων (oxyfluorfen), ακεταμιδίων (napropamide), τριαζολοπυριμιδινών (ετοιμόχρηστο μίγμα penoxsulam + florasulam), φαινοξυαλκανοϊκών (MCPA) (ετοιμόχρηστο μίγμα glyphosate + MCPA), αναστολέων βιοσύνθεσης γλουταμίνης (glufosinate ammonium), αναστολέων λειτουργίας φωτοσυστήματος I (PS I) (diquat), σουλφονουλουριών (tribenuron-methyl) και ζιζανιοκτόνων με άγνωστη θέση δράσης (amitrole) (Πίνακας 2.3). Τα κύρια χαρακτηριστικά και οι ιδιότητες του glyphosate αναφέρονται εκτενώς στην αμέσως επόμενη ενότητα.

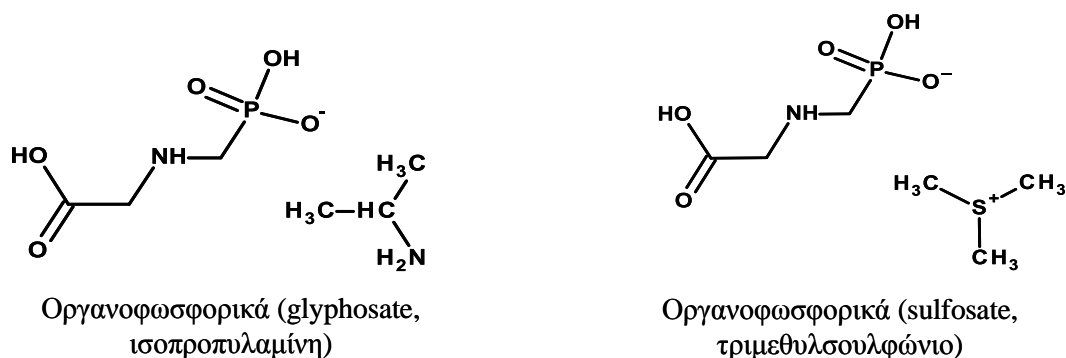
**Πίνακας 2.3.** Τα ζιζανιοκτόνα που καταπολεμούν την κόνυζα (*Coryza spp.*) και οι καλλιέργειες όπου έχουν έγκριση [Πηγή: Βάση δεδομένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (<http://www.minagric.gr/syspest/>)]. Πρόσβαση 17.02.2016.

Ζιζανιοκτόνο	Εσπεριδοειδή	Μηλοειδή	Πυρηγόκαρπα	Ακρόδρυα	Ελιές	Αμπέλια
<b>Με προφυτρωτική (κυρίως) δράση (κατευθυνόμενος ψεκασμός του εδάφους)</b>						
Flumioxazin	Πορτοκαλιά	-	-	-	Χωρίς	Πρέμνα>4
	Μανταρινιά				περιορισμούς	ετών
	Λεμονιά					(Κατά το
	Γκρέιπ φρουτ Φράπα					λήθαργο)
Oxyfluorfen	Πορτοκαλιά	Μηλιά	Ροδακινιά	-	Χωρίς	Πρέμνα>3
	Μανταρινιά	Αχλαδιά	Νεκταρινιά		περιορισμούς	ετών
	Λεμονιά		Βερικοκιά			υποστηλωμένα
	Γκρέιπ φρουτ		Δαμασκηνιά			ή
	Κιτριά		Κορομηλιά Κερασιά Βυσσινιά			αναρριχώμενα (Σταφίδες, οινοποιήσιμα, επιτραπέζια)
Napropamide	Πορτοκαλιά	Μηλιά	Ροδακινιά	-	-	Επιτραπέζια
	Μανταρινιά	Αχλαδιά	Βερικοκιά			και
	Λεμονιά		Δαμασκηνιά			οινοποιήσιμα
	Γκρέιπ φρουτ		Κερασιά Βυσσινιά			
Penoxsulam + Florasulam	Πορτοκαλιά Μανταρινιά Λεμονιά (Δένδρα>3 ετών)	-	-	-	Δένδρα>3 ετών	-
<b>Με μεταφυτρωτική δράση (κατευθυνόμενος ψεκασμός των ζιζανίων)</b>						
Glyphosate	Πορτοκαλιά	Μηλιά	Ροδακινιά	Αμυγδαλιά	Δένδρα>3 ετών	Πρέμνα>3
	Μανταρινιά	Αχλαδιά	Νεκταρινιά	(Δένδρα>3		ετών
	Λεμονιά	(Δένδρα>3	Βερικοκιά	ετών)		(Επιτραπέζια
	Γκρέιπ φρουτ	ετών)	Κερασιά			και
	Κιτριά (Δένδρα>3 ετών)		(Δένδρα>3 ετών)			οινοποιήσιμα)
Glyphosate + MCPA	Πορτοκαλιά	Μηλιά	-	-	Δένδρα>3 ετών	-
	Μανταρινιά	Αχλαδιά				
	Λεμονιά	(Δένδρα>3				
	Γκρέιπ φρουτ Κιτριά	ετών)				

Glufosinate ammonium	(Δένδρα>3 ετών)					
	Πορτοκαλιά	Μηλιά	Ροδακινιά	-	Δένδρα>3 ετών	Πρέμνα>3 ετών
	Μανταρινιά	Αχλαδιά	Νεκταρινιά			
	Λεμονιά	(Δένδρα>3 ετών)	Βερικοκιά			
	Γκρέιπ φρουτ		Δαμασκηνιά			
Diquat	Κιτριά		(Δένδρα>3 ετών)			
	(Δένδρα>3 ετών)					
	Πορτοκαλιά	Μηλιά	Ροδακινιά	Αμυγδαλιά	Ελαιοποιήσιμες	Χωρίς περιορισμούς
	Μανταρινιά	Αχλαδιά	Βερικοκιά	Φουντουκιά		
	Λεμονιά	Κυδωνιά	Δαμασκηνιά	Φιστικιά		
	Γκρέιπ φρουτ		Κερασιά	Καστανιά		
Φράπα		Βυσσινιά	Καρυδιά			
Λιμεττία						
Tribenuron-methyl	-	-	-	-	Δένδρα>3 ετών	-
Amitrole	-	Μηλιά	Ροδακινιά	Αμυγδαλιά	-	Πρέμνα>4 ετών
		Αχλαδιά (>4 ετών)	Βερικοκιά (>4 ετών)	Φουντουκιά		(Επιτραπέζια και οينوποιήσιμα)
		Κυδωνιά	Δαμασκηνιά	Καρυδιά		
			Κερασιά (>4 ετών)	(Δένδρα>4 ετών)		

### 2.1.3.1. Ζιζανιοκτόνα-αναστολείς βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων (ένζυμο EPSPS)

Το glyphosate και το sulfosate είναι τα δύο ζιζανιοκτόνα της ομάδας αυτής που ανήκουν στα **οργανοφωσφορικά** (Organophosphorus) ή στις **γλυκίνες** (Glycines) (Σχήμα 2.1). Το glyphosate αναπτύχθηκε το 1974 στις ΗΠΑ, ενώ το sulfosate αργότερα στη Μεγάλη Βρετανία. Το sulfosate έχει παρόμοια χημική δομή με εκείνη του glyphosate, αφού και τα δύο είναι άλατα του φωσφονομεθυλίου της γλυκίνης (N-(phosphonomethyl)-glycine). Επομένως, ό,τι αναφέρεται στη συνέχεια για τον τρόπο εφαρμογής, μηχανισμό, τρόπο και φάσμα δράσης του glyphosate ισχύει και για το sulfosate.



**Σχήμα 2.1.** Ζιζανιοκτόνα που αναστέλλουν τη βιοσύνθεση αρωματικών αμινοξέων (αναστολείς της δράσης του ενζύμου EPSPS, από Ελευθεροχωρινός, 2014).

Το glyphosate είναι **διασυστηματικό** ζιζανιοκτόνο **φυλλώματος** με δράση εναντίον ευρέος φάσματος ετήσιων και πολυετών ζιζανίων (Baylis, 2000; Powles and Preston, 2006). Απορροφάται εύκολα από τα φύλλα και μετακινείται εντός των φυτών δια μέσου του φλοιώματος. Η διέλευση του μέσα από τη κυτταρική μεμβράνη, εκτός από τον παθητικό μηχανισμό της απλής διάχυσης, διευκολύνεται από τη διαφορά pH μεταξύ κυτταροπλάσματος και κυτταρικού τοιχώματος. Αυτό συμβαίνει διότι το glyphosate, ως ασθενές οξύ, πρωτονιώνεται στο όξινο κυτταρικό τοίχωμα (pH 5,5) και γίνεται υδρόφοβο μόριο (R-COOH), το οποίο διέρχεται ευκολότερα δια μέσου της υδρόφοβης κυτταρικής μεμβράνης. Τα R-COOH όμως, μετά την είσοδό τους εντός του κυτταροπλάσματος (pH 7,2) παγιδεύονται, διότι γίνονται υδρόφιλα ανιόντα (R-COO<sup>-</sup>) λόγω της διάστασης του υδρογόνου (H<sup>+</sup>) της καρβοξυλικής τους ομάδας. Αυτά στη συνέχεια, ως «παγιδευμένα ανιόντα (R-COO<sup>-</sup>)» μετακινούνται στα υπόλοιπα τμήματα του φυτού δια μέσου του φλοιώματος. Η διέλευση του glyphosate

δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης, εκτός από τους δύο προηγούμενους μηχανισμούς, υποβοηθείται από τη συμμετοχή **ABC** (ATP-εξαρτώμενων) διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών μεταφορέων [ATP-binding cassette (ABC) transporters] (Crouzet et al., 2013; Ελευθεροχωρινός, 2014; Ge et al., 2010, 2011; Peng et al., 2010; Sammons and Gaines, 2014; Shaner, 2009; Yuan et al., 2007, 2010).

Το glyphosate, εκτός από το φύλλωμα, απορροφάται και από τις ρίζες των φυτών, όταν είναι βιολογικώς διαθέσιμο στο έδαφος. Αυτό όμως σπανίως συμβαίνει διότι το glyphosate προσροφάται ισχυρά στα κolloειδή του εδάφους (δημιουργεί σύμπλοκα με τα κατιόντα τους εδάφους), με αποτέλεσμα να μην απορροφάται από τις ρίζες και συνεπώς να μη δρα από εδάφους. Βεβαίως, η μεταφύτευση ή η σπορά κάποιων καλλιεργειών δεν είναι ασφαλής πάντοτε μετά την εφαρμογή του glyphosate κατά την προετοιμασία της σποροκλίνης. Αυτό προκύπτει από την έρευνα του Cornish (1992), η οποία έδειξε ότι η καλλιέργεια τομάτας σε αμμώδες έδαφος παρουσίασε προβλήματα φυτοτοξικότητας, όταν η μεταφύτευση έγινε 1, 5 ή 15 ημέρες από την εφαρμογή του glyphosate. Όλα αυτά δείχνουν ότι, για την κανονική ανάπτυξη μερικών καλλιεργειών σε ορισμένα εδάφη, ή σπορά ή η μεταφύτευση τους πρέπει να γίνεται 16-21 ημέρες από την εφαρμογή του glyphosate (Ελευθεροχωρινός, 2014).

Το κοινότερο σύμπτωμα της δράσης του glyphosate είναι η χλώρωση των νέων φύλλων, η οποία ακολουθείται από τη νέκρωση των φυτών. Τα **συμπτώματα** της χλώρωσης εμφανίζονται συνήθως εντός της πρώτης εβδομάδας από την εφαρμογή, ενώ η νέκρωση των φυτών επέρχεται 1-3 εβδομάδες αργότερα. Αυτό συνεπάγεται ότι η κατεργασία του εδάφους πρέπει να αποφεύγεται για δύο περίπου εβδομάδες από την εφαρμογή του glyphosate σε πολυετή ζιζάνια, διότι αυτό αυξάνει τη δράση του. Τα πολυετή φυτά, κατά την αναβλάστησή τους, φέρουν φύλλα με παραμορφώσεις, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζουν το σύμπτωμα της έκπτυξης πολλών μικρόφυλλων βλαστών από έναν κόμβο-γόνατο-διακλάδωση. Η μεταφορά σταγονιδίων κατά την εκλεκτική εφαρμογή του glyphosate προκαλεί συνήθως μεσονεύρια χλώρωση στα ανωτέρω φύλλα των πλατύφυλλων καλλιεργειών (Ελευθεροχωρινός, 2014).

Το glyphosate είναι **μη εκλεκτικό** και γι' αυτό απαγορεύεται η καθολική εφαρμογή του σε καλλιεργούμενα είδη. Το μειονέκτημα αυτό, σε συνδυασμό με τα πολύ καλά ζιζανιολογικά και περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά του, ήταν ο

σημαντικότερος λόγος αναζήτησης νέων τρόπων δημιουργίας ανθεκτικών φυτών στο ζιζανιοκτόνο αυτό (Ελευθεροχωρινός, 2014; Woodburn, 2000). Το τελευταίο επετεύχθη μέσω της εφαρμογής μεθόδων της **γενετικής μηχανικής**, οι οποίες συνέβαλαν στη δημιουργία γενετικώς τροποποιημένων ποικιλιών σόγιας, βαμβακιού, αραβόσιτου, ελαιοκράμβης, μηδικής και ζαχαροτεύτλων με **ανθεκτικότητα** στο **glyphosate** (Duke and Powles, 2008a; Ελευθεροχωρινός, 2014; Green, 2007, 2009; Powles, 2008).

Το glyphosate προσροφάται ισχυρά από τα περισσότερα εδάφη και επομένως η πιθανότητα έκπλυσης και ρύπανσης των υπόγειων νερών είναι μικρή. Αυτό επιβεβαιώνεται από τα διεθνή δεδομένα, τα οποία δείχνουν ότι, σε 7 μόνον από 27.877 δείγματα υπόγειων νερών των Η.Π.Α., ανιχνεύτηκαν υπολείμματα glyphosate σε συγκεντρώσεις ανώτερες από τις αποδεκτές (0,1 μg/L), ενώ σε παρόμοιες αναλύσεις δειγμάτων από υπόγεια νερά της Γαλλίας, της Αυστρίας, της Δανίας, της Νορβηγίας και της Ολλανδίας δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματά του (Vereecken, 2005). Το glyphosate δεν εξατμίζεται και δεν είναι ευαίσθητο στο φως. Η απομάκρυνση του από το έδαφος είναι πολύ γρήγορη και γίνεται κυρίως μέσω μικροβιακής αποδόμησης (Ελευθεροχωρινός, 2014). Τέλος, το glyphosate έχει χαμηλή τοξικότητα σε θηλαστικά, πουλιά και ψάρια (Duke and Powles, 2008b; Ελευθεροχωρινός, 2014; Powles and Preston, 2006).

#### **2.1.4. Διεθνής κατάσταση ανθεκτικότητας ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα**

Η διεθνής εμπειρία και γνώση δείχνει ότι η μη αποτελεσματική αντιμετώπιση ενός ζιζανίου, μετά από ορθολογική εφαρμογή ενός ζιζανιοκτόνου (ευνοϊκές καιρικές συνθήκες, συνιστώμενη δόση, ορθός τρόπος εφαρμογής και κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης των φυτών), συνήθως, εμπεριέχει μεγάλη πιθανότητα για ύπαρξη ανθεκτικών πληθυσμών του ζιζανίου στο συγκεκριμένο ζιζανιοκτόνο.

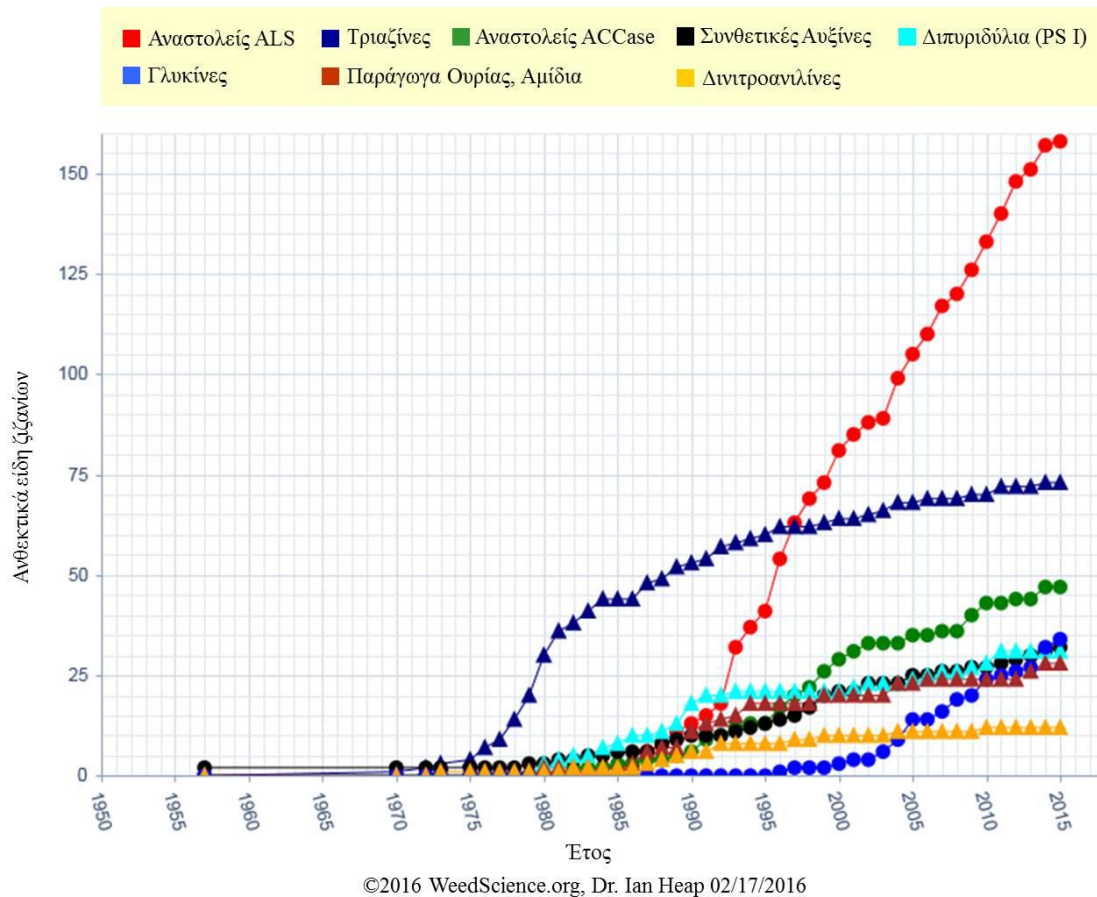
Η επιλογή ανθεκτικών πληθυσμών σε ζιζανιοκτόνα ξεκίνησε με την εισαγωγή των συνθετικών αυξινών στα τέλη της δεκαετίας του 1940. Για τα πρώτα είκοσι χρόνια μετά την εισαγωγή των χημικώς συντιθέμενων αυξινών, είχαν αναφερθεί περιορισμένες μόνο περιπτώσεις ανθεκτικών πληθυσμών ζιζανίων. Αυτό άλλαξε το 1968 με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας πληθυσμού του *Senecio vulgaris* στις τριαζίνες (simazine) (Ryan, 1970). Τα επόμενα 15 χρόνια, ο αριθμός των ανθεκτικών πληθυσμών αυξήθηκε, εξαιτίας της χρήσης των τριαζινικών ζιζανιοκτόνων. Ωστόσο, αν και η ανάπτυξη ανθεκτικών πληθυσμών ζιζανίων στα τριαζινικά ζιζανιοκτόνα

ήταν αρκετά διαδεδομένη, οι ανθεκτικοί πληθυσμοί παρουσίαζαν μειωμένη προσαρμοστικότητα και μπορούσαν εύκολα να αντιμετωπιστούν με άλλα ζιζανιοκτόνα. Η επιστημονική κοινότητα υπέθετε τότε ότι δεν υπήρχε λόγος ανησυχίας, αν και οι εταιρείες παραγωγής φυτοπροστατευτικών προϊόντων επηρεασμένες από την ανάπτυξη ανθεκτικών πληθυσμών ζιζανίων στα τριαζινικά ζιζανιοκτόνα προσπαθούσαν να εντοπίσουν και να διαχειριστούν την ανθεκτικότητα. Στα τέλη της δεκαετίας του 1980, με την ανακάλυψη ανθεκτικών πληθυσμών ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA (ACCase) και σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου οξικογαλακτική συνθάση (ALS ή AHAS), η ανθεκτικότητα ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα έγινε ευρέως πολύ σημαντικό θέμα και ειδικότερα των εταιρειών παραγωγής φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Η ταχεία ανάπτυξη ανθεκτικότητας στις ανωτέρω δύο ομάδες ζιζανιοκτόνων αφύπνισε τις εταιρείες παραγωγής φυτοπροστατευτικών προϊόντων και τις ώθησε να συγκροτήσουν ομάδες εργασίας για να διαχειριστούν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας και να οργανώσουν το 1989 τη βάση δεδομένων Herbicide Resistance Action Committee (HRAC) για την ανθεκτικότητα. Ο στόχος των ομάδων εργασίας ήταν η από κοινού δράση για ανταλλαγή πληροφοριών σχετικώς με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας αλλά και την υιοθέτηση τρόπων διαχείρισής της. Οι προσπάθειες αυτές δεν διέκοψαν το ρυθμό επικράτησης ανθεκτικών πληθυσμών ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα, ο οποίος μειώθηκε αρχικώς αισθητά με την εισαγωγή των γενετικώς τροποποιημένων καλλιεργειών με ανθεκτικότητα στο glyphosate το 1996. Αυτό συνέβη διότι οι αγρότες υιοθέτησαν αμέσως την απλή και αξιόπιστη λύση για τη διαχείριση των ζιζανίων, η οποία βασιζόταν στη χρήση μόνο glyphosate. Η ευρεία και συχνή όμως χρήση του glyphosate είχε ως συνέπεια την επιλογή ανθεκτικών πληθυσμών, οι οποίοι άλλαξαν δραματικά τη διαχείριση των ζιζανίων (Shaner, 2014).

Η πρόσφατη διεθνής ανασκόπηση της ανθεκτικότητας ζιζανίων σε διάφορες ομάδες ζιζανιοκτόνων έδειξε 464 περιπτώσεις ανθεκτικών πληθυσμών που ανήκουν σε 249 διαφορετικά είδη ζιζανίων (από τα οποία τα 105 είναι μονοκοτυλήδονα και τα 144 δικοτυλήδονα) (Heap, 2016). Ειδικότερα, τα 249 είδη ζιζανίων εμφάνισαν ανθεκτικότητα στους 22 από τους 25 γνωστούς τρόπους δράσης των ζιζανιοκτόνων και μάλιστα σε 159 διαφορετικά ζιζανιοκτόνα. Ανθεκτικοί πληθυσμοί ζιζανίων έχουν αναφερθεί σε 86 καλλιεργούμενα είδη και σε 66 χώρες (Heap, 2016). Οι περισσότερες καταγεγραμμένες περιπτώσεις ανθεκτικότητας (158 είδη ζιζανίων) αφορούν τα ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου οξικογαλακτική

συνθάση (ALS ή AHAS), ενώ οι τριαζίνες [ζιζανιοκτόνα-αναστολείς λειτουργίας φωτοσυστήματος II (PS II)] καταλαμβάνουν τη δεύτερη θέση με 73 καταγεγραμμένες περιπτώσεις ανθεκτικότητας. Ακολουθούν τα ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA (ACCase), οι γλυκίνες [ζιζανιοκτόνα-αναστολείς βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων (αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου συνθάση του 5-ενολοπυροσταφυλο-φωσφο-σικιμικού οξέος (EPSPS))], τα ζιζανιοκτόνα με δράση αυξίνης και τα ζιζανιοκτόνα-αναστολείς λειτουργίας φωτοσυστήματος I (PS I) στα οποία ανέπτυξαν ανθεκτικότητα 47, 34, 32 και 31 είδη ζιζανίων, αντίστοιχα. Τέλος, 28 και 12 είδη ζιζανίων, αντίστοιχα, έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στα παράγωγα ουρίας και στα αμίδια φυλλώματος [ζιζανιοκτόνα-αναστολείς λειτουργίας φωτοσυστήματος II (PS II)] και στις δινιτροανιλίνες (ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της μίτωσης). Επίσης, οκτώ (8) , τέσσερις (4) και δύο (2) πληθυσμοί ζιζανίων, αντίστοιχα, ανέπτυξαν ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα-αναστολείς βιοσύνθεσης χλωροφύλλης [αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου οξειδάση του πρωτοπορφυρινογόνου (PPG-O ή PROTOX ή PPOX)], στα ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης των καροτενοειδών [αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου αποκορεσμού του φυτοενίου (PDS) ή τη δράση του ενζύμου διοξυγονάση του 4-υδροξυ-φαινυλο-πυροσταφυλικού οξέος (4-HPPD)] (Σχήμα 2.2) (Hear, 2016).





**Σχήμα 2.2.** Διαγραμματική απεικόνιση της πορείας ανάπτυξης (1950-2015) ανθεκτικών ειδών ζιζανίων στις σημαντικότερες ομάδες ζιζανιοκτόνων (Heap, 2016).

### 2.1.4.1. Ανθεκτικά είδη ζιζανίων στην Ελλάδα

Τα είδη ζιζανίων της χώρας μας με ανθεκτικούς πληθυσμούς σε ζιζανιοκτόνα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4. Η πρώτη καταγραφή ανθεκτικών πληθυσμών ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα έγινε το 1986 στη Δυτική Ελλάδα (Μεσολόγγι) και αφορούσε την ανθεκτικότητα της μουχρίτσας [*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.] στο propanil που αναστέλλει τη λειτουργία του φωτοσυστήματος II (PS II) (Giannopolitis and Vassiliou, 1989). Ανθεκτικότητα στο ίδιο ζιζάνιο και στο ίδιο ζιζανιοκτόνο διαπιστώθηκε 10 χρόνια αργότερα σε πληθυσμούς που αναπτύσσονταν σε καλλιέργειες ρυζιού του Νομού Θεσσαλονίκης (Vasilakoglou et al., 2000).

Το 1996 καταγράφηκαν πληθυσμοί των ζιζανίων τραχύ βλήτο (*Amaranthus retroflexus* L.) και λουβουδιά (*Chenopodium album* L.) σε καλλιέργειες πατάτας, οι οποίοι είχαν ανθεκτικότητα στο metribuzin (αναστολέας λειτουργίας PS II) (Eleftherohorinos et al., 2000).

Το ίδιο έτος, διαπιστώθηκε ότι η μη αποτελεσματική αντιμετώπιση λεπτής ήρας (*Lolium rigidum* Gaudin) μετά από εφαρμογή του diclofor-methyl [αναστολέας της δράσης του ενζύμου καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA (ACCCase)] οφειλόταν σε ανθεκτικότητα στο ζιζανιοκτόνο αυτό, διασταυρωτή ανθεκτικότητα ή σταυρανθεκτικότητα στα clodinafor-propargyl, fluazifop-p-butyl, tralkoxydim και sethoxydim, καθώς και πολλαπλής ανθεκτικότητας στο chlorsulfuron [ανήκει στην οικογένεια των σουλφονουλουριών που αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου οξικογαλακτική συνθάση (ALS ή AHAS)] (Kotoula-Syka et al., 2000). Το 2004, μεταξύ 14 πληθυσμών λεπτής ήρας που προέρχονταν από καλλιέργειες χειμερινών σιτηρών της κεντρικής Μακεδονίας (Νομοί Θεσσαλονίκης και Κιλκίς), βρέθηκαν τέσσερις πληθυσμοί με ανθεκτικότητα στο chlorsulfuron (αναστολέας της δράσης του ενζύμου ALS). Οι τρεις από τους τέσσερις ανθεκτικούς πληθυσμούς του ζιζανίου είχαν διασταυρωτή ανθεκτικότητα στο μίγμα mesosulfuron-methyl + iodosulfuron-methyl-sodium (αναστολείς της δράσης του ενζύμου ALS), ενώ ένας πληθυσμός είχε πολλαπλή ανθεκτικότητα στο tralkoxydim και ένας στο clodinafor-propargyl (αναστολείς της δράσης του ενζύμου ACCCase) (Βασιλείου κ.ά., 2006; Ευθυμιάδης κ.ά., 2008). Επίσης, παρόμοιες έρευνες που έγιναν στη χώρα μας, το 2004-2008, έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα 10 πληθυσμών λεπτής ήρας στο ζιζανιοκτόνο chlorsulfuron οφειλόταν σε τροποποίηση του ενζύμου ALS και ειδικότερα στην παρουσία σημειακών μεταλλάξεων του πρώτου ή δεύτερου νουκλεοτιδίου του κωδικονίου 197 στο γονίδιο *als* (Καλούμενος κ.ά., 2010; Kaloumenos et al., 2012). Οι μεταλλάξεις αυτές είχαν ως συνέπεια την αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη (**Pro**) στη θέση **197** από αλανίνη (**Ala**), αργινίνη (**Arg**), γλουταμίνη (**Gln**), λευκίνη (**Leu**) ή σερίνη (**Ser**) και την ως εκ τούτου τροποποίηση του ενζύμου ALS (ανθεκτικό ένζυμο).

Το 1998, σε καλλιέργεια χειμερινών σιτηρών βρέθηκε πληθυσμός παπαρούνας (*Papaver rhoeas* L.) με ανθεκτικότητα στα chlorsulfuron, thifensulfuron-methyl, triasulfuron και tribenuron-methyl (αναστολείς της δράσης του ενζύμου ALS (Hear, 2016). Επίσης, παρόμοιες έρευνες, που έγιναν στη χώρα μας το 2003-2008, έδειξαν ότι 28 πληθυσμοί παπαρούνας ήταν ανθεκτικοί στο tribenuron-methyl λόγω τροποποίησης του ενζύμου ALS, η οποία οφειλόταν στην παρουσία σημειακών μεταλλάξεων του πρώτου ή δεύτερου νουκλεοτιδίου του κωδικονίου 197 στο γονίδιο *als* (Kaloumenos and Eleftherohorinos, 2008; Καλούμενος κ.ά., 2008β; Kaloumenos et al., 2009a). Ειδικότερα, οι μεταλλάξεις αυτές είχαν ως συνέπεια την

αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη (**Pro**) στη θέση **197** από σερίνη (**Ser**), θρεονίνη (**Thr**), αλανίνη (**Ala**), αργινίνη (**Arg**) ή λευκίνη (**Leu**), με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικού ενζύμου ALS. Η περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι οι πληθυσμοί αυτοί είχαν διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα mesosulfuron-methyl + iodosulfuron-methyl-sodium, florasulam, imazamox και pyriithiobac-sodium (αναστολείς της δράσης του ενζύμου ALS) (Καλούμενος κ.ά., 2008α; Kaloumenos et al., 2011).

Το 2002, σε καλλιέργεια βαμβακιού του Νομού Λάρισας, καταγράφηκε η ύπαρξη ενός πληθυσμού αγριοντοματιάς (*Solanum nigrum* L.) με ανθεκτικότητα στο prometryn (αναστολέας λειτουργίας PS II) (Ελευθεροχωρινός και Παπαμιχαήλ, 2002).

Οι Καλούμενος και Ελευθεροχωρινός (2006) και Kaloumenos και Eleftherohorinos (2009b) ανέφεραν (το 2006) έναν πληθυσμό βέλιουρα (*Sorghum halepense* L.), από καλλιέργεια βαμβακιού του Νομού Δράμας, ο οποίος είχε διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα quizalofop-p-ethyl και propraquizafop (αναστολείς τη δράσης του ενζύμου ACCase).

Οι έρευνες των Παπαπαναγιώτου κ.ά. (2008), Papapanagiotou et al. (2012) και Travlos et al. (2011), οι οποίες έγιναν το 2006-2009, έδειξαν ότι πληθυσμοί αγριοβρώμης (*Avena sterilis* L.) από περιοχές της Μακεδονίας, της Θεσσαλίας και της Βοιωτίας είχαν διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα diclofop-methyl, clodinafop-propargyl, fenoxaprop-p-ethyl, tralkoxydim και pinoxaden (αναστολείς τη δράσης του ενζύμου ACCase). Η πρωτεϊνική ανάλυση αυτών των πληθυσμών έδειξε ότι η διασταυρωτή ανθεκτικότητα οφειλόταν σε τροποποίηση του ενζύμου ACCase και ειδικότερα στην αντικατάσταση των αμινοξέων **Pe1781-Leu**, **Trp1999-Cys**, **Trp2027-Cys**, **Pe2041-Asn**, **Asp2078-Gly** και **Cys2088-Arg** (Παπαπαναγιώτου κ.ά., 2010; Papapanagiotou et al., 2015).

Το 2007-2010, βρέθηκαν πληθυσμοί κόνυζας (*Conyza* spp. Less.) σε διάφορες περιοχές της ηπειρωτικής αλλά και της νησιωτικής Ελλάδας με ανθεκτικότητα στο glyphosate [αναστολέας βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων (αναστολέας της δράσης του ενζύμου συνθάση του 5-ενολοπυροσταφυλο-φωσφο-σικιμικού οξέος (EPSPS))] (Γιαννοπολίτης κ.ά., 2008; Μυλωνάς κ.ά., 2012; Mylonas et al., 2014; Nol et al., 2012; Travlos and Chachalis, 2010; Τραυλός και Χάχαλης, 2012; Travlos and Chachalis, 2013b).

Η αξιολόγηση πολλών πληθυσμών μουχρίτσας [*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv., *E. erecta* (Pollaci) Pignati και *E. oryzicola* (Vasing.)], προερχόμενων από

καλλιέργειες ρυζιού των Νομών Θεσσαλονίκης, Σερρών, Καβάλας και Αιτωλοακαρνανίας, έδειξε την ύπαρξη αρκετών πληθυσμών *E. oryzicola* με διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα imazamox, penoxsulam, bispyribac-sodium, foramsulfuron, nicosulfuron και rimsulfuron (αναστολείς της δράσης του ενζύμου ALS) (Χατζηλαζαρίδου κ.ά., 2010; Καλίτσου κ.ά., 2015; Καλούμενος και Ελευθεροχώρινος, 2010; Καλούμενος κ.ά., 2012; Kaloumenos et al., 2013b; Παπαπαναγιώτου κ.ά., 2012, 2015).

Οι Καλούμενος και Ελευθεροχωρινός (2012) και Kaloumenos et al. (2013a) ανέφεραν ότι ένας πληθυσμός κόκκινου ρυζιού (*Oryza sativa* L.), προερχόμενος από καλλιέργεια ρυζιού του Νομού Θεσσαλονίκης, είχε διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα imazamox και imazethapyr (αναστολείς της δράσης του ενζύμου ALS). Η πρωτεϊνική ανάλυση αυτού του πληθυσμού έδειξε ότι η ανθεκτικότητα οφείλεται σε μη ευαίσθητο ένζυμο ALS λόγω αντικατάστασης του αμινοξέος σερίνη (**Ser**) στη θέση **653** από ασπαραγίνη (**Asn**). Η ίδια αντικατάσταση της σερίνης (**Ser**) στη θέση **653** από ασπαραγίνη (**Asn**) στο ένζυμο ALS ανιχνεύτηκε σε οκτώ ανθεκτικούς πληθυσμούς κόκκινου ρυζιού στο imazamox, οι οποίοι προέρχονταν από καλλιέργειες ρυζιού του Νομού Θεσσαλονίκης (Σιέκρη κ.ά., 2015).

Ο Travlos (2012) ανέφερε ότι ορισμένοι πληθυσμοί μικρόκαρπης φάλαρης (*Phalaris minor* Retz.), προερχόμενοι από καλλιέργειες σιταριού του Νομού Βοιωτίας, είχαν διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα diclofor-methyl, clodinafor-propargyl και fenoxarprop-p-ethyl (αναστολείς της δράσης του ενζύμου ACCase).

Οι Ντοανίδου κ.ά. (2015) και Ntoanidou et al. (2016) ανέφεραν ότι δέκα πληθυσμοί μοσχοκύπερης (*Cyperus difformis* L.), προερχόμενοι από καλλιέργειες ρυζιού του Νομού Θεσσαλονίκης, είχαν διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα azimsulfuron και halosulfuron-methyl (αναστολείς της δράσης του ενζύμου ALS). Η πρωτεϊνική ανάλυση αυτών των πληθυσμών επιβεβαίωσε την ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων και ειδικότερα αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη (**Pro**) στη θέση **197** από σερίνη (**Ser**) ή αλανίνη (**Ala**), η οποία συνέβαλε στην ανθεκτικότητα του ενζύμου-στόχου ALS.

Η αξιολόγηση πληθυσμών άγριου σιναπιού (*Sinapis arvensis* L.), προερχόμενων από καλλιέργειες σιτηρών των νομών Φθιώτιδας και Πιερίας, έδειξε την ύπαρξη ανθεκτικότητας στο tribenuron-methyl (αναστολέας της δράσης του ενζύμου ALS) (Ntoanidou et al., υπό δημοσίευση).

Τα ανωτέρω δείχνουν ότι στη χώρα μας έχουν καταγραφεί αρκετοί πληθυσμοί 16 ειδών ζιζανίων με ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα διαφόρων χημικών οικογενειών/ομάδων, γεγονός που επιβεβαιώνει τον **ταχύ ρυθμό αύξησης των ανθεκτικών πληθυσμών** ζιζανίων. Αυτό προκαλεί μεγάλη ανησυχία διότι καθιστά δύσκολη και, σε ορισμένες περιπτώσεις, αδύνατη την αντιμετώπισή τους, αφού οι ανθεκτικοί πληθυσμοί περιορίζουν την επιλογή ζιζανιοκτόνων και, σε ορισμένες περιπτώσεις, οδηγούν στην επιλογή ζιζανιοκτόνων υψηλότερου κόστους και πιο επικίνδυνων για το περιβάλλον. Είναι προφανές ότι η διαπίστωση αυτή καθιστά αναγκαία τη λήψη μέτρων για την αντιμετώπιση των ήδη εμφανισθέντων ανθεκτικών πληθυσμών, αλλά και για τη μείωση της πιθανότητας εξέλιξης νέων. Η λήψη κατάλληλων μέτρων προϋποθέτει τη διάγνωση και ταυτοποίηση της ανθεκτικότητας (Ελευθεροχωρινός, 2014).

**Πίνακας 2.4.** Είδη ζιζανίων της χώρας μας με ανθεκτικούς πληθυσμούς σε ζιζανιοκτόνα (τροποποιημένο από Ελευθεροχωρινός, 2014).

α/α	Ζιζάνιο	Στόχος δράσης (Ζιζανιοκτόνα)	Πηγή
1	Μουχρίτσα ( <i>Echinochloa crus-galli</i> )	PS II (propanil)	Giannopolitis and Vassiliou (1989); Vasilakoglou et al. (2000)
2	Τραχύ βλήτο ( <i>Amaranthus retroflexus</i> )	PS II (metribuzin)	Eleftherohorinos et al. (2000)
3	Λουβουδιά ( <i>Chenopodium album</i> )	PS II (metribuzin)	Eleftherohorinos et al. (2000)
4	Λεπτή ήρα ( <i>Lolium rigidum</i> )	ALS (chlorsulfuron, mesosulfuron-methyl + iodosulfuron-methyl-sodium), ACCase (diclofop-methyl, clodinafop-propargyl, fluazifop-p-butyl, tralkoxydim, sethoxydim)	Kotoula-Syka et al. (2000); Βασιλείου κ.ά. (2006); Ευθυμιάδης κ.ά. (2008); Καλούμενος κ.ά. (2010); Kaloumenos et al. (2012)
5	Παπαρούνα ( <i>Papaver rhoeas</i> )	ALS (chlorsulfuron, thifensulfuron-methyl, triasulfuron, tribenuron-methyl, mesosulfuron-methyl + iodosulfuron-methyl-sodium, florasulam, imazamox, pyriithiobac-sodium)	Heap (2016); Kaloumenos and Eleftherohorinos (2008); Καλούμενος κ.ά. (2008α, 2008β); Kaloumenos et al. (2009a, 2011)

6	Αγριοντοματιά ( <i>Solanum nigrum</i> )	PS II (prometryn)	Ελευθεροχωρινός και Παπαμιχαήλ (2002)
7	Βέλιουρας ( <i>Sorghum halepense</i> )	ACCCase (quizalofop-p-ethyl, propraquizafor)	Καλούμενος και Ελευθεροχωρινός (2006); Kaloumenos and Eleftherohorinos (2009b)
8	Αγριοβρόμη ( <i>Avena sterilis</i> )	ACCCase (diclofop-methyl, clodinafop-propargyl, fenoxaprop- p-ethyl, tralkoxydim, pinoxaden)	Παπαπαναγιώτου κ.ά. (2008, 2010); Travlos et al. (2011); Ραπαπαναγιώτου et al. (2012, 2015)
9	Κόνυζα <i>Conyza albida</i>	EPSPS (glyphosate)	Γιαννοπολίτης κ.ά. (2008); Τραυλός και Χάχαλης (2012); Μυλωνάς κ.ά. (2012); Travlos and Chachalis (2013b); Μylonas et al. (2014)
10	Κόνυζα <i>Conyza bonariensis</i>	EPSPS (glyphosate)	Γιαννοπολίτης κ.ά. (2008); Travlos and Chachalis (2010); Τραυλός και Χάχαλης (2012); Μυλωνάς κ.ά. (2012); Μylonas et al. (2014)
11	Κόνυζα <i>Conyza canadensis</i>	EPSPS (glyphosate)	Γιαννοπολίτης κ.ά. (2008); Nol et al. (2012); Τραυλός και Χάχαλης (2012); Travlos and Chachalis (2013b)
12	Μουχρίτσα ( <i>Echinochloa oryzicola</i> )	ALS (imazamox, penoxsulam, bisbyribac-sodium, foramsulfuron, nicosulfuron, rimsulfuron)	Καλούμενος και Ελευθεροχώρτινος (2010); Χατζηλαζαρίδου κ.ά. (2010); Καλούμενος κ.ά. (2012); Παπαπαναγιώτου κ.ά. (2012, 2015); Kaloumenos et al. (2013b); Καλίτσου κ.ά. (2015)

13	Κόκκινο ρύζι ( <i>Oryza sativa</i> )	ALS (imazamox, imazethapyr)	Καλούμενος και Ελευθεροχώρινος (2012); Kaloumenos et al. (2013a); Σιέκρη κ.ά. (2015)
14	Μικρόκαρπη φάλαρη ( <i>Phalaris minor</i> )	ACCase (diclofop-methyl, clodinafop-propargyl, fenoxaprop- p-ethyl)	Travlos (2012)
15	Μοσχοκύπερη ( <i>Cyperus difformis</i> )	ALS (azimsulfuron, halosulfuron- methyl)	Ντοανίδου κ.ά. (2015); Ntoanidou et al. (2016)
16	Άγριο σινάπι ( <i>Sinapis arvensis</i> )	ALS (tribenuron-methyl)	Ntoanidou et al. (υπό δημοσίευση)

#### 2.1.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανθεκτικότητα των ζιζανίων

Οι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό εκδήλωσης και το είδος της ανθεκτικότητας των ζιζανίων σχετίζονται με το είδος του ζιζανίου, το ζιζανιοκτόνο και τη γεωργική πρακτική. Ειδικότερα, οι παράγοντες που έχουν σχέση με το ζιζάνιο είναι:

- 1) η συχνότητα των γονιδίων ανθεκτικότητας εντός του αρχικού πληθυσμού [η ανθεκτικότητα επικρατεί ταχύτερα όταν η αρχική συχνότητα των ανθεκτικών ατόμων εντός του αρχικού (φυσικού) πληθυσμού του ζιζανίου είναι υψηλή],
- 2) ο αριθμός των γονιδίων που ελέγχουν την ανθεκτικότητα (η ανθεκτικότητα ενός ζιζανίου εκδηλώνεται ταχύτερα όταν ελέγχεται από ένα γονίδιο),
- 3) ο βαθμός κυριαρχίας των γονιδίων ανθεκτικότητας (η κληρονόμηση των γονιδίων ανθεκτικότητας είναι ευκολότερη όταν ο μηχανισμός ανθεκτικότητας ελέγχεται από κυρίαρχο γονίδιο),
- 4) ο τρόπος κληρονόμησης των γονιδίων ανθεκτικότητας [η δυνατότητα επικράτησης ανθεκτικότητας είναι μεγαλύτερη όταν η κληρονόμηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας οφείλεται σε DNA του πυρήνα και όχι σε DNA χλωροπλαστών ή μιτοχονδρίων (δεν είναι δυνατή η μεταφορά του μέσω γύρης)],
- 5) ο τρόπος επικονίασης των ζιζανίων [όταν τα ζιζάνια είναι σταυρογονιμοποιούμενα ευνοείται η μεταφορά των κυρίαρχων γονιδίων ανθεκτικότητας (του πυρήνα) μέσω της γύρης],
- 6) η ικανότητα των ζιζανίων για παραγωγή οργάνων αναπαραγωγής,

7) η προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών, σε σύγκριση με τους ευαίσθητους πληθυσμούς (η επικράτηση ανθεκτικών πληθυσμών είναι ταχύτερη όταν η προσαρμοστικότητά τους είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των ευαίσθητων πληθυσμών),

8) το απόθεμα οργάνων αναπαραγωγής (σπόρων) του αρχικού πληθυσμού του ζιζανίου στο έδαφος (η εκδήλωση της ανθεκτικότητας επιβραδύνεται όταν το απόθεμα σπόρων του αρχικού ευαίσθητου πληθυσμού είναι μεγάλο),

Οι παράγοντες που σχετίζονται με το ζιζανιοκτόνο είναι:

1) η ένταση της δράσης [η ανθεκτικότητα εμφανίζεται ταχύτερα όταν το ζιζανιοκτόνο χαρακτηρίζεται από υψηλή βιολογική δράση (ασκεί υψηλή πίεση επιλογής στον πληθυσμό των ζιζανίων)],

2) η υπολειμματική διάρκεια του ζιζανιοκτόνου (αυτό συνεπάγεται διαρκή και συνεχή πίεση επιλογής),

3) ο μηχανισμός δράσης του ζιζανιοκτόνου (η δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας είναι μεγαλύτερη όταν ο μηχανισμός δράσης ελέγχεται από ένα μόνο γονίδιο).

Οι παράγοντες που σχετίζονται με τις γεωργικές πρακτικές που εφαρμόζονται και επηρεάζουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των ζιζανίων είναι:

1) η δόση εφαρμογής του ζιζανιοκτόνου [η δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας είναι μεγαλύτερη όταν το ζιζανιοκτόνο εφαρμόζεται σε μεγάλες δόσεις (ασκεί ισχυρή πίεση επιλογής)],

2) η συχνότητα εφαρμογής του ζιζανιοκτόνου (οι συχνές επεμβάσεις ασκούν συνεχή πίεση επιλογής),

3) η χρήση μιγμάτων ζιζανιοκτόνων με διαφορετικό μηχανισμό δράσης (μειώνει την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας),

4) η εναλλαγή ζιζανιοκτόνων στον ίδιο αγρό (μειώνει την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας),

5) η συνδυασμένη χρήση εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης (μειώνει την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας),

6) το εφαρμοζόμενο σύστημα αμειψισποράς των καλλιεργειών (μειώνει την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας),

7) ο τρόπος κατεργασίας του εδάφους (η μειωμένη κατεργασία του εδάφους αυξάνει τη δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας) (Ελευθεροχωρινός, 2014).



