



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ - ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Επιστήμες και Σύγχρονα Συστήματα Φυτικής Παραγωγής»

Κατεύθυνση: «Συστήματα Ολοκληρωμένης-Βιολογικής Παραγωγής και Πιστοποίησης»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

« ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΒΙΟΤΥΠΩΝ ΗΡΑΣ (*Lolium rigidum* Gaud.) ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΔΟΣΕΙΣ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ»



ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Δ. ΝΤΟΥΜΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2018

Επιβλέπων Καθηγητής: Ηλίας Τραυλός



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Επιστήμες και Σύγχρονα Συστήματα Φυτικής Παραγωγής»

Κατεύθυνση: «Συστήματα Ολοκληρωμένης-Βιολογικής Παραγωγής και Πιστοποίησης»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

« ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΒΙΟΤΥΠΩΝ ΗΡΑΣ (*Lolium rigidum* Gaud.) ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΔΟΣΕΙΣ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ»

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Δ. ΝΤΟΥΜΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2018

Επιβλέπων Καθηγητής: Ηλίας Τραυλός

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

« ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΒΙΟΤΥΠΩΝ ΗΡΑΣ (*Lolium rigidum* Gaud.) ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΔΟΣΕΙΣ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ»

Κωνσταντίνος Δ. Ντούμος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπων: Ηλίας Τραυλός, Επίκουρος Καθηγητής

1^ο μέλος: Τάνη Έλενα, Λέκτορας

2^ο μέλος: Παναγιώτα- Θηρεσία Παπαστυλιανού, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θέλω να ευχαριστήσω όλους όσοι συνέβαλαν με το δικό τους τρόπο στη διεξαγωγή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Καταρχάς, θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα της μεταπτυχιακής μου διατριβής Επίκουρο Καθηγητή **κ. Ηλία Τραυλό** και στη Λέκτορα **κα. Έλενα Τάνη**, από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, για την ανάθεση του θέματος, το σχεδιασμό και την επίβλεψη των πειραματικών εργασιών και για τη συνεχή και πολύτιμη συνδρομή που μου προσέφεραν με τις χρήσιμες παρατηρήσεις και διορθώσεις τους σε όλη την πορεία του πειράματος και της συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Επιπρόσθετα, απευθύνω ένα ευχαριστώ στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Παναγιώτα Παπαστυλιανού για τις συμβουλές, τις παρατηρήσεις της αλλά και που δέχθηκε να είναι μέλος στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Από το Εργαστήριο Ζιζανιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, θέλω να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Ερευνητή Α' του εργαστηρίου κ. Δημοσθένη Χάχαλη και τις τεχνικούς βοηθούς κα. Ειρήνη Τριβέλλα και κα. Σοφία Λυμπεροπούλου για τη βοήθειά τους σχετικά με τις μετρήσεις του σικιμικού οξέος που πραγματοποιήθηκαν εκεί.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τη συμφοιτήτριά μου από το Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών κα. Ειρήνη Βλάχου για τις πολύτιμες υποδείξεις της όσον αφορά τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, το πρακτικό της πνεύμα κατά τη διάρκεια των μετρήσεων του πειράματος αλλά και για τη φιλία της σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ακόμη, ευχαριστώ ιδιαίτερα την κα. Ευθαλία Στάθη (Λίλιαν) και τον κ. Αησιόλα Θεοδωρόπουλο, μεταπτυχιακούς φοιτητές του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στο εργαστήριο Βελτίωσης των Φυτών, για τις υποδείξεις και τις παρατηρήσεις τους όσον αφορά τις μοριακές αναλύσεις που έγιναν στο εν λόγω εργαστήριο.