### **2.1.4.3. Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου EPSPS (glyphosate)**

Η επαναλαμβανόμενη χρήση ζιζανιοκτόνων για την αποτελεσματική αντιμετώπιση των ζιζανίων, τα οποία αναπτύσσονται εντός των καλλιεργούμενων ειδών, οδηγεί αναπόφευκτα στην επιλογή γονιδίου ή γονιδίων που καθιστούν ορισμένα φυτά των ζιζανίων ικανά να επιβιώνουν και να ολοκληρώνουν με επιτυχία την αναπαραγωγική τους ικανότητα. Γενικώς, η άσκηση πίεσης επιλογής από τη συνεχή χρήση των ζιζανιοκτόνων προκαλεί αλλαγή στη γενετική σύνθεση των αρχικών πληθυσμών των ζιζανίων, η οποία έχει ως συνέπεια την αύξηση της συχνότητας των φυτών με γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα. Οι σημαντικότεροι γενετικοί παράγοντες που επηρεάζουν την εκδήλωση ανθεκτικότητας εντός των πληθυσμών των ζιζανίων είναι: 1) ο αριθμός των γονιδίων ανθεκτικότητας, 2) η αρχική συχνότητα των γονιδίων ανθεκτικότητας εντός των πληθυσμών, 3) ο τρόπος κληρονόμησης της ανθεκτικότητας, 4) η επίδραση των γονιδίων ανθεκτικότητας στην προσαρμοστικότητα των ζιζανίων και 5) η δυνατότητα ροής-μεταφοράς των γονιδίων ανθεκτικότητας από ανθεκτικά σε ευαίσθητα είδη ζιζανίων (Ελευθεροχωρινός, 2014).

Το glyphosate χρησιμοποιείται ευρέως από το 1974 σε καλλιεργούμενες και ακαλλιεργήτες εκτάσεις διότι είναι εύχρηστο, αποτελεσματικό, οικονομικό και φιλικό προς το περιβάλλον (Baylis, 2000; Duke and Powles, 2008b; Heap, 2014; Okada et al., 2013, 2015; Okada and Jasieniuk, 2014; Powles and Preston, 2006; Powles, 2008; Sansom et al., 2013; Zelaya et al., 2004). Βέβαια η χρήση του αυξήθηκε δραματικά μετά το 1996 εξαιτίας της δημιουργίας των γενετικώς τροποποιημένων ποικιλιών φυτών μεγάλης καλλιέργειας με ανθεκτικότητα στο glyphosate και της εφαρμογής συστημάτων μειωμένης κατεργασίας του εδάφους (Dill, 2005; Duke and Powles, 2008a; Heap, 2014; Norsworthy et al., 2001; Okada et al., 2013, 2015; Okada and Jasieniuk, 2014; Powles and Preston, 2006; Powles, 2008; Sansom et al., 2013; Song et al., 2011). Οι ανακλήσεις των εγκρίσεων πολλών ζιζανιοκτόνων σε συνδυασμό με τη μείωση της τιμής του λόγω της κυκλοφορίας πολλών γενόσημων σκευασμάτων του glyphosate είναι ένας επιπρόσθετος λόγος της αύξησης της χρήσης του (Kaundun et al., 2008; Okada et al., 2013, 2015; Okada and Jasieniuk, 2014; Sansom et al., 2013).

Η συχνή και ευρεία χρήση του glyphosate παγκοσμίως είχε ως συνέπεια την επιλογή και επικράτηση πολλών ανθεκτικών πληθυσμών που ανήκουν σε 34 είδη

ζιζανίων (Hear, 2016). Ο αριθμός αυτών των ειδών ζιζανίων με ανθεκτικότητα στο glyphosate είναι σχετικά μικρός συγκρινόμενος με τους αριθμούς των ειδών ζιζανίων με ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου οξικογαλακτική συνθάση (ALS ή AHAS) ή σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς λειτουργίας φωτοσυστήματος II (PS II) (158 και 105, αντίστοιχα) (Hear, 2016). Ο τρόπος δράσης του glyphosate, η χημική δομή, ο περιορισμένος μεταβολισμός και η απουσία υπολειμματικής δράσης εξηγούν το βραδύ ρυθμό εμφάνισης ανθεκτικών πληθυσμών ειδών ζιζανίων (Bradshaw et al., 1997). Επίσης, η περιορισμένη αρχικώς χρήση του λόγω υψηλού κόστους του glyphosate στα πρώτα έτη κυκλοφορίας του και η χρήση του σε συνδυασμό με άλλα ζιζανιοκτόνα μπορεί να συνέβαλαν στη βραδεία εκδήλωση ανθεκτικότητας (Perez-Jones et al., 2005).

Η πρώτη αναφορά για ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο glyphosate έγινε μετά από 22 χρόνια χρήσης του και ειδικότερα σε έναν πληθυσμό λεπτής ήρας (*Lolium rigidum* Gaudin) που βρέθηκε σε οπωρώνα της Αυστραλίας (Powles et al., 1998). Ακολούθησε το 1997 ένας ανθεκτικός πληθυσμός ελευσίνης [*Eleusine indica* (L.) Gaertn.] σε οπωρώνα της Μαλαισίας (Lee and Ngim, 2000), ενώ το 2000 έγινε η πρώτη αναφορά ανθεκτικού πληθυσμού κόνυζας [*C. canadensis* (L.) Cronq.] σε καλλιέργεια γενετικώς τροποποιημένης ποικιλίας σόγιας με ανθεκτικότητα στο glyphosate (VanGessel, 2001). Το 2001, αναφέρθηκαν δυο ανθεκτικοί πληθυσμοί πολυάνθης ήρας (*Lolium multiflorum* Lam.) σε οπωρώνες της Χιλής (Perez and Kogan, 2003), ενώ το 2003-04 αναφέρθηκαν τέσσερις και πέντε ανθεκτικοί πληθυσμοί κόνυζας [*C. bonariensis* (L.) Cronq.] σε οπωρώνες της Νότιας Αφρικής και της Ισπανίας, αντίστοιχα (Hear, 2016; Urbano et al., 2007). Επίσης, άλλα είδη ζιζανίων με ανθεκτικότητα στο glyphosate είναι τα *Plantago lanceolata* στη Νότια Αφρική, *Ambrosia artemisiifolia* στις ΗΠΑ, *Ambrosia trifida* στις ΗΠΑ, *Parthenium hysterophorus* στην Κολομβία, *Amaranthus palmeri* στις ΗΠΑ (Culpepper et al., 2006), *Amaranthus tuberculatus* (= *A. rudis*) στις ΗΠΑ, *Digitaria insularis* στην Παραγουάη, *Hedyotis verticillata* στη Μαλαισία, *Sorghum halepense* στην Αργεντινή, *Echinochloa colona* στην Αυστραλία, *Kochia scoparia* στις ΗΠΑ, *Cynodon hirsutus* στην Αργεντινή, *Lolium perenne* στην Αργεντινή, *Urochloa panicoides* στην Αυστραλία, *C. albida* (συν. *C. sumantrensis*) στην Ισπανία (González-Torralva et al., 2010), *Chloris truncata* στην Αυστραλία, *Leptochloa virgata* στο Μεξικό, *Poa annua* στις ΗΠΑ, *Raphanus raphanistrum* στην Αυστραλία, *Bromus diandrus* στην Αυστραλία, *Amaranthus spinosus* στις ΗΠΑ, *Amaranthus*

*hybridus* (συν: *quitensis*) στην Αργεντινή, *Bidens pilosa* στο Μεξικό, *Brachiaria eruciformis* στην Αυστραλία, *Bromus rubens* στην Αυστραλία, *Chloris elata* στη Βραζιλία, *Sonchus oleraceus* στην Αυστραλία, *Chloris virgata* στην Αυστραλία και *Lactuca serriola* στην Αυστραλία (Hear, 2016).

Οι περισσότεροι πληθυσμοί των 34 ειδών ζιζανίων με ανθεκτικότητα στο glyphosate απαντώνται σε δενδρώδεις καλλιέργειες (οπωρώνες ή αμπελώνες) και στις γενετικώς τροποποιημένες καλλιέργειες με ανθεκτικότητα στο glyphosate (Dinelli et al., 2008; González-Torralva et al., 2012a; Hear, 2014; Neve, 2008; Sansom et al., 2013). Οι λόγοι που συμβάλουν στην ανάπτυξη ανθεκτικών πληθυσμών ζιζανίων είναι η συνεχής χρήση του glyphosate και η απουσία εναλλακτικών τρόπων διαχείρισης των ζιζανίων. Επιπλέον, εικάζεται ότι οι χαμηλές δόσεις του glyphosate και η μη κατεργασία του εδάφους συμβάλουν στην επιβολή ανθεκτικών πληθυσμών (Dinelli et al., 2008; Okada et al., 2015; Powles, 2008; Sansom et al., 2013).

Η διαπίστωση ότι πληθυσμοί από 16 είδη ζιζανίων, εκτός από την ανθεκτικότητά τους στο glyphosate είχαν πολλαπλή ανθεκτικότητα σε ορισμένα ευρέως χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα, επιβάλλει την εγρήγορση των επιστημόνων για λήψη μέτρων που θα περιορίσουν την επέκταση αυτού του σοβαρού προβλήματος (Ελευθεροχωρινός, 2014, Hear, 2016).

#### **2.1.4.3.1. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας των ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου EPSPS (glyphosate)**

Η ανθεκτικότητα ενός ζιζανίου μπορεί να οφείλεται σε μηχανισμούς που σχετίζονται με:

- 1) την τροποποίηση του στόχου δράσης (ενζύμου ή πρωτεΐνης) του ζιζανιοκτόνου (TSR, **target site resistance**),
- 2) τον ενισχυμένο μεταβολισμό του ζιζανιοκτόνου από τα φυτά (NTSR, **non-target site resistance**),
- 3) την υπερπαραγωγή του ενζύμου-στόχου δράσης ή του ενζύμου μεταβολισμού του ζιζανιοκτόνου (gene overexpression),
- 4) τη μειωμένη μετακίνηση (**reduced translocation**) του ζιζανιοκτόνου στο χώρο δράσης (NTSR, **non-target site resistance**) (Délye et al., 2013b; Ελευθεροχωρινός, 2014; Hear, 2014; Sammons and Gaines, 2014; Shaner et al., 2012; Yuan et al., 2007).

Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας των περισσότερων ανθεκτικών πληθυσμών ειδών ζιζανίων στο glyphosate δεν έχει προσδιοριστεί ακόμη επακριβώς. Η μελέτη όμως μερικών ανθεκτικών πληθυσμών ειδών ζιζανίων έδειξε ότι η ανθεκτικότητά τους οφείλεται σε **τροποποίηση** του ενζύμου **EPSPS**, το οποίο είναι **στόχος δράσης** του **glyphosate** και ένζυμο κλειδί στη βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη. Η πρωτεϊνική εξέταση ανθεκτικών πληθυσμών ελευσίνης (*Eleusine indica*) έδειξε ότι η τροποποίηση του ενζύμου EPSPS οφειλόταν σε αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη (**Pro**) στη θέση **106** από σερίνη (**Ser**) ή θρεονίνη (**Thr**) (Baerson et al., 2002; Ελευθεροχωρινός, 2014; Kaundun et al., 2008; Ng et al., 2003, 2004a, 2004b). Η αντικατάσταση αυτή δεν επιτρέπει την πρόσδεση του glyphosate στο ένζυμο EPSPS, με αποτέλεσμα τη μη αναστολή της δράσης του. Η κληρονομηση της ανθεκτικότητας αυτών των πληθυσμών ελέγχεται από **ημικυρίαρχο γονίδιο** του πυρήνα (Ng et al., 2004b).

Ανθεκτικοί πληθυσμοί στο glyphosate λόγω τροποποίησης του ενζύμου EPSPS, εκτός από την ελευσίνη (*Eleusine indica*), έχουν αναφερθεί και για πληθυσμούς λεπτής ήρας (*Lolium rigidum*), πολύανθης ήρας (*Lolium multiflorum*), *Echinochloa colona*, *Digitaria insularis* και *Amaranthus tuberculatus* (= *A. rudis*) (Ελευθεροχωρινός, 2014; Hear, 2016; Sammons and Gaines, 2014). Η πρωτεϊνική εξέταση ανθεκτικών πληθυσμών λεπτής ήρας (*Lolium rigidum*) έδειξε ότι η τροποποίηση του ενζύμου EPSPS οφειλόταν σε αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη (**Pro**) στη θέση **106** από σερίνη (**Ser**), θρεονίνη (**Thr**), αλανίνη (**Ala**) ή λευκίνη (**Leu**) (Bostamam et al., 2012; Collavo and Sattin, 2012; Kaundun et al., 2011; Simarmata et al., 2008; Wakelin and Preston, 2006b; Yu et al., 2007), ενώ η πρωτεϊνική εξέταση ανθεκτικών πληθυσμών πολύανθης ήρας (*Lolium multiflorum*) έδειξε ότι η τροποποίηση του ενζύμου EPSPS οφειλόταν σε αντικατάσταση της προλίνης (**Pro**) στη θέση **106** από σερίνη (**Ser**) ή αλανίνη (**Ala**) (González-Torralva et al., 2012a; Jasieniuk et al., 2008; Perez-Jones et al., 2007). Επιπρόσθετα, η πρωτεϊνική εξέταση ανθεκτικού πληθυσμού *Echinochloa colona* έδειξε ότι η τροποποίηση του ενζύμου EPSPS οφειλόταν σε αντικατάσταση της προλίνης (**Pro**) στη θέση **106** από σερίνη (**Ser**) (Alarcón-Reverte et al., 2013), ενώ η πρωτεϊνική εξέταση ανθεκτικών πληθυσμών *Digitaria insularis* έδειξε ότι η τροποποίηση του ενζύμου EPSPS οφειλόταν σε αντικατάσταση της προλίνης (**Pro**) στη θέση **106** από θρεονίνη (**Thr**) (de Carvalho et al., 2012). Τέλος, η πρωτεϊνική εξέταση ανθεκτικών πληθυσμών *Amaranthus tuberculatus* (= *A. rudis*) έδειξε ότι η τροποποίηση του

ενζύμου EPSPS οφειλόταν σε αντικατάσταση της προλίνης (**Pro**) στη θέση **106** από σερίνη (**Ser**) (Bell et al., 2013; Nandula et al., 2013).

Ο **μεταβολισμός** του glyphosate έχει αναφερθεί σε ανθεκτικούς πληθυσμούς *Digitaria insularis* στη Βραζιλία. Ειδικότερα, το glyphosate μεταβολίστηκε στους ανθεκτικούς πληθυσμούς σε αμινομεθυλοφωσφονικό οξύ (AMPA), γλυοξυλικό, και σαρκοσίνη σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90%, ενώ μόνον 11% μεταβολίστηκε στον ευαίσθητο πληθυσμό (de Carvalho et al., 2012). Επίσης, ο μεταβολισμός του glyphosate σε γλυοξυλικό, σαρκοσίνη και αμινομεθυλοφωσφονικό οξύ εντός 96 ωρών από την εφαρμογή έχει αναφερθεί σε ανθεκτικό πληθυσμό *C. canadensis* στην Ισπανία (González-Torralva et al., 2012b).

Η **υπερπαραγωγή** (υπερκωδικοποίηση) του ευαίσθητου ενζύμου **EPSPS (gene overexpression)**, ως συνέπεια της παρουσίας 5-160 αντιγράφων του γονιδίου *epsps* (gene amplification), συνέβαλε στην επικράτηση ενός ανθεκτικού πληθυσμού βλήτου (*Amaranthus palmeri*) στο glyphosate. Η επιβίωση των φυτών αυτού του ζιζανίου οφειλόταν στην αδυναμία του glyphosate να αναστείλει πλήρως τη δράση του ενζύμου EPSPS, λόγω της υπερπαραγωγής του εντός των φυτών (Ελευθεροχωρινός, 2014; Gaines et al., 2010). Παρόμοια μορφή ανθεκτικότητας στο glyphosate ταυτοποιήθηκε και σε έναν πληθυσμό πολύανθης ήρας (*Lolium multiflorum*) στο Άρκανσας των ΗΠΑ, ο οποίος είχε 25 επιπλέον αντίγραφα του γονιδίου *epsps* (Ελευθεροχωρινός, 2014; Salas et al., 2012).

Η ανθεκτικότητα ορισμένων πληθυσμών *C. canadensis* και *C. bonariensis*, εκτός από τη μειωμένη μετακίνηση του glyphosate από τα φύλλα στους βλαστούς και στις ρίζες των φυτών, αποδόθηκε και σε **υπερπαραγωγή** του ευαίσθητου ενζύμου EPSPS, η οποία οφειλόταν σε **αυξημένη έκφραση** του γονιδίου *epsps* λόγω της παρουσίας καταλληλότερου **υποκινητή-προαγωγέα** (Dinelli et al., 2006, 2008; Ελευθεροχωρινός, 2014).

Η **μειωμένη μετακίνηση (reduced translocation)** του glyphosate εντός του φυτού θεωρείται από τα σημαντικότερα αίτια της ανθεκτικότητάς του και έχει αναφερθεί σε πληθυσμούς *Lolium rigidum* (Lorraine-Colwill et al., 2002; Wakelin et al., 2004), *C. canadensis* (Dinelli et al., 2006; Feng et al., 2004; Ge et al., 2010, 2011; Koger and Ready, 2005), *Lolium multiflorum* (Michette et al., 2005, 2007; Perez et al., 2004; Perez-Jones et al., 2007) και *C. bonariensis* (Dinelli et al., 2008). Αυτή μπορεί να οφείλεται σε:

1) μειωμένη διέλευση του glyphosate δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης,

- 2) μετακίνηση-εναπόθεση του glyphosate από το κυτταροδιάλυμα στο χυμοτόπιο (χώρος μη δράσης),
- 3) μειωμένη μετακίνηση του glyphosate από το κυτταροδιάλυμα στο χλωροπλάστη (χώρος δράσης) ή απέκκρισή του από το χλωροπλάστη στο κυτταροδιάλυμα,
- 4) απέκκριση του glyphosate από το κυτταροδιάλυμα στο κυτταρικό τοίχωμα (Ελευθεροχωρινός, 2014; Shaner, 2009).

Οι διεργασίες αυτές υποβοηθούνται ή παρεμποδίζονται από τη συμμετοχή **ABC** (ATP-εξαρτώμενων) διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών μεταφορέων [ATP-binding cassette (ABC) transporters] (Crouzet et al., 2013, Ελευθεροχωρινός, 2014; Ge et al., 2010, 2011; Peng et al., 2010; Sammons and Gaines, 2014; Shaner, 2009; Yuan et al., 2007, 2010). Οι διαμεμβρανικοί πρωτεϊνικοί μεταφορείς εμπλέκονται επίσης στη μεταφορά δευτερογενών μεταβολιτών και μεταβολιτών των ζιζανιοκτόνων στο χυμοτόπιο, στην απομάκρυνση τοξικών χημικών ενώσεων από τα φυτικά κύτταρα, καθώς επίσης και στη μετακίνηση λιπαρών οξέων, φωσφολιπιδίων, αυξινών και βαρέων μετάλλων (Peng et al., 2010; Shaner, 2009; Yuan et al., 2007). Σύμφωνα με τον Shaner (2009), περισσότερα από 130 γονίδια έχουν αναφερθεί ότι κωδικοποιούν διαμεμβρανικούς πρωτεϊνικούς μεταφορείς στα φυτά.

Η **κληρονομία** της ανθεκτικότητας λόγω μειωμένης μετακίνησης του glyphosate ελέγχεται από **ημικυρίαρχο γονίδιο** του πυρήνα (Shaner, 2009; Wakelin and Preston, 2006a; Zelaya et al., 2004), ενώ οι ανθεκτικοί πληθυσμοί ορισμένων ζιζανίων παρουσιάζουν **μειωμένη προσαρμοστικότητα** (Ελευθεροχωρινός, 2014; Powles and Preston, 2006; Powles and Yu, 2010; Preston and Wakelin, 2008; Shaner, 2009). Αυτό οφείλεται σε μειωμένη πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων (π.χ. φωσφόρος) από τις ρίζες των ανθεκτικών φυτών και στην περιορισμένη μετακίνηση των προϊόντων φωτοσύνθεσης από τα φύλλα στους μεριστωματικούς ιστούς (Ελευθεροχωρινός, 2014; Shaner, 2009). Η ένταση ανθεκτικότητας αυτής της μορφής μειώνεται σημαντικά όταν το glyphosate εφαρμόζεται σε ανθεκτικά φυτά που αναπτύσσονται σε χαμηλές από ό,τι σε κανονικές θερμοκρασίες (Ελευθεροχωρινός, 2014; Ge et al., 2011; Moretti et al., 2013; Vila-Aiub et al., 2013).

Αυτό όμως που χρήζει ιδιαίτερης αναφοράς είναι ότι το γονίδιο (ή τα γονίδια), το οποίο ελέγχει (ή τα οποία ελέγχουν) τον πιθανό (ή τους πιθανούς) μηχανισμό (ή μηχανισμούς) ανθεκτικότητας μειωμένης μετακίνησης του glyphosate στο χώρο δράσης (χλωροπλάστης), δεν έχει (ή δεν έχουν) αναγνωριστεί-ταυτοποιηθεί (αλληλουχηθεί) ακόμη (Délye, 2013a; Ελευθεροχωρινός, 2014).

Τα πιθανά **αίτια** της **ανθεκτικότητας** πληθυσμών ειδών **ζιζανίων** στο **glyphosate**, με βάση τα παραπάνω είναι:

- 1) η τροποποίηση του ενζύμου EPSPS,
- 2) ο ενισχυμένος μεταβολισμός του glyphosate από τα φυτά,
- 3) η υπερπαραγωγή του ευαίσθητου ενζύμου EPSPS λόγω της παρουσίας πολλών αντιγράφων του γονιδίου *epsps* ή της υπερέκφρασής του,
- 4) η περιορισμένη διέλευση του glyphosate δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης,
- 5) η μετακίνηση-εναπόθεση του glyphosate από το κυτταροδιάλυμα στο χυμοτόπιο (χώρος μη δράσης),
- 6) η περιορισμένη μετακίνηση του glyphosate από το κυτταροδιάλυμα στο χλωροπλάστη (χώρος δράσης) ή απέκκρισή του από το χλωροπλάστη στο κυτταροδιάλυμα,
- 7) η απέκκριση του glyphosate από το κυτταροδιάλυμα στο κυτταρικό τοίχωμα (Beckie, 2011; Crouzet et al., 2013; de Carvalho et al., 2012; Dinelli et al., 2006, 2008; Ελευθεροχωρινός, 2014; Gaines et al., 2010, 2013; Ge et al., 2010, 2011; González-Torralva et al., 2012b; Peng et al., 2010; Powles and Preston, 2006; Powles and Yu, 2010; Preston and Wakelin, 2008; Salas et al., 2012; Sammons and Gaines, 2014; Shaner, 2009; Shaner et al., 2012, Yuan et al., 2007, 2010).

#### **2.1.4.3.2. Παράγοντες επικράτησης ανθεκτικών πληθυσμών κόνυζας (*Conyza* spp.) σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου EPSPS (glyphosate)**

Η *C. canadensis* είναι το πιο ευρέως διαδεδομένο ζιζάνιο με ανθεκτικότητα στο glyphosate στις ΗΠΑ (Heap, 2014; Peng et al., 2010) και γι' αυτό συγκαταλέγεται μεταξύ των δέκα σημαντικότερων (χειρότερων) ζιζανίων του κόσμου όσον αφορά την ανθεκτικότητα (Davis et al., 2009; Dinelli et al., 2008; Eubank et al., 2008; Koger et al., 2004; Zelaya et al., 2004). Τα σημαντικότερα, από οικονομικής σκοπιάς ζιζάνια, με ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα είναι τα *Lolium rigidum* Gaudin, *Avena fatua* L., *Amaranthus retroflexus* L., *A. hybridus* L., *A. rudis* Sauer, *A. tuberculatus* (Moq.) J.D. Sauer, *Chenopodium album* L., *Setaria viridis* (L.) Beauv., *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv., *Eleusine indica* (L.) Gaertn., *Kochia scoparia* (L.) Schrad., *C. canadensis* (L.) Cronq. και *Alopecurus myosuroides* Huds. (Beckie, 2006).

Τα είδη του γένους *Conyza*, εκτός από την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο glyphosate σε πολλές περιοχές του κόσμου και στην Ελλάδα (Γιαννοπολίτης κ.ά., 2008; Μυλωνάς κ.ά., 2012; Mylonas et al., 2014; Nol et al., 2012; Travlos and Chachalis, 2010; Τραυλός και Χάχαλης, 2012; Travlos and Chachalis, 2013b), έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς λειτουργίας φωτοσυστήματος II (PS II), σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς λειτουργίας φωτοσυστήματος I (PS I) και σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου οξικογαλακτική συνθάση (ALS ή AHAS) (Heap, 2016; Koger et al., 2004; Kruger et al., 2010; Santos et al., 2014; VanGessel et al., 2009; Weaver et al., 2004; Zelaya et al., 2004; Zelaya et al., 2007). Η *C. canadensis* ήταν το πρώτο πλατύφυλλο ζιζάνιο που ανέπτυξε ανθεκτικότητα στο glyphosate το 2000 στις ΗΠΑ (Delaware) σε καλλιέργεια γενετικώς τροποποιημένης ποικιλίας σόγιας με ανθεκτικότητα στο glyphosate (VanGessel, 2001), ενώ παγκοσμίως έχουν ήδη αναφερθεί 40, 12 και 5 πληθυσμοί των ειδών *C. canadensis*, *C. bonariensis* και *C. albida*, αντίστοιχα, που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο glyphosate (Heap, 2016).

Η ταχεία εξέλιξη της ανθεκτικότητας στην κόνυζα (*Conyza* spp.) οφείλεται στη βιολογία του ζιζανίου (Davis et al., 2010; Owen and Zelaya, 2005; Powles and Preston, 2006; Sansom et al., 2013; Urbano et al., 2007) και ειδικότερα στη μακρά περίοδο φυτρώματος των σπόρων (φθινόπωρο/άνοιξη) (Buhler and Owen, 1997; Regehr and Bazzaz, 1979; Sansom et al., 2013; Tozzi et al., 2014; Weaver, 2001; Wu et al., 2007), στην παραγωγή σπόρων που δεν έχουν λήθαργο (Buhler and Owen, 1997; Karlsson and Milberg, 2007; Sansom et al., 2013; Tozzi et al., 2014; Weaver, 2001) και μπορούν να φυτρώσουν/βλαστήσουν στο έδαφος αμέσως μετά την ωρίμανση (Buhler and Owen, 1997; Nandula et al., 2006; Sansom et al., 2013; Weaver, 2001; Wu et al., 2007), στη μεγάλη ευκολία διασποράς των σπόρων με τη βοήθεια του ανέμου (έως 500 km για την *C. canadensis*) (Sansom et al., 2013; Shields et al., 2006; Wu et al., 2007) και στην ικανότητα μεγάλης παραγωγής σπόρου ανά φυτό (έως 200.000 σπόρους για την *C. canadensis*) (Sansom et al., 2013; Weaver, 2001; Wu et al., 2007). Επίσης, το γεγονός ότι μπορεί να σταυρογονιμοποιηθεί με τη βοήθεια των εντόμων σε ποσοστό 4% συντελεί επίσης στη διάδοση της ανθεκτικότητας μέσω της γύρης (Dinelli et al., 2006; Owen and Zelaya, 2005; Sansom et al., 2013). Επιπλέον, η υιοθέτηση συστημάτων ελάχιστης ή μη κατεργασίας του εδάφους σε δενδρώδεις καλλιέργειες (οπωρώνες και ελαιώνες) και σε αμπελώνες για την αντιμετώπιση των ζιζανίων συνέβαλε στην αύξηση της χρήσης



ζιζανιοκτόνων (Sansom et al., 2013) και στην ως εκ τούτου αύξηση της δυνατότητας επιλογής και επικράτησης ανθεκτικών πληθυσμών κόνυζας (*Conyza* spp.) (Brown and Whitwell, 1988; Kapusta, 1979; Sansom et al., 2013). Επιπρόσθετα, θετική επιδραση στην ανθεκτικότητα έχει η ευρεία προσαρμοστικότητα της κόνυζας (*Conyza* spp.) σε ποικίλα περιβάλλοντα (καλλιεργούμενες/ακαλλιέργητες/μη καλλιεργούμενες εκτάσεις) (Koger et al., 2004; Sansom et al., 2013; Urbano et al., 2007).

Η ανθεκτικότητα της *C. canadensis* στο glyphosate, σύμφωνα με τους Zelaya et al. (2004), οφείλεται σε ημικυρίαρχο γονίδιο του πυρήνα, ενώ με βάση όσα αναφέρθηκαν ανωτέρω, δεν είναι υπερβολικό αυτό που έχει αναφερθεί «ότι η ανθεκτικότητα της *C. canadensis* είναι το χειρότερο δυνατό σενάριο» (Owen and Zelaya, 2005).

## **2.2. Σκοπός της εργασίας**

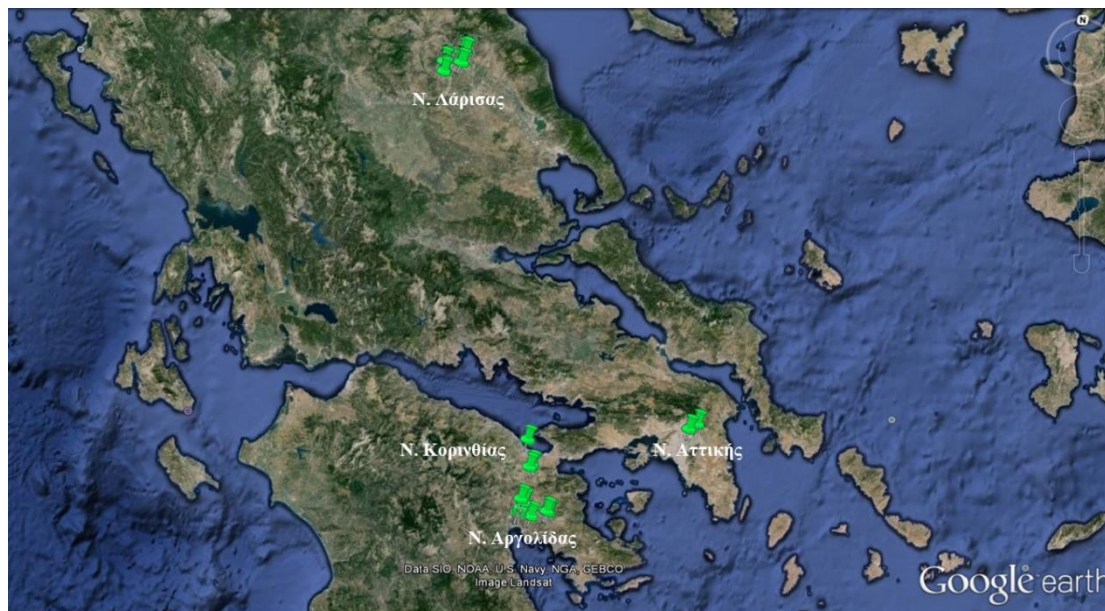
Αφορμή για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας αποτέλεσαν παράπονα που εκφράστηκαν από παραγωγούς δενδρωδών καλλιεργειών (οπωρώνων και ελαιώνων) και αμπελώνων σε περιοχές της Κεντρικής (Νομός Λάρισας) και Νότιας Ελλάδας (Νομοί Αργολίδας και Κορινθίας) αναφορικά με μειωμένη δράση του glyphosate εναντίον διαφόρων πληθυσμών κόνυζας (*Conyza* spp.). Ο συνδυασμός της μειωμένης δράσης των επεμβάσεων και της συνεχώς αυξανόμενης έκτασης του προβλήματος κατέστησε επιτακτική την ανάγκη διερεύνησης της υπόθεσης για πιθανή ύπαρξη ανθεκτικών πληθυσμών κόνυζας (*Conyza* spp.) στο glyphosate, της οποίας τα πειράματα και τα αποτελέσματα που προέκυψαν περιγράφονται λεπτομερώς στις επόμενες ενότητες-κεφάλαια.

## **2.3. Υλικά και μέθοδοι**

### **2.3.1. Συλλογή φυτικού υλικού**

Πραγματοποιήθηκε επιτόπια έρευνα-επισκόπηση κατά τη διάρκεια των μηνών Ιανουαρίου-Σεπτεμβρίου, του έτους 2010, σε δενδρώδεις καλλιέργειες (οπωρώνες και ελαιώνες) και σε αμπελώνες της Κεντρικής (Νομός Λάρισας) και Νότιας Ελλάδας (Νομοί Αργολίδας και Κορινθίας) (Εικόνα 2.3), όπου εκφράστηκαν παράπονα από παραγωγούς για μειωμένη αντιμετώπιση της κόνυζας (*Conyza* spp.), μετά από επαναλαμβανόμενες μεταφυτρωτικές εφαρμογές του glyphosate. Κατά την επιτόπια έρευνα-επισκόπηση επισημάνθηκαν 58 αγροί στους οποίους η αντιμετώπιση της

κόνυζας (*Conyza* spp.) δεν ήταν ικανοποιητική και η κατανομή των φυτών που επιβίωσαν των επεμβάσεων του glyphosate δικαιολογούσε την πιθανή ύπαρξη ανθεκτικότητας και όχι τη μη ορθολογική εφαρμογή του.



**Εικόνα 2.3.** Περιοχές προέλευσης των 60 μελετηθέντων πληθυσμών κόνυζας (*C. albida* και *C. bonariensis*) για ύπαρξη ανθεκτικότητας στο glyphosate (Πηγή: Google earth).

Κατά τη διάρκεια των μηνών Αυγούστου-Σεπτεμβρίου 2010, συλλέχθηκαν σπόροι από φυτά κόνυζας (31 πληθυσμοί *C. albida* και 27 πληθυσμοί *C. bonariensis*), που επιβίωσαν των επεμβάσεων του glyphosate στους 58 προεπισημασμένους αγρούς. Επιπλέον, την ίδια χρονική περίοδο συλλέχθηκαν σπόροι από φυτά ενός πληθυσμού *C. albida* και ενός πληθυσμού *C. bonariensis* που αναπτύσσονταν σε ακαλλιέργητες εκτάσεις της Νότιας Ελλάδας (Νομός Αττικής), τα οποία ουδέποτε δέχθηκαν επεμβάσεις με glyphosate ή κάποιο άλλο ζιζανιοκτόνο. Οι σπόροι αυτών των δύο πληθυσμών χρησιμοποιήθηκαν ως ευαίσθητοι πληθυσμοί/μάρτυρες (S1 για την *C. albida* και S2 για την *C. bonariensis*, αντίστοιχα) (Πίνακας 2.5). Οι σπόροι των φυτών κόνυζας (*C. albida* ή *C. bonariensis*) κάθε αγρού ή ακαλλιέργητης έκτασης χαρακτηρίστηκαν ως διαφορετικός «πληθυσμός». Κατά τη διάρκεια της συλλογής του σπόρου λήφθηκαν μέτρα ώστε να συγκομίζεται αντιπροσωπευτικό δείγμα από κάθε πληθυσμό. Οι σπόροι που συγκομίστηκαν τοποθετήθηκαν αρχικά σε μεγάλες πλαστικές σακούλες και αμέσως μετά σε χάρτινες σακούλες για τη μεταφορά τους στο Εργαστήριο Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενακειού

Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, όπου αφέθηκαν για μια εβδομάδα για αεροζήρανση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, έγινε απομάκρυνση των ξένων υλών και οι καθαροί σπόροι τοποθετήθηκαν σε γυάλινα βάζα και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 3-5 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους στα πειράματα.

**Πίνακας 2.5.** Προέλευση (Νομός) δειγματοληψίας των πληθυσμών κόνυζας (*C. albida* και *C. bonariensis*) που, μετά από αξιολόγηση ως προς την ύπαρξη ανθεκτικότητας στο glyphosate, χαρακτηρίστηκαν σε ανθεκτικούς (R) ή ευαίσθητους (S) πληθυσμούς.

Νομός	Είδος	Πληθυσμοί		
		Ανθεκτικοί (R)	Ευαίσθητοι (S)	Σύνολο
Λάρισα	<i>C. albida</i>	2	1	3
	<i>C. bonariensis</i>	7	18	25
	<b>Υποσύνολο</b>	<b>9</b>	<b>19</b>	<b>28</b>
Αργολίδα	<i>C. albida</i>	15	9	24
	<i>C. bonariensis</i>	0	2	2
	<b>Υποσύνολο</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>26</b>
Κορινθία	<i>C. albida</i>	1	3	4
	<i>C. bonariensis</i>	0	0	0
	<b>Υποσύνολο</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Αττική	<i>C. albida</i>	0	1 (S1)	1
	<i>C. bonariensis</i>	0	1 (S2)	1
	<b>Υποσύνολο</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>Σύνολο</b>	<i>C. albida</i>	18	14	32
	<i>C. bonariensis</i>	7	21	28
	<b>Σύνολο</b>	<b>25</b>	<b>35</b>	<b>60</b>

### 2.3.2. Διερεύνηση ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών

Όλοι οι πληθυσμοί κόνυζας (32 πληθυσμοί *C. albida* και 28 πληθυσμοί *C. bonariensis*), που συλλέχθηκαν κατά το έτος 2010, αξιολογήθηκαν για πιθανή ύπαρξη ανθεκτικότητας στο glyphosate κατά τη διάρκεια φθινόπωρο 2010-φθινόπωρο 2011.

Το πείραμα έγινε σε φυτοδοχεία χωρητικότητας 1,5 L, τα οποία περιείχαν μίγμα ανοικτού-κίτρινου και μαύρου χρώματος τύρφη σε αναλογία 1:2 (ο/ο). Σε κάθε φυτοδοχείο τοποθετήθηκαν περίπου 50 σπόροι κόνυζας στην επιφάνεια του εδαφικού μίγματος και ακολούθως καλύφθηκαν με ένα πολύ λεπτό στρώμα του ίδιου εδαφικού

μίγματος. Τα φυτοδοχεία, μετά τη σπορά, τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου (στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο), όπου, ένα μήνα μετά την εμφάνιση των σποροφύτων κόνυζας, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις στο στάδιο των 2-4 φύλλων, ώστε τελικά, να παραμείνουν τέσσερα ομοιόμορφης ανάπτυξης φυτά κόνυζας ανά φυτοδοχείο. Η άρδευση των φυτών κόνυζας κατά τη διάρκεια του πειράματος γινόταν σύμφωνα με τις ανάγκες τους σε νερό, ενώ δεν πραγματοποιήθηκε λίπανση κατά τη διάρκεια του πειράματος. Κάθε εβδομάδα γινόταν τυχαιοποίηση εκ νέου των φυτοδοχείων.

Οι επεμβάσεις του glyphosate έγιναν μεταφυτρωτικά όταν τα φυτά της κόνυζας ήταν στο στάδιο των 6-8 φύλλων. Η εφαρμογή των επεμβάσεων έγινε με ψεκαστήρα ακριβείας ειδικής κατασκευής, ο οποίος φέρει ακροφύσιο τύπου ριπιδίου 8003, ρυθμισμένο ώστε να εφαρμόζει όγκο ψεκαστικού υγρού 30 L/στρ. με πίεση 280 kPa.

Το πειραματικό σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι πλήρεις ομάδες σε ελεύθερη διάταξη (RCBD, **R**andomized **C**omplete **B**lock **D**esign) και ο κάθε συνδυασμένος παράγοντας (πληθυσμός x δόση glyphosate) είχε τέσσερις επαναλήψεις-φυτοδοχεία (με τέσσερα φυτά ανά φυτοδοχείο).

Οι επεμβάσεις του πειράματος περιελάμβαναν εφαρμογή της συνιστώμενης (63 g δ.ο./στρ.), της διπλάσιας (126 g δ.ο./στρ.) και της τετραπλάσιας της συνιστώμενης δόσης του glyphosate (252 g δ.ο./στρ.), αντίστοιχα. Επιπλέον, για κάθε πληθυσμό (ανθεκτικό ή ευαίσθητο) υπήρχε και η επέμβαση του ασέκαστου μάρτυρα (μη εφαρμογή ζιζανιοκτόνου) με τέσσερα φυτοδοχεία-επαναλήψεις.

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας ή την ευαισθησίας των πληθυσμών στο glyphosate έγινε μακροσκοπικά με τη μέτρηση του αριθμού των φυτών κόνυζας που επιβίωσαν σε κάθε φυτοδοχείο τέσσερις εβδομάδες μετά την εφαρμογή των επεμβάσεων (4 WAT). Ειδικότερα, πληθυσμοί οι οποίοι επιβίωσαν τέσσερις εβδομάδες μετά από εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του glyphosate (63 g δ.ο./στρ.) σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% (μέσος όρος > 2 φυτά/φυτοδοχείο) χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικοί (resistant, R), ενώ πληθυσμοί οι οποίοι επιβίωσαν τέσσερις εβδομάδες μετά από εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του glyphosate (63 g δ.ο./στρ.) σε ποσοστό μικρότερο του 50% (μέσος όρος 0-2 φυτά/φυτοδοχείο) χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητοι (susceptible, S).

Τα πιο εύρωστα φυτά των ανθεκτικών πληθυσμών κόνυζας (*C. albida* ή *C. bonariensis*) που επιβίωσαν (3-4 φυτά που επιβίωσαν και αναβλάστησαν/φυτοδοχείο

μετά από έκθεσή τους στη συνιστώμενη δόση του glyphosate) καθώς και τα ανθέκαστα φυτά των ευαίσθητων πληθυσμών κόνυζας (*C. albida* ή *C. bonariensis*) μεταφυτεύθηκαν σε μεγαλύτερα φυτοδοχεία χωρητικότητας 8,5 L και τοποθετήθηκαν σε υπαίθριο χώρο (φυσικές συνθήκες περιβάλλοντος) του Μπενακειού Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου κατά τη διάρκεια άνοιξη 2011-καλοκαίρι 2011 για να σποροποιήσουν. Τα φυτά των ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida*, των ανθεκτικών πληθυσμών *C. bonariensis*, των ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* και των ευαίσθητων πληθυσμών *C. bonariensis* τοποθετήθηκαν σε τέσσερα διαφορετικά σημεία για την αποφυγή σταυρογονιμοποίησης. Κατά τη διάρκεια των μηνών Αυγούστου-Σεπτεμβρίου 2011, ώριμοι σπόροι κάθε φυτού κόνυζας (*C. albida* ή *C. bonariensis*) συλλέχθηκαν χωριστά σε χάρτινες σακούλες και ακολούθως μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενακειού Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, όπου αφέθηκαν για μια εβδομάδα για αεροξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, έγινε απομάκρυνση των ξένων υλών και οι καθαροί σπόροι τοποθετήθηκαν σε γυάλινα βάζα και αποθηκευτήκαν σε θερμοκρασία 3-5 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους για περαιτέρω έρευνα.

### 2.3.3. Προσδιορισμός της έντασης ανθεκτικότητας

Πέντε πληθυσμοί *C. albida*, που από εδώ και στο εξής θα αναφέρονται ως R1, R2, R3, R4 και R5, αντίστοιχα, και τρεις πληθυσμοί *C. bonariensis*, που από εδώ και στο εξής θα αναφέρονται ως R6, R7 και R8, αντίστοιχα, οι οποίοι αξιολογήθηκαν στο πείραμα διερεύνησης ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών και χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικοί (R) (τα φυτά επιβίωσαν και αναβλάστησαν μετά από έκθεσή τους στη συνιστώμενη δόση του glyphosate), χρησιμοποιήθηκαν σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια φθινόπωρο 2011-χειμώνας 2012. Οι τέσσερις από τους πέντε πληθυσμούς *C. albida* (R1, R3, R4, R5) προέρχονταν από το Νομό Αργολίδας, ενώ ο πέμπτος (R2) προέρχονταν από το Νομό Λάρισας. Οι τρεις πληθυσμοί *C. bonariensis* (R6, R7, R8) προέρχονταν από το Νομό Λάρισας. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε ανθεκτικό πληθυσμό προήλθαν από φυτά κόνυζας που επιβίωσαν και αναπτύχθηκαν κατά το πείραμα διερεύνησης ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών.

Το πείραμα αποσκοπούσε στον προσδιορισμό της δόσης του glyphosate που απαιτείται για τη μείωση της ανάπτυξης των φυτών κόνυζας κατά 50% (GR<sub>50</sub> τιμή,

growth reduction 50%) και ακολούθως στον υπολογισμό της έντασης ανθεκτικότητας (R/S) ( $GR_{50}$  τιμή του ανθεκτικού πληθυσμού/ $GR_{50}$  τιμή του ευαίσθητου πληθυσμού) (S1 για την *C. albida* ή S2 για την *C. bonariensis*). Παράλληλα, την ίδια χρονική περίοδο αξιολογήθηκαν ως προς την ευαισθησία τους στο glyphosate ένας ευαίσθητος (S) πληθυσμός *C. albida* (S1) και ένας ευαίσθητος (S) πληθυσμός *C. bonariensis* (S2) (τα φυτά των πληθυσμών αυτών αντιμετωπίστηκαν αποτελεσματικά μετά από έκθεσή τους στη συνιστώμενη δόση του glyphosate στο πείραμα διερεύνησης ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών) προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της έντασης ανθεκτικότητας των υπολοίπων πληθυσμών. Οι δύο ευαίσθητοι πληθυσμοί *C. albida* και *C. bonariensis* (S1 και S2, αντίστοιχα) προέρχονταν από το Νομό Αττικής. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε ευαίσθητο πληθυσμό προήλθαν από τους αντίστοιχους αφέκαστους μάρτυρες κόνυζας που αναπτύχθηκαν κατά το πείραμα διερεύνησης ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών.

Οι σπόροι από κάθε πληθυσμό (οκτώ ανθεκτικοί και δύο ευαίσθητοι) σπάρθηκαν σε πλαστικούς δίσκους των 24 θέσεων και διαστάσεων 6x5,5x5 cm για κάθε θέση. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα ανοικτού-κίτρινου και μαύρου χρώματος τύρφη σε αναλογία 1:2 (ο/ο). Σε κάθε θέση τοποθετήθηκαν περίπου 20 σπόροι κόνυζας στην επιφάνεια του εδαφικού μίγματος και ακολούθως καλύφθηκαν με ένα πολύ λεπτό στρώμα του ίδιου εδαφικού μίγματος. Οι πλαστικοί δίσκοι, μετά τη σπορά, τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου (στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο) όπου, μετά την εμφάνιση των σποροφύτων κόνυζας, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις στο στάδιο των 2-4 φύλλων, ώστε τελικά, να παραμείνουν ομοιόμορφης ανάπτυξης φυτά κόνυζας σε κάθε πληθυσμό. Στη συνέχεια, έγινε μεταφύτευση δύο ομοιόμορφων ανεπτυγμένων φυτών κόνυζας σε κάθε φυτοδοχείο χωρητικότητας 1,5 L (τα οποία περιείχαν το προαναφερθέν μίγμα τύρφης) και όλα τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου. Η άρδευση των φυτών κόνυζας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων γινόταν σύμφωνα με τις ανάγκες τους σε νερό, ενώ δεν πραγματοποιήθηκε λίπανση κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Κάθε εβδομάδα γινόταν τυχαιοποίηση εκ νέου των φυτοδοχείων.

Οι επεμβάσεις του glyphosate έγιναν μεταφυτρωτικά όταν τα φυτά της κόνυζας ήταν στο στάδιο των 6-8 φύλλων. Η εφαρμογή των επεμβάσεων έγινε με ψεκαστήρα ακριβείας ειδικής κατασκευής, ο οποίος, όπως προαναφέρθηκε, φέρει

ακροφύσιο τύπου ριπιδίου 8003, ρυθμισμένο ώστε να εφαρμόζει όγκο ψεκαστικού υγρού 30 L/στρ. με πίεση 280 kPa.

Το πειραματικό σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι πλήρεις ομάδες σε ελεύθερη διάταξη (RCBD, **R**andomized **C**omplete **B**lock **D**esign) και ο κάθε συνδυασμένος παράγοντας (πληθυσμός x δόση glyphosate) είχε τέσσερις επαναλήψεις-φυτοδοχεία (με δύο φυτά ανά φυτοδοχείο). Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές (επανάληψη στο χρόνο).

Οι επεμβάσεις των πειραμάτων για τους ανθεκτικούς πληθυσμούς περιελάμβαναν εφαρμογή της 1/2 της συνιστώμενης δόσης του glyphosate (31,5 g δ.ο./στρ.), τη συνιστώμενη (63 g δ.ο./στρ.), τη διπλάσια (126 g δ.ο./στρ.), την τετραπλάσια (252 g δ.ο./στρ.), την οκταπλάσια (504 g δ.ο./στρ.) και τη δεκαεξαπλάσια (1008 g δ.ο./στρ.) της συνιστώμενης δόσης του glyphosate, αντίστοιχα. Επιπλέον, για κάθε πληθυσμό υπήρχε και η επέμβαση του αφέκαστου μάρτυρα (μη εφαρμογή ζιζανιοκτόνου) με τέσσερα φυτοδοχεία-επαναλήψεις.

Οι επεμβάσεις των πειραμάτων για τους ευαίσθητους πληθυσμούς περιελάμβαναν εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του glyphosate (63 g δ.ο./στρ.), 1/2 (31,5 g δ.ο./στρ.), 1/4 (15,75 g δ.ο./στρ.), 1/8 (7,875 g δ.ο./στρ.), 1/16 (3,9375 g δ.ο./στρ.) και 1/32 (1,96875 g δ.ο./στρ.) της συνιστώμενης δόσης του glyphosate, αντίστοιχα. Επιπλέον, για κάθε πληθυσμό υπήρχε και η επέμβαση του αφέκαστου μάρτυρα (μη εφαρμογή ζιζανιοκτόνου) με τέσσερα φυτοδοχεία-επαναλήψεις.

Η επίδραση των επεμβάσεων στην ανάπτυξη των φυτών κόνυζας αξιολογήθηκε έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate (6 WAT) με προσδιορισμό του νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών κόνυζας που επιβίωσαν σε κάθε φυτοδοχείο. Οι ανθεκτικοί και οι ευαίσθητοι πληθυσμοί των δύο ειδών αξιολογήθηκαν σε χωριστά πειράματα εξαιτίας των διαφορετικών δόσεων του glyphosate που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως ποσοστό (%) του μέσου νωπού βάρους του αφέκαστου μάρτυρα για κάθε πληθυσμό.

## **2.4. Στατιστική ανάλυση**

Η ανάλυση των δεδομένων του πειράματος διερεύνησης ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών έγινε με βάση την παραγοντική προσέγγιση 4 x 60 [4 επεμβάσεις του glyphosate x 60 πληθυσμοί κόνυζας (32 πληθυσμοί *C. abida* και 28 πληθυσμοί *C. bonariensis*)]. Η σύγκριση των μέσων όρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς (ΕΣΔ) και σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Η

ανάλυση παραλλακτικότητας των δεδομένων (ANOVA) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού στατιστικής ανάλυσης δεδομένων SPSS (v. 15.0).

Η ανάλυση των δεδομένων των πειραμάτων προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας ( $GR_{50}$ , R/S) ήταν συνδυασμένη ως προς το χρόνο πραγματοποίησης των δύο πειραμάτων. Τα δεδομένα των ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* αναλύθηκαν χωριστά από τα αντίστοιχα δεδομένα των ανθεκτικών πληθυσμών *C. bonariensis*. Επίσης, τα δεδομένα κάθε ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* και *C. bonariensis* αναλύθηκαν χωριστά. Συγκεκριμένα, για την ανάλυση των δεδομένων των ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* χρησιμοποιήθηκαν οι παραγοντικές προσεγγίσεις 7 x 5 (7 επεμβάσεις glyphosate x 5 ανθεκτικοί πληθυσμοί *C. albida*) και 7 x 3 (7 επεμβάσεις glyphosate x 3 ανθεκτικοί πληθυσμοί *C. bonariensis*), αντίστοιχα. Για την ανάλυση των δεδομένων του κάθε ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* και *C. bonariensis* χρησιμοποιήθηκε η προσέγγιση των 7 επεμβάσεων glyphosate με 4 επαναλήψεις. Η σύγκριση των μέσων όρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς (ΕΣΔ) και σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Τα δεδομένα (νωπό βάρος των φυτών κόνυζας) των πειραμάτων προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας ( $GR_{50}$ , R/S), εκφρασμένα ως ποσοστό (%) του μέσου νωπού βάρους του αφέκαστου μάρτυρα για κάθε πληθυσμό, χρησιμοποιήθηκαν στη μη γραμμική λογαριθμική-λογιστική (log-logistic) εξίσωση συμμεταβολής (1) των Seefeldt et al. (1995) η οποία παρουσιάζεται παρακάτω:

$$y = C + \frac{D - C}{1 + \exp\{b[\log(x) - \log(GR_{50})]\}} \quad (1)$$

όπου  $C$  = το κατώτατο όριο του νωπού βάρους,  $D$  = το ανώτατο όριο του νωπού βάρους,  $b$  = η κλίση της γραμμής στη δόση  $GR_{50}$  και  $GR_{50}$  = η δόση του glyphosate, η οποία απαιτείται για τη μείωση του νωπού βάρους των φυτών κατά 50%. Στη συγκεκριμένη εξίσωση συμμεταβολής, η δόση του glyphosate (g δ.ο./στρ.) είναι η ανεξάρτητη μεταβλητή ( $x$ ) και το νωπό βάρος των φυτών εκφρασμένου ως ποσοστό (%) του μέσου νωπού βάρους του αφέκαστου μάρτυρα για κάθε πληθυσμό κόνυζας αποτελεί την εξαρτημένη μεταβλητή ( $y$ ).

Η μη γραμμική λογαριθμική-λογιστική (log-logistic) εξίσωση συμμεταβολής των Seefeldt et al. (1995) χρησιμοποιήθηκε διότι περιέγραφε καλύτερα, σε σύγκριση με άλλες εξισώσεις συμμεταβολής (υψηλότερος συντελεστής προσδιορισμού,  $R^2$ ), τη σχέση μεταξύ του νωπού βάρους των φυτών κόνυζας [εκφρασμένου ως ποσοστό (%)]



του μέσου νωπού βάρους του αγέκαστου μάρτυρα] για κάθε πληθυσμό κόνυζας και της δόσης του glyphosate. Με τη βοήθεια της μη γραμμικής λογαριθμικής-λογιστικής (log-logistic) εξίσωσης συμεταβολής των Seefeldt et al. (1995), προσδιορίστηκε η δόση του glyphosate ( $GR_{50}$  τιμή), η οποία απαιτείται για τη μείωση του νωπού βάρους των φυτών κόνυζας κάθε πληθυσμού κατά 50%. Ακολούθως, υπολογίστηκε η ένταση ανθεκτικότητας των ανθεκτικών πληθυσμών κόνυζας (*C. albida* ή *C. bonariensis*) από το λόγο ανθεκτικότητας (R/S), όπου αριθμητής είναι η  $GR_{50}$  τιμή του ανθεκτικού πληθυσμού κόνυζας (*C. albida* ή *C. bonariensis*) και παρονομαστής η  $GR_{50}$  τιμή του ευαίσθητου πληθυσμού κόνυζας (S1 για την *C. albida* ή S2 για την *C. bonariensis*).

Οι αναλύσεις παραλλακτικότητας των δεδομένων (ANOVAs) καθώς και ο υπολογισμός των  $GR_{50}$  τιμών πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού στατιστικής ανάλυσης δεδομένων SPSS (v. 15.0).

## **2.5. Αποτελέσματα και συζήτηση**

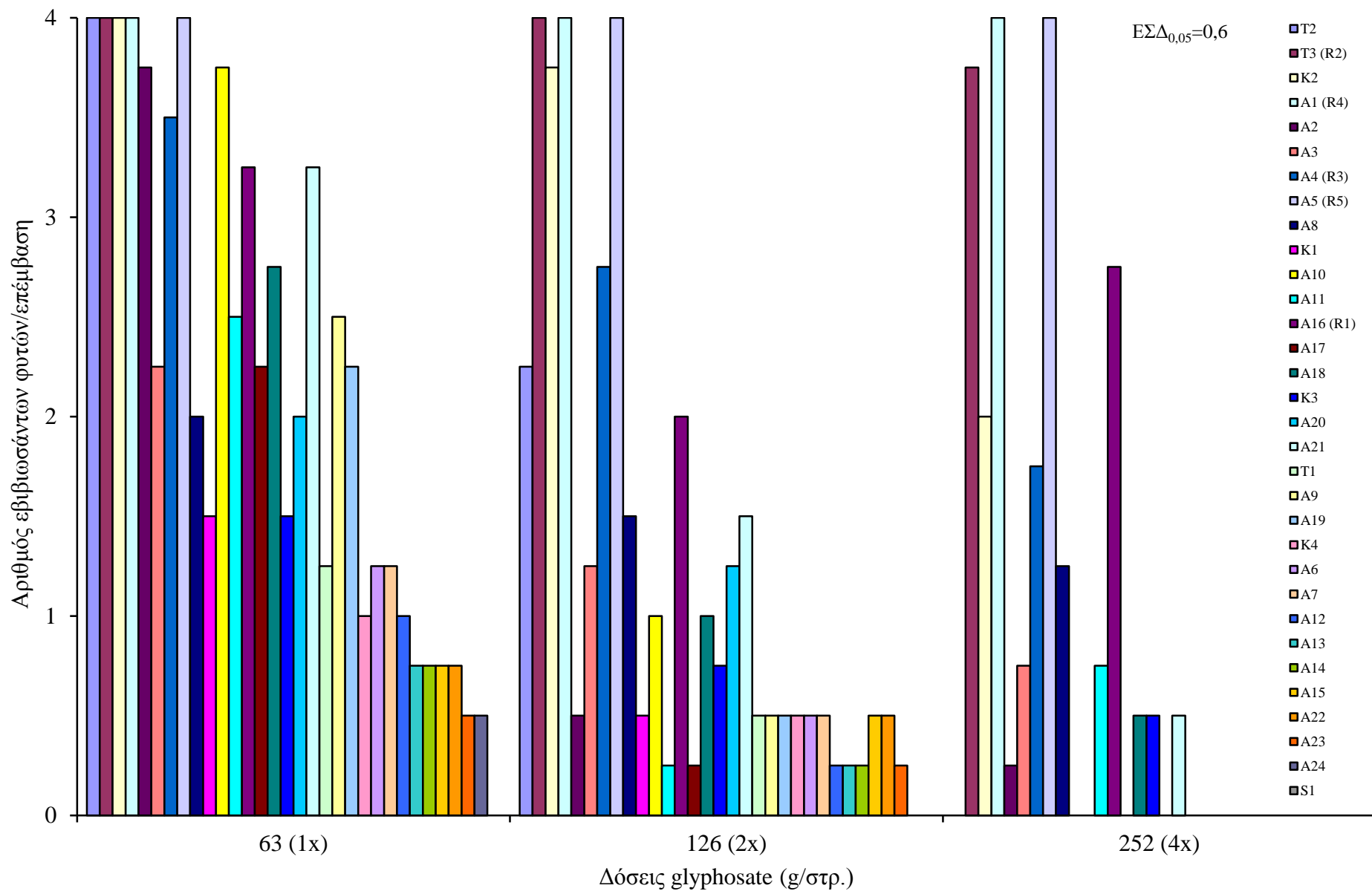
### **2.5.1. Διερεύνηση ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών**

Οι 32 και οι 28 από τους 60 αξιολογηθέντες πληθυσμούς κόνυζας άνηκαν στα είδη *C. albida* και *C. bonariensis* που κυριαρχούσαν στο Νομό Αργολίδας και στο Νομό Λάρισας, αντιστοίχως (Πίνακας 2.5). Η ανάλυση παραλλακτικότητας των δεδομένων (ANOVA) έδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των πληθυσμών κόνυζας και των επεμβάσεων του glyphosate, γεγονός που υποδηλώνει ότι ορισμένοι πληθυσμοί ήταν ανθεκτικοί στο glyphosate. Ειδικότερα, ορισμένοι πληθυσμοί επιβίωσαν τέσσερις εβδομάδες μετά από εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του glyphosate (63 g δ.ο./στρ.) σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% (μέσος όρος > 2 φυτά/φυτοδοχείο) και γι' αυτό χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικοί (R), ενώ άλλοι πληθυσμοί επιβίωσαν τέσσερις εβδομάδες μετά από εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του glyphosate (63 g δ.ο./στρ.) αλλά σε ποσοστό μικρότερο του 50% (μέσος όρος 0-2 φυτά/φυτοδοχείο) και χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητοι (S).

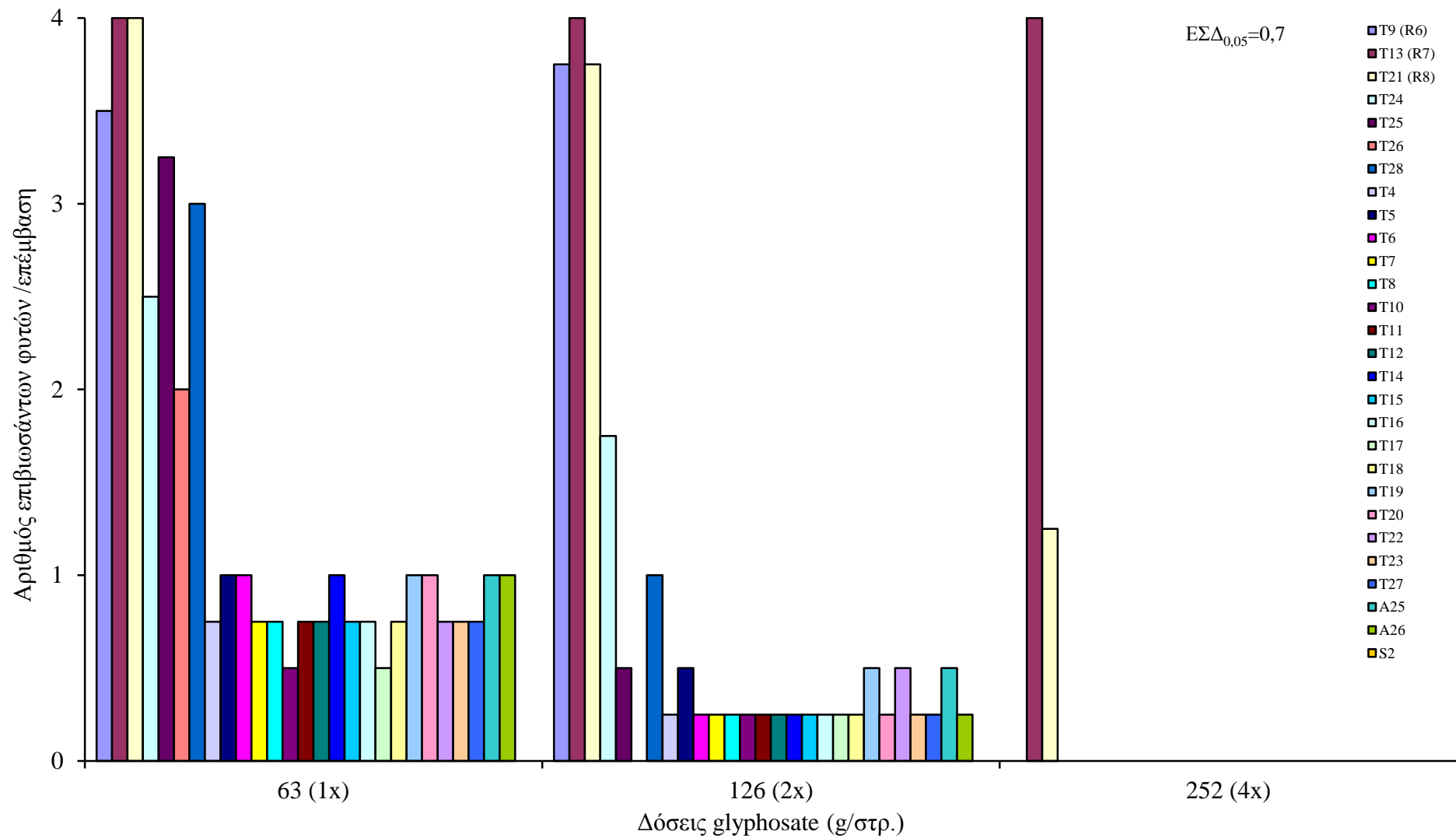
Σύμφωνα με το παραπάνω κριτήριο, οι 18 από τους 32 πληθυσμούς *C. albida* χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικοί (R) υποδηλώνοντας 56% συχνότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας, ενώ οι 7 από τους 28 πληθυσμούς *C. bonariensis* χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικοί (R) υποδηλώνοντας 25% συχνότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Οι υπόλοιποι πληθυσμοί των δύο ειδών (14 από τους 32 πληθυσμούς *C. albida* και 21

από τους 28 πληθυσμούς *C. bonariensis*) χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητοι (S) (Πίνακας 2.5, Σχήματα 2.3 και 2.4).

Η εφαρμογή της τετραπλάσιας της συνιστώμενης δόσης του glyphosate μείωσε την ανάπτυξη των φυτών κατά 100% σε 19 από τους 32 πληθυσμούς *C. albida*, ενώ η ίδια δόση μείωσε την ανάπτυξη των φυτών κατά 100% σε 26 από τους 28 πληθυσμούς *C. bonariensis* (Σχήματα 2.3 και 2.4).



**Σχήμα 2.3.** Επίδραση του glyphosate στον αριθμό των φυτών 32 πληθυσμών *C. albida*. Η αξιολόγηση έγινε στις τέσσερις εβδομάδες μετά την εφαρμογή. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.



**Σχήμα 2.4.** Επίδραση του glyphosate στον αριθμό των φυτών 28 πληθυσμών *C. bonariensis*. Η αξιολόγηση έγινε στις τέσσερις εβδομάδες μετά την εφαρμογή. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.

Οι 15 από τους 18 ανθεκτικούς πληθυσμούς *C. albida* προέρχονταν από το Νομό Αργολίδας, δύο από το Νομό Λάρισας και ένας από το Νομό Κορινθίας, ενώ οι 7 ανθεκτικοί πληθυσμοί *C. bonariensis* προέρχονταν από το Νομό Λάρισας (Πίνακας 2.5). Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα αυτού του πειράματος, μπορούμε να συμπεραίνουμε ότι η συχνότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας ήταν μεγαλύτερη στους πληθυσμούς *C. albida* από ό,τι στους πληθυσμούς *C. bonariensis*. Επιπρόσθετα, οι ανθεκτικοί πληθυσμοί των ειδών *C. albida* και *C. bonariensis* διέφεραν ως προς τον αριθμό των επιβιωσάντων φυτών (ορισμένοι πληθυσμοί ήταν πιο ανθεκτικοί από κάποιους άλλους).

Η μειωμένη δράση του glyphosate σε 25 από τους 60 πληθυσμούς κόνυζας (*Conyza* spp.) που συλλέχθηκαν αποτελεί ουσιαστική ένδειξη ύπαρξης ανθεκτικότητας. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στη συνεχή χρήση του glyphosate σε μεγαλύτερες από τη συνιστώμενη δόση (σύμφωνα με δήλωση των παραγωγών) κατά τα τελευταία χρόνια.

Ο ικανοποιητικός έλεγχος των πληθυσμών κόνυζας στα πειράματα φυτοδοχείων από αγρούς με μειωμένη δράση του glyphosate μπορεί να αποδοθεί σε μη ορθολογική εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου, ακατάλληλο στάδιο του ζιζανίου κατά την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου ή/και μη ευνοϊκές συνθήκες περιβάλλοντος κατά ή μετά την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου (Καλούμενος, 2009; LeBaron, 1987).

Η ευαισθησία των πληθυσμών κόνυζας στο glyphosate που συλλέχθηκαν από ακαλλιέργητες εκτάσεις ήταν αναμενόμενη ως συνέπεια της απουσίας έκθεσής τους στο glyphosate και συνεπώς στην έλλειψη της αναγκαίας πίεσης επιλογής ως προς το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητας (Christoffers, 1999; Καλούμενος, 2009).

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στο ποσοστό των ανθεκτικών πληθυσμών κόνυζας μεταξύ των Νομών (περιοχών) δειγματοληψίας πιθανώς να οφείλονται στην επικράτηση-υιοθέτηση διαφορετικών γεωργικών πρακτικών από τους παραγωγούς κάθε περιοχής και κυρίως στο διαφορετικό ιστορικό χημικής αντιμετώπισής τους (Καλούμενος, 2009; Llewellyn and Powles, 2001).

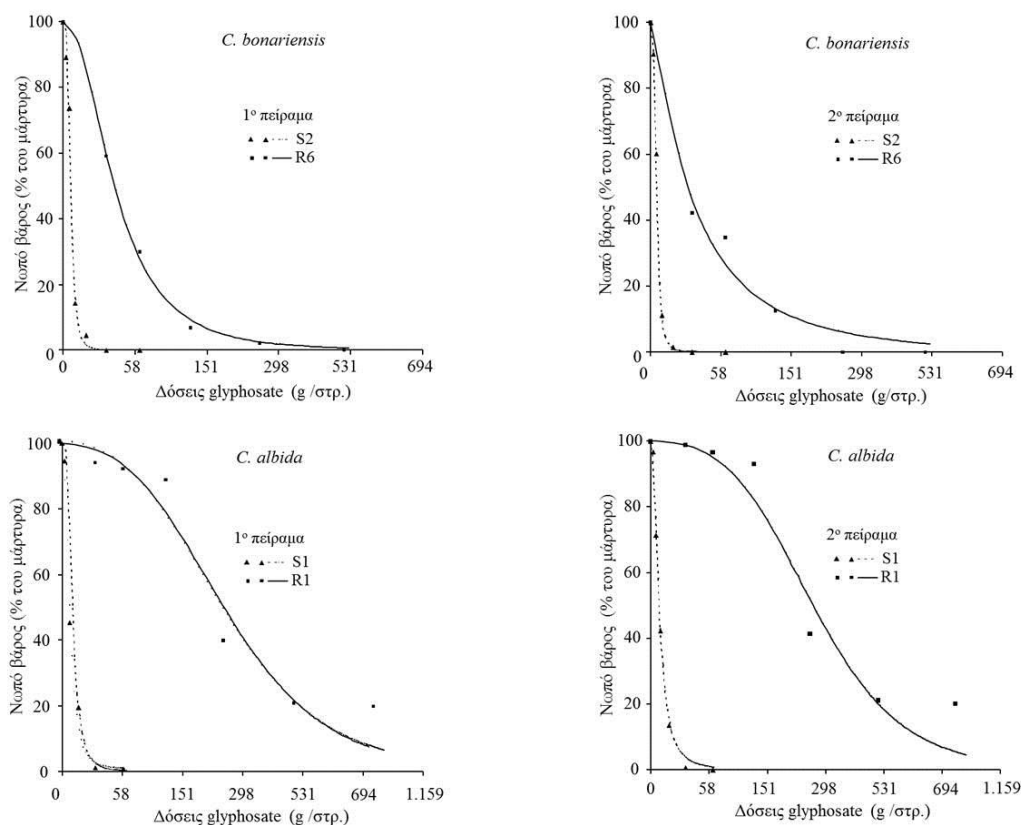
Οι αναφορές για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας της *C. albida* στο glyphosate είναι πολύ περιορισμένες (Mylonas et al., 2014; Santos et al., 2014; Travlos and Chachalis 2013b) σε αντίθεση με τις αντίστοιχες αναφορές για ανάπτυξη ανθεκτικότητας της *C. bonariensis* (Dinelli et al., 2008; Shrestha et al., 2008; Urbano et al., 2007; Walker et al., 2011). Η πρώτη αναφορά στην Ελλάδα για παρουσία ανθεκτικών πληθυσμών *Conyza* spp. έγινε από τους Γιαννοπολίτης κ.ά. (2008), ενώ

ακολούθησαν πολλές αναφορές ανθεκτικών πληθυσμών στο glyphosate των ειδών *C. bonariensis* (Μυλωνάς κ.ά., 2012; Mylonas et al., 2014; Travlos and Chachalis, 2010; Τραυλός και Χάχαλης, 2012), *C. canadensis* (Nol et al., 2012; Τραυλός και Χάχαλης, 2012; Travlos and Chachalis, 2013b) και *C. albida* (Μυλωνάς κ.ά., 2012; Mylonas et al., 2014; Τραυλός και Χάχαλης, 2012; Travlos and Chachalis, 2013b).

### 2.5.2. Προσδιορισμός της έντασης ανθεκτικότητας

Οι συνδυασμένες, ως προς το χρόνο πραγματοποίησης των δύο πειραμάτων (επανάληψη), αναλύσεις παραλλακτικότητας των δεδομένων (ANOVAs) των ανθεκτικών και των ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* δεν έδειξαν σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χρόνου πραγματοποίησης των δύο πειραμάτων, των ανθεκτικών ή των ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* και των επεμβάσεων του glyphosate, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ανθεκτικοί και οι ευαίσθητοι πληθυσμοί *C. albida* και *C. bonariensis* συμπεριφέρθηκαν με τον ίδιο τρόπο μετά από εφαρμογή των επεμβάσεων του glyphosate και στα δυο πειράματα.

Η σύγκριση του νωπού βάρους (έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate) του ανθεκτικού πληθυσμού *C. albida* (R1) σε σχέση με το νωπό βάρος του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1), καθώς και η σύγκριση του νωπού βάρους του ανθεκτικού πληθυσμού *C. bonariensis* (R6) σε σχέση με το νωπό βάρος του ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis* (S2) έδειξε σημαντικές διαφορές (Σχήμα 2.5). Αυτό επιβεβαιώθηκε και από τις GR<sub>50</sub> τιμές (δόση glyphosate που απαιτείται για τη μείωση του νωπού βάρους των φυτών κόνυζας κάθε πληθυσμού κατά 50%) που προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια της μη γραμμικής λογαριθμικής-λογιστικής (log-logistic) εξίσωσης συμμεταβολής των Seefeldt et al. (1995), καθώς και από τις υπολογισθείσες τιμές έντασης ανθεκτικότητας των ανθεκτικών πληθυσμών κόνυζας (*C. albida* ή *C. bonariensis*) [λόγος ανθεκτικότητας (R/S), όπου αριθμητής είναι η GR<sub>50</sub> τιμή του ανθεκτικού πληθυσμού κόνυζας (*C. albida* ή *C. bonariensis*) και παρονομαστής η GR<sub>50</sub> τιμή του ευαίσθητου πληθυσμού κόνυζας (S1 για την *C. albida* ή S2 για την *C. bonariensis*)].



**Σχήμα 2.5.** Επίδραση του glyphosate εναντίον ενός ανθεκτικού (R1) και ενός ευαίσθητου (S1) πληθυσμού *C. albida* καθώς και ενός ανθεκτικού (R6) και ενός ευαίσθητου (S2) πληθυσμού *C. bonariensis* στα δύο πειράματα. Η αξιολόγηση έγινε στις έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.

Ο ανθεκτικός πληθυσμός *C. albida* (R1), σύμφωνα με τις  $GR_{50}$  τιμές, είχε τη μεγαλύτερη  $GR_{50}$  τιμή (245-261 g δ.ο./στρ.), ενώ ο ανθεκτικός πληθυσμός *C. albida* (R2) τη μικρότερη  $GR_{50}$  τιμή (54-63 g δ.ο./στρ.). Οι υπόλοιποι ανθεκτικοί πληθυσμοί *C. albida* (R3, R4 και R5) εμφάνισαν  $GR_{50}$  τιμές 111-126 g δ.ο./στρ., 82-83 g δ.ο./στρ. και 66-76 g δ.ο./στρ., αντίστοιχα. Ο ευαίσθητος πληθυσμός *C. albida* (S1) εμφάνισε  $GR_{50}$  τιμή 7-8 g δ.ο./στρ. (Πίνακας 2.6). Η κατάταξη των ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* σύμφωνα με την υπολογισθείσα ένταση ανθεκτικότητας (R/S) ήταν  $R1 > R3 > R4 > R5 > R2$ .

Οι ανθεκτικοί πληθυσμοί *C. bonariensis* (R6, R7 και R8) εμφάνισαν  $GR_{50}$  τιμές 28-39 g δ.ο./στρ., 22-31 g δ.ο./στρ. και 17-20 g δ.ο./στρ., αντίστοιχα. Ο ευαίσθητος πληθυσμός *C. albida* (S2) εμφάνισε  $GR_{50}$  τιμή 4-5 g δ.ο./στρ. (Πίνακας 2.6). Η κατάταξη των ανθεκτικών πληθυσμών *C. bonariensis* σύμφωνα με την υπολογισθείσα ένταση ανθεκτικότητας (R/S) ήταν  $R6 > R7 > R8$ .

**Πίνακας 2.6.** GR<sub>50</sub> τιμές και ένταση ανθεκτικότητας (R/S) για τους οκτώ ανθεκτικούς (R1-R8) και τους δύο ευαίσθητους (S1, S2) πληθυσμούς *C. albida* και *C. bonariensis* που αξιολογηθήκαν στα δύο πειράματα.

Πληθυσμοί	GR <sub>50</sub> (95% CL) (g δ.ο./στρ.)	R/S (±SE)	R <sup>2</sup>	s <sub>e</sub>
<b>1<sup>ο</sup> πείραμα προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας</b>				
<i>C. albida</i>				
R1	245 (155-374)	30,6 (±6,6)	0,769	18,4
R2	63 (47-74)	7,9 (±1,1)	0,888	9,8
R3	111 (93-138)	13,9 (±2,0)	0,905	11,5
R4	83 (68-111)	10,4 (±1,8)	0,862	10,9
R5	66 (46-76)	8,3 (±1,2)	0,866	10,9
S1	8 (6-9)	1,0	0,934	2,9
<i>C. bonariensis</i>				
R6	39 (24-50)	7,8 (±1,5)	0,794	11,3
R7	31 (26-35)	6,2 (±0,8)	0,934	11,5
R8	17 (12-24)	3,4 (±0,7)	0,896	4,9
S2	5 (4-6)	1,0	0,878	14,3
<b>2<sup>ο</sup> πείραμα προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας</b>				
<i>C. albida</i>				
R1	261 (174-405)	37,3 (±8,6)	0,766	19,6
R2	54 (46-59)	7,7 (±1,0)	0,927	7,1
R3	126 (108-159)	18,0 (±2,7)	0,831	12,3
R4	82 (64-93)	11,7 (±1,7)	0,887	11,5
R5	76 (56-109)	10,9 (±2,1)	0,733	13,3
S1	7 (5-8)	1,0	0,897	0,2
<i>C. bonariensis</i>				
R6	28 (13-44)	7,0 (±1,9)	0,773	12,9
R7	22 (16-27)	5,5 (±0,7)	0,924	9,5
R8	20 (2-21)	5,0 (±1,2)	0,985	3,6
S2	4 (3-5)	1,0	0,907	11,8

GR<sub>50</sub>: δόση του glyphosate που απαιτείται για τη μείωση του νεπού βάρους των φυτών *C. albida* ή *C. bonariensis* κατά 50%.

R/S: ένταση ανθεκτικότητας;  $R/S = GR_{50}$  (ανθεκτικός πληθυσμός)/GR<sub>50</sub> (ευαίσθητος πληθυσμός).

CL: όρια εμπιστοσύνης; SE: τυπικό σφάλμα.

R<sup>2</sup>: συντελεστής προσδιορισμού.

s<sub>e</sub>: τυπικό σφάλμα.



Η ένταση ανθεκτικότητας (R/S) των ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* κυμάνθηκε από 7,7 έως 37,3, η οποία συμφωνεί με την ένταση ανθεκτικότητας που έχει αναφερθεί από τους Travlos and Chachalis (2013b) σε άλλους ελληνικούς πληθυσμούς. Παρόμοια αποτελέσματα για την ένταση ανθεκτικότητας πληθυσμών *C. canadensis* αναφέρονται και από άλλους ερευνητές (Davis et al., 2008; González-Torralva et al., 2012b; Koger et al., 2004; Shrestha et al., 2007; Song et al., 2011; Trainer et al., 2005; VanGessel, 2001).

Η 3,4-7,8 ένταση ανθεκτικότητας (R/S) των ανθεκτικών πληθυσμών *C. bonariensis* βρίσκεται σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα των Shrestha et al. (2008), οι οποίοι ανέφεραν ότι η ένταση ανθεκτικότητας πληθυσμών *C. bonariensis* στις ΗΠΑ κυμάνθηκε από 3 έως 10. Επίσης, 2,9-10, 3-6 και 4-7 ένταση ανθεκτικότητας έχει αναφερθεί στην Ισπανία (Dinelli et al., 2008; Urbano et al., 2007), στην Αυστραλία (Walker et al., 2011) και στην Ελλάδα (Travlos and Chachalis, 2010).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας ( $GR_{50}$ , R/S) επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα του πειράματος διερεύνησης ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών στο glyphosate. Γενικώς, οι πληθυσμοί της *C. albida* ήταν ανθεκτικότεροι στο glyphosate από ό,τι οι πληθυσμοί της *C. bonariensis*, αλλά και η συχνότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας ήταν μεγαλύτερη στους πληθυσμούς *C. albida* από ό,τι στους πληθυσμούς *C. bonariensis*.

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην ένταση ανθεκτικότητας (R/S) των ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis*, πιθανόν να οφείλονται στο ότι ο ευαίσθητος πληθυσμός *C. bonariensis* (S2) ήταν πιο ευαίσθητος από τον ευαίσθητο πληθυσμό *C. albida* (S1). Επιπρόσθετα, οι διαφορετικές γεωργικές πρακτικές εξαιτίας των διαφορετικών καλλιεργειών που υπάρχουν στις δύο περιοχές (Κεντρική και Νότια Ελλάδα) μπορεί να συνεισέφεραν σε αυτές τις διαφορές. Ειδικότερα για το τελευταίο, αξίζει να αναφερθεί ότι στην Κεντρική Ελλάδα (Νομός Λάρισας) υπήρχαν αρδευόμενοι οπωρώνες αχλαδιάς και αμπελώνες, ενώ ελαιώνες και αρδευόμενοι οπωρώνες εσπεριδοειδών υπήρχαν στη Νότια Ελλάδα (Νομοί Αργολίδας και Κορινθίας).

Οι σημαντικές διαφορές μεταξύ των εντάσεων ανθεκτικότητας (R/S) των πέντε ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* αλλά και μεταξύ των εντάσεων ανθεκτικότητας (R/S) των τριών ανθεκτικών πληθυσμών *C. bonariensis* μπορεί να οφείλονται σε διαφορετική πίεση επιλογής των επεμβάσεων του glyphosate εξαιτίας

της εφαρμογής διαφορετικών γεωργικών πρακτικών. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται από τους Okada et al. (2015), οι οποίοι βρήκαν διαφορετική συχνότητα και ένταση ανθεκτικότητας μεταξύ πληθυσμών *C. bonariensis* και *C. canadensis*, οι οποίες αποδόθηκαν σε αλληλεπίδραση μεταξύ γενοτύπων και περιβάλλοντος, αλλά και στις διαφορετικές γεωργικές πρακτικές που εφαρμόστηκαν στα διαφορετικά περιβάλλοντα.

### Επίδραση της εποχής εφαρμογής στη δράση του glyphosate εναντίον πληθυσμών *Conyza albida* και *C. bonariensis*

#### 3.1. Εισαγωγή

Οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών στη δράση του glyphosate εναντίον της κόνυζας (*Conyza* spp.) είναι περιορισμένες (Walker et al., 2011). Οι Ge et al. (2011) ανέφεραν ότι η δράση του glyphosate εναντίον ενός ανθεκτικού πληθυσμού *C. canadensis* ήταν μεγαλύτερη όταν το glyphosate εφαρμόστηκε σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών από ό,τι σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Moretti et al. (2013) οι οποίοι βρήκαν ότι η ένταση ανθεκτικότητας ενός πληθυσμού *C. bonariensis* στο glyphosate ήταν μεγαλύτερη μετά από εφαρμογή το καλοκαίρι από ό,τι το φθινόπωρο ή το χειμώνα.

Οι Vila-Aiub et al. (2013) ανέφεραν ότι η δράση του glyphosate εναντίον ανθεκτικών πληθυσμών *Sorghum halepense* και *Lolium rigidum* αυξήθηκε όταν αυτό εφαρμόστηκε σε φυτά τα οποία αναπτύσσονταν σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών από ό,τι σε περιόδους υψηλών θερμοκρασιών. Επίσης, οι Adkins et al. (1998) βρήκαν ότι η αντιμετώπιση των ζιζανίων *Avena fatua* L. και *Urochloa panicoides* Beauv. με glyphosate μειωνόταν με τα από εφαρμογή του σε φυτά που αναπτύσσονταν σε συνθήκες μειωμένης εδαφικής υγρασίας. Τέλος, οι Walker et al. (2011) αναφέρουν ότι η αντιμετώπιση των ζιζανίων μειώνεται μετά από εφαρμογή ζιζανιοκτόνων σε φυτά που αναπτύσσονται σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών και χαμηλής υγρασίας.

#### 3.2. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να αξιολογηθεί η επίδραση της εποχής εφαρμογής στη δράση του glyphosate εναντίον πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis*.

#### 3.3. Υλικά και μέθοδοι

Ένας πληθυσμός *C. albida* (R1) και ένας πληθυσμός *C. bonariensis* (R6), οι οποίοι αξιολογήθηκαν στα πειράματα προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας και χαρακτηρίστηκαν ως οι ανθεκτικότεροι (R) πληθυσμοί για κάθε είδος (εμφάνισαν

τη μεγαλύτερη GR<sub>50</sub> τιμή ανά είδος και στα δύο πειράματα), καθώς και ένας ευαίσθητος (S) πληθυσμός *C. albida* (S1) και ένας ευαίσθητος (S) πληθυσμός *C. bonariensis* (S2) (τα φυτά των πληθυσμών αυτών αντιμετωπίστηκαν αποτελεσματικά μετά από έκθεσή τους στη συνιστώμενη δόση του ζιζανιοκτόνου glyphosate), χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια φθινόπωρο 2011-χειμώνας 2012, άνοιξη 2012-καλοκαίρι 2012, άνοιξη 2013-καλοκαίρι 2013.

Τα πειράματα αποσκοπούσαν στον προσδιορισμό της δόσης του glyphosate που απαιτείται για τη μείωση της ανάπτυξης των φυτών κόνυζας κατά 50% (GR<sub>50</sub> τιμή, growth reduction 50%). Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε ανθεκτικό πληθυσμό προήλθαν από φυτά κόνυζας που επιβίωσαν και αναπτύχθηκαν κατά το πείραμα διερεύνησης ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών, ενώ οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε ευαίσθητο πληθυσμό προήλθαν από τους αντίστοιχους αφέκαστους μάρτυρες κόνυζας που αναπτύχθηκαν κατά το ίδιο πείραμα.

Οι σπόροι από κάθε πληθυσμό (δύο ανθεκτικοί και δύο ευαίσθητοι) σπάρθηκαν σε πλαστικούς δίσκους των 24 θέσεων και διαστάσεων 6x5,5x5 cm για κάθε θέση. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα ανοικτού-κίτρινου και μαύρου χρώματος τύρφη σε αναλογία 1:2 (ο/ο). Σε κάθε θέση τοποθετήθηκαν περίπου 20 σπόροι κόνυζας επί της επιφάνειας του εδαφικού μίγματος και ακολούθως καλύφθηκαν με ένα πολύ λεπτό στρώμα του ίδιου εδαφικού μίγματος. Οι πλαστικοί δίσκοι, μετά τη σπορά, τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου (στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο) όπου, μετά την εμφάνιση των σποροφύτων κόνυζας, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις στο στάδιο των 2-4 φύλλων, ώστε τελικά, να παραμείνουν ομοιόμορφης ανάπτυξης φυτά κόνυζας σε κάθε πληθυσμό. Στη συνέχεια, έγινε μεταφύτευση δύο ομοιόμορφων ανεπτυγμένων φυτών κόνυζας σε κάθε φυτοδοχείο χωρητικότητας 1,5 L (τα οποία περιείχαν το προαναφερθέν μίγμα τύρφης) και όλα τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου. Η άρδευση των φυτών κόνυζας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων γινόταν σύμφωνα με τις ανάγκες τους σε νερό, ενώ δεν πραγματοποιήθηκε λίπανση κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Κάθε εβδομάδα γινόταν τυχαιοποίηση εκ νέου των φυτοδοχείων.

Οι επεμβάσεις του glyphosate έγιναν μεταφυτρωτικά όταν τα φυτά της κόνυζας ήταν στο στάδιο των 6-8 φύλλων. Η εφαρμογή των επεμβάσεων έγινε με ψεκαστήρα ακριβείας ειδικής κατασκευής, ο οποίος φέρει ακροφύσιο τύπου ριπιδίου

8003, ρυθμισμένο ώστε να εφαρμόζει όγκο ψεκαστικού υγρού 30 L/στρ. με πίεση 280 kPa.

Το πειραματικό σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι πλήρεις ομάδες σε ελεύθερη διάταξη (RCBD, **R**andomized **C**omplete **B**lock **D**esign) και ο κάθε συνδυασμένος παράγοντας (πληθυσμός x δόση glyphosate) είχε τέσσερις επαναλήψεις-φυτοδοχεία (με δυο φυτά ανά φυτοδοχείο). Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές (επανάληψη στο χρόνο).

Οι επεμβάσεις των πειραμάτων για τους ανθεκτικούς πληθυσμούς περιελάμβαναν εφαρμογή της 1/2 της συνιστώμενης δόσης δόσης του glyphosate (31,5 g δ.ο./στρ.), τη συνιστώμενη (63 g δ.ο./στρ.), τη διπλάσια (126 g δ.ο./στρ.), την τετραπλάσια (252 g δ.ο./στρ.), την οκταπλάσια (504 g δ.ο./στρ.) και τη δεκαεξαπλάσια (1008 g δ.ο./στρ.) της συνιστώμενης δόσης του glyphosate, αντίστοιχα. Επιπλέον, για κάθε πληθυσμό υπήρχε και η επέμβαση του απέκαστου μάρτυρα (μη εφαρμογή ζιζανιοκτόνου) με τέσσερα φυτοδοχεία-επαναλήψεις.

Οι επεμβάσεις των πειραμάτων για τους ευαίσθητους πληθυσμούς περιελάμβαναν εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του glyphosate (63 g δ.ο./στρ.), 1/2 (31,5 g δ.ο./στρ.) της συνιστώμενης, 1/4 (15,75 g δ.ο./στρ.), 1/8 (7,875 g δ.ο./στρ.), 1/16 (3,9375 g δ.ο./στρ.) και 1/32 (1,96875 g δ.ο./στρ.) της συνιστώμενης δόσης του glyphosate, αντίστοιχα. Επιπλέον, για κάθε πληθυσμό υπήρχε και η επέμβαση του απέκαστου μάρτυρα (μη εφαρμογή ζιζανιοκτόνου) με τέσσερα φυτοδοχεία-επαναλήψεις.

Η επίδραση των επεμβάσεων στην ανάπτυξη των φυτών κόνυζας αξιολογήθηκε έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate (6 WAT) με προσδιορισμό του νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών κόνυζας που επιβίωσαν σε κάθε φυτοδοχείο. Οι ανθεκτικοί και οι ευαίσθητοι πληθυσμοί των δύο ειδών αξιολογήθηκαν χωριστά εξαιτίας των διαφορετικών δόσεων του glyphosate που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως ποσοστό (%) του μέσου νωπού βάρους του απέκαστου μάρτυρα για κάθε πληθυσμό.

### **3.4. Στατιστική ανάλυση**

Η ανάλυση των δεδομένων της επίδρασης της εποχής εφαρμογής στη δράση του glyphosate εναντίον πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* ήταν συνδυασμένη ως προς το χρόνο πραγματοποίησης των δύο πειραμάτων, αλλά τα δεδομένα των ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* αναλύθηκαν χωριστά από τα

αντίστοιχα δεδομένα των ευαίσθητων πληθυσμών. Συγκεκριμένα, για την ανάλυση των δεδομένων των ανθεκτικών πληθυσμών χρησιμοποιήθηκε η παραγοντική προσέγγιση 7 x 2 x 2 [7 επεμβάσεις του glyphosate x 2 ανθεκτικοί πληθυσμοί (1 *C. abida* και 1 *C. bonariensis*) x 2 εποχές (χειμώνας/καλοκαίρι)], ενώ για την ανάλυση των δεδομένων των ευαίσθητων πληθυσμών χρησιμοποιήθηκε επίσης η ίδια παραγοντική προσέγγιση 7 x 2 x 2 [7 επεμβάσεις του glyphosate x 2 ευαίσθητοι πληθυσμοί (1 *C. abida* και 1 *C. bonariensis*) x 2 εποχές (χειμώνας/καλοκαίρι)]. Η σύγκριση των μέσων όρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς (ΕΣΔ) και σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Τα δεδομένα (νωπό βάρος των φυτών κόνυζας) των δύο πειραμάτων, εκφρασμένα ως ποσοστό (%) του μέσου νωπού βάρους του απέκαστου μάρτυρα για κάθε πληθυσμό, χρησιμοποιήθηκαν στη μη γραμμική λογαριθμική-λογιστική (log-logistic) εξίσωση συμμεταβολής (2) των Seefeldt et al. (1995), η οποία παρουσιάζεται παρακάτω:

$$y = C + \frac{D - C}{1 + \exp\{b[\log(x) - \log(GR_{50})]\}} \quad (2)$$

όπου  $C$  = το κατώτατο όριο νωπού βάρους,  $D$  = το ανώτατο όριο νωπού βάρους,  $b$  = η κλίση της γραμμής στη δόση  $GR_{50}$  και  $GR_{50}$  = η δόση του glyphosate, η οποία απαιτείται για μείωση του νωπού βάρους των φυτών κατά 50%. Στη συγκεκριμένη εξίσωση συμμεταβολής, η δόση του glyphosate (g δ.ο./στρ.) είναι η ανεξάρτητη μεταβλητή ( $x$ ) και το νωπό βάρος των φυτών εκφρασμένου ως ποσοστό (%) του μέσου νωπού βάρους του απέκαστου μάρτυρα για κάθε πληθυσμό κόνυζας αποτελεί την εξαρτημένη μεταβλητή ( $y$ ).

Η μη γραμμική λογαριθμική-λογιστική (log-logistic) εξίσωση συμμεταβολής των Seefeldt et al. (1995) χρησιμοποιήθηκε διότι περιέγραφε καλύτερα, σε σύγκριση με άλλες εξισώσεις συμμεταβολής (υψηλότερος συντελεστής προσδιορισμού,  $R^2$ ), τη σχέση μεταξύ του νωπού βάρους των φυτών κόνυζας [εκφρασμένου ως ποσοστό (%) του μέσου νωπού βάρους του απέκαστου μάρτυρα] για κάθε πληθυσμό κόνυζας και της δόσης του glyphosate. Με τη βοήθεια της μη γραμμικής λογαριθμικής-λογιστικής (log-logistic) εξίσωσης συμμεταβολής των Seefeldt et al. (1995), προσδιορίστηκε η δόση του glyphosate ( $GR_{50}$  τιμή), η οποία απαιτείται για τη μείωση του νωπού βάρους των φυτών κόνυζας κάθε πληθυσμού κατά 50%.

Οι αναλύσεις παραλλακτικότητας των δεδομένων (ANOVAs) καθώς και ο υπολογισμός των GR<sub>50</sub> τιμών πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού στατιστικής ανάλυσης δεδομένων SPSS (v. 15.0).

### **3.5. Αποτελέσματα και συζήτηση**

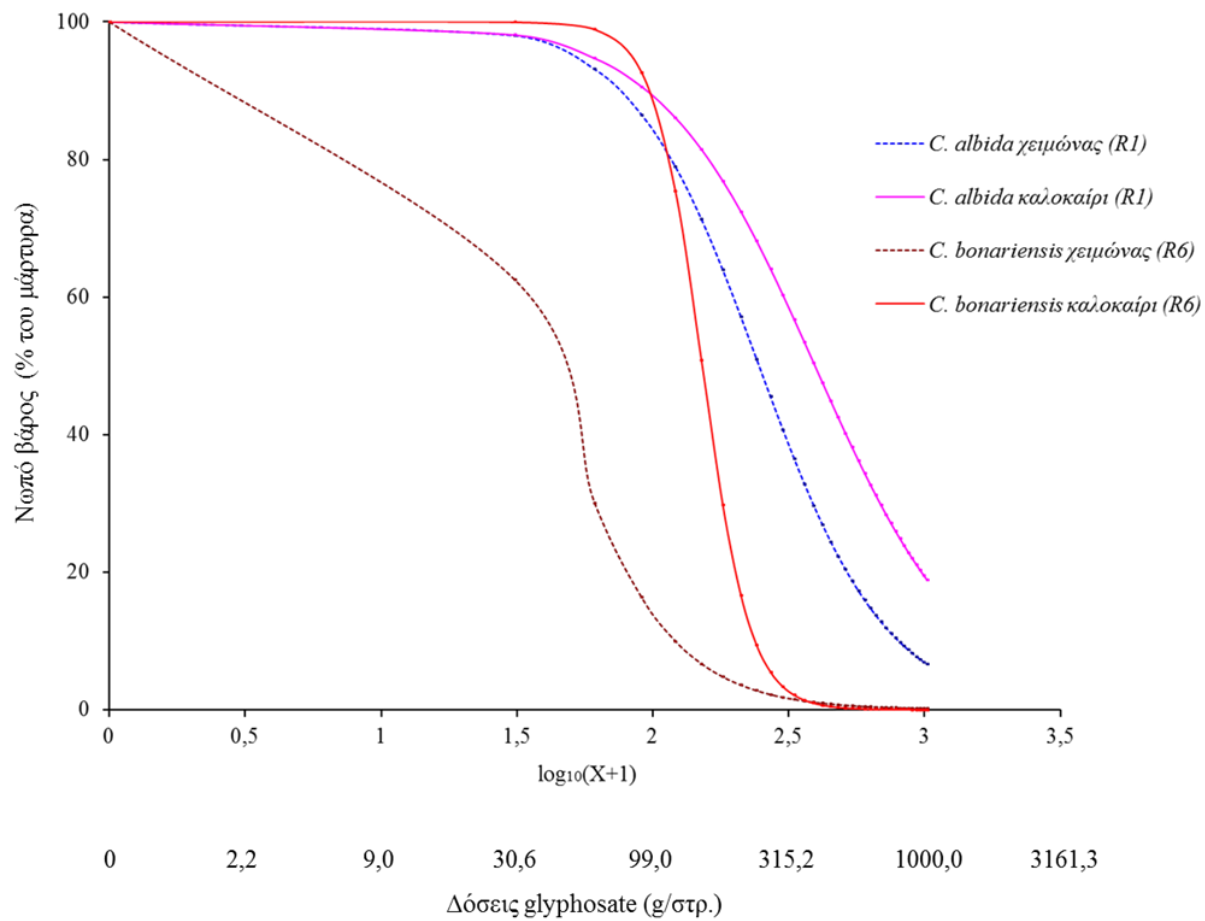
Η συνδυασμένη, ως προς το χρόνο πραγματοποίησης των δύο πειραμάτων (επανάληψη), ανάλυση παραλλακτικότητας των δεδομένων (ANOVA) των ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* δεν έδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χρόνου πραγματοποίησης των δυο πειραμάτων, των ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* και των επεμβάσεων του glyphosate, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ανθεκτικοί πληθυσμοί *C. albida* και *C. bonariensis* συμπεριφέρθηκαν με τον ίδιο τρόπο μετά από εφαρμογή των επεμβάσεων του glyphosate και στα δύο πειράματα. Αντίθετα, η συνδυασμένη, ως προς την εποχή πραγματοποίησης των δύο πειραμάτων (επανάληψη), ανάλυση παραλλακτικότητας των δεδομένων (ANOVA) των ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* έδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της εποχής (χειμώνα/καλοκαίρι) εφαρμογής του glyphosate, των ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* και των επεμβάσεων του glyphosate, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εποχή εφαρμογής του glyphosate διαφοροποίησε τη δράση του εναντίον των ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis*.

Η συνδυασμένη, ως προς το χρόνο πραγματοποίησης των δύο πειραμάτων (επανάληψη), ανάλυση παραλλακτικότητας των δεδομένων (ANOVA) των ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* δεν έδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χρόνου πραγματοποίησης των δυο πειραμάτων, των ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* και των επεμβάσεων του glyphosate, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ευαίσθητοι πληθυσμοί *C. albida* και *C. bonariensis* συμπεριφέρθηκαν με τον ίδιο τρόπο μετά από εφαρμογή των επεμβάσεων του glyphosate και στα δύο πειράματα. Αντίθετα, η συνδυασμένη, ως προς την εποχή πραγματοποίησης των δύο πειραμάτων (επανάληψη), ανάλυση παραλλακτικότητας των δεδομένων (ANOVA) των ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* έδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της εποχής (χειμώνα/καλοκαίρι) εφαρμογής του glyphosate, των ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* και των επεμβάσεων του glyphosate, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εποχή εφαρμογής

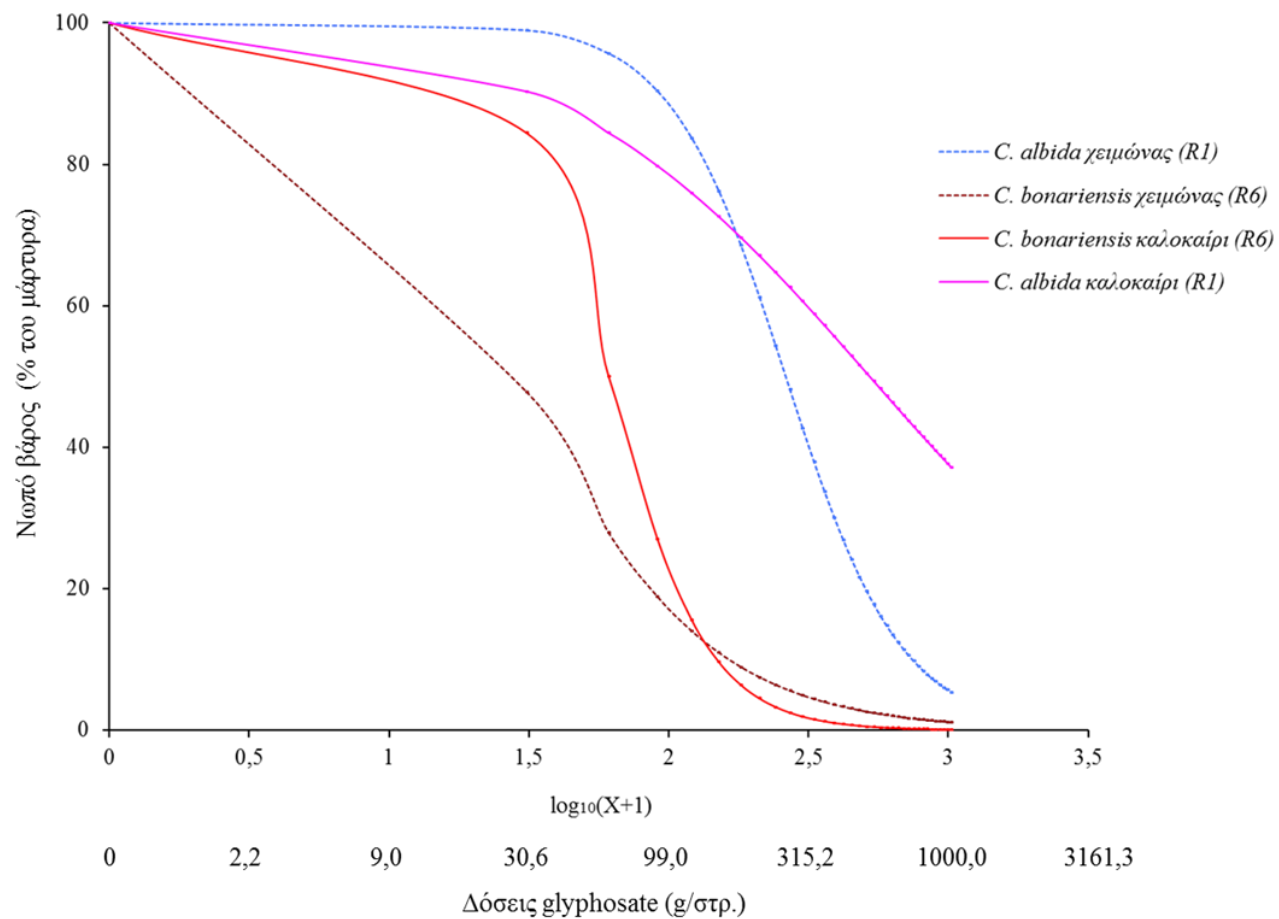
του glyphosate διαφοροποίησε τη δράση του εναντίον των ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis*.

Η σύγκριση των νωπών βαρών (έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate) των ανθεκτικότερων πληθυσμών *C. albida* (R1) και *C. bonariensis* (R6) έδειξε σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των δύο ειδών όσο και μεταξύ της εποχής εφαρμογής του glyphosate (χειμώνας/καλοκαίρι) (Σχήματα 3.1 και 3.2). Επίσης, η αντίστοιχη σύγκριση των νωπών βαρών των ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* (S1) και *C. bonariensis* (S2) έδειξε παρόμοιες διαφορές σε ευαισθησία τόσο μεταξύ των δύο ειδών όσο και μεταξύ της εποχής εφαρμογής του glyphosate (χειμώνας/καλοκαίρι) (Σχήματα 3.3 και 3.4).

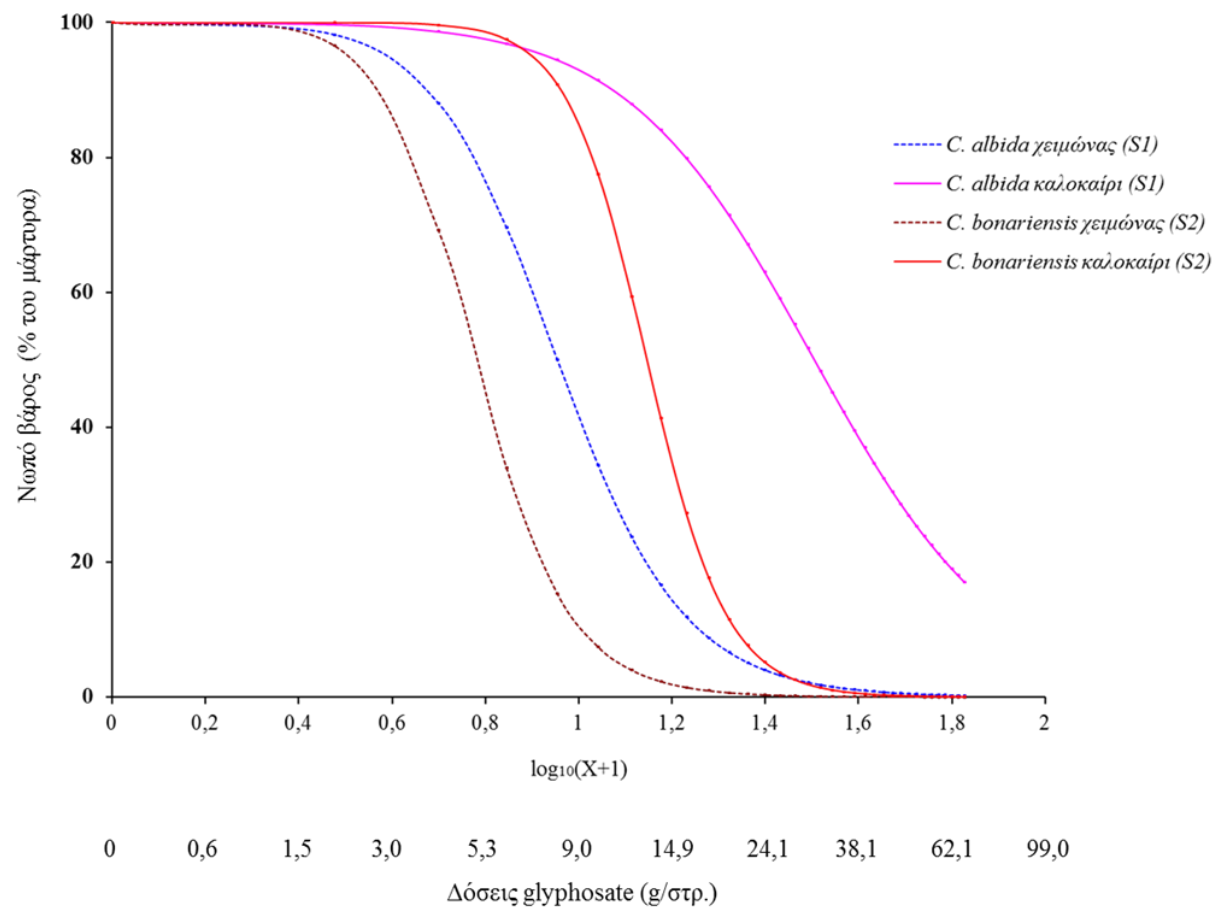




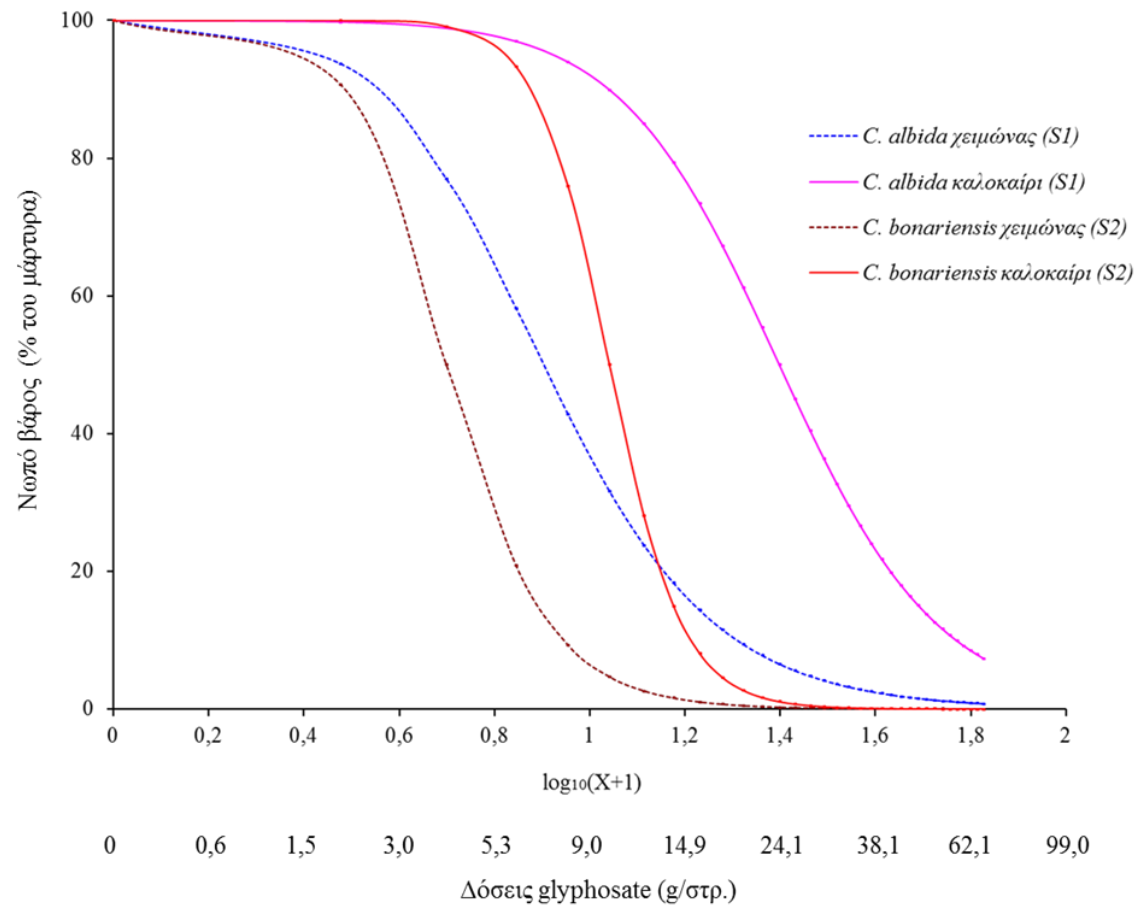
**Σχήμα 3.1.** Επίδραση της εποχής εφαρμογής στη δράση του glyphosate εναντίον των ανθεκτικότερων πληθυσμών *C. albida* (R1) και *C. bonariensis* (R6) στο πρώτο πείραμα. Η αξιολόγηση έγινε στις έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.



**Σχήμα 3.2.** Επίδραση της εποχής εφαρμογής στη δράση του glyphosate εναντίον των ανθεκτικότερων πληθυσμών *C. albida* (R1) και *C. bonariensis* (R6) στο δεύτερο πείραμα. Η αξιολόγηση έγινε στις έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή του. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.



**Σχήμα 3.3.** Επίδραση της εποχής εφαρμογής στη δράση του glyphosate εναντίον των ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* (S1) και *C. bonariensis* (S2) στο πρώτο πείραμα. Η αξιολόγηση έγινε στις έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.



**Σχήμα 3.4.** Επίδραση της εποχής εφαρμογής στη δράση του glyphosate εναντίον των ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* (S1) και *C. bonariensis* (S2) στο δεύτερο πείραμα. Η αξιολόγηση έγινε στις έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.

Οι προσδιορισθείσες GR<sub>50</sub> τιμές του glyphosate από την ανωτέρω μη γραμμική λογαριθμική-λογιστική (log-logistic) εξίσωση συμμεταβολής των Seefeldt et al. (1995) έδειξαν μεγάλες διαφορές μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis*, γεγονός που επιβεβαιώνει την ανθεκτικότητα ορισμένων πληθυσμών. Επίσης, οι προσδιορισθείσες GR<sub>50</sub> τιμές έδειξαν μεγάλες διαφορές μεταξύ των δύο εποχών εφαρμογής του glyphosate (χειμώνα/καλοκαίρι), γεγονός που σημαίνει διαφορά στην ευαισθησία των πληθυσμών λόγω συνθηκών ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, ο ανθεκτικότερος πληθυσμός *C. albida* (R1) είχε GR<sub>50</sub> τιμή 245-261 g δ.ο./στρ. και 394-522 g δ.ο./στρ. για χειμώνα και καλοκαίρι, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τον ανθεκτικότερο πληθυσμό *C. bonariensis* (R6) ήταν 28-39 g δ.ο./στρ. και 60-151 g δ.ο./στρ. (Πίνακες 3.1 και 3.2). Επίσης, ο ευαίσθητος πληθυσμός *C. albida* (S1) είχε GR<sub>50</sub> τιμή 7-8 g δ.ο./στρ. και 24-31 g δ.ο./στρ. για χειμώνα και καλοκαίρι, ενώ ο ευαίσθητος πληθυσμός *C. bonariensis* (S2) είχε το χειμώνα GR<sub>50</sub> τιμή 4-5 g δ.ο./στρ. και το καλοκαίρι 10-13 g δ.ο./στρ. (Πίνακες 3.1 και 3.2).

**Πίνακας 3.1.** GR<sub>50</sub> τιμές για τους δύο ανθεκτικούς (R1, R6) και τους δύο ευαίσθητους (S1, S2) πληθυσμούς *C. albida* και *C. bonariensis* που αξιολογήθηκαν στα δύο πειράματα το χειμώνα.

Πληθυσμοί	GR <sub>50</sub> (95% CL) (g δ.ο./στρ.)	R <sup>2</sup>	s <sub>e</sub>
<b>Χειμώνας 1<sup>ο</sup> πείραμα (θερμοκρασίες ψεκασμών 5-12 °C)</b>			
<i>C. albida</i>			
R1	245 (155-374)	0,769	18,4
S1	8 (6-9)	0,934	2,9
<i>C. bonariensis</i>			
R6	39 (24-50)	0,794	11,3
S2	5 (4-6)	0,878	14,3
<b>Χειμώνας 2<sup>ο</sup> πείραμα (θερμοκρασίες ψεκασμών 5-12 °C)</b>			
<i>C. albida</i>			
R1	261 (174-405)	0,766	19,6
S1	7 (5-8)	0,897	0,2
<i>C. bonariensis</i>			
R6	28 (13-44)	0,773	12,9
S2	4 (3-5)	0,907	11,8

GR<sub>50</sub>: δόση του glyphosate που απαιτείται για τη μείωση του νωπού βάρους των φυτών *C. albida* ή *C. bonariensis* κατά 50%.

CL: όρια εμπιστοσύνης.

R<sup>2</sup>: συντελεστής προσδιορισμού.

s<sub>e</sub>: τυπικό σφάλμα.

**Πίνακας 3.2.** GR<sub>50</sub> τιμές για τους δυο ανθεκτικούς (R1, R6) και τους δυο ευαίσθητους (S1, S2) πληθυσμούς *C. albida* και *C. bonariensis* που αξιολογήθηκαν στα δυο πειράματα το καλοκαίρι.

Πληθυσμοί	GR <sub>50</sub> (95% CL) (g δ.ο./στρ.)	R <sup>2</sup>	s <sub>e</sub>
<b>Καλοκαίρι 1<sup>ο</sup> πείραμα (θερμοκρασίες ψεκασμών 27-31 °C)</b>			
<i>C. albida</i>			
R1	394 (310-457)	0,863	12,6
S1	31 (23-39)	0,840	14,6
<i>C. bonariensis</i>			
R6	151 (115-193)	0,908	14,1
S2	13 (10-16)	0,940	11,3
<b>Καλοκαίρι 2<sup>ο</sup> πείραμα (θερμοκρασίες ψεκασμών 27-31 °C)</b>			
<i>C. albida</i>			
R1	522 (267-841)	0,624	15,5
S1	24 (19-29)	0,932	10,0
<i>C. bonariensis</i>			
R6	60 (47-75)	0,811	15,2
S2	10 (7-12)	0,947	11,1

GR<sub>50</sub>: δόση του glyphosate που απαιτείται για τη μείωση του νωπού βάρους των φυτών *C. albida* ή *C. bonariensis* κατά 50%.

CL: όρια εμπιστοσύνης.

R<sup>2</sup>: συντελεστής προσδιορισμού.

s<sub>e</sub>: τυπικό σφάλμα.

Το γεγονός ότι οι ανθεκτικοί και οι ευαίσθητοι πληθυσμοί *C. albida* και *C. bonariensis* εμφάνισαν μεγαλύτερη ευαισθησία (μικρότερες GR<sub>50</sub> τιμές) μετά από εφαρμογή του glyphosate το χειμώνα (θερμοκρασίες ψεκασμών 5-12 °C) από ό,τι το καλοκαίρι (θερμοκρασίες ψεκασμών 27-31 °C) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η δράση του glyphosate εναντίον της κόνυζας (*Conyza* spp.) αυξάνει με τη μείωση των θερμοκρασιών του περιβάλλοντος.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα των Ge et al. (2011), οι οποίοι αναφέρουν ότι η αντιμετώπιση ενός ανθεκτικού πληθυσμού *C. canadensis* ήταν αποτελεσματικότερη μετά από εφαρμογή του glyphosate σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών. Αυτό, σύμφωνα με τις ίδιες πηγές, μπορεί να αποδοθεί στη μειωμένη μεταφορά και παγίδευση του glyphosate στα χυμοτόπια όταν οι θερμοκρασίες κυμαίνονται από 5 έως 12 °C, με αποτέλεσμα μεγαλύτερη ποσότητα του glyphosate να είναι βιολογικώς διαθέσιμη για μεταφορά και δράση εντός των χλωροπλαστών (χώρος δράσης του ενζύμου EPSPS). Η υπόθεση αυτή μπορεί να φανεί χρήσιμη για την αντιμετώπιση άλλων ζιζανίων σε συνθήκες αγρού, υπό την προϋπόθεση ότι ο προαναφερθείς μηχανισμός ανθεκτικότητας στο glyphosate ενυπάρχει και στα είδη αυτά (Ge et al., 2011). Επίσης, οι Moretti et al. (2013) αναφέρουν ότι η ένταση ανθεκτικότητας ενός ανθεκτικού πληθυσμού *C. bonariensis* στο glyphosate ήταν μεγαλύτερη μετά από εφαρμογή το καλοκαίρι από ό,τι το χειμώνα (GR<sub>50</sub> τιμή 94 g δ.ο./στρ. το καλοκαίρι και GR<sub>50</sub> τιμή 22 g δ.ο./στρ. το χειμώνα). Τέλος, οι Vila-Aiub et al. (2013) αναφέρουν ότι η αντιμετώπιση ανθεκτικών στο glyphosate πληθυσμών *Sorghum halepense* και *Lolium rigidum* ήταν καλύτερη όταν το glyphosate εφαρμόστηκε σε φυτά που αναπτύσσονταν σε χαμηλές από ό,τι σε υψηλές θερμοκρασίες.

### Προσαρμοστικότητα ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών *Conyza albida* και *C. bonariensis* στο glyphosate

#### 4.1. Εισαγωγή

Η **προσαρμοστικότητα** ορίζεται ως «η ικανότητα ενός φαινοτύπου να επιβιώνει και να παράγει ικανοποιητικό αριθμό γόνιμων απογόνων υπό την πίεση επιλογής που δέχεται σε δεδομένο περιβάλλον και δεδομένη χρονική στιγμή» (Radosevich et al., 1997). Η κατανόηση των πλειοτροπικών επιπτώσεων των γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα είναι απαραίτητη, ώστε να καταστεί δυνατή η πρόβλεψη εξέλιξης της ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς των ζιζανίων. Η ανθεκτικότητα των οργανισμών στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων και των ζιζανιοκτόνων, οδηγεί σε ορισμένες περιπτώσεις, σε μείωση της προσαρμοστικότητας αυτών των οργανισμών (Coustau et al., 2000; Παπαπαναγιώτου, 2013; Papapanagiotou et al., 2015). Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων έχει κατά κανόνα αρνητική επίπτωση στην επιβίωση και την προσαρμοστικότητα των οργανισμών (Lande, 1983), αλλά οι περισσότερες μεταλλάξεις γονιδίων, που οδηγούν σε επικράτηση ανθεκτικών πληθυσμών σε ζιζανιοκτόνα, δεν σχετίζονται με μειωμένη προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών ατόμων σε σύγκριση με τα ευαίσθητα άτομα (Kaloumenos and Eleftherohorinos, 2008; Papapanagiotou et al., 2015).

Η προσαρμοστικότητα των ατόμων ενός ανθεκτικού πληθυσμού επηρεάζει τη δυναμική και τη συχνότητα εμφάνισης εντός των αγρών. Η μείωση της προσαρμοστικότητας των ατόμων ενός ανθεκτικού πληθυσμού προκύπτει ως συνέπεια της μείωσης της ενεργότητας και της κινητικής των ενζύμων, της αυξημένης ευπάθειας έναντι παθογόνων ή της «εκτροπής» των περιορισμένων ενεργειακών πηγών από την αύξηση-αναπαραγωγή των φυτών στην παραγωγή νέων ή την αυξημένη παραγωγή υπαρχόντων ενζύμων, που είναι σε θέση να μεταβολίσουν τα ζιζανιοκτόνα (Παπαπαναγιώτου, 2013; Papapanagiotou et al., 2015; Powles and Preston, 2006; Salzmann et al., 2008; Werck-Reichhart et al., 2000). Μείωση της προσαρμοστικότητας, που προκαλείται από την ανθεκτικότητα των φυτών σε ζιζανιοκτόνα έχει επιβεβαιωθεί για τις χημικές οικογένειες των τριαζινών (Holt and Thill, 1994; Salzmann et al., 2008), των σουλφονουλουριών (Alcocer-Ruthling et al.,



1992a, 1992b; Tardif et al., 2006), των ιμιδαζολινονών (Sha et al., 2007), των δινιτροανιλινών (Darmency et al., 2011) και των φαινοξυαλκανοϊκών (Bourdote et al., 1996; Hall and Romano, 1995).

Η εκδήλωση αρνητικών επιπτώσεων στην προσαρμοστικότητα των φυτών μπορεί να προκύψει όταν οι σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα-στόχους των ζιζανιοκτόνων προσδίδουν ανθεκτικότητα και ταυτόχρονα ασκούν αρνητική επίδραση στο φυσιολογικό μεταβολισμό και τη λειτουργία των ανθεκτικών φυτών. Η αντικατάσταση μεμονωμένων αμινοξέων εμποδίζει την πρόσδεση των ζιζανιοκτόνων-αναστολέων στο ένζυμο-στόχο αλλά επηρεάζει συχνά τη λειτουργία και την κινητική του ενζύμου (Tranel and Wright, 2002). Επίσης, επειδή η ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα συνιστά αμυντικό μηχανισμό που αναδύεται ως συνέπεια της πίεσης επιλογής των ζιζανιοκτόνων, αυτό δυνητικά προκαλεί απομάκρυνση-κατανάλωση πηγών (προϊόντων φωτοσύνθεσης, αποθηκευμένη ενέργεια), που δεν διατίθενται πλέον για την αύξηση και την αναπαραγωγή των φυτών. Ειδικότερα, η ανθεκτικότητα που οφείλεται σε αυξημένο μεταβολισμό των ζιζανιοκτόνων από τα φυτά [αυξημένη παραγωγή των ενζύμων μονοοξυγονασών (Cytochrome P450 monooxygenases)], απαιτεί δαπάνη ενέργειας και πηγών για τη σύνθεση των προαναφερθέντων ενζύμων, με αποτέλεσμα τις αρνητικές επιπτώσεις στην προσαρμοστικότητα των φυτών (Παπαπαναγιώτου, 2013; Vila-Aiub et al., 2009a; Werck-Reichhart et al., 2000). Τέλος, η μειωμένη προσαρμοστικότητα μπορεί να εκδηλωθεί ως προϊόν αρνητικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του τροποποιημένου ανθεκτικού γενοτύπου και του περιβάλλοντος. Έτσι, ένα ανθεκτικό ζιζάνιο μπορεί να καταστεί ευπαθέστερο στην προσβολή από κάποιο παθογόνο, όπως συνέβη με έναν πληθυσμό του ζιζανίου *Senecio vulgaris* (μαρτιάκος) ανθεκτικό στις τριαζίνες, ο οποίος παρουσίασε μειωμένη αντοχή στην προσβολή από το μύκητα *Puccinia lagenophorae* (Παπαπαναγιώτου, 2013; Salzmann et al., 2008).

Τα αλληλόμορφα γονίδια, που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αυτογονιμοποιούμενα είδη, προέρχονται από φυτά με στενό γενετικό υπόβαθρο, ενώ τα αλληλόμορφα των αντίστοιχων σταυρογονιμοποιούμενων ειδών προέρχονται από φυτά με ευρύ γενετικό υπόβαθρο. Αυτή η διαφορά του γενετικού υπόβαθρου διαφοροποιεί τη συχνότητα έκφρασης και την ένταση της αρνητικής επίδρασης στην προσαρμοστικότητα των φυτών, υποδηλώνοντας διαφορετική επίπτωση μεταξύ πληθυσμών ζιζανίων αλλά και μεμονωμένων φυτών (Παπαπαναγιώτου, 2013; Villa-Aiub et al., 2009b).

Η επίδραση του χαρακτηριστικού της ανθεκτικότητας στην προσαρμοστικότητα των φυτών ποικίλει ανάλογα με το είδος του ζιζανίου και τον τύπο της ανθεκτικότητας σε ζιζανιοκτόνα. Για παράδειγμα, η ανθεκτικότητα των φυτών στα ζιζανιοκτόνα-αναστολείς λειτουργίας φωτοσυστήματος II (PS II) (τριαζίνες) είναι άμεσα συνδεδεμένη με μειωμένη ανάπτυξη και μειωμένη ανταγωνιστική ικανότητα των ανθεκτικών ατόμων. Η σημειακή μετάλλαξη του *psbA* γονιδίου προκαλεί αντικατάσταση του αμινοξέος σερίνη (**Ser**) στη θέση **264** από γλυκίνη (**Gly**) στην πρωτεΐνη D1 του φωτοσυστήματος II (PS II), με αποτέλεσμα οι πληθυσμοί των ζιζανίων να γίνονται ανθεκτικοί στα ζιζανιοκτόνα της οικογένειας των τριαζινών και, ταυτοχρόνως, να χαρακτηρίζονται από μικρότερη προσαρμοστικότητα σε σχέση με τους ευαίσθητους πληθυσμούς, λόγω βραδύτερου ρυθμού φωτοσύνθεσης. Οι ανθεκτικοί πληθυσμοί παρουσιάζουν βραδύτερο ρυθμό ροής ηλεκτρονίων, επειδή το αμινοξύ γλυκίνη (Gly), σε σύγκριση με το αμινοξύ σερίνη (Ser) των ευαίσθητων πληθυσμών της τροποποιημένης πρωτεΐνης D1, αυξάνει το χρόνο παραμονής των ηλεκτρονίων στη θέση Q<sub>A</sub> πριν αυτά αποδοθούν στην πλαστοκινίνη της θέσης Q<sub>B</sub> του φωτοσυστήματος II (PS II) (Ελευθεροχωρινός, 2014; Monaco et al., 2002).

Η ανάπτυξη ενός ανθεκτικού πληθυσμού ζιζανίου με σημαντική οικονομική σπουδαιότητα (προκαλεί σημαντική μείωση της απόδοσης και υποβαθμίζει την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων) απαιτεί τη λήψη άμεσων μέτρων και ειδικότερα την εξεύρεση αποτελεσματικών εναλλακτικών μεθόδων ζιζανιοκτονίας. Αυτό όμως που αξίζει να αναφερθεί είναι ότι η αποτελεσματική αντιμετώπιση των ανθεκτικών ζιζανίων δεν αναστρέφει συνήθως την εξέλιξη της ανθεκτικότητας, αλλά απλώς αναστέλλει την πίεση επιλογής ως προς την ανθεκτικότητα με αποτέλεσμα η συχνότητα των αλληλομόρφων ανθεκτικότητας να μην αυξάνεται (Christoffers, 1999; Καλούμενος, 2009). Βέβαια, η συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων γονιδίων της ανθεκτικότητας μπορεί να μειωθεί αν υπάρξει πίεση επιλογής ως προς το χαρακτηριστικό της ευαισθησίας ενός ζιζανίου σε ζιζανιοκτόνα. Αυτό συμβαίνει όταν οι συνθήκες ανάπτυξης ευνοούν την προσαρμοστικότητα των ευαίσθητων ατόμων και όχι των ανθεκτικών. Επομένως, κάθε προσπάθεια μείωσης της προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών σε ζιζανιοκτόνα ατόμων επιτρέπει στη φυσική επιλογή να επαναφέρει την ευαισθησία στα ζιζανιοκτόνα ως κυρίαρχο χαρακτηριστικό ενός πληθυσμού (Christoffers, 1999; Καλούμενος, 2009; Roush et al., 1990).

## 4.2. Σκοπός της εργασίας

Πολλές από τις πιθανές στρατηγικές αντιμετώπισης ζιζανίων με ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα βασίζονται στην κατανόηση των διαφορών προσαρμοστικότητας μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων ατόμων ενός πληθυσμού. Επομένως, η γνώση της επίδρασης που έχει το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητας στην προσαρμοστικότητα των φυτών κρίνεται ως σημαντικό πεδίο έρευνας επειδή παρέχει τις απαραίτητες πληροφορίες για τη λήψη των κατάλληλων μέτρων αντιμετώπισής τους (Καλούμενος, 2009; Roush et al., 1990). Λαμβάνοντας υπόψη τη σπουδαιότητα της κατανόησης των διαφορών στην προσαρμοστικότητα μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων ατόμων ενός πληθυσμού και δεδομένου ότι οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την προσαρμοστικότητα ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών του γένους *Conyza* στο glyphosate είναι ελάχιστες, αποφασίστηκε η παρούσα εργασία με σκοπό τη μελέτη της προσαρμοστικότητας (ρυθμός ανάπτυξης και φαινολογικά χαρακτηριστικά) ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* στο glyphosate.

## 4.3. Υλικά και μέθοδοι

Πέντε ανθεκτικοί (R) πληθυσμοί *C. albida* (R1, R2, R3, R4, R5), τρεις ανθεκτικοί (R) πληθυσμοί *C. bonariensis* (R6, R7, R8), ένας ευαίσθητος (S) πληθυσμός *C. albida* (S1) και ένας ευαίσθητος (S) πληθυσμός *C. bonariensis* (S2) αξιολογήθηκαν ως προς την προσαρμοστικότητα (ρυθμός ανάπτυξης και φαινολογικά χαρακτηριστικά) σε συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια άνοιξη-φθινόπωρο 2012/άνοιξη-φθινόπωρο 2014. Οι τέσσερις από τους πέντε ανθεκτικούς πληθυσμούς *C. albida* (R1, R3, R4, R5) προέρχονταν από το Νομό Αργολίδας, ενώ ο πέμπτος (R2) προέρχονταν από το Νομό Λάρισας. Οι τρεις ανθεκτικοί πληθυσμοί *C. bonariensis* (R6, R7, R8) προέρχονταν από το Νομό Λάρισας. Οι δύο ευαίσθητοι πληθυσμοί *C. albida* και *C. bonariensis* (S1 και S2, αντίστοιχα) προέρχονταν από το Νομό Αττικής. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε ανθεκτικό πληθυσμό προήλθαν από φυτά κόνυζας που επιβίωσαν και αναπτύχθηκαν κατά το πείραμα διερεύνησης ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών, ενώ οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε ευαίσθητο πληθυσμό προήλθαν από τους αντίστοιχους απέκαστους μάρτυρες κόνυζας που αναπτύχθηκαν κατά το ίδιο πείραμα. Τα φυτά των πληθυσμών κόνυζας αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες απουσίας ανταγωνισμού προκειμένου να

αποδώσουν το μέγιστο των δυνατοτήτων τους. Όλοι οι ανωτέρω πληθυσμοί είχαν χρησιμοποιηθεί και στα πειράματα προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας.

#### **4.3.1. Προετοιμασία, φύτευμα, μεταφύτευση και ανάπτυξη των φυτών**

Οι σπόροι από κάθε πληθυσμό (οκτώ ανθεκτικοί και δύο ευαίσθητοι) σπάρθηκαν σε πλαστικούς δίσκους των 24 θέσεων και διαστάσεων 6x5,5x5 cm για κάθε θέση. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα ανοικτού-κίτρινου και μαύρου χρώματος τύρφη σε αναλογία 1:2 (ο/ο). Σε κάθε θέση τοποθετήθηκαν περίπου 20 σπόροι κόνυζας στην επιφάνεια του εδαφικού μίγματος και ακολούθως καλύφθηκαν με ένα πολύ λεπτό στρώμα του ίδιου εδαφικού μίγματος. Οι πλαστικοί δίσκοι, μετά τη σπορά, τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου (στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο) όπου, μετά την εμφάνιση των σποροφύτων κόνυζας, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις, ώστε τελικά, να παραμείνουν ομοιόμορφης ανάπτυξης φυτά κόνυζας στο στάδιο των 2-4 φύλλων σε κάθε πληθυσμό. Ένα μήνα μετά τη σπορά, έγινε μεταφύτευση δύο ομοιόμορφων ανεπτυγμένων φυτών κόνυζας (στάδιο 2-4 φύλλων) σε κάθε φυτοδοχείο χωρητικότητας 8,5 L (τα οποία περιείχαν το προαναφερθέν μίγμα τύρφης). Μετά τη μεταφύτευση, όλα τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν σε υπαίθριο χώρο του Μπενακειού Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου ώστε τα φυτά κόνυζας να αναπτυχθούν υπό φυσικές συνθήκες περιβάλλοντος. Τα φυτά κόνυζας αρδεύονταν με στάγδην άρδευση [σταλάκτες (ένας/φυτοδοχείο) σταθερής παροχής 4 L/hr] για να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη υγρασία που είναι απαραίτητη για την ομοιόμορφη και κανονική ανάπτυξη των φυτών, ενώ δεν πραγματοποιήθηκε λίπανση κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Το πειραματικό σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι πλήρεις ομάδες σε ελεύθερη διάταξη (RCBD, **R**andomized **C**omplete **B**lock **D**esign) και ο κάθε συνδυασμένος παράγοντας (πληθυσμός x δειγματοληψία) είχε τέσσερις επαναλήψεις-φυτοδοχεία (με δύο φυτά ανά φυτοδοχείο). Το πείραμα επαναλήφθηκε δυο φορές (επανάληψη στο χρόνο).

Η αξιολόγηση της προσαρμοστικότητας έγινε με προσδιορισμό του νωπού (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται) και ξηρού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών κόνυζας ανά πληθυσμό και επανάληψη-φυτοδοχείο σε πέντε διαφορετικές δειγματοληψίες που εκφράστηκαν ως ημέρες από την εγκατάσταση των φυτοδοχείων στον υπαίθριο χώρο (HAE). Ειδικότερα, η πρώτη δειγματοληψία έγινε στο στάδιο της

ροζέτας, η δεύτερη στο στάδιο της επιμήκυνσης του στελέχους (bolting stage), η τρίτη στην άνθιση, η τέταρτη στο 50-80% της σποροποίησης και η πέμπτη στο 100% της σποροποίησης. Επίσης, σε ορισμένες δειγματοληψίες μετρήθηκε το ύψος των φυτών (ύψος κεντρικού στελέχους), η διάμετρος της ροζέτας και ο αριθμός των φύλλων των φυτών (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Επιπρόσθετα, για κάθε πληθυσμό καταγράφηκε η ημερομηνία έναρξης επιμήκυνσης του στελέχους (bolting stage), η ημερομηνία έναρξης σχηματισμού ανθοφόρων οφθαλμών, η ημερομηνία έναρξης της άνθισης και η ημερομηνία έναρξης της σποροποίησης. Οι φαινολογικές μετρήσεις λαμβάνονταν καθημερινά με μακροσκοπική παρατήρηση χρησιμοποιώντας τα φυτά κόνυζας (*C. albida* ή *C. bonariensis*) της τελευταίας δειγματοληψίας. Τα δεδομένα των φαινολογικών μετρήσεων εκφράστηκαν ως ημέρες από την εγκατάσταση των φυτοδοχείων στον υπαίθριο χώρο (HAE).

#### 4.4. Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των λογαριθμημένων δεδομένων της προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών και των ευαίσθητων πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* στο glyphosate ήταν συνδυασμένη ως προς το χρόνο πραγματοποίησης των δύο πειραμάτων, αλλά έγινε χωριστά για τα λογαριθμημένα δεδομένα των ανθεκτικών και των ευαίσθητων πληθυσμών κάθε είδους. Συγκεκριμένα, για την ανάλυση των λογαριθμημένων δεδομένων των ανθεκτικών και του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* χρησιμοποιήθηκε η παραγοντική προσέγγιση 6 x 5 [6 πληθυσμοί *C. albida* (5 ανθεκτικοί και 1 ευαίσθητος πληθυσμός) x 5 δειγματοληψίες], ενώ για την ανάλυση των λογαριθμημένων δεδομένων των ανθεκτικών και του ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis* χρησιμοποιήθηκε η παραγοντική προσέγγιση 4 x 5 [4 πληθυσμοί *C. bonariensis* (3 ανθεκτικοί και 1 ευαίσθητος πληθυσμός) x 5 δειγματοληψίες]. Η σύγκριση των μέσων όρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς (ΕΣΔ) και σε επίπεδο σημαντικότητας 5% στα λογαριθμημένα δεδομένα, αν και οι τιμές στα Σχήματα 4.1-4.4 είναι οι μη λογαριθμημένες. Επίσης, η ανάλυση των δεδομένων ανά φαινολογικό στάδιο των πέντε (5) ανθεκτικών και του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* και των τριών (3) ανθεκτικών και του ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis* έγινε χωριστά. Η σύγκριση των μέσων όρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς (ΕΣΔ) και σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Τα μέσα ξηρά βάρη του υπέργειου τμήματος των φυτών κάθε πληθυσμού κόνυζας (*C. albida* ή *C. bonariensis*) χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του ρυθμού ανάπτυξης (κλίση  $b$ ) και του συντελεστή προσδιορισμού ( $R^2$ ). Η δευτεροβάθμια εξίσωση βρέθηκε να περιγράφει καλύτερα τη σχέση μεταξύ του ξηρού βάρους [εξαρτημένη μεταβλητή ( $y$ )] και του χρόνου (ημέρες από την εγκατάσταση των φυτοδοχείων στον υπαίθριο χώρο) [ανεξάρτητη μεταβλητή ( $x$ )]. Οι εκτιμώμενες ημέρες για το μέγιστο του ξηρού βάρους κάθε πληθυσμού υπολογίστηκαν μετά από παραγωγή (βρίσκοντας την 1<sup>η</sup> και τη 2<sup>η</sup> παράγωγο) χρησιμοποιώντας τα ελάχιστα τετράγωνα των συντελεστών  $a$ ,  $b$  και  $c$  της δευτεροβάθμιας εξίσωσης.

Οι αναλύσεις παραλλακτικότητας των δεδομένων (ANOVAs) καθώς και η εξεύρεση των εξισώσεων συμμεταβολής πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού στατιστικής ανάλυσης δεδομένων SPSS (v. 15.0).

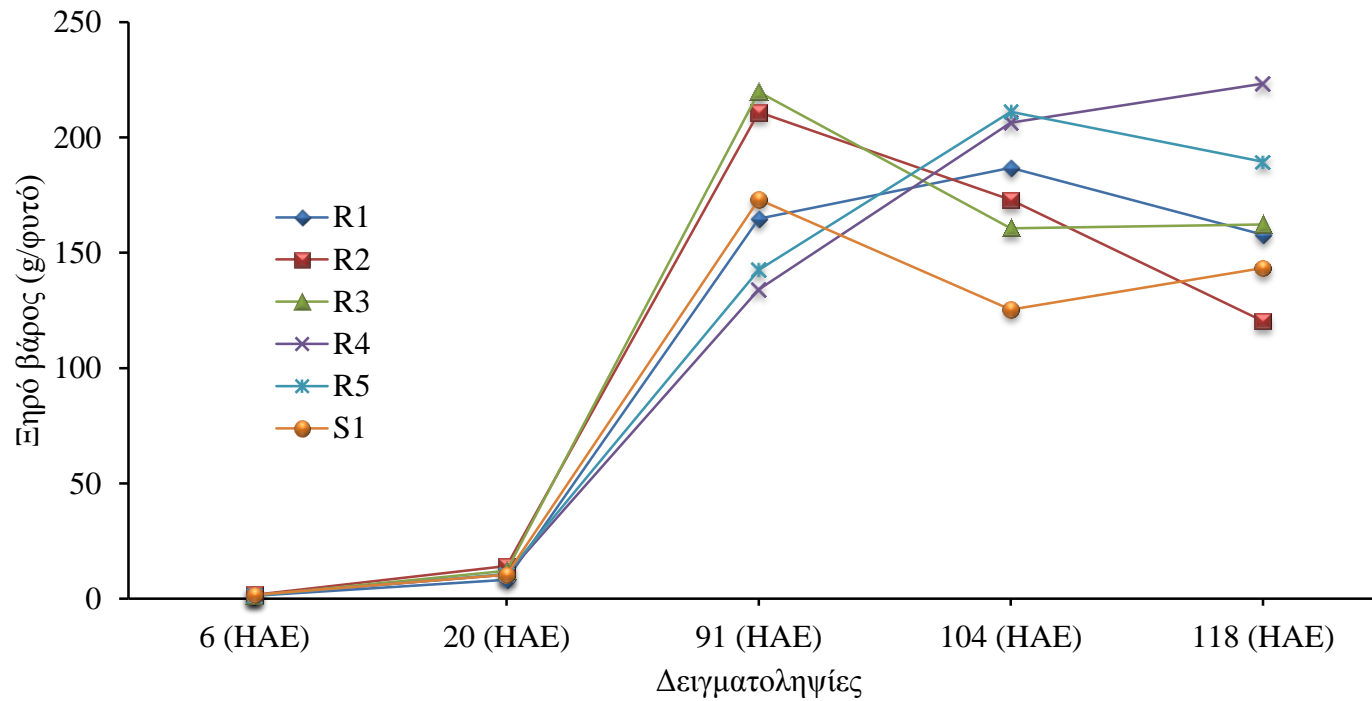
#### **4.5. Αποτελέσματα και συζήτηση**

Οι συνδυασμένες, ως προς το χρόνο πραγματοποίησης των δύο πειραμάτων (επανάληψη), αναλύσεις παραλλακτικότητας των λογαριθμημένων δεδομένων (ANOVAs) του ξηρού βάρους των ανθεκτικών και του ευαίσθητου πληθυσμού της *C. albida* και των αντίστοιχων πληθυσμών της *C. bonariensis* έδειξαν σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χρόνου πραγματοποίησης των δυο πειραμάτων και των πληθυσμών κάθε είδους κόνυζας, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ανθεκτικοί και οι ευαίσθητοι πληθυσμοί *C. albida* και *C. bonariensis* συμπεριφέρθηκαν με διαφορετικό τρόπο και στα δυο πειράματα.

Το 2012, το ξηρό βάρος των φυτών του ανθεκτικότερου πληθυσμού *C. albida* (R1) κατά το στάδιο της σποροποίησης (118 HAE) ήταν μεγαλύτερο (10%) από εκείνο του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1), ενώ το ξηρό βάρος των φυτών του λιγότερο ανθεκτικού πληθυσμού *C. albida* (R2) κατά το στάδιο της σποροποίησης (118 HAE) ήταν μικρότερο (19%) από εκείνο του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1) (Σχήμα 4.1). Το ξηρό βάρος των φυτών του μετρίως ανθεκτικού πληθυσμού *C. albida* (R4) κατά το στάδιο της σποροποίησης (118 HAE) ήταν πολύ μεγαλύτερο (56%) από εκείνο του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1). Το μέγιστο ξηρό βάρος του ανθεκτικότερου πληθυσμού *C. albida* (R1) καταγράφηκε στην τέταρτη δειγματοληψία (104 HAE), ενώ το μέγιστο ξηρό βάρος του λιγότερο ανθεκτικού πληθυσμού *C. albida* (R2) καθώς και του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1)

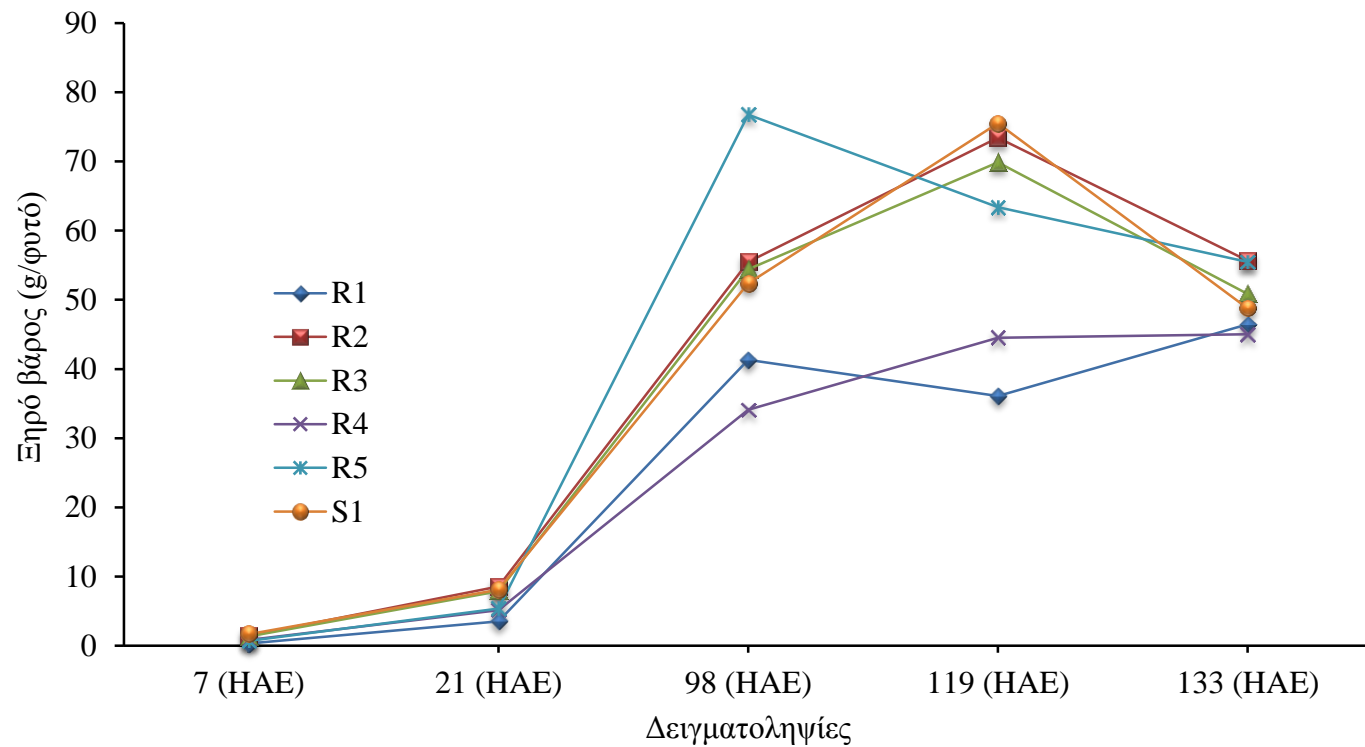
καταγράφηκε στην τρίτη δειγματοληψία (91 HAE). Αντίθετα, το ξηρό βάρος του μετρίως ανθεκτικού πληθυσμού *C. albida* (R4) συνέχιζε να αυξάνει έως την τελευταία δειγματοληψία (118 HAE).

Το 2014, το ξηρό βάρος των φυτών του ανθεκτικότερου πληθυσμού *C. albida* (R1) κατά το στάδιο της σποροποίησης (133 HAE) ήταν ελαφρώς μικρότερο (5%) από εκείνο του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1), ενώ το ξηρό βάρος των φυτών του λιγότερο ανθεκτικού πληθυσμού *C. albida* (R2) κατά το στάδιο της σποροποίησης (133 HAE) ήταν μεγαλύτερο (14%) από εκείνο του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1) (Σχήμα 4.2). Το ξηρό βάρος των φυτών του μετρίως ανθεκτικού πληθυσμού *C. albida* (R4) κατά το στάδιο της σποροποίησης (133 HAE) ήταν ελαφρώς μικρότερο (8%) από εκείνο του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1). Το μέγιστο ξηρό βάρος του ανθεκτικότερου πληθυσμού *C. albida* (R1) καταγράφηκε στην τρίτη δειγματοληψία (98 HAE), ενώ το μέγιστο ξηρό βάρος του λιγότερο ανθεκτικού πληθυσμού *C. albida* (R2) καθώς και του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1) καταγράφηκε στην τέταρτη δειγματοληψία (119 HAE). Αντίθετα, το ξηρό του βάρος του μετρίως ανθεκτικού πληθυσμού *C. albida* (R4) συνέχιζε να αυξάνει έως την τελευταία δειγματοληψία (133 HAE).



**Σχήμα 4.1.** Ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών πέντε ανθεκτικών (R1-R5) και ενός ευαίσθητου (S1) πληθυσμού *C. albida* στο πρώτο πείραμα (2012). Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων. Η μη ύπαρξη ΕΣΔ<sub>0,05</sub> για τη σύγκριση των μέσων όρων οφείλεται στο ότι οι τιμές είναι πραγματικά ξηρά βάρη, ενώ η ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) και η σύγκριση των μέσων όρων στο κείμενο πραγματοποιήθηκαν με τα λογαριθμημένα ξηρά βάρη.

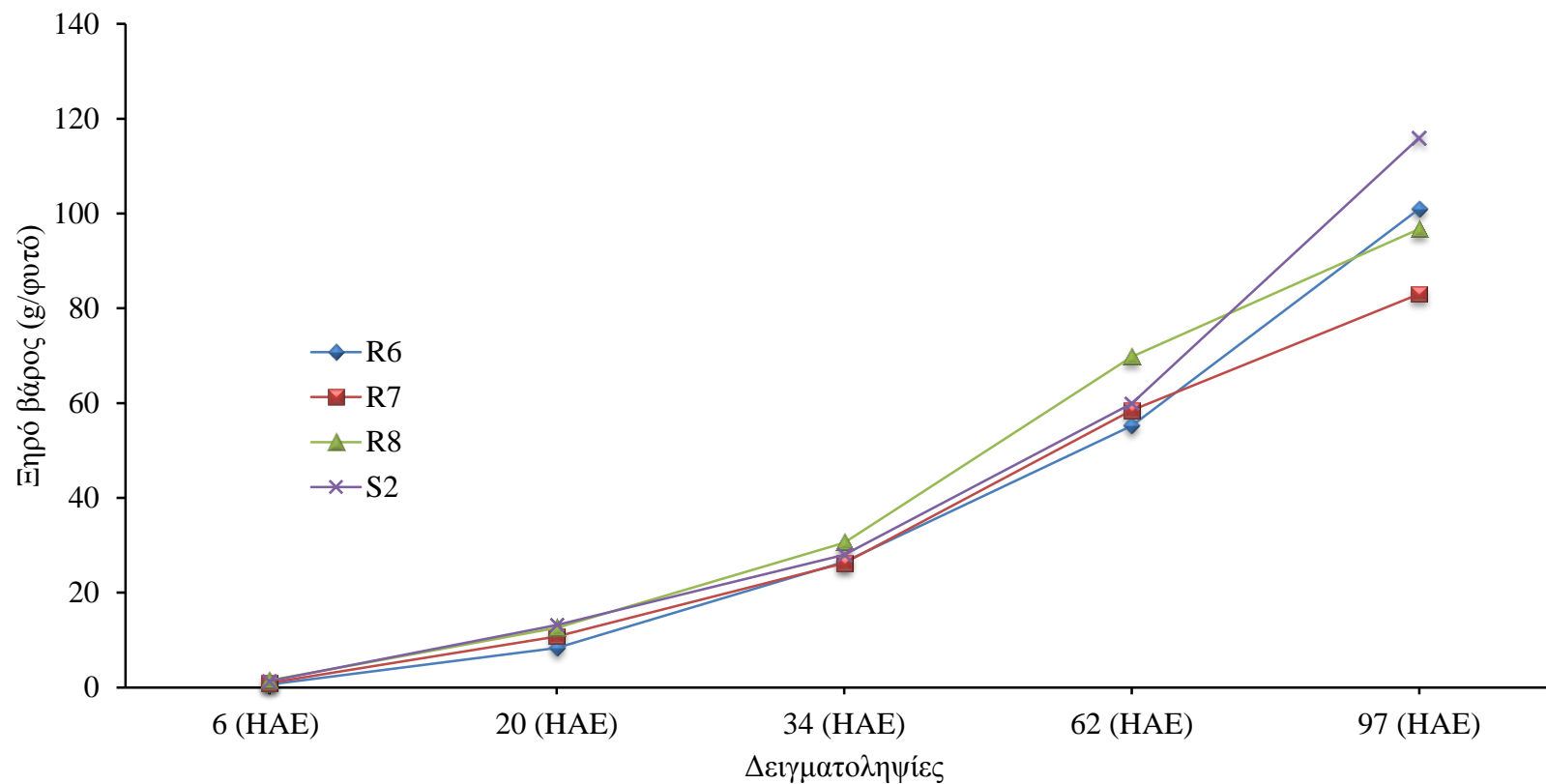




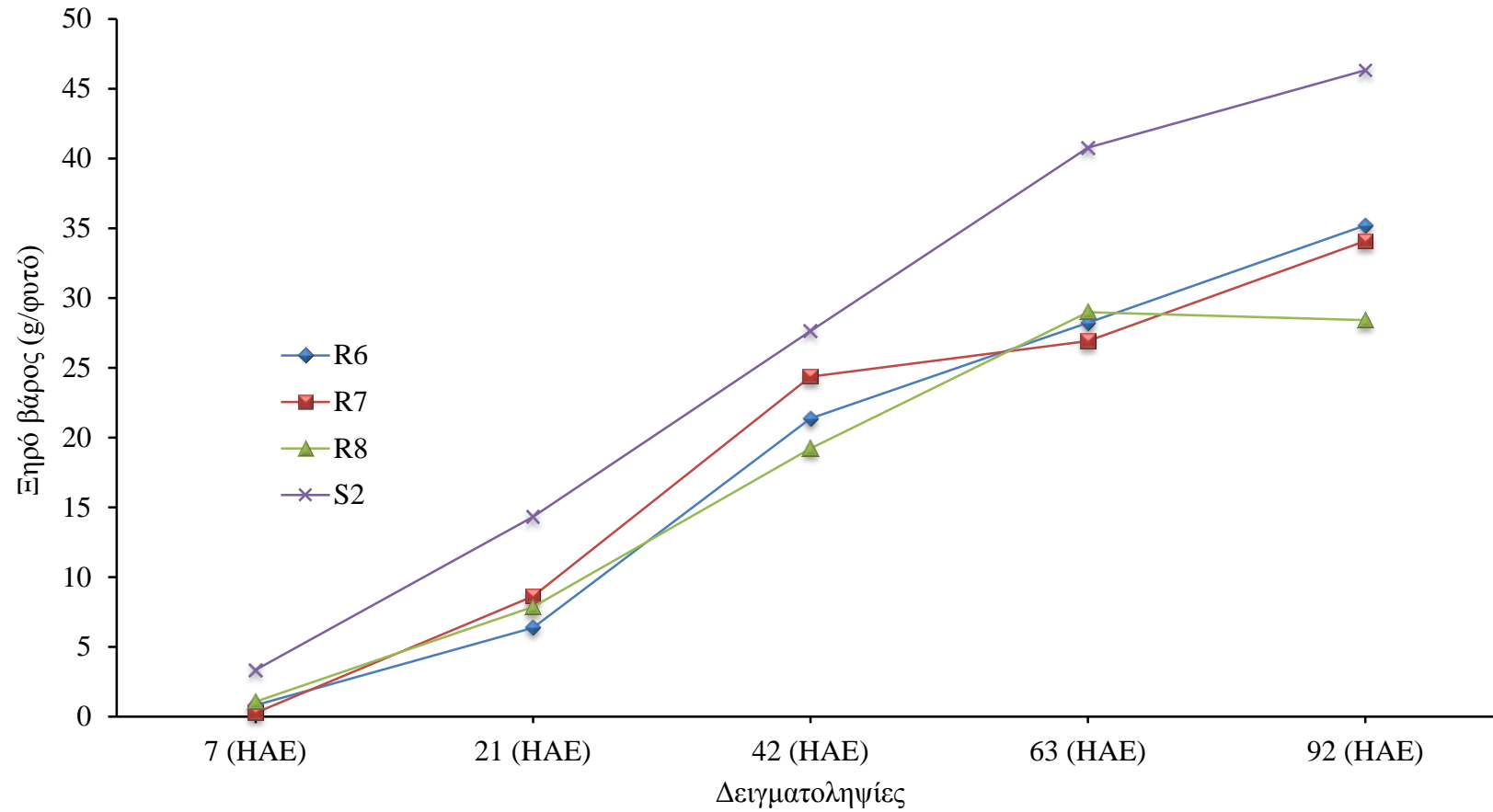
**Σχήμα 4.2.** Ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών πέντε ανθεκτικών (R1-R5) και ενός ευαίσθητου (S1) πληθυσμού *C. albida* στο δεύτερο πείραμα (2014). Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων. Η μη ύπαρξη ΕΣΔ<sub>0,05</sub> για τη σύγκριση των μέσων όρων οφείλεται στο ότι οι τιμές είναι πραγματικά ξηρά βάρη, ενώ η ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) και η σύγκριση των μέσων όρων στο κείμενο πραγματοποιήθηκαν με τα λογαριθμημένα ξηρά βάρη.

Το 2012, το ξηρό βάρος των τριών ανθεκτικών πληθυσμών *C. bonariensis* (R6, R7, R8) ήταν μικρότερο (15-40%) από το ξηρό βάρος του ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis* (S2) κατά το στάδιο της σποροποίησης (97 HAE), ενώ το ξηρό βάρος όλων των πληθυσμών (R6, R7, R8, S2) αυξανόταν έως την τελευταία δειγματοληψία (97 HAE) (Σχήμα 4.3).

Το 2014, το ξηρό βάρος των τριών ανθεκτικών πληθυσμών *C. bonariensis* (R6, R7, R8) ήταν πολύ μικρότερο (32-63%) από το ξηρό βάρος του ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis* (S2) κατά το στάδιο της σποροποίησης (92 HAE), ενώ το ξηρό βάρος των ανθεκτικών και του ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis* (R6, R7 και S2) συνέχιζε να αυξάνει έως την τελευταία δειγματοληψία (92 HAE) (Σχήμα 4.4). Αντίθετα, το μέγιστο του ξηρό βάρος του ανθεκτικού πληθυσμού *C. bonariensis* (R8) καταγράφηκε στην τέταρτη δειγματοληψία (63 HAE).



**Σχήμα 4.3.** Ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών τριών ανθεκτικών (R6-R8) και ενός ευαίσθητου (S2) πληθυσμού *C. bonariensis* στο πρώτο πείραμα (2012). Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων. Η μη ύπαρξη ΕΣΔ<sub>0,05</sub> για τη σύγκριση των μέσων όρων οφείλεται στο ότι οι τιμές είναι πραγματικά ξηρά βάρη, ενώ η ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) και η σύγκριση των μέσων όρων στο κείμενο πραγματοποιήθηκαν με τα λογαριθμημένα ξηρά βάρη.



**Σχήμα 4.4.** Ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών τριών ανθεκτικών (R6-R8) και ενός ευαίσθητου (S2) πληθυσμού *C. bonariensis* στο δεύτερο πείραμα (2014). Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων. Η μη ύπαρξη ΕΣΔ<sub>0,05</sub> για τη σύγκριση των μέσων όρων οφείλεται στο ότι οι τιμές είναι πραγματικά ξηρά βάρη, ενώ η ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) και η σύγκριση των μέσων όρων στο κείμενο πραγματοποιήθηκαν με τα λογαριθμημένα ξηρά βάρη.

Ο υπολογισμός του ρυθμού ανάπτυξης (κλίση b) των ανωτέρω πληθυσμών επιβεβαίωσε σε μεγάλο βαθμό τα αποτελέσματα των αναλύσεων παραλλακτικότητας (ANOVAs). Ειδικότερα, το 2012, ο λιγότερο ανθεκτικός πληθυσμός *C. albida* (R2) είχε το μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης (6,6), ενώ ο μετρίως ανθεκτικός πληθυσμός *C. albida* (R4) είχε το μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης (0,4). Η φθίνουσα σειρά κατάταξης όλων των πληθυσμών *C. albida*, με βάση το ρυθμό ανάπτυξης κατά το 2012, ήταν R2>R3>S1>R1>R5>R4 (Πίνακας 4.1), ενώ η αντίστοιχη σειρά κατάταξης κατά το 2014 ήταν R5>S1, R3>R2>R1>R4 (Πίνακας 4.2).

Ο ανθεκτικός πληθυσμός *C. bonariensis* (R8) είχε το μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης (1,4) το 2012, ενώ ο ανθεκτικός πληθυσμός *C. bonariensis* (R6) είχε το μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης (0,8). Η φθίνουσα σειρά κατάταξης όλων των πληθυσμών *C. bonariensis*, με βάση το ρυθμό ανάπτυξης κατά το 2012 ήταν R8>R7>R6>S2 (Πίνακας 4.3), ενώ η αντίστοιχη σειρά κατάταξης κατά το 2014 ήταν S2>R7, R8>R6 (Πίνακας 4.4).

**Πίνακας 4.1.** Ρυθμός ανάπτυξης (κλίση  $b \pm SE$ ) και συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ) πέντε ανθεκτικών (R1-R5) και ενός ευαίσθητου (S1) πληθυσμού *C. albida* στο πρώτο πείραμα (2012).

Πληθυσμοί	Κλίση ( $b \pm SE$ )	Εκτιμώμενες ημέρες (days) για το μέγιστο ξηρό βάρος (max DW)	$R^2$
R1	3,6 $\pm$ 1,5	>118	0,963
R2	6,6 $\pm$ 2,3	80	0,922
R3	5,4 $\pm$ 2,4	90	0,924
R4	0,4 $\pm$ 1,2	>118	0,985
R5	1,9 $\pm$ 1,8	>118	0,960
S1	3,7 $\pm$ 1,9	98	0,926

**Πίνακας 4.2.** Ρυθμός ανάπτυξης (κλίση  $b \pm SE$ ) και συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ) πέντε ανθεκτικών (R1-R5) και ενός ευαίσθητου (S1) πληθυσμού *C. albida* στο δεύτερο πείραμα (2014).

Πληθυσμοί	Κλίση ( $b \pm SE$ )	Εκτιμώμενες ημέρες (days) για το μέγιστο ξηρό βάρος (max DW)	$R^2$
R1	0,6±0,3	>133	0,965
R2	1,1±0,5	114	0,949
R3	1,2±0,5	120	0,944
R4	0,4±0,1	>133	0,994
R5	1,9±0,5	95	0,958
S1	1,2±0,8	120	0,897

**Πίνακας 4.3.** Ρυθμός ανάπτυξης (κλίση  $b \pm SE$ ) και συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ) τριών ανθεκτικών (R6-R8) και ενός ευαίσθητου (S2) πληθυσμού *C. bonariensis* στο πρώτο πείραμα (2012).

Πληθυσμοί	Κλίση ( $b \pm SE$ )	Εκτιμώμενες ημέρες (days) για το μέγιστο ξηρό βάρος (max DW)	$R^2$
R6	0,8±0,2	>97	0,998
R7	1,2±0,2	>97	0,993
R8	1,4±0,3	>97	0,990
S2	0,7±0,1	>97	1,000

**Πίνακας 4.4.** Ρυθμός ανάπτυξης (κλίση  $b \pm SE$ ) και συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ) τριών ανθεκτικών (R6-R8) και ενός ευαίσθητου (S2) πληθυσμού *C. bonariensis* στο δεύτερο πείραμα (2014).

Πληθυσμοί	Κλίση ( $b \pm SE$ )	Εκτιμώμενες ημέρες (days) για το μέγιστο ξηρό βάρος (max DW)	$R^2$
R6	0,7±0,1	>92	0,989
R7	0,8±0,2	>92	0,980
R8	0,8±0,1	>92	0,984
S2	1,0±0,1	>92	0,996

Η συνδυασμένη, ως προς το χρόνο πραγματοποίησης των δύο πειραμάτων (επανάληψη), ανάλυση παραλλακτικότητας των δεδομένων (ANOVA) της ημερομηνίας έναρξης επιμήκυνσης του στελέχους (bolting stage) έδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χρόνου πραγματοποίησης των δυο πειραμάτων και των πληθυσμών της *C. albida*, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πληθυσμοί *C. albida* συμπεριφέρθηκαν με διαφορετικό τρόπο και στα δυο πειράματα.. Αντίθετα, οι αντίστοιχες συνδυασμένες, ως προς το χρόνο πραγματοποίησης των δύο πειραμάτων (επανάληψη), αναλύσεις παραλλακτικότητας των δεδομένων (ANOVAs) της ημερομηνίας έναρξης σχηματισμού ανθοφόρων οφθαλμών, της ημερομηνίας έναρξης της άνθισης και της ημερομηνίας έναρξης της σποροποίησης δεν έδειξαν σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χρόνου πραγματοποίησης των δύο πειραμάτων και των πληθυσμών της *C. albida*, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πληθυσμοί *C. albida* συμπεριφέρθηκαν με τον ίδιο τρόπο και στα δυο πειράματα..

Το 2012, η εμφάνιση του πρώτου ανθοφόρου οφθαλμού, η εμφάνιση του πρώτου άνθους και η έναρξη της σποροποίησης των φυτών του ανθεκτικότερου πληθυσμού *C. albida* (R1) παρατηρήθηκαν 5 ημέρες νωρίτερα από ό,τι στα φυτά του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1) (Πίνακας 4.5). Αντίθετα, το 2014, τα αντίστοιχα φαινολογικά στάδια των φυτών του ανθεκτικότερου πληθυσμού *C. albida* (R1) παρατηρήθηκαν 3-5 ημέρες νωρίτερα σε σχέση με τα φυτά του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1) (Πίνακας 4.6).

Το 2012, η έναρξη επιμήκυνσης του στελέχους, η εμφάνιση του πρώτου ανθοφόρου οφθαλμού, η εμφάνιση του πρώτου άνθους και η έναρξη της σποροποίησης των φυτών του λιγότερο ανθεκτικού πληθυσμού *C. albida* (R2) παρατηρήθηκαν 0-4 ημέρες νωρίτερα από ό,τι στα φυτά του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1) (Πίνακας 4.5). Αντίθετα, το 2014, τα αντίστοιχα φαινολογικά στάδια των φυτών του ίδιου λιγότερο ανθεκτικού πληθυσμού *C. albida* (R2) παρατηρήθηκαν 3-8 ημέρες νωρίτερα σε σχέση με τα φυτά του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1) (Πίνακας 4.6).

Το 2012, η έναρξη επιμήκυνσης του στελέχους, η εμφάνιση του πρώτου ανθοφόρου οφθαλμού, η εμφάνιση του πρώτου άνθους και η έναρξη της σποροποίησης των φυτών του μετρίως ανθεκτικού πληθυσμού *C. albida* (R4) παρατηρήθηκαν 5-13 ημέρες αργότερα από ό,τι στα φυτά του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1) (Πίνακας 4.5). Αντίθετα, το 2014, τα αντίστοιχα φαινολογικά στάδια των φυτών του μετρίως ανθεκτικού πληθυσμού *C. albida* (R4) παρατηρήθηκαν 8-9

ημέρες αργότερα σε σχέση με τα φυτά του ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1) (Πίνακας 4.6).

**Πίνακας 4.5.** Φαινολογικά στάδια πέντε ανθεκτικών (R1-R5) και ενός ευαίσθητου (S1) πληθυσμού *C. albida* στο πρώτο πείραμα (2012). Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.

Πληθυσμοί <i>C. albida</i> (2012)							
	R1	R2	R3	R4	R5	S1	
Φαινολογικό στάδιο	Ημέρες από την εγκατάσταση των φυτοδοχείων στον υπαίθριο χώρο						ΕΣΔ <sub>0,05</sub>
Έναρξη επιμήκυνσης του στελέχους	19	21	21	34	25	21	4
Έναρξη εμφάνισης ανθοφόρων οφθαλμών	66	68	72	76	75	71	4
Έναρξη άνθισης	77	78	85	87	85	82	5
Έναρξη σποροποίησης	85	88	91	95	94	90	5



**Πίνακας 4.6.** Φαινολογικά στάδια πέντε ανθεκτικών (R1-R5) και ενός ευαίσθητου (S1) πληθυσμού *C. albida* στο δεύτερο πείραμα (2014). Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.

Πληθυσμοί <i>C. albida</i> (2014)							
	R1	R2	R3	R4	R5	S1	
Φαινολογικό στάδιο	Ημέρες από την εγκατάσταση των φυτοδοχείων στον υπαίθριο χώρο						ΕΣΔ <sub>0,05</sub>
Έναρξη επιμήκυνσης του στελέχους	23	16	16	27	21	19	4
Έναρξη εμφάνισης ανθοφόρων οφθαλμών	67	64	70	79	74	70	4
Έναρξη άνθισης	81	78	84	93	89	85	5
Έναρξη σποροποίησης	89	86	94	102	98	94	5

Οι συνδυασμένες, ως προς το χρόνο πραγματοποίησης των δύο πειραμάτων (επανάληψη), αναλύσεις παραλλακτικότητας των δεδομένων (ANOVAs) της ημερομηνία έναρξης επιμήκυνσης του στελέχους (bolting stage), της ημερομηνίας έναρξης σχηματισμού ανθοφόρων οφθαλμών, της ημερομηνίας έναρξης της άνθισης και της ημερομηνίας έναρξης της σποροποίησης έδειξαν σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χρόνου πραγματοποίησης των δυο πειραμάτων και των πληθυσμών της *C. bonariensis*, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πληθυσμοί *C. bonariensis* συμπεριφέρθηκαν με διαφορετικό τρόπο και στα δυο πειράματα.

Το 2012, η έναρξη επιμήκυνσης του στελέχους, η εμφάνιση του πρώτου ανθοφόρου οφθαλμού, η εμφάνιση του πρώτου άνθους και η έναρξη της σποροποίησης των φυτών των τριών ανθεκτικών πληθυσμών *C. bonariensis* (R6, R7, R8) παρατηρήθηκαν 0-8 ημέρες νωρίτερα από ότι στα φυτά του ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis* (S2) (Πίνακας 4.7).

Το 2014, τα αντίστοιχα φαινολογικά στάδια των φυτών του ανθεκτικού πληθυσμού *C. bonariensis* (R7) παρατηρήθηκαν 4-5 ημέρες αργότερα σε σχέση με τα φυτά του ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis* (S2) (Πίνακας 4.8).

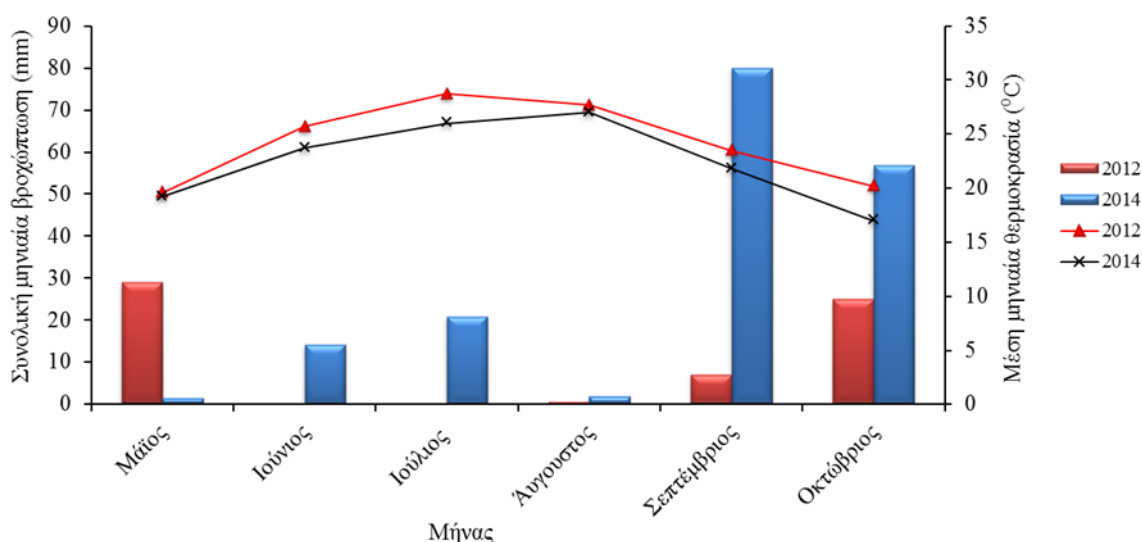
**Πίνακας 4.7.** Φαινολογικά στάδια τριών ανθεκτικών (R6-R8) και ενός ευαίσθητου (S2) πληθυσμού *C. bonariensis* στο πρώτο πείραμα (2012). Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.

Πληθυσμοί <i>C. bonariensis</i> (2012)							
			R6	R7	R8	S2	
Φαινολογικό στάδιο			Ημέρες από την εγκατάσταση των φυτοδοχείων στον υπαίθριο χώρο				EΣΔ <sub>0,05</sub>
Έναρξη	επιμήκυνσης	του	16	13	13	16	4
στελέχους							
Έναρξη	εμφάνισης	ανθοφόρων	20	21	20	27	4
οφθαλμών							
Έναρξη	άνθισης		30	29	29	37	4
Έναρξη	σποροποίησης		38	38	38	46	4

**Πίνακας 4.8.** Φαινολογικά στάδια τριών ανθεκτικών (R6-R8) και ενός ευαίσθητου (S2) πληθυσμού *C. bonariensis* στο δεύτερο πείραμα (2012). Κάθε τιμή είναι μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων.

Πληθυσμοί <i>C. bonariensis</i> (2014)							
			R6	R7	R8	S2	
Φαινολογικό στάδιο			Ημέρες από την εγκατάσταση των φυτοδοχείων στον υπαίθριο χώρο				EΣΔ <sub>0,05</sub>
Έναρξη	επιμήκυνσης	του	14	14	14	9	4
στελέχους							
Έναρξη	εμφάνισης	ανθοφόρων	23	27	24	22	4
οφθαλμών							
Έναρξη	άνθισης		32	37	33	33	4
Έναρξη	σποροποίησης		41	47	42	43	4

Τα προαναφερθέντα δεδομένα δείχνουν ότι το ξηρό βάρος και τα φαινολογικά χαρακτηριστικά των πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* διαφοροποιήθηκαν κατά τα έτη 2012 και 2014 λόγω πιθανώς του θερμότερου και ξηρότερου καλοκαιριού του 2012 σε σχέση με το καλοκαίρι του 2014. Αυτό επιβεβαιώνεται από τα κλιματολογικά δεδομένα του Σχήματος 4.5, όπου οι μέσες μηνιαίες θερμοκρασίες των μηνών Μαΐου, Ιουνίου, Ιουλίου, Αυγούστου, Σεπτεμβρίου και Οκτωβρίου 2012 ήταν 19,6 °C, 25,7 °C, 28,7 °C, 27,7 °C, 23,5 °C, και 20,2 °C, αντίστοιχα, και ήταν μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες του 2014 που ήταν 19,2 °C, 23,7 °C, 26 °C, 27 °C, 21,8 °C και 17 °C. Επιπλέον, οι συνολικές μηνιαίες βροχοπτώσεις των μηνών Μαΐου, Ιουνίου, Ιουλίου, Αυγούστου, Σεπτεμβρίου και Οκτωβρίου 2012 ήταν 29 mm, 0 mm, 0 mm, 0,6 mm, 7 mm και 25 mm, αντίστοιχα, ενώ για τους αντίστοιχους μήνες του 2014 ήταν 1,4 mm, 14,2 mm, 20,8 mm, 1,8 mm, 80 mm και 56,8 mm.



**Σχήμα 4.5.** Μέση μηνιαία θερμοκρασία και συνολική μηνιαία βροχόπτωση που καταγράφηκαν στην περιοχή Εκάλη Αττικής κατά τα έτη 2012 και 2014 [Πηγή: Βάση δεδομένων του Εθνικού Αστεροσκοπείου Αθηνών (<http://meteo.gr/meteosearch/>) για την περιοχή Εκάλη Αττικής].

Τα προαναφερθέντα δεδομένα των δύο πειραμάτων (2012 και 2014) δείχνουν ότι η προσαρμοστικότητα των πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* δεν επηρεάζεται από το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητας, αλλά επηρεάζεται από την περιοχή προέλευσης των πληθυσμών και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την

αξιολόγησή τους. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τους υπολογισθέντες ρυθμούς ανάπτυξης (κλίση b) των πληθυσμών.

Ο ανταγωνισμός μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών δεν μελετήθηκε επειδή οι πληθυσμοί προέρχονταν από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και οι όποιες διαφορές στην προσαρμοστικότητα πιθανόν να μην οφείλονται στο χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητας αλλά στην επίδραση του περιβάλλοντος. Για το λόγο αυτό τα ανωτέρω πειράματα πραγματοποιήθηκαν απουσία ανταγωνισμού ώστε να δοθεί η δυνατότητα στα φυτά των ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών να εκφράσουν πλήρως το γενότυπό τους (Vila Aiub et al., 2011).

Οι διαφορές του ξηρού βάρους και των φαινολογικών χαρακτηριστικών των ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* σε σχέση με τους αντίστοιχους ευαίσθητους πληθυσμούς μπορούν να αποδοθούν στη διαφορετική προέλευση (γεωγραφικές περιοχές) και στο διαφορετικό γενετικό ιστορικό (Vila-Aiub et al., 2009b). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα των Alcorta et al. (2011), οι οποίοι αναφέρουν ότι ένας ανθεκτικός στο glyphosate πληθυσμός *C. canadensis* άνθισε και σποροποίησε 10 και 7 ημέρες νωρίτερα, αντίστοιχα, από ό,τι ο ευαίσθητος πληθυσμός *C. canadensis*. Επιπρόσθετα, οι Shrestha et al. (2010) αναφέρουν ότι ένας ανθεκτικός στο glyphosate πληθυσμός *C. canadensis* άνθισε και σποροποίησε 3 έως 4 εβδομάδες νωρίτερα, αντίστοιχα, από ό,τι ο ευαίσθητος πληθυσμός *C. canadensis*. Επίσης, οι Shrestha et al. (2014) αναφέρουν ότι δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τα φαινολογικά τους χαρακτηριστικά και τη βιομάζα μεταξύ πέντε ανθεκτικών και πέντε ευαίσθητων στο glyphosate πληθυσμών *C. bonariensis*. Στην Ελλάδα, οι Travlos and Chachalis (2013a) δεν παρατήρησαν διαφορές προσαρμοστικότητας μεταξύ ενός ανθεκτικού και ενός ευαίσθητου στο glyphosate πληθυσμών *C. bonariensis* οι οποίοι προέρχονταν από διαφορετικές περιοχές.

Οι Davis et al. (2009) ανέφεραν ότι φυτά από ανθεκτικούς πληθυσμούς *C. canadensis* στο glyphosate και σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς του ενζύμου ALS παράγαγαν παρόμοια βιομάζα και σπόρους σε σύγκριση με τους αντίστοιχους ευαίσθητους πληθυσμούς, υποδηλώνοντας ότι δεν υπήρχε διαφορά προσαρμοστικότητας μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών πληθυσμών. Επίσης, οι Pedersen et al. (2007) δεν παρατήρησαν σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη ή στον ανταγωνισμό μεταξύ ενός ανθεκτικού και ενός ευαίσθητου στο glyphosate πληθυσμού *Lolium rigidum*, γεγονός που επιβεβαιώνει τη μη ύπαρξη διαφοράς προσαρμοστικότητας στον ανθεκτικό πληθυσμό. Παρόμοια αποτελέσματα

αναφέρονται από τους Brabham et al. (2011), οι οποίοι ανέφεραν ότι ένας ανθεκτικός στο glyphosate πληθυσμός *Ambrosia trifida* εμφάνισε ταχεία ανάπτυξη στα πρώτα στάδια σε σχέση με τον αντίστοιχο ευαίσθητο πληθυσμό, αλλά οι δύο πληθυσμοί 50 ημέρες αργότερα είχαν το ίδιο ύψος, το ίδιο βάρος βλαστών και παρόμοια φυλλική επιφάνεια.

Οι Westhoven et al. (2008) ανέφεραν ότι οκτώ πληθυσμοί *Chenopodium album* με ανθεκτικότητα στο glyphosate είχαν μεγαλύτερο ύψος από τους δύο ευαίσθητους πληθυσμούς 6 και 10 εβδομάδες μετά τη μεταφύτευση, αλλά είχαν μικρότερο ξηρό βάρος κατά το στάδιο της ωρίμανσης. Οι οκτώ ανθεκτικοί πληθυσμοί εμφάνισαν ανθικές καταβολές 6 έως 8 εβδομάδες μετά τη μεταφύτευση, ενώ οι δύο ευαίσθητοι πληθυσμοί εμφάνισαν ανθικές καταβολές 12 εβδομάδες αργότερα. Βέβαια, με βάση την παραγωγή σπόρου, οι οκτώ ανθεκτικοί πληθυσμοί παρήγαγαν ίδια ποσότητα σπόρου με τους ευαίσθητους πληθυσμούς, γεγονός που σημαίνει απουσία διαφοράς προσαρμοστικότητας. Αξίζει να αναφερθεί ότι παρόμοιες μελέτες προσαρμοστικότητας ανθεκτικών και ευαίσθητων στο glyphosate πληθυσμών *C. albida* δεν έχουν αναφερθεί έως σήμερα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η προσαρμοστικότητα των πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* δεν σχετίζεται με το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητας, αλλά επηρεάζεται από την περιοχή προέλευσης των πληθυσμών και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την αξιολόγησή τους.

### Μοριακή ταυτοποίηση των ειδών *Conyza albida* και *C. bonariensis*

#### 5.1. Εισαγωγή

Τα είδη του γένους *Conyza* (κόνυζα) που κυριαρχούν στην Ελλάδα αλλά και στην Ευρώπη είναι τα *C. albida* (συν. *C. sumatrensis*) Willd. ex Sprengel (Fleabane ή Sumatran fleabane), *C. bonariensis* (L.) Cronq. (Hairy fleabane) και *C. canadensis* (L.) Cronq. (Horseweed) (Mylonas et al., 2014; Thébaud and Abbott, 1995; Γιαννίτσaros, 1997). Το είδος *C. canadensis* είναι διπλοειδές ( $2n=18$ ), ενώ τα είδη *C. albida* και *C. bonariensis* είναι εξαπλοειδή ( $2n=54$ ) (Thébaud and Abbott, 1995).

Βασιζόμενοι στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, τα ανωτέρω τρία είδη κόνυζας στο στάδιο του ρόδακα μοιάζουν πολύ μεταξύ τους και η μακροσκοπική διάκρισή-αναγνώρισή τους είναι πολύ δύσκολη (Γιαννοπολίτης, 2003; Mylonas et al., 2014; Shrestha et al., 2008), ενώ η διάκρισή-αναγνώρισή τους στο στάδιο της άνθισης αλλά και της σποροποίησης είναι πιο εύκολη. Επιπρόσθετα, η δυσκολία διάκρισης-αναγνώρισης αυξάνεται ακόμη περισσότερο αν ληφθεί υπόψη ότι υπάρχει και μικρό ποσοστό υβριδισμού μεταξύ των ειδών *C. canadensis* και *C. bonariensis* (Okada et al., 2015). Βέβαια, ο αριθμός των υβριδίων είναι σχετικά μικρός και ως εκ τούτου είναι σπάνιο να ανιχνευτούν στον αγρό λόγω μειωμένης προσαρμοστικότητας. Η μειωμένη προσαρμοστικότητα των υβριδίων οφείλεται στα διαφορετικά επίπεδα πλοειδίας των δύο γονέων (η *C. canadensis* είναι διπλοειδές και η *C. bonariensis* εξαπλοειδές) (Okada et al., 2015).

Τα παραπάνω καθιστούν αναγκαία τη χρήση μοριακών τεχνικών, οι οποίες είναι αξιόπιστες στη μελέτη της εξέλιξης, στο διαχωρισμό των ειδών και στην επίλυση ταξινομικών διαφορών μεταξύ των ειδών (Clegg and Zurawski, 1992; Kaloumenos et al., 2013b). Ειδικότερα, η αλληλούχηση χλωροπλαστικού DNA (cpDNA) έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί στην ταυτοποίηση διαφορετικών φυτικών ειδών (Clegg and Zurawski, 1992; Wolfe et al., 1987). Έτσι, αποφασίστηκε να ερευνηθεί η δυνατότητα χρήσης των περιοχών του χλωροπλαστικού DNA (cpDNA) των ειδών του γένους *Conyza* για την παροχή πληροφοριών σχετικά με τη μοριακή ταυτοποίησή τους.

## 5.2. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η προσαρμογή μοριακής μεθόδου [ανάλυση των *ITS2* και *rbcL* περιοχών του χλωροπλαστικού DNA (cpDNA)] για τη μοριακή ταυτοποίηση των ειδών *C. albida* και *C. bonariensis*.

## 5.3. Υλικά και μέθοδοι

### 5.3.1. Προέλευση σπόρων και παραγωγή φυτικού υλικού

Οι ανθεκτικότεροι πληθυσμοί *C. albida* (R1) και *C. bonariensis* (R6), καθώς επίσης οι ευαίσθητοι *C. albida* (S1) και *C. bonariensis* (S2) πληθυσμοί χρησιμοποιήθηκαν για τη μοριακή ταυτοποίησή τους κατά τη διάρκεια άνοιξη 2013-καλοκαίρι 2013. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε ανθεκτικό πληθυσμό προήλθαν από φυτά κόνυζας που επιβίωσαν και αναπτύχθηκαν κατά το πείραμα διερεύνησης ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών, ενώ οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε ευαίσθητο πληθυσμό προήλθαν από τους αντίστοιχους απέκαστους μάρτυρες κόνυζας που αναπτύχθηκαν κατά το ίδιο πείραμα.

Οι σπόροι από κάθε πληθυσμό (δύο ανθεκτικοί και δυο ευαίσθητοι) σπάρθηκαν σε πλαστικούς δίσκους των 24 θέσεων και διαστάσεων 6x5,5x5 cm για κάθε θέση. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα ανοικτού-κίτρινου και μαύρου χρώματος τύρφη σε αναλογία 1:2 (o/o). Σε κάθε θέση τοποθετήθηκαν περίπου 20 σπόροι κόνυζας επί της επιφάνειας του εδαφικού μίγματος και ακολούθως καλύφθηκαν με ένα πολύ λεπτό στρώμα του ίδιου εδαφικού μίγματος. Οι πλαστικοί δίσκοι, μετά τη σπορά, τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου (στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο) όπου, μετά την εμφάνιση των σποροφύτων κόνυζας, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις στο στάδιο των 2-4 φύλλων, ώστε τελικά, να παραμείνουν ομοιόμορφης ανάπτυξης φυτά κόνυζας σε κάθε πληθυσμό. Στη συνέχεια, έγινε μεταφύτευση τριών ομοιόμορφων ανεπτυγμένων φυτών κόνυζας σε κάθε φυτοδοχείο χωρητικότητας 1,5 L (τα οποία περιείχαν το προαναφερθέν μίγμα τύρφης) και όλα τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου. Η άρδευση των φυτών κόνυζας κατά τη διάρκεια του πειράματος γινόταν σύμφωνα με τις ανάγκες τους σε νερό, ενώ δεν πραγματοποιήθηκε λίπανση κατά τη διάρκεια του πειράματος. Κάθε εβδομάδα γινόταν τυχαιοποίηση εκ νέου των φυτοδοχείων.

Η εφαρμογή του glyphosate έγινε μεταφυτρωτικά όταν τα φυτά της κόνυζας ήταν στο στάδιο των 6-8 φύλλων. Για την εφαρμογή του glyphosate χρησιμοποιήθηκε

ψεκαστήρας ακριβείας ειδικής κατασκευής, ο οποίος φέρει ακροφύσιο τύπου ριπιδίου 8003, ρυθμισμένο ώστε να εφαρμόζει όγκο ψεκαστικού υγρού 30 L/στρ. με πίεση 280 kPa.

Το πειραματικό σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι πλήρεις ομάδες σε ελεύθερη διάταξη (RCBD, **R**andomized **C**omplete **B**lock **D**esign) και ο κάθε συνδυασμένος παράγοντας (πληθυσμός x δόση glyphosate) είχε τέσσερις επαναλήψεις-φυτοδοχεία (με τρία φυτά ανά φυτοδοχείο).

Οι επεμβάσεις του πειράματος για τους ανθεκτικούς πληθυσμούς περιελάμβαναν εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του glyphosate (63 g δ.ο./στρ.), ενώ οι ευαίσθητοι πληθυσμοί αφέθηκαν να αναπτυχθούν απουσία ζιζανιοκτόνου. Επιπλέον, για κάθε ανθεκτικό πληθυσμό υπήρχε και η επέμβαση του ανέκαστου μάρτυρα (μη εφαρμογή ζιζανιοκτόνου) με τέσσερα φυτοδοχεία-επαναλήψεις. Ο σκοπός της εφαρμογής αυτής ήταν η επιβεβαίωση της ανθεκτικότητας των χαρακτηρισθέντων ως ανθεκτικών πληθυσμών.

Τρεις εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate (3 WAT) συλλέχθηκε φυτικό υλικό (φύλλα) για να χρησιμοποιηθεί στις περαιτέρω εργαστηριακές εργασίες μοριακής ταυτοποίησης των ειδών που περιγράφονται στην παρακάτω ενότητα.

### **5.3.2. Διαδικασία μοριακής ταυτοποίησης ειδών του γένους *Conyza***

Τα φύλλα των φυτών από τους παραπάνω πληθυσμούς χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμου συνόλου αντιδραστηρίων και υλικών [Qiagen DNeasy plant mini kit (Qiagen, Crawley, UK)] με προδιαγεγραμμένο τρόπο και χρονική σειρά εφαρμογής ακολουθώντας πιστά τη μεθοδολογία που περιγράφεται στις οδηγίες χρήσης του παρασκευαστή. Η συγκέντρωση του DNA που παραλήφθηκε κατά την απομόνωση, προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα 260 και 280 nm (χρησιμοποιώντας Eppendorf BioPhotometer) και στη συνέχεια διαχωρίστηκε σε πηκτή αγαρόζης 0,8%. Τα δείγματα, αφού αραιώθηκαν σε 20 ng/μL, πάρθηκαν 25 μL (χρήση MJ θερμοκυκλοποιητή) που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Το μείγμα κάθε αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης περιείχε 20 ng γενωμικό DNA, 1 x PCR buffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM δεοξυριβονουκλεοτίδια, 300 nM forward και reverse εκκινητές (Πίνακας 5.1) και 0,5 U Kapa Taq DNA polymerase (Kapa Biosystems, Foster City, USA). Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή περιελάμβανε το αρχικό στάδιο τήξης στους 97 °C για 3 λεπτά ακολουθούμενους από 30 κύκλους



των 20 δευτερολέπτων στους 94 °C, των 40 δευτερολέπτων στους 54 °C και των 20-40 δευτερολέπτων στους 72 °C. Μετά το πέρας του 30<sup>ου</sup> κύκλου συμπεριλήφθηκε ένα τελικό στάδιο επέκτασης στους 72 °C για 2 λεπτά. Τα καθαρά προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αλληλουχίθηκαν αμέσως σε δύο κατευθύνσεις για κάθε τμήμα με Big Dye terminator v3.1 Cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) σε έναν αυτοματοποιημένο ABI 3730 αναλυτή (PE Applied Biosystems). Οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και αμινοξέων συγκρίθηκαν με χρήση του λογισμικού CLUSTAL W.

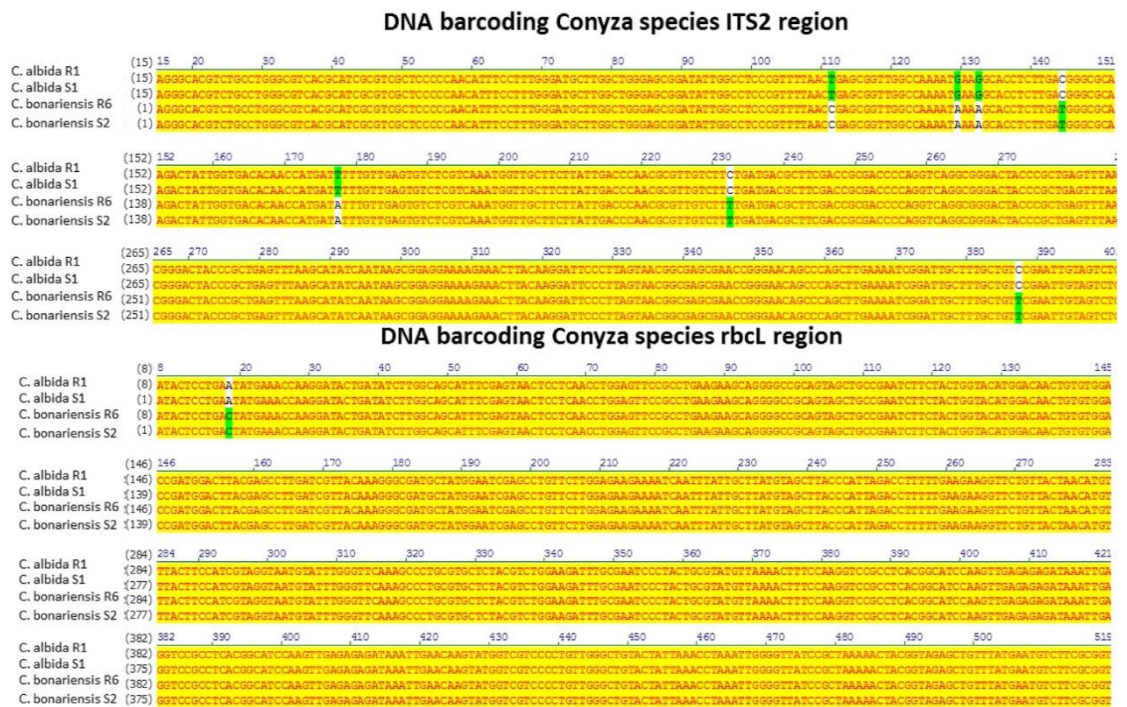
**Πίνακας 5.1.** Εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στη μοριακή ταυτοποίηση των δύο ειδών του γένους *Conyza*.

Περιοχή	Εκκινητής	Θερμοκ. (°C)	Πηγή
trnL-F	5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'	59	Taberlet et al. (2007)
trnL-R	5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3'	59	Taberlet et al. (2007)
rbcL-F	5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'	59	Hollingsworth et al. (2009)
rbcL-R	5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'	59	Hollingsworth et al. (2009)
ITS2-F	5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'	59	Chen et al. (2010)
ITS2-R	5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'	59	Chen et al. (2010)

#### 5.4. Αποτελέσματα και συζήτηση

Τα αποτελέσματα των έξι φυτών κάθε είδους ήταν ίδια. Ειδικότερα, στην *ITS2* (Second internal transcribed spacer) περιοχή του χλωροπλαστικού DNA (cpDNA) ανιχνεύτηκαν επτά σημειακές διαφορές στα νουκλεοτίδια μεταξύ των δύο ειδών, ανεξάρτητα από την ανθεκτικότητα ή την ευαισθησία τους στο glyphosate (Σχήμα 5.1). Επιπρόσθετα, στην *rbcL* [Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco)] περιοχή του χλωροπλαστικού DNA (cpDNA) ανιχνεύτηκε μια σημειακή διαφορά στα νουκλεοτίδια μεταξύ των δύο ειδών (Σχήμα 5.1), ενώ αντιθέτως στην

*trnL* [tRNA<sup>Leu</sup> (UAA) intron] περιοχή του χλωροπλαστικού DNA (cpDNA) δεν ανιχνεύθηκαν σημειακές διαφορές στα νουκλεοτίδια μεταξύ των δυο ειδών (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Οι σημειακές διαφορές που ανιχνεύθηκαν στα νουκλεοτίδια μεταξύ των δύο ειδών ήταν ανεξάρτητες από το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητας ή της ευαισθησίας των πληθυσμών *Conyza*.



**Σχήμα 5.1.** Γραμμικοδικός (αλληλούχηση νουκλεοτιδίων) των *ITS2* και *rbcl* περιοχών του χλωροπλαστικού DNA (cpDNA) ενός ανθεκτικού (R1) και ενός ευαίσθητου (S1) πληθυσμού *C. albida*, καθώς επίσης και ενός ανθεκτικού (R6) και ενός ευαίσθητου (S2) πληθυσμού *C. bonariensis*.

Η σύγκριση της αλληλούχησης του χλωροπλαστικού DNA (cpDNA) δείχνει ότι οι δύο ανθεκτικοί πληθυσμοί R1 και R6 ανήκουν στα είδη *C. albida* και *C. bonariensis*, αντίστοιχα, ενώ οι δύο ευαίσθητοι πληθυσμοί S1 και S2 ανήκουν στα είδη *C. albida* και *C. bonariensis*, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το χλωροπλαστικό DNA (cpDNA) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση των ειδών *C. albida* και *C. bonariensis*. Η *ITS2* περιοχή παρέχει αξιόπιστες πληροφορίες σε ποσοστό μεγαλύτερο του 97% για την αναγνώριση του γένους και σε ποσοστό μεγαλύτερο του 74% για την αναγνώριση του είδους (Chen et al., 2010) και έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για το διαχωρισμό των ψυχανθών (Madesis et al., 2012). Επιπρόσθετα, η *ITS2* περιοχή έδειξε μεγάλη ευαισθησία στο διαχωρισμό πολύ

συγγενών ειδών όπως συμβαίνει με τα είδη *C. albida* και *C. bonariensis*. Η μοριακή ταυτοποίηση των ειδών *C. albida* και *C. bonariensis* αναφέρθηκε για πρώτη φορά παγκοσμίως (Mylonas et al., 2014).

### Μοριακή βάση της ανθεκτικότητας πληθυσμών *Conyza albida* και *C. bonariensis* στο glyphosate

#### 6.1. Εισαγωγή

##### 6.1.1. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας της κόνυζας (*Conyza* spp.) στο glyphosate

Ο μηχανισμός ή οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας της κόνυζας (*Conyza* spp.) στο glyphosate δεν έχουν προσδιοριστεί επακριβώς έως σήμερα (Davis et al., 2010; Dinelli et al., 2008; Owen and Zelaya, 2005; Preston and Wakelin, 2008; VanGessel et al., 2009; Yuan et al., 2010). Οι περισσότερες έρευνες συγκλίνουν στο ότι ο πιθανότερος μηχανισμός ανθεκτικότητας σχετίζεται με τη μειωμένη μετακίνηση του glyphosate στο χώρο δράσης (χλωροπλάστης) (Dinelli et al., 2006, 2008; Feng et al., 2004; Ge et al., 2010, 2011; Koger and Ready, 2005), η οποία, για την *C. canadensis*, εικάζεται ότι οφείλεται σε ημικυρίαρχο γονίδιο του πυρήνα (Zelaya et al., 2004). Αυτό όμως που χρήζει ιδιαίτερης αναφοράς είναι ότι το γονίδιο (ή τα γονίδια), το οποίο ελέγχει (ή τα οποία ελέγχουν) τη μειωμένη μετακίνηση του glyphosate στο χώρο δράσης της *C. canadensis*, δεν έχει (ή δεν έχουν) αναγνωριστεί-ταυτοποιηθεί (αλληλουχηθεί) ακόμη (Davis et al., 2010; Yuan et al., 2010).

Διαφορές στη συγκέντρωση του σικιμικού οξέος έχουν παρατηρηθεί μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών *C. canadensis* μετά από ψεκασμό με glyphosate. Ειδικότερα, η συγκέντρωση του σικιμικού οξέος στους ανθεκτικούς πληθυσμούς μειώνεται 2-4 μέρες μετά την εφαρμογή του glyphosate (ενδεικτικό της ύπαρξης ανθεκτικού ενζύμου EPSPS), ενώ στους ευαίσθητους πληθυσμούς η συγκέντρωση του σικιμικού οξέος συνεχίζει να αυξάνει (Mueller et al., 2003; Owen and Zelaya, 2005). Οι Feng et al. (2004), οι Koger and Ready (2005) και οι Dinelli et al. (2006) ανέφεραν ότι η απορρόφηση του glyphosate δεν διέφερε μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών *C. canadensis*, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η ανθεκτικότητα οφείλεται σε διαφορές μετά την απορρόφηση του glyphosate. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Dinelli et al. (2008) για ανθεκτικούς και ευαίσθητους πληθυσμούς *C. bonariensis*. Ο μεταβολισμός του glyphosate δεν παρατηρήθηκε ως μηχανισμός ανθεκτικότητας σε ανθεκτικούς και ευαίσθητους πληθυσμούς *C. canadensis* και *C. bonariensis* (Dinelli et al., 2006, 2008; Feng et al.,

2004). Αντιθέτως, οι González-Torralva et al. (2012b) ανέφεραν ότι το glyphosate μεταβολίστηκε εξ ολοκλήρου σε ανθεκτικό πληθυσμό σε γλυοξυλικό, σαρκοσίνη και αμινομεθυλοφωσφονικό οξύ (AMPA) εντός 96 ωρών από την εφαρμογή, ενώ μεγάλη ποσότητα του glyphosate παρέμεινε στον ευαίσθητο πληθυσμό και ο μόνος μη τοξικός μεταβολίτης ήταν το γλυοξυλικό.

Η διαφορά στη μετακίνηση του glyphosate μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών προτάθηκε ως πιθανός μηχανισμός ανθεκτικότητας της *C. canadensis* (Feng et al., 2004; Koger and Ready, 2005). Ειδικότερα, οι Powles and Preston (2006) και Preston and Wakelin (2008) ανέφεραν ότι η μετακίνηση του glyphosate από τα φύλλα στις ρίζες των ανθεκτικών φυτών ήταν εξαιρετικά μειωμένη σε σύγκριση με τα ευαίσθητα φυτά. Οι διαφορές στη μετακίνηση αποδόθηκαν σε διαφορές κυτταρικής κατανομής που μειώνουν την είσοδο του glyphosate εντός του φλοιώματος, μειωμένη μετακίνηση στους χλωροπλάστες και ως εκ τούτου μειωμένη αναστολή της δράσης του ενζύμου EPSPS (Feng et al., 2004). Παρόμοιος μηχανισμός ανθεκτικότητας έχει αναφερθεί σε πληθυσμούς των ειδών *Lolium rigidum* (Lorraine-Colwill et al., 2002; Wakelin et al., 2004), *Lolium multiflorum* (Mchette et al., 2005, 2007; Perez et al., 2004; Perez-Jones et al., 2007) και *C. bonariensis* (Dinelli et al., 2008). Βέβαια, δεν αποκλείεται και άλλοι μηχανισμοί να συμβάλουν στην ανθεκτικότητα αυτών των ζιζανίων στο glyphosate (Preston and Wakelin, 2008).

Ο Ελευθεροχωρινός (2014) και ο Shaner (2009) αναφέρουν ως πιθανούς μηχανισμούς μέσω των οποίων η κυτταρική απορρόφηση του glyphosate και εν συνεχεία η μετακίνησή του μπορεί να είναι μειωμένη. Αυτοί είναι:

- 1) η περιορισμένη διέλευση του glyphosate δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης,
- 2) η μετακίνηση-εναπόθεση του glyphosate από το κυτταροδιάλυμα στο χυμοτόπιο (χώρος μη δράσης),
- 3) η μειωμένη μετακίνηση του glyphosate από το κυτταροδιάλυμα στο χλωροπλάστη (χώρος δράσης) ή απέκκρισή του από το χλωροπλάστη στο κυτταροδιάλυμα,
- 4) η απέκκριση του glyphosate από το κυτταροδιάλυμα στο κυτταρικό τοίχωμα.

Οι διεργασίες αυτές υποβοηθούνται ή παρεμποδίζονται από τη συμμετοχή **ABC** (ATP-εξααρτώμενων) διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών μεταφορέων [ATP-binding cassette (ABC) transporters] (Crouzet et al., 2013, Ελευθεροχωρινός, 2014; Ge et al., 2010, 2011; Peng et al., 2010; Sammons and Gaines, 2014; Shaner, 2009; Yuan et al., 2007, 2010). Οι Yuan et al. (2007) ανέφεραν ότι η ανθεκτικότητα ορισμένων πληθυσμών *C. canadensis* στο glyphosate σχετίζεται με τροποποιημένους

διαμεμβρανικούς πρωτεϊνικούς μεταφορείς. Οι διαμεμβρανικοί πρωτεϊνικοί μεταφορείς, εκτός από τη συμμετοχή τους στη ανθεκτικότητα του glyphosate, συμβάλλουν στη μεταφορά ανεπιθύμητων δευτερογενών μεταβολιτών και μεταβολιτών των ζιζανιοκτόνων στο χυμοτόπιο, στην απομάκρυνση τοξικών χημικών ενώσεων από τα φυτικά κύτταρα και στη μετακίνηση λιπαρών οξέων, φωσφολιπιδίων, αυξινών και βαρέων μετάλλων (Peng et al., 2010; Shaner, 2009; Yuan et al., 2007). Ο Shaner (2009) αναφέρει ότι οι ανθεκτικοί πληθυσμοί *C. canadensis* επάγουν την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν διαμεμβρανικούς πρωτεϊνικούς μεταφορείς που αναγνωρίζουν το glyphosate, το δεσμεύουν και το μεταφέρουν εντός του χυμοτοπίου (χώρος μη δράσης) ή το απεκκρίνουν στα κυτταρικά τοιχώματα. Αυτό έχει ως συνέπεια τη μειωμένη μετακίνηση του glyphosate στα μεριστώματα και ειδικότερα στους χλωροπλάστες (χώρος δράσης). Σύμφωνα με τις ίδιες πηγές (Shaner, 2009), υπάρχουν περισσότερα από 130 γονίδια που κωδικοποιούν διαμεμβρανικούς πρωτεϊνικούς μεταφορείς στα φυτά.

Οι Ge et al. (2010), χρησιμοποιώντας τις  $^{31}\text{P}$  NMR τεχνικές για τη διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς *C. canadensis*, ανέφεραν ότι η συσσώρευση του glyphosate είναι σημαντικά μεγαλύτερη στα χυμοτόπια των ανθεκτικών από ό,τι των ευαίσθητων πληθυσμών *C. canadensis*. Ειδικότερα, αν και η ίδια ποσότητα του glyphosate εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα των ανθεκτικών και των ευαίσθητων φυτών, το glyphosate μετακινείται ταχύτερα στα χυμοτόπια των ανθεκτικών και όχι των ευαίσθητων φυτών. Οι ίδιες τιμές pH των χυμοτοπίων των ανθεκτικών και ευαίσθητων φυτών απορρίπτει την υπόθεση ότι η μετακίνηση αυτή υποβοηθείται από τις διαφορετικές τιμές pH. Η διαπίστωση αυτή, σε συνδυασμό με την προτιμητέα μετακίνηση του glyphosate από το κυτταροδιάλυμα στο χυμοτόπιο των ανθεκτικών και όχι των ευαίσθητων φυτών, υποδηλώνει την παρουσία διαμεμβρανικού πρωτεϊνικού μεταφορέα στους ανθεκτικούς πληθυσμούς ή σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στους ανθεκτικούς από ό,τι στους ευαίσθητους πληθυσμούς. Η παραμένουσα μικρότερη ποσότητα glyphosate εντός του κυτταροπλάσματος των ανθεκτικών φυτών δεν αρκεί να αναστείλει πλήρως το ένζυμο EPSPS, όταν μετακινηθεί εντός των χλωροπλάστων. Η ερμηνεία αυτή εξηγεί ικανοποιητικά τη μειωμένη μετακίνηση glyphosate που έχει αναφερθεί από άλλους ερευνητές (Feng et al., 2004; Koger and Ready, 2005). Οι ευαίσθητοι πληθυσμοί αντιμετωπίζονται επειδή μεγαλύτερη ποσότητα glyphosate παραμένει διαθέσιμη εντός του κυτταροπλάσματος και μετακινείται στο χώρο δράσης, ενώ το glyphosate

που μετακινείται στο χυμοτόπιο, παραμένει επ' αόριστον ή αποδομείται ενζυμικά σε μη τοξικές ενώσεις (Ge et al., 2010).

Οι Ge et al. (2011) ανέφεραν ότι ο διαμεμβρανικός πρωτεϊνικός μεταφορέας, σε θερμές συνθήκες, υποβοηθά περισσότερο τη μετακίνηση του glyphosate από το κυτταροδιάλυμα στο χυμοτόπιο με αποτέλεσμα τη μη δράση του. Αντίθετα, σε ψυχρές συνθήκες, η μετακίνηση του glyphosate από το κυτταροδιάλυμα στο χυμοτόπιο μειώνεται σημαντικά με αποτέλεσμα να εκδηλώνεται η δράση του. Οι Nol et al. (2012) αναφέρουν ότι τα γονίδια M10 και M11 των διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών μεταφορέων εκφράζονται μόνον σε ανθεκτικό και μετρίως ανθεκτικό πληθυσμό *C. canadensis* αλλά όχι σε ευαίσθητο πληθυσμό, γεγονός που επιβεβαιώνει την πιθανή συμμετοχή των διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών μεταφορέων στη μειωμένη μετακίνηση του glyphosate και στην ως εκ τούτου δημιουργία του μηχανισμού ανθεκτικότητας της *C. canadensis* στο glyphosate. Διαφορετικές απόψεις για τα γονίδια M10 και M11 των διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών μεταφορέων αναφέρονται από τους Peng et al. (2010) και Sammons and Gaines (2014). Ειδικότερα, οι Peng et al. (2010) υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει σαφής ένδειξη ότι ο M11 διαμεμβρανικός πρωτεϊνικός μεταφορέας μπορεί να μετακινήσει το glyphosate, ενώ οι Sammons and Gaines (2014) αναφέρουν ότι δεν είναι επαρκώς τεκμηριωμένο εάν οι M10, M11 ή άλλοι διαμεμβρανικοί πρωτεϊνικοί μεταφορείς έχουν άμεσο ρόλο στη μεταφορά του ζιζανιοκτόνου glyphosate στο χυμοτόπιο των ανθεκτικών φυτών της *C. canadensis*. Σύμφωνα με τις ίδιες πηγές (Sammons and Gaines, 2014), επιπρόσθετες μελέτες κρίνονται απαραίτητες για να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος (ή ρόλοι) των διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών μεταφορέων, συμπεριλαμβανομένων και των M10 και M11, στη μετακίνηση του glyphosate εντός των ανθεκτικών φυτών των ζιζανίων. Οι Tani et al. (2015) ανέφεραν ότι η ανθεκτικότητα ορισμένων πληθυσμών *C. canadensis* στο glyphosate δεν σχετίζεται με σημειακή μετάλλαξη στη θέση 106 του ενζύμου EPSPS αλλά με συγχρονισμό υπερέκφρασης του ενζύμου EPSPS και της παρουσίας ABC διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών μεταφορέων.

Η ανθεκτικότητα ορισμένων πληθυσμών *C. canadensis* και *C. bonariensis*, εκτός από τη μειωμένη μετακίνηση του glyphosate από τα φύλλα στους βλαστούς και στις ρίζες των φυτών, αποδόθηκε και σε υπερπαραγωγή του ευαίσθητου ενζύμου EPSPS, η οποία οφειλόταν σε αυξημένη έκφραση του γονιδίου *epsps* λόγω της παρουσίας καταλληλότερου υποκινητή-προαγωγέα (Dinelli et al., 2006, 2008; Ελευθεροχωρινός, 2014).

## 6.2. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αλληλούχηση τμήματος του γονιδίου *epsps* από έναν ανθεκτικό και έναν ευαίσθητο πληθυσμό *C. albida* και *C. bonariensis* για ανίχνευση-εντοπισμό πιθανών σημειακών μεταλλάξεων υπεύθυνων για την ανθεκτικότητα στο glyphosate.

## 6.3. Υλικά και μέθοδοι

### 6.3.1. Προέλευση σπόρων και παραγωγή φυτικού υλικού

Οι ανθεκτικότεροι πληθυσμοί *C. albida* (R1) και *C. bonariensis* (R6), καθώς επίσης οι ευαίσθητοι *C. albida* (S1) και *C. bonariensis* (S2) πληθυσμοί χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της μοριακής βάσης της ανθεκτικότητας στο glyphosate κατά τη διάρκεια άνοιξη 2013-καλοκαίρι 2013. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε ανθεκτικό πληθυσμό προήλθαν από φυτά κόνυζας που επιβίωσαν και αναπτύχθηκαν κατά το πείραμα διερεύνησης ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών, ενώ οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε ευαίσθητο πληθυσμό προήλθαν από τους αντίστοιχους αντέκαστους μάρτυρες κόνυζας που αναπτύχθηκαν κατά το ίδιο πείραμα.

Οι σπόροι από κάθε πληθυσμό (δύο ανθεκτικοί και δυο ευαίσθητοι) σπάρθηκαν σε πλαστικούς δίσκους των 24 θέσεων και διαστάσεων 6x5,5x5 cm για κάθε θέση. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα ανοικτού-κίτρινου και μαύρου χρώματος τύρφη σε αναλογία 1:2 (ο/ο). Σε κάθε θέση τοποθετήθηκαν περίπου 20 σπόροι κόνυζας επί της επιφάνειας του εδαφικού μίγματος και ακολούθως καλύφθηκαν με ένα πολύ λεπτό στρώμα του ίδιου εδαφικού μίγματος. Οι πλαστικοί δίσκοι, μετά τη σπορά, τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου (στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο) όπου, μετά την εμφάνιση των σποροφύτων κόνυζας, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις στο στάδιο των 2-4 φύλλων, ώστε τελικά, να παραμείνουν ομοιόμορφης ανάπτυξης φυτά κόνυζας σε κάθε πληθυσμό. Στη συνέχεια, έγινε μεταφύτευση τριών ομοιόμορφων ανεπτυγμένων φυτών κόνυζας σε κάθε φυτοδοχείο χωρητικότητας 1,5 L (τα οποία περιείχαν το προαναφερθέν μείγμα τύρφης) και όλα τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου. Η άρδευση των φυτών κόνυζας κατά τη διάρκεια του πειράματος γινόταν σύμφωνα με τις ανάγκες τους σε νερό, ενώ δεν πραγματοποιήθηκε λίπανση κατά τη διάρκεια του πειράματος. Κάθε εβδομάδα γινόταν τυχαιοποίηση εκ νέου των φυτοδοχείων.



Η εφαρμογή του glyphosate έγινε μεταφυτρωτικά όταν τα φυτά της κόνυζας ήταν στο στάδιο των 6-8 φύλλων. Για την εφαρμογή του glyphosate χρησιμοποιήθηκε ψεκαστήρας ακριβείας ειδικής κατασκευής, ο οποίος φέρει ακροφύσιο τύπου ριπιδίου 8003, ρυθμισμένο ώστε να εφαρμόζει όγκο ψεκαστικού υγρού 30 L/στρ. με πίεση 280 kPa.

Το πειραματικό σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι πλήρεις ομάδες σε ελεύθερη διάταξη (RCBD, **R**andomized **C**omplete **B**lock **D**esign) και ο κάθε συνδυασμένος παράγοντας (πληθυσμός x δόση glyphosate) είχε τέσσερις επαναλήψεις-φυτοδοχεία (με τρία φυτά ανά φυτοδοχείο).

Οι επεμβάσεις του πειράματος για τους ανθεκτικούς πληθυσμούς περιελάμβαναν εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του glyphosate (63 g δ.ο./στρ.), ενώ οι ευαίσθητοι πληθυσμοί αφέθηκαν να αναπτυχθούν απουσία ζιζανιοκτόνου. Επιπλέον, για κάθε ανθεκτικό πληθυσμό υπήρχε και η επέμβαση του απέκαστου μάρτυρα (μη εφαρμογή ζιζανιοκτόνου) με τέσσερα φυτοδοχεία-επαναλήψεις. Ο σκοπός της εφαρμογής αυτής ήταν η επιβεβαίωση της ανθεκτικότητας των χαρακτηρισθέντων ως ανθεκτικών πληθυσμών.

Τρεις εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate (3 WAT) συλλέχθηκε φυτικό υλικό (φύλλα) για να χρησιμοποιηθεί στις περαιτέρω εργαστηριακές εργασίες που περιγράφονται στην παρακάτω ενότητα.

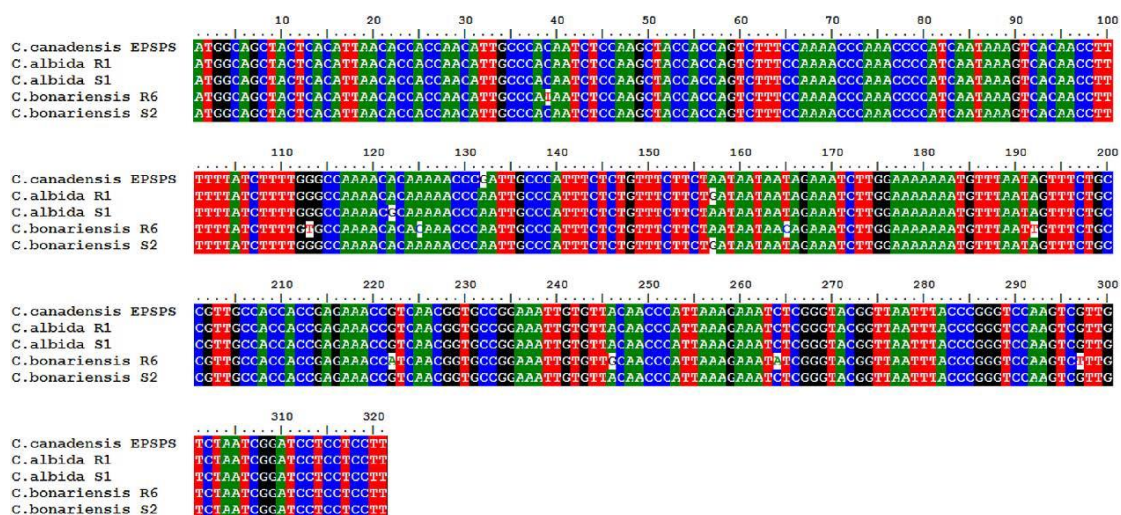
### **6.3.2. Ενίσχυση και αλληλούχηση τμήματος του γονιδίου *epsps***

Το συνολικό RNA απομονώθηκε από τα φύλλα ενός ανθεκτικού πληθυσμού *C. albida* (R1), ενός ανθεκτικού πληθυσμού *C. bonariensis* (R6), ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* (S1) και ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis* (S2) χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο TRIZOL (Invitrogen) και ακολουθώντας πιστά τη μεθοδολογία, όπως αυτή περιγράφεται στις οδηγίες του παρασκευαστή. Το RNA μεταγράφηκε αντίστροφα σε γενωμικό DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας 200u SuperScript II-RT (Invitrogen) σε μείγμα αντίδρασης 50 μL, το οποίο περιείχε 1 μg συνολικό RNA, 0,5 μg 3' RACE adapter εκκινήτη 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTA (T)17-3' (Invitrogen), 0,5 mM dNTPs, 1 x first strand buffer (Invitrogen) και 10 mM DTT (Invitrogen). Οι αντιδράσεις επώαστηκαν για 50 λεπτά στους 42 °C και στη συνέχεια για 15 λεπτά στους 70 °C για να αδρανοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφή (RT).

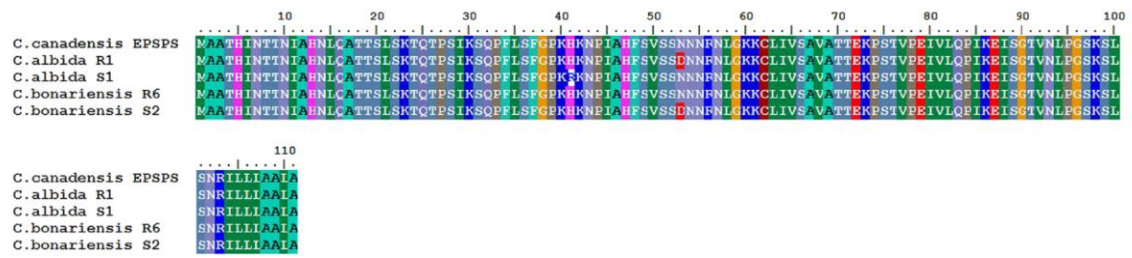
Η απομόνωση του γονιδίου *epsps* έγινε με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) σε συνολικό όγκο αντίδρασης 50  $\mu$ L χρησιμοποιώντας Eppendorf Master-cycler Gradient θερμοκυκλοποιητή (Brinkman Instruments, Westbury, NY). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση τις δημοσιευμένες αλληλουχίες του γονιδίου *epsps* (Peng et al., 2010): EPSPS1F (23 mer) 5'-ATGGCAGCTACTCACATTAACAC-3' και EPSPS1R (22 mer) 5'-GCAAACCACTACCCATAATCAC. Ποσοστό 10% του γενωμικού DNA (cDNA) που συντέθηκε (χρησιμοποιήθηκαν 50 ng από 25 ng DNA/ $\mu$ l σε κάθε αντίδραση για κάθε δείγμα) χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης που περιείχε 0,4 mM EPSPS1F, 0,4 mM EPSPS1R, 0,2 mM dNTPs και 1 U Accuzyme DNA polymerase (Bioline). Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή περιελάμβανε το αρχικό στάδιο τήξης στους 97 °C για 3 λεπτά ακολουθούμενος από 35 κύκλους των 15 δευτερολέπτων στους 97 °C, των 45 δευτερολέπτων στους 60 °C και των 2 λεπτών στους 72 °C. Μετά το πέρας του 35<sup>ου</sup> κύκλου συμπεριλήφθηκε ένα τελικό στάδιο επέκτασης στους 72 °C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, το προϊόν κάθε αλυσιδωτής αντίδρασης διαχωρίστηκε σε πηκτή αγαρόζης 1,5%, από όπου η ζώνη που αντιστοιχούσε στο τμήμα του γονιδίου *epsps* εντοπίστηκε και αποκόπηκε. Η παραλαβή του τμήματος του γονιδίου *epsps* από την πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με χρήση εμπορικά διαθέσιμου συνόλου αντιδραστηρίων και υλικών [Pure Link PCR Purification Kit (Invitrogen)], αλλά με προδιαγεγραμμένο τρόπο και χρονική σειρά χρήσης ακολουθώντας τη μεθοδολογία που περιγράφεται στις οδηγίες χρήσης του παρασκευαστή. Τα καθαρά προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αλληλουχίστηκαν αμέσως σε δύο κατευθύνσεις για κάθε τμήμα με Big Dye terminator v3.1 Cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) σε έναν αυτοματοποιημένο ABI 3730 αναλυτή (PE Applied Biosystems). Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων αλληλούχησης έγινε με χρήση του λογισμικού BioEdit. Το ίδιο λογισμικό χρησιμοποιήθηκε και για τη μετάφραση των αλληλουχιών νουκλεοτιδίων σε αντίστοιχη αλληλουχία αμινοξέων. Οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και αμινοξέων συγκρίθηκαν με χρήση του λογισμικού CLUSTAL W χρησιμοποιώντας την αντίστοιχη αλληλούχηση του γονιδίου *epsps* για την *C. canadensis* (Peng et al., 2010).

## 6.4. Αποτελέσματα και συζήτηση

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης τμήματος του γονιδίου *epsps* των ειδών *C. albida* και *C. bonariensis* των έξι φυτών από κάθε πληθυσμό ήταν ίδια, ενώ η σύγκριση των νουκλεοτιδίων με το γονίδιο *epsps* της *C. canadensis* έδειξε σημειακές αλλαγές (Σχήμα 6.1). Βέβαια, αν και οι σημειακές αλλαγές οδήγησαν σε αντικατάσταση της ιστιδίνης (**His**) στη θέση **41** του ενζύμου EPSPS από αργινίνη (**Arg**), η αντικατάσταση αυτή δεν σχετίζεται με την αντικατάσταση της προλίνης (**Pro**) στη θέση **106** του ενζύμου EPSPS από σερίνη (**Ser**), θρεονίνη (**Thr**), αλανίνη (**Ala**) ή λευκίνη (**Leu**) η οποία, όπως έχει αναφερθεί, σχετίζεται με την ανθεκτικότητα του ενζύμου EPSPS στο glyphosate (Σχήμα 6.2) (Beckie, 2011; Powles and Preston, 2006; Powles and Yu, 2010; Samons and Gaines, 2014; Shaner, 2009; Shaner et al., 2012).



**Σχήμα 6.1.** Αλληλούχηση τμήματος του γονιδίου *epsps* ενός ανθεκτικού (R1) και ενός ευαίσθητου (S1) πληθυσμού *C. albida*, καθώς επίσης και ενός ανθεκτικού (R6) και ενός ευαίσθητου (S2) πληθυσμού *C. bonariensis* συγκρινόμενα με την *C. canadensis* (Peng et al., 2010).



**Σχήμα 6.2.** Αλληλούχηση τμήματος του ενζύμου EPSPS ενός ανθεκτικού (R1) και ενός ευαίσθητου (S1) πληθυσμού *C. albida*, καθώς επίσης και ενός ανθεκτικού (R6) και ενός ευαίσθητου (S2) πληθυσμού *C. bonariensis* συγκρινόμενα με την *C. canadensis* (Peng et al., 2010).

Επειδή η αλληλούχηση του γονιδίου *epsps* στους ανθεκτικότερους πληθυσμούς *C. albida* και *C. bonariensis* καθώς και στους ευαίσθητους πληθυσμούς *C. albida* και *C. bonariensis* δεν έδειξε σημειακές μεταλλάξεις του ενζύμου EPSPS που να εξηγούν την ανθεκτικότητα στο glyphosate αποφασίστηκε να μην αλληλουχηθούν οι υπόλοιποι ανθεκτικοί πληθυσμοί *C. albida* και *C. bonariensis*.

Το γεγονός ότι οι ανθεκτικότεροι πληθυσμοί *C. albida* και *C. bonariensis* δεν εμφάνισαν σημειακές μεταλλάξεις στη θέση **106** του ενζύμου EPSPS μας οδηγεί στην υπόθεση ότι ο πιθανότερος μηχανισμός ανθεκτικότητας αυτών των πληθυσμών σχετίζεται με τη μειωμένη μετακίνηση του glyphosate στο χώρο δράσης (χλωροπλάστης) (**NTSR, non-target site resistance**) (Dinelli et al., 2006, 2008; Feng et al., 2004; Ge et al., 2010, 2011; Koger and Ready, 2005). Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας της *C. albida* στο glyphosate αναφέρθηκε για πρώτη φορά παγκοσμίως (Mylonas et al., 2014).

### Ξενογλώσση βιβλιογραφία

- Adkins, S.W., Tanpipat, A., Swarbrick, J.T., Boersma, M., 1998. Influence of environmental factors on glyphosate efficacy when applied to *Avena fatua* or *Urochloa panicoides*. *Weed Research* 38, 129-138.
- Alarcón-Reverte, R., García, A., Urzúa, J., Fischer, A.J., 2013. Resistance to glyphosate in junglerice (*Echinochloa colona*) from California. *Weed Science* 61, 48-54.
- Alcocer-Ruthling, M., Thill, D.C., Shafi, B., 1992a. Differential competitiveness of sulfonylurea resistant and susceptible prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology* 6, 303-309.
- Alcocer-Ruthling, M., Thill, D.C., Mallory-Smith, C., 1992b. Monitoring the occurrence of sulfonylurea-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology* 6, 437-430.
- Alcorta, M., Fidelibus, M.W., Steenwerth, K.L., Shrestha, A., 2011. Effect of vineyard row orientation on growth and phenology of glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science* 59, 55-60.
- Baerson, S.R., Rodriguez, D.L., Tran, M., Feng, Y., Biest, N.A., Dill, G.M., 2002. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme-5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate-synthase. *Plant Physiology* 129, 1265-1275.
- Baylis, A.D., 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science* 56, 299-308.
- Beckie, H.J., 2006. Herbicide-resistant weeds: management tactics and practices. *Weed Technology* 20, 793-814.
- Beckie, H.J., 2011. Herbicide-resistant weed management: focus on glyphosate. *Pest Management Science* 67, 1037-1048.
- Bell, M.S., Hager, A.G., Tranel, P.J., 2013. Multiple resistance to herbicides from four site-of-action groups in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). *Weed Science* 61, 460-468.

- Bostamam, Y., Malone, J.M., Dolman, F.C., Boutsalis, P., Preston, C., 2012. Rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) populations containing a target site mutation in EPSPS and reduced glyphosate translocation are more resistant to glyphosate. *Weed Science* 60, 474-479.
- Bourdot, G.W., Saville, D.J., Hurrell, G.A., 1996. Ecological fitness and the decline of resistance to the herbicide MCPA in a population of *Ranunculus acris*. *Journal of Applied Ecology* 33, 151-160.
- Brabham, C.B., Gerber, C.K., Johnson, W.G., 2011. Fate of glyphosate-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*) in the presence and absence of glyphosate. *Weed Science* 59, 506-511.
- Bradshaw, L.D., Padgett, S.R., Kimball, S.L., Wells, B.H., 1997. Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technology* 11, 189-198.
- Brown, S.M., Whitwell, T., 1988. Influence of tillage on horseweed, *Conyza canadensis*. *Weed Technology* 2, 269-270.
- Bruce, J.A., Kells, J.J., 1990. Horseweed (*Conyza canadensis*) control in no-tillage soybeans (*Glycine max*) with preplant and preemergence herbicides. *Weed Technology* 4, 642-647.
- Buhler, D.D., Owen, M.D.K., 1997. Emergence and survival of horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science* 45 98-101.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Ying, L., Li, X., Jia, X., Lin, Y., Leon, C., 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *Plos One* 5, e8613. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>.
- Christoffers, M.J., 1999. Genetic aspects of herbicide-resistant weed management. *Weed Technology* 13, 647-652.
- Clegg, M.T., Zurawski, G., 1992. Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects, in: Soltis, P.S., Soltis, D.E., Doyle, J.J. (Eds.), *Molecular Systematics of Plants*. Chapman & Hall., New York, pp. 1-13.
- Collavo, A., Sattin, M., 2012. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum* selected in Italian perennial crops: bioevaluation, management and molecular bases of target-site resistance. *Weed Research* 52, 16-24.
- Cornish, P.S., 1992. Glyphosate residues in a sandy soil affect tomato transplants. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 32, 395-399.

- Coustau, C., Chevillon, C., Ffrench-Constant, R., 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends in Ecology and Evolution* 15, 378-383.
- Cronquist, A., 1976. *Conyza* Less., in: Tutin T.G., et al. (Eds.), *Flora Europaea*. Cambridge University Press., London, 4, p. 120.
- Crouzet, J., Roland, J., Peeters, E., Trombik, T., Ducos, E., Nader, J., Boutry, M., 2013. NtPDR1, a plasma membrane ABC transporter from *Nicotiana tabacum*, is involved in diterpene transport. *Plant Molecular Biology* 82, 181-192.
- Culpepper, A.S., Grey, T.L., Vencill, W.K., Kichler, J.M., Webster, T.M., Brown, S.M., York, A.C., Davis, J.W., Hanna, W.W., 2006. Glyphosate-resistant palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. *Weed Science* 54, 620-626.
- Danin, A., 1976a. Notes on four adventive composites in Israel. *Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh* 34, 403-410.
- Danin, A., 1976b. On three adventive species of *Conyza* (Compositae) in Greece. *Candollea* 31, 107-109.
- Darmency, H., Picard, J.C., Wang, T., 2011. Fitness costs linked to dinitroaniline resistance mutation in *Setaria*. *Heredity* 107, 80-86.
- Davis, V.M., Johnson, W.G., 2008. Glyphosate-Resistant horseweed (*Conyza canadensis*) Emergence, survival, and fecundity in no-till soybean. *Weed Science* 56, 231-236.
- Davis, V.M., Gibson, K.D., Johnson, W.G., 2008. A field survey to determine distribution and frequency of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) in Indiana. *Weed Technology* 22, 331-338.
- Davis, V.M., Kruger, G.R., Stachler, J.M., Loux, M.M., Johnson, W.G., 2009. Growth and seed production of horseweed (*Conyza canadensis*) populations resistant to Glyphosate, ALS-Inhibiting, and multiple (Glyphosate + ALS-Inhibiting) herbicides. *Weed Science* 57, 494-504.
- Davis, V.M., Kruger, G.R., Hallett, S.G., Tranel, P.J., Johnson, W.G., 2010. Heritability of glyphosate resistance in Indiana horseweed (*Conyza canadensis*) populations. *Weed Science* 58, 30-38.
- de Carvalho, L.B., Alves, P.L.D.C.A., González-Torralva, F., Cruz-Hipolito, H.E., Rojano-Delgado, A.M., De Prado, R., Gil-Humanes, J., Barro, F., de Castro, M.D.L., 2012. Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 615-622.



- Délye, C., 2013a. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Management Science* 69, 176-187.
- Délye, C., Jasieniuk, M., Le Corre, V., 2013b. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics* 29, 649-658.
- De Prado, R.A., Franco, A.R., 2004. Cross-resistance and herbicide metabolism in grass weeds in Europe: biochemical and physiological aspects. *Weed Science* 52, 441-447.
- Dill, G.M., 2005. Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Management Science* 61, 219-224.
- Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P., Barnes, J., 2006. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86, 30-41.
- Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti, A., Catizone, P., Urbano, J.M., Barnes, J., 2008. Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. *Weed Research* 48, 257-265.
- Duke, S.O., Powles, S.B., 2008a. Glyphosate-resistant weeds and crops. *Pest Management Science* 64, 317-318.
- Duke, S.O., Powles, S.B., 2008b. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* 64, 319-325.
- Economou, G., Tzakou, O., Gani, A., Yannitsaros, A., Bilalis, D., 2002. Allelopathic effect of *Conyza albida* on *Avena sativa* and *Spirodela polyrhiza*. *Journal of Agronomy and Crop Science* 188, 248-253.
- Eleftherohorinos, I.G., Vasilakoglou, I.B., Dhima, K.V., 2000. Metribuzin resistance in *Amaranthus retroflexus* and *Chenopodium album* in Greece. *Weed Science* 48, 69-74.
- Eubank, T.W., Poston, D.H., Nandula, V.K., Koger, C.H., Shaw, D.R., Reynolds, D.B., 2008. Glyphosate-Resistant horseweed (*Conyza canadensis*) control using glyphosate-, paraquat-, and glufosinate-based herbicide programs. *Weed Technology* 22, 16-21.
- Feng, P.C.C., Tran, M., Chiu, T., Sammons, R.D., Heck, G.R., Cajacob, C.A., 2004. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Science* 52, 498-505.

- Gaines, T.A., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S.T., Shaner, D.L., Nissen, S.J., Patzoldt, W.L., Tranel, P.J., Culpepper, A.S., Grey, T.L., Webster, T.M., Vencill, W.K., Sammons, R.D., Jiang, J., Preston, C., Leach, J.E., Westra, P., 2010. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 1029-1034.
- Gaines, T.A., Wright, A.A., Molin, W.T., Lorentz, L., Riggins, C.W., Tranel, P.J., Beffa, R., Westra, P., Powles, S.B., 2013. Identification of genetic elements associated with *EPSPS* gene amplification. *Plos One* 8, e65819. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0065819>.
- Gasquez, J., 1997. Genetics of herbicide resistance within weeds. Factors of evolution, inheritance and fitness. in: De Prado, R., Jorrín, J., García-Torres, L. (Eds.), *Weed and Crop Resistance to Herbicides*. Kluwer Academic Publishers., Dordrecht, The Netherlands, pp. 181-190.
- Ge, X., d'Avignon, D.A., Ackerman, J.J.H., Sammons, R.D., 2010. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Management Science* 66, 345-348.
- Ge, X., d'Avignon, D.A., Ackerman, J.J.H., Duncan, B., Spaur, M.B., Sammons, R.D., 2011. Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by  $^{31}\text{P}$  NMR. *Pest Management Science* 67, 1215-1221.
- Giannopolitis, C.N., Vassiliou, G., 1989. Propanil tolerance in *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. *Tropical Pest Management* 35, 6-7.
- González-Torralva, F., Cruz-Hipolito, H., Bastida, F., Mülleder, N., Smeda, R.J., De Prado, R., 2010. Differential susceptibility to glyphosate among the *Conyza* weed species in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 4361-4366.
- González-Torralva, F., Gil-Humanes, J., Barro, F., Brants, I., De Prado, R., 2012a. Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain. *Plant Physiology and Biochemistry* 58, 16-22.
- González-Torralva, F., Rojano-Delgado, A.M., Luque de Castro, M.D., Mülleder, N., De Prado, R., 2012b. Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-

- resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. *Journal of Plant Physiology* 169, 1673-1679.
- Green, J.M., 2007. Review of glyphosate and ALS-inhibiting herbicide crop resistance and resistant weed management. *Weed Technology* 21, 547-558.
- Green, J.M., 2009. Evolution of glyphosate-resistant crop technology. *Weed Science* 57, 108-117.
- Hall, J.C., Romano, M.L., 1995. Morphological and physiological differences between the auxinic herbicide-susceptible (S) and-resistant (R) wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 52, 149-155.
- Heap, I., 2014. Global perspective of herbicide-resistant weeds. *Pest Management Science* 70, 1306-1315.
- Heap, I., 2016. International survey of herbicide resistant weeds. Available at website <http://www.weedscience.org> (accessed 17.02.2016).
- Herbicide Resistance Action Committee (HRAC), 2016. Management of Resistance. Available at website [http://www.hracglobal.com/pages/management\\_ofresistance.aspx](http://www.hracglobal.com/pages/management_ofresistance.aspx) (accessed 17.02.2016).
- Hermann, K.M., Weaver, L.M., 1999. The shikimic pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 473-503.
- Heywood, V.H., 1993. *Flowering Plants of the World*, Oxford University Press, New York.
- Hollingsworth, P.M., et al., 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12794-12797.
- Holm, L., Doll, J., Holm, E., Pancho, J., Herberger, J., 1997. *Conyza canadensis* (L.) Cronq. (syn. *Erigeron canadensis* L.), *World Weeds: Natural Histories and Distribution*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 226-235.
- Holt, J.S., Thill, D.C., 1994. Growth and productivity of resistant plants, in: Powles, S.B., Holtum, J.A.M. (Eds.), *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 299-316.
- Jasieniuk, M., Ahmad, R., Sherwood, A.M., Firestone, J.L., Perez-Jones, A., Lanini, W.T., Mallory-Smith, C., Stednick, Z., 2008. Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California: distribution, response to

- glyphosate, and molecular evidence for an altered target enzyme. *Weed Science* 56, 496-502.
- Kaloumenos, N.S., Eleftherohorinos, I.G., 2008. Corn poppy (*Papaver rhoeas*) resistance to ALS-inhibiting herbicides and its impact on growth rate. *Weed Science* 56, 789-796.
- Kaloumenos, N.S., Dordas, C.A., Diamantidis, G.C., Eleftherohorinos, I.G., 2009a. Multiple Pro<sub>197</sub> substitutions in the acetolactate synthase of corn poppy (*Papaver rhoeas*) confer resistance to tribenuron. *Weed Science* 57, 362-368.
- Kaloumenos, N.S., Eleftherohorinos, I.G., 2009b. Identification of a johnsongrass (*Sorghum halepense*) biotype resistant to ACCase-inhibiting herbicides in Northern Greece. *Weed Technology* 23, 470-476.
- Kaloumenos, N.S., Adamouli, V.N., Dordas, C.A., Eleftherohorinos, I.G., 2011. Corn poppy (*Papaver rhoeas*) cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides. *Pest Management Science* 67, 574-585.
- Kaloumenos, N.S., Tsioni, V.C., Daliani, E.G., Papavassileiou, S.E., Vassileiou, A.G., Laoutidou, P.N., Eleftherohorinos, I.G., 2012. Multiple Pro-197 substitutions in the acetolactate synthase of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) and their impact on chlorsulfuron activity and plant growth. *Crop Protection* 38, 35-43.
- Kaloumenos, N.S., Capote, N., Aguado, A., Eleftherohorinos, I.G., 2013a. Red rice (*Oryza sativa*) cross-resistance to imidazolinone herbicides used in resistant cultivars grown in northern Greece. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105, 177-183.
- Kaloumenos, N.S., Chatzilazaridou, S.L., Mylona, P.V., Polidoros, A.N., Eleftherohorinos, I.G., 2013b. Target-site mutation associated with cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides in late watergrass (*Echinochloa oryzicola* Vasing). *Pest Management Science* 69, 865-873.
- Kapusta, G., 1979. Seedbed tillage and herbicide influence on soybean (*Glycine max*) weed control and yield. *Weed Science* 27, 520-526.
- Karlsson, L.M., Milberg, P., 2007. Comparing after-ripening response and germination requirements of *Conyza canadensis* and *C. bonariensis* (Asteraceae) through logistic functions. *Weed Research* 47, 433-441.
- Kaundun, S.S., Zelaya, I.A., Dale, R.P., Lycett, A.J., Carter, P., Sharples, K.R., McIndoe, E., 2008. Importance of the P106S target-site mutation in conferring

- resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from Philippines. *Weed Science* 56, 637-646.
- Kaundun, S.S., Dale, R.P., Zelaya, I.A., Dinelli, G., Marotti, I., McIndoe, E., Cairns, A., 2011. A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism(s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum* population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 3227-3233.
- Koger, C.H., Poston, D.H., Hayes, R.M., Montgomery, R.F., 2004. Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) in Mississippi. *Weed Technology* 18, 820-825.
- Koger, C.H., Reddy, K.N., 2005. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science* 53, 84-89.
- Kotoula-Syka, E., Tal, A., Rubin, B., 2000. Diclofop-resistant *Lolium rigidum* from northern Greece with cross-resistance to ACCase inhibitors and multiple resistance to chlorsulfuron. *Pest Management Science* 56, 1054-1058.
- Kruger, G.R., Davis, V.M., Weller, S.C., Stachler, J.M., Loux, M.M., Johnson, W.G., 2009. Frequency, distribution, and characterization of horseweed (*Conyza canadensis*) biotypes with resistance to Glyphosate and ALS-Inhibiting herbicides. *Weed Science* 57, 652-659.
- Kruger, G.R., Davis, V.M., Weller, S.C., Johnson, W.G., 2010. Control of horseweed (*Conyza canadensis*) with growth regulator herbicides. *Weed Technology* 24, 425-429.
- Lande, R., 1983. The response to selection on major and minor mutations affecting a metrical trait. *Heredity* 50, 47-65.
- LeBaron, H.M., 1987. Genetic engineering for herbicide resistance. Introduction. *Weed Science* 35 (Suppl. 1), 2-3.
- Lee, L.J., Ngim, J., 2000. A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gaertn) in Malaysia. *Pest Management Science* 56, 336-339.
- Llewellyn, R.S., Powles S.B., 2001. High levels of herbicide resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in the wheat belt of Western Australia. *Weed Technology* 15, 242-248.
- Lorraine-Colwill, D.F., Powles, S.B., Hawkes, T.R., Hollinshead, P.H., Warner, S.A.J., Preston, C., 2002. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74, 62-72.

- Madesis, P., Ganopoulos, I., Anagnostis, A., Tsaftaris, A., 2012. The application of Bar-HRM (Barcode DNA-High Resolution Melting) analysis for authenticity testing and quantitative detection of bean crops (Leguminosae) without prior DNA purification. *Food Control* 25, 576-582.
- Michitte, P., De Prado, R., Espinoza, N., Gauvrit, C., 2005. Glyphosate resistance in a Chilean *Lolium multiflorum*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 70, 507-513.
- Michitte, P., De Prado, R., Espinoza, N., Ruiz-Santaella, J.P., Gauvrit, C., 2007. Mechanisms of resistance to glyphosate in a ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Science* 55, 435-440.
- Monaco, T.J., Weller, S.C., Ashton, F.M., 2002. *Weed Science: Principles and Practices*, fourth ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Moretti, M.L., Hanson, B.D., Hembree, K.J., Shrestha, A., 2013. Glyphosate resistance is more variable than paraquat resistance in a multiple-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) population. *Weed Science* 61, 396-402.
- Mueller, T.C., Massey, J.H., Hayes, R.M., Main, C.L., Stewart Jr, C.N., 2003. Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 680-684.
- Mylonas, P.N., Giannopolitis, C.N., Efthimiadis, P.G., Menexes, G.C., Madesis, P.B., Eleftherohorinos, I.G., 2014. Glyphosate resistance of molecularly identified *Conyza albida* and *C. bonariensis* populations. *Crop Protection* 65, 207-215.
- Nandula, V.K., Eubank, T.W., Poston, D.H., Koger, C.H., Reddy, K.N., 2006. Factors affecting germination of horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science* 54, 898-902.
- Nandula, V.K., Ray, J.D., Ribeiro, D.N., Pan, Z., Reddy, K.N., 2013. Glyphosate resistance in tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Mississippi is due to both altered target-site and nontarget-site mechanisms. *Weed Science* 61, 374-383.
- Ng., C.H., Wickneswary, R., Salmijah, S., Teng, Y.T., Ismail, B.S., 2003. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. *Weed Research* 43, 108-115.
- Ng., C.H., Wickneswary, R., Salmijah, S., Teng, Y.T., Ismail, B.S., 2004a. Glyphosate resistance in *Eleusine indica* (L.) Gaertn. from different origins and

- polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Australian Journal of Agricultural Research* 55, 407-414.
- Ng., C.H., Wickneswary, R., Salmijah, S., Ismail, B.S., 2004b. Inheritance of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*). *Weed Science* 52, 564-570.
- Nol, N., Tsikou, D., Eid, M., Livieratos, I.C., Giannopolitis, C.N., 2012. Shikimate leaf disc assay for early detection of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* and relative transcript level of EPSPS and ABC transporter genes. *Weed Research* 52, 233-241.
- Norsworthy, J.K., Burgos, N.R., Oliver, L.R., 2001. Differences in weed tolerance to glyphosate involve different mechanisms. *Weed Technology* 15, 725-731.
- Norsworthy, J.K., McClelland, M., Griffith, G.M., 2009. *Conyza canadensis* (L.) Cronquist response to pre-plant application of residual herbicides in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Crop Protection* 28, 62-67.
- Neve, P., 2008. Simulation modelling to understand the evolution and management of glyphosate resistance in weeds. *Pest Management Science* 64, 392-401.
- Ntoanidou, S., Kaloumenos, N., Diamantidis, G., Madesis, P., Eleftherohorinos, I., 2016. Molecular basis of *Cyperus difformis* cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 127, 38-45.
- Okada, M., Hanson, B.D., Hembree, K.J., Peng, Y., Sherstha, A., Stewart Jr, C.N., Wright, S.D., Jasieniuk, M., 2013. Evolution and spread of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* in California. *Evolutionary applications* 6, 761-777.
- Okada, M., Jasieniuk, M., 2014. Inheritance of glyphosate resistance in hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) from California. *Weed Science* 62, 258-266.
- Okada, M., Hanson, B.D., Hembree, K.J., Peng, Y., Sherstha, A., Stewart Jr, C.N., Wright, S.D., Jasieniuk, M., 2015. Evolution and spread of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* in California and a comparison with closely related *Conyza canadensis*. *Weed Research* 55, 173-184.
- Owen, M.D.K., Zelaya, I.A., 2005. Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Management Science* 61, 301-311.
- Owen, M.J., Walsh, M.J., Llewellyn, R.S., Powles, S.B., 2007. Widespread occurrence of multiple herbicide resistance in Western Australian annual

- ryegrass (*Lolium rigidum*) populations. Australian Journal of Agricultural Research 58, 711-718.
- Papapanagiotou, A.P., Kaloumenos, N.S., Eleftherohorinos, I.G., 2012. Sterile oat (*Avena sterilis* L.) cross-resistance profile to ACCase-inhibiting herbicides in Greece. Crop Protection 35, 118-126.
- Papapanagiotou, A.P., Paresidou, M.I., Kaloumenos, N.S., Eleftherohorinos, I.G., 2015. ACCase mutations in *Avena sterilis* populations and their impact on plant fitness. Pesticide Biochemistry and Physiology 123, 40-48.
- Patzoldt, W.L., Tranel, P.J., Hager, A.G., 2005. A waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) biotype with multiple resistance across three herbicides sites of action. Weed Science 53, 30-36.
- Pedersen, B.P., Neve, P., Andreasen, C., Powles, S.B., 2007. Ecological fitness of a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population: growth and seed production along a competition gradient. Basic and Applied Ecology 8, 258-268.
- Peng, Y., Abercrombie, L.L.G., Yuan, J.S., Riggins, C.W., Sammons, R.D., Tranel, P.J., Stewart Jr, C.N., 2010. Characterization of the horseweed (*Conyza canadensis*) transcriptome using GS-FLX 454 pyrosequencing and its application for expression analysis of candidate non-target herbicide resistance genes. Pest Management Science 66, 1053-1062.
- Perez, A., Kogan, M., 2003. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. Weed Research 43, 12-19.
- Perez, A., Alister, C., Kogan, M., 2004. Absorption, translocation and allocation of glyphosate in resistant and susceptible Chilean biotypes of *Lolium multiflorum*. Weed Biology and Management 4, 56-58.
- Perez-Jones, A., Park, K.W., Colquhoun, J., Mallory-Smith, C., Shaner, D., 2005. Identification of glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. Weed Science 53, 775-779.
- Perez-Jones, A., Park, K.W., Polge, N., Colquhoun, J., Mallory-Smith, C.A., 2007. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. Planta 226, 395-404.
- Powles, S.B., Lorraine-Colwill, D.F., Dellow, J.J., Perston, C., 1998. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. Weed Science 46, 604-607.



- Powles, S.B., Preston, C., 2006. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Technology* 20, 282-289.
- Powles, S.B., 2008. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Management Science* 64, 360-365.
- Powles, S.B., Yu, Q., 2010. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology* 61, 317-347.
- Preston, C., Wakelin, A.M., 2008. Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns. *Pest Management Science* 64, 372-376.
- Radosevich, S., Holt, J., Ghersa, C., 1997. *Weed Ecology: Implications for Management*, second ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Regehr, D.L., Bazzaz, F.A., 1979. The population dynamics of *Erigeron canadensis*, a successional winter annual. *Journal of Ecology* 67, 923-933.
- Roush, M.L., Radosevich, S.R., Maxwell, B.D., 1990. Future outlook for herbicide-resistance research. *Weed Technology* 4, 208-214.
- Rubin, B., 1996. Herbicide-resistant weeds-the inevitable phenomenon: mechanisms, distribution and significance. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* XV, 17-32.
- Ryan, G.F., 1970. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Science* 18, 614-616.
- Salas, R.A., Dayan, F.E., Pan, Z., Watson, S.B., Dickson, J.W., Scott, R.C., Burgos, N.R., 2012. *EPSPS* gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* spp. *multiflorum*) from Arkansas. *Pest Management Science* 68, 1223-1230.
- Salzmann, D., Handley, R.J., Müller-Schärer, H., 2008. Functional significance of triazine-herbicide resistance in defense of *Senecio vulgaris* against a rust fungus. *Basic and Applied Ecology* 9, 577-587.
- Sammons, R.D., Gaines, T.A., 2014. Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Management Science* 70, 1367-1377.
- Sansom, M., Saborido, A.A., Dubois, M., 2013. Control of *Conyza* spp. with glyphosate - A review of the situation in Europe. *Plant Protection Science* 49, 44-53.
- Santos, G., Oliveira Jr., R.S., Constantin, J., Francischini, A.C., Machado, M.F.P.S., Mangolin, C.A., Nakajima J.N., 2014. *Conyza sumatrensis*: a new weed species

- resistant to glyphosate in the Americas. *Weed Biology and Management* 14, 106-114.
- Seefeldt, S.S., Jensen, J.E., Fuerst, E.P., 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology* 9, 218-227.
- Sha, X.Y., Linscombe, S.D., Groth, D.E., 2007. Field evaluation of imidazolinone-tolerant clearfield rice (*Oryza sativa* L.) at nine Louisiana locations. *Crop Science* 47, 1177-1185.
- Shaner, D.L., 2009. Role of Translocation as a Mechanism of Resistance to Glyphosate. *Weed Science* 57, 118-123.
- Shaner, D.L., Lindenmeyer, R.B., Ostlie, M.H., 2012. What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us? *Pest Management Science* 68, 3-9.
- Shaner, D.L., 2014. Lessons learned from the history of herbicide resistance. *Weed Science* 62, 427-431.
- Shields, E.J., Dauer, J.T., VanGessel, M.J., Neumann, G., 2006. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed collected in the planetary boundary layer. *Weed Science* 54, 1063-1067.
- Shrestha, A., Hembree, K.J., Va, N., 2007. Growth stage influences level of resistance in glyphosate-resistant horseweed. *California Agriculture* 61, 67-70.
- Shrestha, A., Hanson, B.D., Hembree, K.J., 2008. Glyphosate-resistant hairy fleabane documented in the Central Valley. *California Agriculture* 62, 116-119.
- Shrestha, A., Hanson, B.D., Fidelibus, M.W., Alcorta, M., 2010. Growth, phenology, and intraspecific competition between glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible horseweeds (*Conyza canadensis*) in the San Joaquin Valley of California. *Weed Science* 58, 147-153.
- Shrestha, A., Steinhauer, K.M., Moretti, M.L., Hanson, B.D., Jasieniuk, M., Hembree, K.J., Wright, S.D., 2014. Distribution of glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in central California and their phenological development. *Journal of Pest Science* 87, 201-209.
- Simarmata, M., Penner, D., 2008. The basis for glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) from California. *Weed Science* 56, 181-188.
- Song, X.L., Wu, J.J., Zhang, H.J., Qiang, S., 2011. Occurrence of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) population in China. *Agricultural Sciences in China* 10, 1049-1055.

- Steinrücken, H.C., Amrhein, N., 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94, 1207-1212.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermat, T., Corthier, G., Brochmann, C., Willerslev, E., 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research* 35, e14. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl938>.
- Tani, E., Chachalis, D., Travlos, I.S., 2015. A glyphosate resistance mechanism in *Conyza canadensis* involves synchronization of *EPSPS* and *ABC-transporter* genes. *Plant Molecular Biology Reporter* 33, 1721-1730.
- Tardif, F.J., Rajcan, I., Costea, M., 2006. A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. *New Phytologist* 169, 251-264.
- Thébaud, C., Abbott, R.J., 1995. Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. *American Journal of Botany* 82, 360-368.
- Tozzi, E., Beckie, H., Weiss, R., Gonzalez-Andujar, J.L., Storkey, J., Cici, S.Z.H., Van Acker, R.C., 2014. Seed germination response to temperature for a range of international populations of *Conyza canadensis*. *Weed Research* 54, 178-185.
- Trainer, G.D., Loux, M.M., Harrison, K., Regnier, E., 2005. Response of horseweed biotypes to foliar applications of cloransulam-methyl and glyphosate. *Weed Technology* 19, 231-236.
- Tranel, P.J., Wright, T.R., 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science* 50, 700-712.
- Travlos, I.S., Chachalis, D., 2010. Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) is reported in Greece. *Weed Technology* 24, 569-573.
- Travlos, I.S., Giannopolitis, C.N., Economou, G., 2011. Diclofop resistance in sterile wild oat (*Avena sterilis* L.) in wheat fields in Greece and its management with other post-emergence herbicides. *Crop Protection* 30, 1449-1454.
- Travlos, I.S., 2012. Evaluation of herbicide-resistance status on populations of littleseed canarygrass (*Phalaris minor* Retz.) from southern Greece and suggestions for their effective control. *Journal of Plant Protection Research* 52, 308-313.

- Travlos, I.S., Chachalis, D., 2013a. Relative competitiveness of glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible populations of hairy fleabane, *Conyza bonariensis*. *Journal of Pest Science* 86, 345-351.
- Travlos, I.S., Chachalis, D., 2013b. Assessment of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) and fleabane (*Conyza albida* Willd. ex Spreng) populations from perennial crops in Greece. *International Journal of plant Production* 7, 665-676.
- Tzakou, O., Gani, A., Economou, G., Yannitsaros, A., 2004. Chemical composition and allelopathic activity of oil and volatile fractions of *Conyza albida* Willd. ex Sprengel from Greece. *Journal of Essential Oil Research* 16, 425-428.
- Urbano, J.M., Borrego, A., Torres, V., Leon, J.M., Jimenez, C., Dinelli, G., Barnes, J., 2007. Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. *Weed Technology* 21, 396-401.
- VanGessel, M.J., 2001. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Science* 49, 703-705.
- VanGessel, M.J., Scott, B.A., Johnson, Q.R., White-Hansen, S.E., 2009. Influence of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) Growth stage on response to glyphosate applications. *Weed Technology* 23, 49-53.
- Vasilakoglou, I.B., Eleftherohorinos, I.G., Dhima, K.V., 2000. Propanil-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) biotypes found in Greece. *Weed Technology* 14, 524-529.
- Vereecken, H., 2005. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science* 61, 1139-1151.
- Vila-Aiub, M.M., Neve, P., Powles, S.B., 2009a. Evidence for an ecological cost of enhanced herbicide metabolism in *Lolium rigidum*. *Journal of Ecology* 97, 772-780.
- Vila-Aiub, M.M., Neve, P., Powles, S.B., 2009b. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants *New Phytologist* 184, 751-767.
- Vila-Aiub, M.M., Neve, P., Roux, F., 2011. A unified approach to the estimation and interpretation of resistance costs in plants. *Heredity* 107, 386-394.
- Vila-Aiub, M.M., Gundel, P.E., Yub, Q., Powles, S.B., 2013. Glyphosate resistance in *Sorghum halepense* and *Lolium rigidum* is reduced at suboptimal growing temperatures. *Pest Management Science* 69, 228-232.

- Wakelin, A.M., Lorraine-Colwill, D.F., Preston, C., 2004. Glyphosate resistance in four different populations of *Lolium rigidum* is associated with reduced translocation of glyphosate to meristematic zones. *Weed Research* 44, 453-459.
- Wakelin, A. M., Preston, C., 2006a. Inheritance of glyphosate resistance in several populations of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) from Australia. *Weed Science* 54, 212-219.
- Wakelin, A.M., Preston, C., 2006b. A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. *Weed Research* 46, 432-440.
- Walker, S., Bell, K., Robinson, G., Widderick, M., 2011. Flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis*) populations have developed glyphosate resistance in north-east Australian cropping fields. *Crop Protection* 30, 311-317.
- Weaver, S.E., 2001. The biology of Canadian weeds. 115. *Conyza canadensis*. *Canadian Journal of Plant Science* 81, 867-875.
- Weaver, S., Downs, M., Neufeld, B., 2004. Response of paraquat-resistant and-susceptible horseweed (*Conyza canadensis*) to diquat, linuron, and oxyfluorfen. *Weed Science* 52, 549-553.
- Weed Science Society of America (WSSA), 2016. Herbicide Resistance. Available at website <http://wssa.net/weed/resistance/> (accessed 17.02.2016).
- Werck-Reichhart, D., Hehn, A., Didierjean, L., 2000. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends in Plant Science* 5, 116-123.
- Westhoven, A.M., Kruger, G.R., Gerber, C.K., Stachler, J.M., Loux, M.M., Johnson, W.G., 2008. Characterization of selected common lambsquarters (*Chenopodium album*) biotypes with tolerance to glyphosate. *Weed Science* 56, 685-691.
- Wolfe, K.H., Li, W.H., Sharp, P.M., 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 9054-9058.
- Woodburn, A.T., 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Management Science* 56, 309-312.
- Wu, H., Walker, S., Rollin, M.J., Tan, D.K.Y., Robinson, G., Werth, J., 2007. Germination, persistence, and emergence of flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis* [L.] Cronquist). *Weed Biology and Management* 7, 192-197.
- Yu, Q., Cairns, A., Powles, S., 2007. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta* 225, 499-513.

- Yuan, J.S., Tranel, P.J., Stewart Jr, C.N., 2007. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science* 12, 6-13.
- Yuan, J.S., Abercrombie, L.L.G., Cao, Y., Halfhill, M.D., Zhou, X., Peng, Y., Hu, J., Rao, M.R., Heck, G.R., Larosa, T.J., Sammons, R.D., Wang, X., Ranjan, P., Johnson, D.H., Wadl, P.A., Scheffler, B.E., Rinehart, T.A., Trigiano, R.N., Stewart Jr, C.N., 2010. Functional genomics analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) with special reference to the evolution of non-target-site glyphosate resistance. *Weed Science* 58, 109-117.
- Zelaya, I.A., Owen, M.D.K., VanGessel, M.J., 2004. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq.. *Theoretical and Applied Genetics* 110, 58-70.
- Zelaya, I.A., Owen, M.D.K., VanGessel, M.J., 2007. Transfer of glyphosate resistance: evidence of hybridization in *Conyza* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 94, 660-673.
- Zinzolker, A., Kigel, J., Rubin, B., 1985. Effects of environmental factors on the germination and flowering of *Conyza albida*, *C. bonariensis* and *C. canadensis*. Abstracts of papers presented at the 9<sup>th</sup> conference of the weed science society of Israel. *Phytoparasitica* 13, 229-230.

### **Ελληνική βιβλιογραφία**

- Βασιλείου, Α., Παπαβασιλείου, Σ., Καλούμενος, Ν., Ελευθεροχωρινός, Η., 2006. Διερεύνηση της ανθεκτικότητας 14 *Lolium rigidum* βιοτύπων στα ζιζανιοκτόνα chlorsulfuron και tralkoxydim. 14<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Βόλος, 7-8 Δεκεμβρίου 2006. Περιλήψεις Ανακοινώσεων, σελ. 60.
- Γιαννίτσαρος, Α., 1997. Είδη του γένους *Conyza* Less. στην Ελλάδα. 10<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Θεσσαλονίκη, 16-18 Δεκεμβρίου 1997. Περιλήψεις Ανακοινώσεων, σελ. 22.
- Γιαννοπολίτης, Κ.Ν., 2003. Οδηγός αναγνώρισης ζιζανίων της Ελλάδας. Γεωργία-Κτηνοτροφία 9, 117-119.
- Γιαννοπολίτης, Κ., Τραυλός, Η., Χάχαλης, Δ., Παπαγεωργίου, Ι., Καζαντζίδου, Α., 2008. Διερεύνηση της ανθεκτικότητας βιοτύπων της κόνυζας (*Conyza* spp.) στο ζιζανιοκτόνο glyphosate. 15<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Θεσσαλονίκη, 11-12 Δεκεμβρίου 2008. Περιλήψεις

Ανακοινώσεων, σελ. 44. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).

Γιαννοπολίτης, Κ.Ν., 2015. Το ζιζάνιο «κόνυζα» και η αντιμετώπισή του σε δενδρώνες και αμπελώνες. Γεωργία-Κτηνοτροφία 3, 34-38.

Γκανή, Α., 2000. Μελέτη πτητικών συστατικών τριών ειδών του γένους *Coryza* Less.. Φυτοχημική μελέτη-ανίχνευση αλληλοπαθητικού δυναμικού του φυτού *Coryza albida* Willd. ex Sprengel. Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης «Φαρμακογνωσία Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων». Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Φαρμακευτική Σχολή. Τομέας Φαρμακογνωσίας.

Εθνικό Αστεροσκοπείο Αθηνών, 2016. Βάση κλιματικών δεδομένων. Διαθέσιμη στην ιστοσελίδα <http://meteo.gr/meteosearch/> (πρόσβαση 17.02.2016).

Ελευθεροχωρινός, Η.Γ., Παπαμιχαήλ, Δ.Μ., 2002. Ανάπτυξη ανθεκτικού βιοτύπου αγριοτοματιάς (*Solanum nigrum* L.) στο ζιζανιοκτόνο prometryn. 12<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Αθήνα, 2-3 Δεκεμβρίου 2002. Περιλήψεις Ανακοινώσεων, σελ. 68.

Ελευθεροχωρινός, Η.Γ., 2014. Ζιζανιολογία, 4<sup>η</sup> Έκδοση. Εκδόσεις Αγροτύπος Α.Ε., Αθήνα.

Ευθυμιάδης, Θ., Καλούμενος, Ν., Ελευθεροχωρινός, Η., 2008. Διερεύνηση της ανθεκτικότητας οκτώ βιοτύπων ήρας (*Lolium rigidum* L.) στα ζιζανιοκτόνα mesosulfuron+iodosulfuron, diclofop-methyl, clodinafor propargyl και glyphosate. 15<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Θεσσαλονίκη, 11-12 Δεκεμβρίου 2008. Περιλήψεις Ανακοινώσεων, σελ. 49. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).

Καλίτσου, Ν., Ντοανίδου, Σ., Διαμαντίδης, Γ., Μαδέσης, Π., Ελευθεροχωρινός, Η., 2015. Μοριακή διερεύνηση της ανθεκτικότητας πληθυσμών μουχρίτσας (*Echinochloa*) σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου ALS. 18<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Ηράκλειο Κρήτης, 3-4 Μαρτίου 2015. Πρακτικά, σελ. 39-40. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).

Καλούμενος, Ν., Ελευθεροχωρινός, Η., 2006. Αξιολόγηση βιοτύπου του ζιζανίου *Sorghum halepense* για ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε ζιζανιοκτόνα αναστολείς

- του ενζύμου ACCase. 14<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Βόλος, 7-8 Δεκεμβρίου 2006. Περιλήψεις Ανακοινώσεων, σελ. 61.
- Καλούμενος, Ν., Δόρδας, Χ., Διαμαντίδης, Γ., Ελευθεροχωρινός, Η., 2008α. Επίδραση των ζιζανιοκτόνων chlorsulfuron, florasulam, imazamox, pyriithiobac και tribenuron στη δράση του ενζύμου ALS από ανθεκτικούς πληθυσμούς παπαρούνας (*Paraver rhoeas* L.). 15<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Θεσσαλονίκη, 11-12 Δεκεμβρίου 2008. Περιλήψεις Ανακοινώσεων, σελ. 46. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).
- Καλούμενος, Ν., Δόρδας, Χ., Διαμαντίδης, Γ., Ελευθεροχωρινός, Η., 2008β. Αλληλούχηση του ALS γονιδίου από 28 ανθεκτικούς στο tribenuron πληθυσμούς παπαρούνας (*Paraver rhoeas* L.). 15<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Θεσσαλονίκη, 11-12 Δεκεμβρίου 2008. Περιλήψεις Ανακοινώσεων, σελ. 47. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).
- Καλούμενος, Ν.Σ., 2009. Διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα, της βιολογίας και της χημικής αντιμετώπισης διαφόρων πληθυσμών παπαρούνας (*Paraver rhoeas* L.). Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Γεωπονική Σχολή. Τομέας Φυτών Μεγάλης Καλλιέργειας και Οικολογίας.
- Καλούμενος, Ν.Σ., Ελευθεροχωρινός, Η.Γ., 2010. Αξιολόγηση 11 βιοτύπων του ζιζανίου μουχρίτσα (*Echinochloa* spp.) για πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα imazamox και profoxydim. 16<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Καρδίτσα, 1-2 Δεκεμβρίου 2010. Περιλήψεις Ανακοινώσεων, σελ. 34. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).
- Καλούμενος, Ν.Σ., Τσιώνη, Β.Κ., Νταλιάνη, Ε.Γ., Δόρδας, Χ.Α., Ελευθεροχωρινός, Η.Γ., 2010. Αλληλούχηση του ALS γονιδίου και δράση του ALS ενζύμου από 13 πληθυσμούς ήρας λεπτής (*Lolium rigidum*) με σταυρανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα chlorsulfuron και mesosulfuron. 16<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Καρδίτσα, 1-2 Δεκεμβρίου 2010. Περιλήψεις Ανακοινώσεων, σελ. 37. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).



- Καλούμενος, Ν., Χατζηλαζαρίδου, Σ., Μυλωνά, Φ., Πολύδωρος, Α., Ελευθεροχωρινός, Η., 2012. Μοριακή ταυτοποίηση ειδών *Echinochloa* και αλληλούχηση του ALS γονιδίου από 4 πληθυσμούς μουχρίτσας (*Echinochloa phyllorogon* (Stapf) Stapf ex Kossenko) με διασταυρωτή ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου ALS. 17<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Αθήνα, 22-24 Νοεμβρίου 2012. Πρακτικά, σελ. 26-28. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).
- Καλούμενος, Ν., Ελευθεροχωρινός, Η., 2012. Διασταυρωτή ανθεκτικότητα κόκκινου ρυζιού (*Oryza sativa* L.) στο imazamox και imazethapyr λόγω ροής του ALS γονιδίου από ποικιλία ρυζιού 'clearfield'. 17<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Αθήνα, 22-24 Νοεμβρίου 2012. Πρακτικά, σελ. 28-31. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).
- Μυλωνάς, Φ.Ν., Γιαννοπολίτης Κ.Ν., Ευθυμιάδης Π.Γ., Μενεξές Γ.Χ., Ελευθεροχωρινός, Η.Γ., 2012. Αξιολόγηση 60 πληθυσμών του ζιζανίου *Conyza* spp. για πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο glyphosate και μελέτη της έντασης ανθεκτικότητας οκτώ βιοτύπων των ειδών *Conyza albida* και *C. bonariensis* στο glyphosate. 17<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Αθήνα, 22-24 Νοεμβρίου 2012. Πρακτικά, σελ. 15-18. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).
- Ντοανίδου, Σ., Καλούμενος, Ν., Διαμαντίδης, Γ., Μαδέσης, Π., Ελευθεροχωρινός, Η., 2015. Μοριακή βάση της ανθεκτικότητας μοσχοκύτερης (*Cyperus difformis*) σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της δράσης του ενζύμου ALS. 18<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Ηράκλειο Κρήτης, 3-4 Μαρτίου 2015. Πρακτικά, σελ. 35-36. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).
- Παπαπαναγιώτου, Α., Καλούμενος, Ν., Ελευθεροχωρινός, Η., 2008. Αξιολόγηση 114 βιοτύπων αγριοβρώμης (*Avena sterilis* L.) για πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα clodinafor propargyl, fenoxaprop-p-ethyl και mesosulfuron + iodosulfuron. 15<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Θεσσαλονίκη, 11-12 Δεκεμβρίου 2008. Περιλήψεις Ανακοινώσεων, σελ. 48.

Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).

Παπαπαναγιώτου, Α.Π., Καλούμενος, Ν.Σ., Δόρδας, Χ.Α., Ελευθεροχωρινός Η.Γ., 2010. Μελέτη της έντασης ανθεκτικότητας (R/S) εννέα βιοτύπων του ζιζανίου αγριοβρώμη (*Avena sterilis*) σε ζιζανιοκτόνα αναστολείς της δράσης του ACCase ενζύμου και αλληλούχησης του ACCase γονιδίου. 16<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Καρδίτσα, 1-2 Δεκεμβρίου 2010. Περιλήψεις Ανακοινώσεων, σελ. 38. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).

Παπαπαναγιώτου, Α.Π., Μενεξές, Γ.Χ., Ελευθεροχωρινός, Η.Γ., 2012. Αξιολόγηση τριών βιοτύπων του ζιζανίου μουχρίτσα (*Echinochloa phyllorogon* (Stapf) Stapf ex Kossenko) από τη Δυτική Ελλάδα για πιθανή ανάπτυξη διασταυρωτής ανθεκτικότητας σε ζιζανιοκτόνα αναστολής της δράσης του ενζύμου ALS. 17<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Αθήνα, 22-24 Νοεμβρίου 2012. Πρακτικά, σελ. 31-33. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).

Παπαπαναγιώτου, Α.Π., 2013. Διερεύνηση της βιολογίας, των μηχανισμών ανθεκτικότητας σε ζιζανιοκτόνα και της χημικής αντιμετώπισης βιοτύπων αγριοβρώμης (*Avena sterilis* L.) Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Γεωπονική Σχολή. Τομέας Φυτών Μεγάλης Καλλιέργειας και Οικολογίας.

Παπαπαναγιώτου, Α., Ντοανίδου, Σ., Μαδέσης, Π., Μενεξές, Γ., Ελευθεροχωρινός, Η., 2015. Απειλή μουχρίτσας στην καλλιέργεια ρυζιού με πολλαπλή ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς των ενζύμων ALS/ACCase. 18<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Ηράκλειο Κρήτης, 3-4 Μαρτίου 2015. Πρακτικά, σελ. 31-32. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).

Σιέκρη, Η., Ντοανίδου, Σ., Διαμαντίδης, Γ., Μαδέσης, Π., Ελευθεροχωρινός, Η., 2015. Μοριακή διερεύνηση πληθυσμών κόκκινου ρυζιού (*Oryza sativa* L.) για ανθεκτικότητα στο imazamox. 18<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Ηράκλειο Κρήτης, 3-4 Μαρτίου 2015. Πρακτικά, σελ. 37-38. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).

- Τραυλός, Η., Χάχαλης, Δ., 2012. Η ανθεκτικότητα πληθυσμών των τριών ειδών κόνυζας (*Conyza canadensis*, *C. bonariensis*, *C. albida*) στο glyphosate στην Ελλάδα: Η ανταγωνιστική τους ικανότητα και η διαχείρισή τους. 17<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Αθήνα, 22-24 Νοεμβρίου 2012. Πρακτικά, σελ. 13-15. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).
- Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2016. Βάση δεδομένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Διαθέσιμη στην ιστοσελίδα <http://www.minagric.gr/syspest/> (πρόσβαση 17.02.2016).
- Χατζηλαζαρίδου, Σ.Α., Καλούμενος, Ν.Σ., Ελευθεροχωρινός, Η.Γ., 2010. Αξιολόγηση 30 βιοτύπων του ζιζανίου μουχρίτσα (*Echinochloa* spp.) για πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο ζιζανιοκτόνο penoxsulam. 16<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Καρδίτσα, 1-2 Δεκεμβρίου 2010. Περίληψεις Ανακοινώσεων, σελ. 36. Διαθέσιμη ιστοσελίδα <http://www.eze.org.gr/conference.php> (πρόσβαση 17.02.2016).

## 1. Δημοσιευμένη εργασία

Crop Protection 65 (2014) 207–215



Contents lists available at ScienceDirect

Crop Protection

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cropro](http://www.elsevier.com/locate/cropro)

## Glyphosate resistance of molecularly identified *Conyza albida* and *Conyza bonariensis* populations



Philippos N. Mylonas<sup>a</sup>, Costas N. Giannopolitis<sup>b</sup>, Panagiotis G. Efthimiadis<sup>c</sup>,  
Giorgos C. Menexes<sup>d</sup>, Panagiotis B. Madesis<sup>e</sup>, Ilias G. Eleftherohorinos<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Biological Control of Pesticides, Department of Pesticides Control & Phytopharmacy, Benaki Phytopathological Institute, 8 S. Delta str., 145 61, Kifissia, Athens, Greece

<sup>b</sup> Agrotipos Publishing SA, 5 Evoias str., 151 25, Maroussi, Athens, Greece

<sup>c</sup> Laboratory of Agronomy, Faculty of Crop Science, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos str., 118 55, Athens, Greece

<sup>d</sup> Laboratory of Agronomy, School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, 541 24, Thessaloniki, Greece

<sup>e</sup> Institute of Applied Biosciences, CERTH, 6th km Charilaou-Thermis Road, 57001, Thessaloniki, Greece

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 June 2014

Received in revised form

16 July 2014

Accepted 20 July 2014

Available online 28 August 2014

## Keywords:

Glyphosate

*Conyza* resistance*Conyza* species discrimination

EPSPS gene sequence

## ABSTRACT

In the initial screening, 18 out of 32 *Conyza albida* and 7 out of 28 *Conyza bonariensis* populations, sampled from main perennial crop regions of central and southern Greece, were found to be resistant to glyphosate. The level of resistance determined in dose–response experiments with representative populations of the two species was found to range from 7.7 to 37.3 for *C. albida* and from 3.4 to 7.8 for *C. bonariensis*. The comparison of the resistant and susceptible *C. albida* and *C. bonariensis* EPSPS gene sequences indicated that possess single nucleotide changes compared to *Conyza canadensis* EPSPS gene, but none of these changes is located at the position 106 that has been reported to confer resistance to glyphosate. Finally, the cpDNA sequence comparison analysis used for the most resistant population of each species and the respective susceptible counterparts was found to be a reliable tool for discrimination of conventionally classified *C. albida* and *C. bonariensis* plants that are morphologically similar. This is the first report for molecular identification of *Conyza* species.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 2. Περιλήψεις ανακοινώσεων σε εθνικά συνέδρια

### 2.1. 17<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Αθήνα, 22-24 Νοεμβρίου 2012.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ 60 ΠΛΗΘΗΣΜΩΝ ΤΟΥ ΖΙΖΑΝΙΟΥ *Conyza* spp. ΓΙΑ ΠΙΘΑΝΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ GLYPHOSATE ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΤΑΣΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΚΤΩ ΒΙΟΤΥΠΩΝ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ *Conyza albida* ΚΑΙ *C. bonariensis* ΣΤΟ GLYPHOSATE  
Φ.Ν. Μυλωνάς<sup>1,2</sup>, Κ.Ν. Γιαννοπολίτης<sup>3</sup>, Π. Γ. Ευθυμιάδης<sup>1</sup>, Γ.Χ. Μενεξές<sup>4</sup> και Η.Γ. Ελευθεροχωρινός

<sup>1</sup> Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Γεωργίας.

<sup>2</sup> Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Εργαστήριο Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων.

<sup>3</sup> Εκδόσεις Αγροτύπος Α.Ε.

<sup>4</sup> Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Γεωπονική Σχολή, Εργαστήριο Γεωργίας.

Email: [ph.mylonas@bpi.gr](mailto:ph.mylonas@bpi.gr)

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε πειράματα φυτοδοχείων αξιολογήθηκαν 60 πληθυσμοί του ζιζανίου *Conyza* spp. για την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο glyphosate. Οι σπόροι των 58 πληθυσμών προέρχονταν από οπωρώνες, ελαιώνες και αμπελώνες των νομών Αργολίδας, Λάρισας και Κορινθίας, ενώ δυο πληθυσμοί προέρχονταν από ακαλλιέργητες εκτάσεις του νομού Αττικής όπου ποτέ δεν είχαν γίνει επεμβάσεις με glyphosate (ευαίσθητοι). 25 πληθυσμοί του ζιζανίου *Conyza* spp. δεν αντιμετωπίστηκαν αποτελεσματικά στη συνιστώμενη δόση του ζιζανιοκτόνου (16-70 %) και χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικοί ενώ οι υπόλοιποι χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητοι. Οι δύο χαρακτηρισμένοι ως ευαίσθητοι πληθυσμοί αντιμετωπίστηκαν αποτελεσματικά με όλες τις επεμβάσεις του ζιζανιοκτόνου (95-100%). Τα πειράματα προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας 5 ανθεκτικών (R) βιοτύπων *C. albida* και 3 ανθεκτικών (R) βιοτύπων *C. bonariensis* στο ζιζανιοκτόνο glyphosate έδειξαν ότι αυτή κυμάνθηκε από 8 έως 39 και από 3 έως 10, αντιστοίχως.

*Λέξεις Κλειδιά:* ανθεκτικότητα στο glyphosate, *Conyza* spp.



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα είδη του γένους *Conyza* (οικογένεια Asteraceae) που απαντώνται στην Ελλάδα είναι το *C. bonariensis* (L.) Cronq., το *C. canadensis* (L.) Cronq και το *C. albida* Wild. ex Sprengel (Γιαννίτσaros, 1997). Πρόκειται για επιγενή είδη που έχουν προέλευση από την Αμερική. Τα δύο πρώτα είδη είναι γνωστά στην Ελλάδα από τον προπερασμένο αιώνα, ενώ το *C. albida* φαίνεται ότι έχει εισαχθεί πρόσφατα και είναι γνωστό από το 1976. Παράγουν τεράστιες ποσότητες αχαινίων που φέρουν πάππο και γι' αυτό η εξάπλωσή τους από περιοχή σε περιοχή είναι εύκολη και ταχύτατη. Τα τρία είδη, τα οποία έχουν πλήρως προσαρμοστεί σε πολλές περιοχές της Ελλάδας (Γιαννίτσaros, 1997), συγκαταλέγονται μεταξύ των χειρότερων ζιζανίων του κόσμου. Απαντώνται συχνά σε μεικτούς πληθυσμούς σε οπωρώνες, αμπελώνες αλλά και σε ακαλλιέργητες εκτάσεις. Σε εδάφη όπου γίνεται μειωμένη ή μη κατεργασία εμφανίζονται σε μεγαλύτερους πληθυσμούς (Weaver, 2001).

Η αντιμετώπιση των ειδών του γένους *Conyza* βασίζεται κυρίως σε επαναλαμβανόμενες εφαρμογές μεταφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων και κυρίως του glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine], το οποίο θεωρείται ως το σημαντικότερο ευρέος φάσματος μη εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο παγκοσμίως (Baylis, 2000; Nol κ.ά., 2012). Αν και η πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικών στο glyphosate βιοτύπων ζιζανίων αρχικά θεωρούνταν μικρή, η συνεχής και εντατική χρήση του κατά τα τελευταία χρόνια οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικών βιοτύπων που ανήκουν σε 24 είδη ζιζανίων (Heap, 2012). Ειδικότερα τα είδη *C. bonariensis*, *C. canadensis* και *C. albida* έχουν ήδη αναπτύξει 13, 31 και 3 βιοτύπους, αντιστοίχως, με ανθεκτικότητα στο glyphosate (Heap, 2012). Η ανθεκτικότητα του είδους *C. canadensis* δεν οφείλεται σε ανθεκτικό ένζυμο EPSPS αλλά σε μειωμένη μετακίνηση του ζιζανιοκτόνου (Feng κ.ά., 2004) που έχει εξηγηθεί από την γρήγορη αποβολή του στα χυμοτόπια (Ge κ.ά., 2010), όπου καθίσταται ανενεργό, με τη συμμετοχή ειδικών μεταφορέων (Nol κ.ά., 2012).

Στη χώρα μας μια πρώτη διερεύνηση το 2008 (Γιαννοπολίτης κ.ά., 2008) έδειξε την παρουσία ανθεκτικών πληθυσμών *Conyza* spp. σε ορισμένες περιοχές και ήδη έχουν αναφερθεί ανθεκτικοί στο glyphosate βιότυποι των ειδών *C. bonariensis* (Travlos και Chachalis, 2010) και *C. canadensis* (Nol κ.ά., 2012). Βέβαια, επειδή τα παράπονα από διάφορες περιοχές για μειωμένη αποτελεσματικότητα του glyphosate στα είδη του γένους *Conyza* είναι πολλά, αποφασίστηκε να διερευνηθεί περαιτέρω το πρόβλημα αυτό και να προσδιοριστεί η ένταση της ανθεκτικότητας στο glyphosate διάφορων νέων βιοτύπων του *C. bonariensis* αλλά και βιοτύπων του *C. albida*.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

**Προέλευση και συλλογή φυτικού υλικού.** Κατά το διάστημα Ιανουάριος-Σεπτέμβριος 2010 πραγματοποιήθηκε έρευνα-επισκόπηση σε οπωρώνες, ελαιώνες και αμπελώνες των νομών Αργολίδας, Λάρισας και Κορινθίας η οποία ανέδειξε 58 αγρούς όπου υπήρχαν υπόνοιες για πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικών πληθυσμών του ζιζανίου *Conyza* spp.. Ακολούθως συλλέχθηκε σπόρος από τους προεπισημασμένους αυτούς αγρούς καθώς και σπόρος από δύο ακαλλιέργητες εκτάσεις του νομού Αττικής όπου ποτέ δεν είχαν γίνει επεμβάσεις με glyphosate (ευαίσθητοι πληθυσμοί).

**Πειράματα Φυτοδοχείων.** Τα πειράματα ελέγχου για πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας των προαναφερθέντων πληθυσμών στο glyphosate καθώς και τα πειράματα προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας πραγματοποιήθηκαν κατά τα έτη 2010, 2011 και 2012 χρησιμοποιώντας πλαστικά φυτοδοχεία χωρητικότητας 1,5 L. Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα ανοικτού-κίτρινου και μαύρου χρώματος τύρφης σε αναλογία 1:2. Μετά την εμφάνιση των σποροφύτων, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις στο στάδιο των 2-4 και 4-6 φύλλων ώστε τελικά να παραμείνουν ομοιόμορφα αναπτυγμένα φυτά σε όλα τα φυτοδοχεία. Τα φυτά κατά την διάρκεια των πειραμάτων αρδεύονταν ανάλογα με τις ανάγκες τους σε νερό. Οι επεμβάσεις του ζιζανιοκτόνου έγιναν όταν τα φυτά ήταν στο στάδιο των 6-8 φύλλων. Το πειραματικό σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν πλήρεις ομάδες σε ελεύθερη διάταξη (RCBD) με 4 επαναλήψεις (φυτοδοχεία) ανά επέμβαση.

**Πειράματα ελέγχου ανάπτυξης ανθεκτικότητας.** Όλοι οι πληθυσμοί αξιολογήθηκαν αρχικώς ως προς την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο ζιζανιοκτόνο glyphosate κατά τα έτη 2010-2011. Το glyphosate εφαρμόστηκε στη συνιστώμενη δόση (63 g δ.ο/στρ), διπλάσια και τετραπλάσια (της συνιστώμενης) δόση. Για την σύγκριση της αποτελεσματικότητας των επεμβάσεων του ζιζανιοκτόνου υπήρχε για κάθε πληθυσμό και απέκαστος μάρτυρας (μη εφαρμογή ζιζανιοκτόνου). Η αποτελεσματικότητα των επεμβάσεων εκφράστηκε ως % αναστολή της ανάπτυξης των φυτών. Η



αξιολόγηση έγινε μακροσκοπικά τέσσερις εβδομάδες μετά τον ψεκάσμο χρησιμοποιώντας την κλίμακα 0-100 (0: μη καταπολέμησι-φυτά χωρίς συμπτώματα και παρόμοια με εκείνα του αμέκαστου μάρτυρα, 100: πλήρης νέκρωση των φυτών).

**Πειράματα προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας (GR<sub>50</sub>, R/S).** Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά τα έτη 2011-2012 μελετήθηκε (μακροσκοπική εκτίμηση και προσδιορισμός χλωρού βάρους) η ένταση ανθεκτικότητας πέντε ανθεκτικών (R) βιοτύπων του *C. albida* και τριών βιοτύπων του *C. bonariensis* στο glyphosate. Ειδικότερα, το glyphosate χρησιμοποιήθηκε στις δόσεις [1/2x, 1x (συνιστώμενη, 63 g δ.ο/στρ), 2x, 4x, 8x, 16x] για τους οκτώ R βιότυπους. Αντίθετα, για δυο ευαίσθητους (S) βιότυπους (έναν για κάθε είδος) χρησιμοποιήθηκε το ίδιο ζιζανιοκτόνο αλλά σε δόσεις 1x (συνιστώμενη, 63 g δ.ο/στρ), 1/2x, 1/4x, 1/8x, 1/16x και 1/32x. Για κάθε βιότυπο (ανθεκτικό ή ευαίσθητο) μεταξύ των επεμβάσεων υπήρχε και αμέκαστος μάρτυρας (μη εφαρμογή ζιζανιοκτόνου). Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές στο χρόνο. Η επίδραση των επεμβάσεων στην ανάπτυξη των φυτών αξιολογήθηκε έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate με προσδιορισμό του χλωρού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών που επιβίωσαν σε κάθε φυτοδοχείο. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως ποσοστό (%) του μέσου χλωρού βάρους του αμέκαστου μάρτυρα για κάθε βιότυπο. Οι μέσοι όροι των επεμβάσεων χρησιμοποιήθηκαν για την εξεύρεση της καταλληλότερης εξίσωσης συμμεταβολής με σκοπό τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ζιζανιοκτόνου που προκαλεί μείωση του χλωρού βάρους (GR<sub>50</sub> τιμή) των φυτών κάθε βιότυπου (Seefeldt κ.ά., 1995). Ακολούθως, οι προσδιορισθείσες GR<sub>50</sub> τιμές χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της έντασης ανθεκτικότητας [R/S, λόγος της GR<sub>50</sub> τιμής ενός R πληθυσμού προς την αντίστοιχη GR<sub>50</sub> τιμή του S πληθυσμού] των βιοτύπων στο ζιζανιοκτόνο.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

**Πειράματα ελέγχου ανάπτυξης ανθεκτικότητας.** Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι 25 πληθυσμοί του ζιζανίου *Conyza* spp. δεν αντιμετωπίστηκαν αποτελεσματικά (16-70% μείωση της ανάπτυξης των φυτών σε σχέση με το μάρτυρα) στη συνιστώμενη δόση του glyphosate και χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικοί (R) ενώ οι υπόλοιποι χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητοι (S). Οι δύο χαρακτηρισμένοι ως ευαίσθητοι πληθυσμοί αντιμετωπίστηκαν αποτελεσματικά (95-100% μείωση της ανάπτυξης των φυτών σε σχέση με το μάρτυρα) με όλες τις επεμβάσεις του ζιζανιοκτόνου. Ακολούθως, τα πιο εύρωστα φυτά των ανθεκτικών πληθυσμών μεταφυτεύτηκαν σε μεγαλύτερα φυτοδοχεία (8,5 L) και αφέθηκαν σε συνθήκες περιβάλλοντος για να σποροποιήσουν. Κατά την ωρίμανση, οι σπόροι κάθε φυτού συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν ξεχωριστά για περαιτέρω χρήση τους στις πειραματικές εργασίες.

**Πειράματα προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας (R/S).** Τα δεδομένα έδειξαν ότι η ένταση ανθεκτικότητας (R/S) των πέντε βιοτύπων του είδους *C. albida* κυμάνθηκε από 7,96 έως 32,51 στο πρώτο πείραμα και από 8,15 έως 38,91 στο δεύτερο πείραμα, ενώ η ένταση ανθεκτικότητας (R/S) των τριών βιοτύπων του είδους *C. bonariensis* κυμάνθηκε από 2,51 έως 9,75 στο πρώτο πείραμα και από 3,82 έως 6,20 στο δεύτερο πείραμα.

### 4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Baylis, A.D. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science* 56: 299-308.
- Feng, P.C., M. Tran, T. Chiu, R.D. Sammons, G.R. Heck, and C. A. Cajacob. 2004. Investigation into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza Canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed science*: 52:498-505.
- Ge, X., D. D'avignon, J. Ackerman, and R.D. Sammons. 2010. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Management Science*: 66: 345-348.
- Heap, I. 2012. International survey of herbicide resistant weeds. Available at web site <http://www.weedscience.org/In.asp>
- Nol, N., D. Tsikou, M. Eid, I.C. Livieratos, and C.N. Giannopolitis. 2012. Shikimate leaf disc assay for early detection of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* and relative transcript level of EPSPS and ABC transporter genes. *Weed Research* 52: 233-241.
- Seefeldt, S., J. Jensen, and E. Fuerst. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology* 9: 218-227.

Travlos, I.S. and D. Chachalis. 2010. Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) is reported in Greece. *Weed Technology* 24: 569-573.

Weaver, S. E. 2001. The biology of Canadian weeds. 115. *Conyza canadensis*. *Canadian Journal of Plant Science* 81: 867-875.

Γιαννίσαρος, Α. 1997. Είδη του γένους *Conyza* Less. στην Ελλάδα. 10ο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Θεσσαλονίκη 16-18 Δεκεμβρίου 1997. Περιλήψεις Ανακοινώσεων σελ. 22.

Γιαννοπολίτης, Κ., Η. Τραυλός, Δ. Χάχαλης, Ι. Παπαγεωργίου και Α. Καζαντζίδου. 2008. Διερεύνηση της ανθεκτικότητας βιοτύπων της Κόνυζας (*Conyza* spp.) στο ζιζανιοκτόνο glyphosate. 15ο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Θεσσαλονίκη 11-12 Δεκεμβρίου 2008. Περιλήψεις Ανακοινώσεων σελ. 44.



ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΟΚΤΩ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΔΥΟ  
ΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΒΙΟΤΥΠΩΝ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ *Conyza albida* ΚΑΙ *C. bonariensis* ΣΤΟ GLYPHOSATE  
Φ.Ν. Μυλωνάς<sup>1,2</sup>, Κ.Ν. Γιαννοπολίτης<sup>3</sup>, Π.Γ. Ευθυμιάδης<sup>1</sup> και Η.Γ. Ελευθεροχωρινός<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Γεωργίας.

<sup>2</sup> Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Εργαστήριο Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων.

<sup>3</sup> Εκδόσεις Αγροτύπος Α.Ε.

<sup>4</sup> Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Γεωπονική Σχολή, Εργαστήριο Γεωργίας.

Email: [ph.mylonas@bpi.gr](mailto:ph.mylonas@bpi.gr)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος αξιολογήθηκαν ως προς τον ρυθμό ανάπτυξης, τα μορφολογικά και φαινολογικά χαρακτηριστικά πέντε (5) ανθεκτικοί βιότυποι στο glyphosate του είδους *Conyza albida*, τρεις (3) ανθεκτικοί βιότυποι του *C. bonariensis*, ένας ευαίσθητος βιότυπος *C. albida* και ένας ευαίσθητος βιότυπος *C. bonariensis*. Τα δεδομένα έδειξαν ότι η έναρξη της επιμήκυνσης του στελέχους, η εμφάνιση του πρώτου ανθοφόρου οφθαλμού, η εμφάνιση του πρώτου άνθους και η έναρξη της σποροποίησης των φυτών ενός ανθεκτικού βιότυπου του *C. albida* έγινε 5-13 ημέρες αργότερα σε σύγκριση με τα φυτά του ευαίσθητου βιότυπου. Αντιθέτως, τα προαναφερθέντα στάδια καταγράφηκαν στα φυτά ενός άλλου ανθεκτικού βιότυπου του *C. albida* 2-5 ημέρες νωρίτερα από ότι στα φυτά του ευαίσθητου βιότυπου. Το ξηρό βάρος των φυτών του πρώτου (οψιμότερου) ανθεκτικού βιότυπου κατά το στάδιο της σποροποίησης ήταν πολύ μεγαλύτερο από του ευαίσθητου βιότυπου, ενώ το αντίστοιχο ξηρό βάρος του δεύτερου (πρωιμότερου) ανθεκτικού βιότυπου ήταν ελαφρώς μεγαλύτερο από το ξηρό βάρος του ευαίσθητου βιότυπου. Σχετικώς με το *C. bonariensis*, η έναρξη της επιμήκυνσης του στελέχους, η εμφάνιση του πρώτου ανθοφόρου οφθαλμού, η εμφάνιση του πρώτου άνθους και η έναρξη της σποροποίησης των φυτών των τριών ανθεκτικών βιότυπων παρατηρήθηκε 0-8 ημέρες νωρίτερα από ότι στα φυτά του ευαίσθητου βιότυπου, ενώ το ξηρό βάρος τους ήταν ελαφρώς μικρότερο από το ξηρό βάρος του ευαίσθητου βιότυπου κατά το στάδιο της σποροποίησης.

**Λέξεις Κλειδιά:** ρυθμός ανάπτυξης, φαινολογικά χαρακτηριστικά, glyphosate, *Conyza* spp.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα είδη του γένους *Conyza* (οικογένεια Asteraceae) που απαντώνται στην Ελλάδα είναι το *C. bonariensis* (L.) Cronq., το *C. canadensis* (L.) Cronq και το *C. albida* Wild. ex Sprengel (Γιαννίσαρος, 1997). Τα είδη αυτά παράγουν τεράστιες ποσότητες αχαινίων μέσω των οποίων η εξάπλωσή τους από περιοχή σε περιοχή είναι εύκολη και ταχύτατη. Τα τρία είδη, τα οποία έχουν πλήρως προσαρμοστεί σε πολλές περιοχές της Ελλάδας (Γιαννίσαρος, 1997), συγκαταλέγονται μεταξύ των χειρότερων ζιζανίων του κόσμου και απαντώνται συχνά σε μεικτούς πληθυσμούς σε σπυρώνες, αμπελώνες αλλά και σε ακαλλιέργητες εκτάσεις.

Η αντιμετώπιση των ειδών του γένους *Conyza* βασίζεται κυρίως σε επαναλαμβανόμενες εφαρμογές μεταφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων και κυρίως του glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine], το οποίο θεωρείται ως το σημαντικότερο ευρέος φάσματος μη εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο παγκοσμίως (Baylis, 2000; Nol κ.ά., 2012). Βέβαια, η συνεχής και εντατική χρήση του glyphosate κατά τα τελευταία χρόνια οδήγησε στην ανάπτυξη 13, 31 και 3 ανθεκτικών βιότυπων που ανήκουν στα είδη *C. bonariensis*, *C. canadensis* και *C. albida* (Hear, 2012). Η πρώτη αναφορά ανθεκτικών πληθυσμών στο glyphosate του γένους *Conyza* στη χώρα μας έγινε από τους Γιαννοπολίτης κ.ά. (2008) και ακολούθησαν αναφορές ανθεκτικών βιότυπων στο glyphosate των ειδών *C. bonariensis* (Travlos και Chachalis, 2010) και *C. canadensis* (Nol κ.ά., 2012).

Οι Shrestha κ.ά. (2010) αναφέρουν ότι η αυξημένη προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών βιότυπων του γένους *Conyza* είναι ανεπιθύμητη επειδή συμβάλλει στην ταχεία εξάπλωσή τους. Βέβαια, σύμφωνα με τις ίδιες πηγές (Shrestha κ.ά., 2010), αυτό δεν συμβαίνει πάντοτε αφού η μελέτη ενός ανθεκτικού και ενός ευαίσθητου βιότυπου του *C. canadensis* έδειξε ότι ο ανθεκτικός βιότυπος ήταν υψηλότερος από τον ευαίσθητο, αλλά το ξηρό βάρος του ήταν μικρότερο κατά 40%. Αντίθετα, η μελέτη ενός ανθεκτικού και ενός ευαίσθητου βιότυπου του *C. bonariensis* έδειξε ότι δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των δύο βιότυπων σε συνθήκες μη ανταγωνισμού (Travlos και Chachalis, 2012).



Επειδή οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικώς με την προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών και ευαίσθητων βιοτύπων του γένους *Colyza* υπό τις ίδιες συνθήκες είναι ελάχιστες και εξαιτίας της μεγάλης σπουδαιότητας τέτοιων μελετών στην επιλογή των μεθόδων αντιμετώπισής τους, αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία όπου αξιολογήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης, τα μορφολογικά και τα φαινολογικά χαρακτηριστικά διαφόρων ανθεκτικών και ευαίσθητων βιοτύπων στο glyphosate των *C. bonariensis* και *C. albida*.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

**Προέλευση φυτικού υλικού.** Σπόροι από πέντε και τρεις ανθεκτικούς βιότυπους των ειδών *C. albida* και *C. bonariensis*, αντίστοιχα, καθώς και σπόροι από δύο ευαίσθητους βιότυπους των ανωτέρω ειδών (ένας για κάθε είδος) αξιολογήθηκαν ως προς τον ρυθμό ανάπτυξης, τα μορφολογικά και τα φαινολογικά χαρακτηριστικά των φυτών. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε βιότυπο προήλθαν από φυτά που αναπτύχθηκαν κατά το πείραμα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας των βιοτύπων.

**Πείραμα φυτοδοχείων.** Το πείραμα πραγματοποιήθηκε κατά την καλλιεργητική περίοδο άνοιξη-θέρος του 2012. Ειδικότερα, σπόροι από κάθε βιότυπο σπάρθηκαν σε πλαστικούς δίσκους των 24 θέσεων και διαστάσεων 6x5.5x5 cm για κάθε θέση. Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα ανοικτού-κίτρινου και μαύρου χρώματος τύρφης σε αναλογία 1:2. Ακολούθως, οι πλαστικοί δίσκοι τοποθετήθηκαν εντός του θερμοκηπίου όπου, μετά την εμφάνιση των σποροφύτων, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις ώστε τελικά να παραμείνουν ομοιόμορφα ανεπτυγμένα φυτά στο στάδιο των 2-4 φύλλων. Στη συνέχεια, δύο ομοιόμορφα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε κάθε φυτοδοχείο (χωρητικότητας 8,5 L χρησιμοποιώντας το προαναφερθέν μείγμα εδάφους) και όλα τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν σε υπαίθριο χώρο ώστε τα φυτά να αναπτυχθούν υπό φυσικές συνθήκες περιβάλλοντος (άνοιξη-θέρος του 2012). Τα φυτά κατά τη διάρκεια του πειράματος αρδεύονταν με στάγδην άρδευση για να εξασφαλιστεί το ομοιόμορφο πότισμα που είναι απαραίτητο για την ομοιόμορφη και κανονική ανάπτυξη των φυτών. Χρησιμοποιήθηκε το 10 x 5 (10 βιότυποι x 5 δειγματοληψίες) παραγοντικό πείραμα με τέσσερις (4) επαναλήψεις (φυτοδοχεία) για κάθε συνδυασμένο παράγοντα. Το πειραματικό σχέδιο ήταν πλήρεις ομάδες σε ελεύθερη διάταξη (RCBD). Ειδικότερα, η πρώτη δειγματοληψία έγινε στο στάδιο της ροζέτας, η δεύτερη στο στάδιο της επιμήκυνσης του στελέχους (bolting stage), η τρίτη στην άνθηση, η τέταρτη στο 50-80% της σποροποίησης και η πέμπτη στο 100% της σποροποίησης. Σε κάθε δειγματοληψία καταγράφηκε το χλωρό και το ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών ανά βιότυπο και επανάληψη (φυτοδοχείο). Επίσης, σε ορισμένες δειγματοληψίες μετρήθηκε το ύψος των φυτών (ύψος κεντρικού στελέχους), η διάμετρος της ροζέτας και ο αριθμός των φύλλων των φυτών. Επιπρόσθετα, για κάθε βιότυπο καταγράφηκε η ημερομηνία έναρξης επιμήκυνσης του στελέχους (bolting), η ημερομηνία έναρξης σχηματισμού ανθοφόρων οφθαλμών, η ημερομηνία έναρξης της άνθησης και η ημερομηνία έναρξης της σποροποίησης. Οι φαινολογικές μετρήσεις λαμβάνονταν καθημερινά με μακροσκοπική παρατήρηση. Τα δεδομένα των φαινολογικών μετρήσεων εκφράστηκαν ως ημέρες (DAT) από την εγκατάσταση των φυτοδοχείων στον υπαίθριο χώρο.

## 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα δεδομένα έδειξαν ότι η έναρξη της επιμήκυνσης του στελέχους, η εμφάνιση του πρώτου ανθοφόρου οφθαλμού, η εμφάνιση του πρώτου άνθους και η έναρξη της σποροποίησης των φυτών ενός ανθεκτικού βιοτύπου του *C. albida* καταγράφηκε 5-13 ημέρες αργότερα σε σύγκριση με τα φυτά του ευαίσθητου βιοτύπου. Αντιθέτως, τα προαναφερθέντα στάδια των φυτών ενός άλλου ανθεκτικού βιοτύπου του *C. albida* παρατηρήθηκαν 2-5 ημέρες νωρίτερα από ότι στα φυτά του ευαίσθητου βιοτύπου. Το ξηρό βάρος των φυτών του πρώτου (οψιμότερου) ανθεκτικού βιοτύπου κατά το στάδιο της σποροποίησης ήταν πολύ μεγαλύτερο από εκείνο του ευαίσθητου βιοτύπου, ενώ το αντίστοιχο ξηρό βάρος του δευτέρου (πρωιμότερου) ανθεκτικού βιοτύπου ήταν ελαφρώς μεγαλύτερο του ευαίσθητου βιοτύπου. Σχετικώς με το *C. bonariensis*, η έναρξη της επιμήκυνσης του στελέχους, η εμφάνιση του πρώτου ανθοφόρου οφθαλμού, η εμφάνιση του πρώτου άνθους και η έναρξη της σποροποίησης των φυτών των τριών ανθεκτικών βιοτύπων παρατηρήθηκε 0-8 ημέρες νωρίτερα από ότι στα φυτά του ευαίσθητου βιοτύπου, ενώ το ξηρό βάρος τους ήταν ελαφρώς μικρότερο από το ξηρό βάρος του ευαίσθητου βιοτύπου κατά το στάδιο της σποροποίησης. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής δείχνουν ότι ο ρυθμός αύξησης παρουσιάζει μεγαλύτερη παραλλακτικότητα μεταξύ των ανθεκτικών βιοτύπων του *C. albida* σε σύγκριση με τον ευαίσθητο



βιότυπο, ενώ ο αντίστοιχος ρυθμός των ανθεκτικών βιοτύπων του *C. bonariensis* παρουσιάζει μικρότερη παραλλακτικότητα.

#### 4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Baylis, A.D. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science* 56: 299-308.

Heap, I. 2012. International survey of herbicide resistant weeds. Available at web site <http://www.weedscience.org/In.asp>

Nol, N., D. Tsikou, M. Eid, I.C. Livieratos, and C.N. Giannopolitis. 2012. Shikimate leaf disc assay for early detection of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* and relative transcript level of EPSPS and ABC transporter genes. *Weed Research* 52: 233-241.

Shrestha, A., B.D. Bradley, D. Hanson, M.W. Fidelibus, and M. Alcorta. 2010. Growth, phenology, and intraspecific competition between glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible horseweeds (*Conyza canadensis*) in the San Joaquin valley of California. *Weed Science* 58: 147-153.

Travlos, I.G. and D. Chachalis. 2010. Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) is reported in Greece. *Weed Technology* 24: 569-573.

Travlos, I.G. and D. Chachalis. 2012. Relative competitiveness of glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible populations of hairy fleabane, *Conyza bonariensis*. *Journal of Pest Science*. (in press).

Γιαννίτσaros, A. 1997. Είδη του γένους *Conyza* Less. στην Ελλάδα. 10ο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Θεσσαλονίκη 16-18 Δεκεμβρίου 1997. Περιλήψεις Ανακοινώσεων σελ. 22.

Γιαννοπολίτης, Κ., Η. Τραυλός, Δ. Χάχαλης, Ι. Παπαγεωργίου και Α. Καζαντζίδου. 2008. Διερεύνηση της ανθεκτικότητας βιοτύπων της κόνουζας (*Conyza* spp.) στο ζιζανιοκτόνο glyphosate. 15ο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Θεσσαλονίκη 11-12 Δεκεμβρίου 2008. Περιλήψεις Ανακοινώσεων σελ. 44.

## 2.2. 18<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας. Ηράκλειο Κρήτης, 3-4 Μαρτίου 2015.

ΠΡΑΚΤΙΚΑ 18<sup>ου</sup> ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ ΤΗΣ ΕΖΕ

### 2<sup>η</sup> ΕΝΟΤΗΤΑ: ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΖΙΖΑΝΙΩΝ ΣΕ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ

#### ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ GLYPHOSATE ΕΝΑΝΤΙΟΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ *Conyza albida* ΚΑΙ *C. bonariensis* ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΕΙΜΕΡΙΝΗ/ΘΕΡΙΝΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ

Φ.Ν. Μυλωνάς<sup>1,2</sup>, Κ.Ν. Γιαννοπολίτης<sup>3</sup>, Π.Γ. Ευθυμιάδης<sup>2</sup>, Γ.Χ. Μενεξές<sup>4</sup> και Η.Γ.  
Ελευθεροχωρινός<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο,  
Εργαστήριο Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων  
Σ. Δέλτα 8,14561, Κηφισιά, Αθήνα, Ελλάδα

<sup>2</sup>Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Γεωργίας  
<sup>3</sup>Εκδόσεις Αγροτύπος Α.Ε.

<sup>4</sup>Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Γεωπονίας, Εργαστήριο Γεωργίας  
Email: ph.mylonas@bpi.gr

Σε πειράματα φυτοδοχείων, ένας ανθεκτικός και ένας ευαίσθητος πληθυσμός από τα είδη *Conyza albida* και *C. bonariensis*, αξιολογήθηκαν για την ευαισθησία τους στη χειμερινή/θερινή εφαρμογή του glyphosate. Οι επεμβάσεις του ζιζανιοκτόνου έγιναν όταν τα φυτά ήταν στο στάδιο των 6-8 φύλλων. Το glyphosate χρησιμοποιήθηκε στις δόσεις 1/2x, 1x (συνιστώμενη, 63 g δ.ο./στρ), 2x, 4x, 8x, 16x για τους ανθεκτικούς πληθυσμούς, ενώ για τους ευαίσθητους πληθυσμούς χρησιμοποιήθηκε στις δόσεις 1x (συνιστώμενη, 63 g δ.ο./στρ), 1/2x, 1/4x, 1/8x, 1/16x και 1/32x. Για κάθε πληθυσμό (ανθεκτικό ή ευαίσθητο) μεταξύ των επεμβάσεων υπήρχε και απέκαστος μάρτυρας (μη εφαρμογή ζιζανιοκτόνου). Τα πειράματα έγιναν το 2011-12 και 2012-13, ενώ για κάθε συνδυασμένη επέμβαση υπήρχαν τέσσερις επαναλήψεις (φυτοδοχεία). Η δράση του glyphosate αξιολογήθηκε έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή του με προσδιορισμό του χλωρού βάρους του υπέργειου τμήματος των επιβιωσάντων φυτών σε κάθε φυτοδοχείο. Τα πρωτογενή δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για την συνδυασμένη ανάλυση της παραλλακτικότητας, ενώ, εκφρασμένα ως ποσοστό (%) του μέσου χλωρού βάρους του απέκαστου μάρτυρα για κάθε πληθυσμό, χρησιμοποιήθηκαν για την εξεύρεση της μη γραμμικής λογαριθμικής-λογιστικής εξίσωσης συμμεταβολής [ $\gamma$ -άξονας: χλωρό βάρος (% του απέκαστου μάρτυρα) και  $x$ -άξονας: συγκέντρωση glyphosate]. Αυτό έγινε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ζιζανιοκτόνου που προκαλεί μείωση του χλωρού βάρους κατά 50% (GR<sub>50</sub> τιμή) των φυτών κάθε πληθυσμού. Τα δεδομένα έδειξαν ότι η δράση του glyphosate εναντίον των ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών και των δύο ειδών *Conyza* ήταν μεγαλύτερη μετά από χειμερινή εφαρμογή. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από τις υπολογισθείσες GR<sub>50</sub> τιμές για τους ανθεκτικούς και ευαίσθητους πληθυσμούς των δυο ειδών, οι οποίες ήταν μικρότερες για την χειμερινή εφαρμογή του glyphosate σε σύγκριση με τη θερινή εφαρμογή. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η αντιμετώπιση των ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών των δύο ειδών *Conyza* είναι καλύτερη μετά από χειμερινή εφαρμογή του glyphosate και όχι μετά από θερινή εφαρμογή.



GLYPHOSATE EFFICACY AGAINST *Conyza albida* AND *C. bonariensis* POPULATIONS  
AFTER APPLICATION IN WINTER/SUMMER

P.N. Mylonas<sup>1,2</sup>, C.N. Giannopolitis<sup>3</sup>, P.G. Efthimiadis<sup>2</sup>, G.C. Menexes<sup>4</sup> and I.G.  
Eleftherohorinos<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Benaki Phytopathological Institute, Laboratory of Biological Control of Pesticides  
8 S. Delta str., 145 61, Kifissia, Athens, Greece

<sup>2</sup>Agricultural University of Athens, Laboratory of Agronomy

<sup>3</sup>Agrotypos Publishing S.A.

<sup>4</sup>Aristotle University of Thessaloniki, School of Agriculture, Laboratory of Agronomy  
Email: ph.mylonas@bpi.gr

Pot experiments were carried out to study glyphosate efficacy against one resistant and one susceptible population of either *Conyza albida* or *C. bonariensis* after its application in winter or in summer. Plants were treated with glyphosate when reached the 6 to 8 leaf growth stage. For the resistant populations, glyphosate was applied at 1/2x, 1x (recommended rate, 63 g a.i./ha), 2x, 4x, 8x, and 16x, while for the susceptible populations glyphosate was applied at 1x (recommended rate, 63 g a.i./ha), 1/2x, 1/4x, 1/8x, 1/16x, and 1/32x. Also, an untreated control for each population (resistant or susceptible) was included. The experiments were conducted during 2011-12 and 2012-13 with four replications (pots) for each combined treatment. At 6 WAT, the control of *C. albida* and *C. bonariensis* populations was assessed by determining the fresh weight of all survived plants in each pot. The raw data were used for the combined analysis of variance, whereas, expressed as percentage (%) of mean fresh weight of the respective untreated control of each population, were subjected to nonlinear regression analysis using the log-logistic equation [*y*-axis: fresh weight (% of control) and *x*-axis: herbicide concentration]. This was made in order to determine the amount of glyphosate required for 50% reduction of fresh weight (GR<sub>50</sub> value) for each population. The data showed that glyphosate efficacy was higher in winter than in summer application against resistant and susceptible populations of both *Conyza* species. This was confirmed by the calculated GR<sub>50</sub> values for resistant and susceptible populations of both species, which were lower after the glyphosate application in winter than in summer. These findings revealed that the control obtained for resistant and susceptible populations of both *Conyza* species is higher after glyphosate application in winter than in summer.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ  
ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ *Conyza albida* ΚΑΙ *C. bonariensis* ΣΤΟ GLYPHOSATE

Φ.Ν. Μυλωνάς<sup>1,2</sup>, Κ.Ν. Γιαννοπολίτης<sup>3</sup>, Π. Γ. Ευθυμιάδης<sup>2</sup>, Γ.Χ. Μενεξές<sup>4</sup> και Η.Γ.  
Ελευθεροχωρινός<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Εργαστήριο Βιολογικού Ελέγχου  
Γεωργικών Φαρμάκων, Σ. Δέλτα 8, 14561, Κηφισιά, Αθήνα, Ελλάδα

<sup>2</sup>Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Γεωργίας

<sup>3</sup>Εκδόσεις Αγροτύπος Α.Ε.

<sup>4</sup>Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Γεωπονίας, Εργαστήριο Γεωργίας  
Email: ph.mylonas@bpi.gr

Σε συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος αξιολογήθηκαν, ως προς τον ρυθμό ανάπτυξης, τα μορφολογικά και φαινολογικά χαρακτηριστικά, πέντε ανθεκτικοί πληθυσμοί στο glyphosate του *Conyza albida*, τρεις ανθεκτικοί πληθυσμοί του *C. bonariensis*, ένας ευαίσθητος πληθυσμός *C. albida* και ένας ευαίσθητος πληθυσμός *C. bonariensis*. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε πληθυσμό προήλθαν από φυτά που επεβίωσαν και αναπτύχθηκαν κατά το προκαταρκτικό πείραμα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας των πληθυσμών. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε φυτοδοχεία κατά την άνοιξη-θέρος του 2012 και 2014. Χρησιμοποιήθηκε το 10 x 5 (10 πληθυσμοί x 5 δειγματοληψίες) παραγοντικό πείραμα με τέσσερις επαναλήψεις (φυτοδοχεία) για κάθε συνδυασμένο παράγοντα. Η πρώτη δειγματοληψία έγινε στο στάδιο της ροζέτας, η δεύτερη στο στάδιο της επιμήκυνσης του στελέχους (bolting stage), η τρίτη στην άνθηση, η τέταρτη στο 50-80% της σποροποίησης και η πέμπτη στο 100% της σποροποίησης. Σε κάθε δειγματοληψία προσδιορίστηκε το χλωρό και το ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών ανά πληθυσμό και επανάληψη (φυτοδοχείο). Επίσης, σε ορισμένες δειγματοληψίες μετρήθηκε το ύψος των φυτών (ύψος κεντρικού στελέχους), η διάμετρος της ροζέτας και ο αριθμός των φύλλων των φυτών. Επιπρόσθετα, για κάθε πληθυσμό καταγράφηκε η ημερομηνία έναρξης επιμήκυνσης του στελέχους (bolting), η ημερομηνία έναρξης σχηματισμού ανθοφόρων οφθαλμών, η ημερομηνία έναρξης της άνθησης και η ημερομηνία έναρξης της σποροποίησης. Η συνδυασμένη, ως προς το χρόνο, ανάλυση των δεδομένων των δύο πειραμάτων έδειξε ότι το ξηρό βάρος των ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών των δύο ειδών *Conyza* διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο πειραμάτων. Όσον αφορά τα φαινολογικά χαρακτηριστικά, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν για την *C. albida* μεταξύ των δύο πειραμάτων στο στάδιο της έναρξης επιμήκυνσης του στελέχους, ενώ για την *C. bonariensis* παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε όλα τα προαναφερθέντα φαινολογικά στάδια.



GROWTH RATE EVALUATION OF SUSCEPTIBLE AND RESISTANT *Conyza albida* AND *C. bonariensis* POPULATIONS TO GLYPHOSATE

P.N. Mylonas<sup>1,2</sup>, C.N. Giannopolitis<sup>3</sup>, P.G. Efthimiadis<sup>2</sup>, G.C. Menexes<sup>4</sup> and I.G. Eleftherohorinos<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Benaki Phytopathological Institute, Laboratory of Biological Control of Pesticides  
8 S. Delta str., 145 61, Kifissia, Athens, Greece

<sup>2</sup>Agricultural University of Athens, Laboratory of Agronomy

<sup>3</sup>Agrotipos Publishing S.A.

<sup>4</sup>Aristotle University of Thessaloniki, School of Agriculture, Laboratory of Agronomy  
Email: ph.mylonas@bpi.gr

The growth rate, the morphological and phenological characteristics of five glyphosate resistant *Conyza albida* populations, three glyphosate resistant *C. bonariensis* populations, one susceptible *C. albida* population, and one susceptible *C. bonariensis* population were studied under natural environmental conditions. The seeds used for each population were selected from plants that survived glyphosate application during the preliminary resistance screening experiment. The experiment was conducted in pots during spring-summer 2012 and 2014. The 10 x 5 (10 populations x 5 harvests) factorial experiment was used with four replications (pots) for each combined factor. The first harvest was done at the rosette stage, the second at bolting stage, the third at full flowering, the fourth at 50-80% of seed production, and the fifth at 100% of seed production. In each harvest, the fresh and dry weights were determined per population and replication (pot). In addition, in some harvests the height of main stem, the rosette diameter and the number of leaves were recorded. Furthermore, plants were inspected daily in order to record beginning of bolting (extension of main stem), first appearance of a floral bud, first appearance of an open flower, and first appearance of a flower with seeds. The combined over experimental time analysis of the data indicated that dry weight of resistant and susceptible populations of both *Conyza* species was significantly different between the two experiments. Concerning the phenological characteristics, beginning of bolting stage was significantly different between the two experiments for *C. albida*, while for *C. bonariensis* significant differences were observed between the two experiments in all the aforementioned phenological stages.

### 3. Πίνακες ανάλυσης παραλλακτικότητας και εξισώσεις συμμεταβολής

**Πίνακας 1.** Πείραμα διερεύνησης ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών. Ανάλυση παραλλακτικότητας του αριθμού των επιβιωσάντων φυτών 60 πληθυσμών *C. albida* και *C. bonariensis* στις τέσσερις εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Ομάδες	3	0,640	*
Πληθυσμοί (A)	59	10,588	*
Σφάλμα	177	0,188	
Επεμβάσεις glyphosate (B)	3	584,424	*
A x B	177	2,099	*
Σφάλμα	540	0,199	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		24,70%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 2.** Πείραμα διερεύνησης ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών. Ανάλυση παραλλακτικότητας του αριθμού των επιβιωσάντων φυτών 32 πληθυσμών *C. albida* στις τέσσερις εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Ομάδες	3	0,036	NS
Πληθυσμοί (A)	31	12,043	*
Σφάλμα	93	0,161	
Επεμβάσεις glyphosate (B)	3	271,755	*
A x B	93	2,300	*
Σφάλμα	288	0,161	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		19,98%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 3.** Πείραμα διερεύνησης ύπαρξης ανθεκτικών πληθυσμών. Ανάλυση παραλλακτικότητας του αριθμού των επιβιωσάντων φυτών 28 πληθυσμών *C. bonariensis* στις τέσσερις εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Ομάδες	3	1,247	*
Πληθυσμοί (A)	27	7,659	*
Σφάλμα	81	0,202	



Επεμβάσεις glyphosate (B)	3	318,872	*
A x B	81	1,716	*
Σφάλμα	252	0,242	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		31,21%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 4.** Πειράματα προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας. Ανάλυση παραλλακτικότητας του νοπού βάρους των φυτών πέντε ανθεκτικών πληθυσμών *C. albida* στις έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	367,740	*
Σφάλμα	6	4,144	
Πληθυσμοί (B)	4	213,506	*
A x B	4	17,280	*
Επεμβάσεις glyphosate (C)	6	1078,467	*
A x C	6	20,345	*
B x C	24	16,466	*
A x B x C	24	3,971	NS
Σφάλμα	204	4,661	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		31,36%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 5.** Πειράματα προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας. Ανάλυση παραλλακτικότητας του νοπού βάρους των φυτών τριών ανθεκτικών πληθυσμών *C. bonariensis* στις έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	13,397	*
Σφάλμα	6	1,714	
Πληθυσμοί (B)	2	5,799	*
A x B	2	7,888	*
Επεμβάσεις glyphosate (C)	6	404,901	*
A x C	6	5,417	*
B x C	12	17,107	*
A x B x C	12	2,435	NS
Σφάλμα	120	1,364	

Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)	48,93%
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$	

**Πίνακας 6.** Πειράματα προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας. Ανάλυση παραλλακτικότητας του νωπού βάρους των φυτών ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* στις έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	20,740	NS
Σφάλμα	6	12,356	
Επεμβάσεις glyphosate (B)	6	417,889	*
A x B	6	6,872	NS
Σφάλμα	36	3,733	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		24,62%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 7.** Πειράματα προσδιορισμού της έντασης ανθεκτικότητας. Ανάλυση παραλλακτικότητας του νωπού βάρους των φυτών ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis* στις έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	78,850	*
Σφάλμα	6	12,215	
Επεμβάσεις glyphosate (B)	6	585,310	*
A x B	6	22,713	NS
Σφάλμα	36	8,988	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		40,66%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 8.** Πειράματα επίδρασης της εποχής εφαρμογής στη δράση του glyphosate. Ανάλυση παραλλακτικότητας του νωπού βάρους των φυτών του ανθεκτικότερου πληθυσμού *C. albida* και του ανθεκτικότερου πληθυσμού *C. bonariensis* στις έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	41,412	*
Σφάλμα	6	1,470	

Εποχή (B)	1	14,363	NS
A x B	1	160,764	*
Σφάλμα	6	3,071	
Πληθυσμοί (C)	1	1835,689	*
A x C	1	106,252	*
B x C	1	206,754	*
A x B x C	1	2,955	NS
Επεμβάσεις glyphosate (D)	6	478,787	*
A x D	6	9,460	*
B x D	6	10,536	*
C x D	6	33,055	*
A x B x D	6	19,414	*
A x C x D	6	7,073	NS
B x C x D	6	38,004	*
A x B x C x D	6	1,087	NS
Σφάλμα	156	3,458	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		30,12%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 9.** Πειράματα επίδρασης της εποχής εφαρμογής στη δράση του glyphosate. Ανάλυση παραλλακτικότητας του νωπού βάρους των φυτών ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida* και ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis* στις έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή του glyphosate.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	101,332	*
Σφάλμα	6	11,342	
Εποχή (B)	1	83,714	*
A x B	1	552,263	*
Σφάλμα	6	4,056	
Πληθυσμοί (C)	1	171,570	*
A x C	1	109,816	*
B x C	1	91,061	*
A x B x C	1	37,868	*
Επεμβάσεις glyphosate (D)	6	1290,971	*
A x D	6	11,265	*
B x D	6	137,042	*

C x D	6	36,731	*
A x B x D	6	26,540	*
A x C x D	6	4,741	NS
B x C x D	6	16,052	*
A x B x C x D	6	0,888	NS
Σφάλμα	156	4,888	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		26,89%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 10.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Ανάλυση παραλλακτικότητας του λογαριθμημένου ξηρού βάρους των φυτών πέντε ανθεκτικών και ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	7,747	*
Σφάλμα	6	0,040	
Πληθυσμοί (B)	5	0,110	*
A x B	5	0,074	*
Δειγματοληψίες (C)	4	26,864	*
A x C	4	0,439	*
B x C	20	0,027	NS
A x B x C	20	0,016	NS
Σφάλμα	174	0,018	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		9,35%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 11.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Ανάλυση παραλλακτικότητας του λογαριθμημένου ξηρού βάρους των φυτών τριών ανθεκτικών και ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	1,211	*
Σφάλμα	6	0,040	
Πληθυσμοί (B)	3	0,199	*
A x B	3	0,087	*
Δειγματοληψίες (C)	4	10,931	*
A x C	4	0,259	*

B x C	12	0,025	*
A x B x C	12	0,011	NS
Σφάλμα	114	0,06	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		19,83%	
Επίπεδο σημαντικότητας α=0,05			

**Πίνακας 12.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ), πιθανότητα σημαντικότητας (P) και εκτιμώμενες ημέρες επίτευξης του μεγίστου ξηρού βάρους (max DW) από την υπολογισθείσα δευτεροβάθμια εξίσωση μεταξύ του ξηρού βάρους και του χρόνου ανάπτυξης των φυτών (ημέρες από την εγκατάσταση των φυτοδοχείων στον υπαίθριο χώρο) της *C. albida* στο πρώτο πείραμα (2012).

Ξηρό βάρος (DW)		Δευτεροβάθμια εξίσωση $Y=a+bX+cX^2$			
Πληθυσμοί	$R^2$	P	Εκτιμώμενες ημέρες (days) για το μέγιστο ξηρό βάρος (max DW)	Μέγιστο ξηρό βάρος (max DW)	SE*
R1	0,963	0,037	>118	176,8	24,7
R2	0,922	0,078	80	198,5	36,9
R3	0,924	0,076	90	189,8	38,3
R4	0,985	0,015	>118	229,2	18,4
R5	0,960	0,040	>118	205,9	28,1
S1	0,926	0,074	98	147,1	30,5

\*SE: τυπικό σφάλμα (n=5).

**Πίνακας 13.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ), πιθανότητα σημαντικότητας (P) και εκτιμώμενες ημέρες επίτευξης του μεγίστου ξηρού βάρους (max DW) από την υπολογισθείσα δευτεροβάθμια εξίσωση μεταξύ του ξηρού βάρους και του χρόνου ανάπτυξης των φυτών (ημέρες από την εγκατάσταση των φυτοδοχείων στον υπαίθριο χώρο) της *C. albida* στο δεύτερο πείραμα (2014).

Ξηρό βάρος (DW)		Δευτεροβάθμια εξίσωση $Y=a+bX+cX^2$			
Πληθυσμοί	$R^2$	P	Εκτιμώμενες ημέρες (days) για το μέγιστο ξηρό βάρος (max DW)	Μέγιστο ξηρό βάρος (max DW)	SE*
R1	0,965	0,035	>133	40,6	5,8
R2	0,949	0,051	114	55,6	10,2
R3	0,944	0,056	120	61,5	10,1
R4	0,994	0,006	>133	46,5	2,3
R5	0,958	0,049	95	70,1	10,2
S1	0,897	0,103	120	61,8	14,3

\*SE: τυπικό σφάλμα (n=5).

**Πίνακας 14.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ), πιθανότητα σημαντικότητας (P) και εκτιμώμενες ημέρες επίτευξης του μεγίστου ξηρού βάρους (max DW) από την υπολογισθείσα δευτεροβάθμια εξίσωση μεταξύ του ξηρού βάρους και του χρόνου ανάπτυξης των φυτών (ημέρες από την εγκατάσταση των φυτοδοχείων στον υπαίθριο χώρο) της *C. bonariensis* στο πρώτο πείραμα (2012).

Ξηρό βάρος (DW)		Δευτεροβάθμια εξίσωση $Y=a+bX+cX^2$			
Πληθυσμοί	$R^2$	P	Εκτιμώμενες ημέρες (days) για το μέγιστο ξηρό βάρος (max DW)	Μέγιστο ξηρό βάρος (max DW)	SE*
R6	0,998	0,012	>97	97,1	2,6
R7	0,993	0,007	>97	83,9	4,1
R8	0,990	0,010	>97	95,3	5,5
S2	1,000	<0,001	>97	119,5	1,1

\*SE: τυπικό σφάλμα (n=5).

**Πίνακας 15.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ), πιθανότητα σημαντικότητας (P) και εκτιμώμενες ημέρες επίτευξης του μεγίστου ξηρού βάρους (max DW) από την υπολογισθείσα δευτεροβάθμια εξίσωση μεταξύ του ξηρού βάρους και του χρόνου ανάπτυξης των φυτών (ημέρες από την εγκατάσταση των φυτοδοχείων στον υπαίθριο χώρο) της *C. bonariensis* στο δεύτερο πείραμα (2014).

Ξηρό βάρος (DW)		Δευτεροβάθμια εξίσωση $Y=a+bX+cX^2$			
Πληθυσμοί	$R^2$	P	Εκτιμώμενες ημέρες (days) για το μέγιστο ξηρό βάρος (max DW)	Μέγιστο ξηρό βάρος (max DW)	SE*
R6	0,989	0,011	>92	36,8	2,1
R7	0,980	0,020	>92	36,7	2,8
R8	0,984	0,016	>92	27,8	2,2
S2	0,996	0,004	>92	43,0	1,5

\*SE: τυπικό σφάλμα (n=5).

**Πίνακας 16.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Συντελεστές δευτεροβάθμιας εξίσωσης ( $Y=a+bX+cX^2$ ) που περιγράφει καλύτερα τη σχέση μεταξύ του ξηρού βάρους [εξαρτημένη μεταβλητή (y)] και του χρόνου (ημέρες από την εγκατάσταση των φυτοδοχείων στον υπαίθριο χώρο) [ανεξάρτητη μεταβλητή (x)].

<i>C. albida</i>	2012			2014			
	Πληθυσμοί	a	b ( $\pm$ SE)	c	a	b ( $\pm$ SE)	c
R1		-35,634	3,570 ( $\pm$ 1,540)	-0,015	-5,841	0,615 ( $\pm$ 0,305)	-0,002
R2		-63,225	6,551 ( $\pm$ 2,303)	-0,041	-9,528	1,141 ( $\pm$ 0,534)	-0,005
R3		-52,313	5,390 ( $\pm$ 2,386)	-0,030	-10,501	1,200 ( $\pm$ 0,533)	-0,005
R4		-2,638	0,431 ( $\pm$ 1,148)	0,013	-2,784	0,424 ( $\pm$ 0,120)	-0,0004
R5		-18,029	1,938 ( $\pm$ 1,752)	-0,00034	-19,788	1,896 ( $\pm$ 0,536)	-0,010
S1		-35,195	3,722 ( $\pm$ 1,904)	-0,019	-10,304	1,201 ( $\pm$ 0,752)	-0,005

**Πίνακας 17.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Συντελεστές δευτεροβάθμιας εξίσωσης ( $Y=a+bX+cX^2$ ) που περιγράφει καλύτερα τη σχέση μεταξύ του ξηρού βάρους [εξαρτημένη μεταβλητή ( $y$ )] και του χρόνου (ημέρες από την εγκατάσταση των φυτοδοχείων στον υπαίθριο χώρο) [ανεξάρτητη μεταβλητή ( $x$ )].

<i>C. bonariensis</i>		2012			2014		
Πληθυσμοί	a	b ( $\pm$ SE)	c	a	b ( $\pm$ SE)	c	
R6	-5,318	0,765 ( $\pm$ 0,151)	0,003	-5,302	0,734 ( $\pm$ 0,127)	-0,003	
R7	-8,432	1,146 ( $\pm$ 0,232)	-0,002	-5,474	0,826 ( $\pm$ 0,168)	-0,004	
R8	-10,120	1,378 ( $\pm$ 0,318)	-0,003	-5,621	0,817 ( $\pm$ 0,134)	-0,005	
S2	-2,553	0,676 ( $\pm$ 0,061)	0,006	-3,683	0,967 ( $\pm$ 0,092)	-0,005	

**Πίνακας 18.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Ανάλυση παραλλακτικότητας των ημερών για την έναρξη επιμήκυνσης του στελέχους των φυτών πέντε ανθεκτικών και ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	102,083	*
Σφάλμα	6	7,750	
Πληθυσμοί (B)	5	162,233	*
A x B	5	33,233	*
Σφάλμα	30	6,133	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		11,41%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 19.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Ανάλυση παραλλακτικότητας των ημερών για την έναρξη εμφάνισης ανοθοφόρων οφθαλμών των φυτών πέντε ανθεκτικών και ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	4,687	NS
Σφάλμα	6	21,104	



Πληθυσμοί (B)	5	161,158	*
A x B	5	11,575	NS
Σφάλμα	30	9,333	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		4,32%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 20.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Ανάλυση παραλλακτικότητας των ημερών για την έναρξη της άνθισης των φυτών πέντε ανθεκτικών και ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	75,000	NS
Σφάλμα	6	29,611	
Πληθυσμοί (B)	5	176,333	*
A x B	5	14,000	NS
Σφάλμα	30	9,511	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		3,69%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 21.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Ανάλυση παραλλακτικότητας των ημερών για την έναρξη της σποροποίησης των φυτών πέντε ανθεκτικών και ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. albida*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	147,000	NS
Σφάλμα	6	32,556	
Πληθυσμοί (B)	5	172,383	*
A x B	5	17,350	NS
Σφάλμα	30	11,489	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		3,69%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 22.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Ανάλυση παραλλακτικότητας των ημερών για την έναρξη επιμήκυνσης του στελέχους των φυτών τριών ανθεκτικών και ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	15,125	NS
Σφάλμα	6	4,646	
Πληθυσμοί (B)	3	7,917	NS
A x B	3	26,208	*
Σφάλμα	18	8,229	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		21,45%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 23.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Ανάλυση παραλλακτικότητας των ημερών για την έναρξη εμφάνισης ανθοφόρων οφθαλμών των φυτών τριών ανθεκτικών και ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	30,031	NS
Σφάλμα	6	5,281	
Πληθυσμοί (B)	3	15,615	NS
A x B	3	43,448	*
Σφάλμα	18	6,031	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		10,78%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 24.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Ανάλυση παραλλακτικότητας των ημερών για την έναρξη της άνθισης των φυτών τριών ανθεκτικών και ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	50,000	*
Σφάλμα	6	7,250	
Πληθυσμοί (B)	3	32,083	*
A x B	3	56,250	*
Σφάλμα	18	7,722	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		8,58%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			

**Πίνακας 25.** Πειράματα μελέτης της προσαρμοστικότητας. Ανάλυση παραλλακτικότητας των ημερών για την έναρξη της σποροποίησης των φυτών τριών ανθεκτικών και ενός ευαίσθητου πληθυσμού *C. bonariensis*.

Πηγή παραλλακτικότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	
Πειράματα (A)	1	84,500	*
Σφάλμα	6	8,417	
Πληθυσμοί (B)	3	41,917	*
A x B	3	53,917	*
Σφάλμα	18	6,944	
Συντελεστής παραλλακτικότητας (CV)		6,33%	
Επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$			