Τέλος, απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους εντός και εκτός πανεπιστημίου (και που δεν αναφέρονται επώνυμα παραπάνω) με βοήθησαν με την οικονομική τους ενίσχυση ή με την πολύτιμη και συνεχή ενθάρρυνσή τους ώστε να βγει εις πέρας το παρόν έργο, και, κυρίως, ευχαριστώ την οικογένειά μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λεπτή ήρα (*Lolium rigidum* Gaud.) είναι ένα ετήσιο χειμερινό ζιζάνιο, ιδιαίτερα επιβλαβές κυρίως για τις καλλιέργειες των χειμερινών σιτηρών και δευτερευόντως για άλλες χειμερινές, πρώιμες ανοιξιάτικες και πολυετείς καλλιέργειες. Το ζιζάνιο συναντάται σε όλο σχεδόν τον κόσμο, ενώ και στην Ελλάδα η συχνότητά του είναι ιδιαίτερα υψηλή. Η αποτελεσματική αντιμετώπιση της λεπτής ήρας αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για τους καλλιεργητές σιτηρών, διότι το ζιζάνιο έχει αναπτύξει σε κάποιες περιοχές υψηλή ανθεκτικότητα έναντι ορισμένων ευρέως χρησιμοποιούμενων ζιζανιοκτόνων.

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι διττός. Αφενός είναι η διερεύνηση της ανθεκτικότητας οκτώ βιότυπων λεπτής ήρας από βιότυπους που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας στα ζιζανιοκτόνα mesosulfuron + iodosulfuron (σουλφονουλουρίες), στο clodinafor-propargyl (αρυλοξυφαινοξυαλκανοικά οξέα) και στο glyphosate (γλυκίνες) μέσω της μέτρησης της αποτελεσματικότητας (νωπό-ξηρό βάρος, ύψος, αριθμός φύλλων). Αφετέρου, είναι η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται σε πιθανή ανθεκτικότητα των βιότυπων στο ζιζανιοκτόνο glyphosate (βιοχημικό τεστ μέτρησης σικιμικού οξέος, έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο EPSPS και του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη-μεταφορέα M10).

Στο παρόν πείραμα φάνηκε πως όλοι οι βιότυποι, με εξαίρεση τον 58, παρουσίασαν μειωμένη ευαισθησία στο clodinafor-propargyl (ο 61 έδωσε ένδειξη μειωμένης ευαισθησίας), χαμηλή ευαισθησία στην επέμβαση με σουλφονουλουρίες έδειξαν να έχουν οι βιότυποι 52,70 και 64, ενδείξεις για μειωμένη ευαισθησία στο μίγμα σουλφονουλουριών φάνηκε να δίνουν οι βιότυποι 50, 63 και 72, ενώ ο 58 και ο 61 φάνηκε να συνεχίζουν να παραμένουν αρκετά ευαίσθητοι. Υπάρχουν μόνο κάποιες ενδείξεις για σχετικά μειωμένη ευαισθησία ορισμένων βιότυπων στο glyphosate, όπως ο 52 ή ο 70, όπως αυτές προκύπτουν από τα πειράματα δόσης-απόκρισης και χωρίς αυτό να επιβεβαιώνεται από σημαντικές διαφορές στη συσσώρευση του σικιμικού οξέος. Επομένως, απαιτείται εκτεταμένη μελέτη και επανάληψη του πειράματος ώστε να επικυρωθούν τα αποτελέσματα και να μπορούμε να μιλήσουμε με απόλυτη βεβαιότητα. Βιότυποι όπως ο 61 και ο 72 φάνηκε πως διατηρούν ακόμη την αυξημένη ευαισθησία τους στο glyphosate.

Αν και φάνηκε πως η έκφραση του γονιδίου του ενζύμου EPSPS είναι διαφορετική σε κάθε βιότυπο ξεχωριστά, ωστόσο δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του γονιδίου μεταξύ αψέκαστου μάρτυρα και ψεκασμένων φυτών αλλά ούτε και στην αλληλεπίδραση βιότυπου και μεταχείρισης.

Φάνηκε πως δεν υπήρξε επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη-μεταφορέα M10 σε κανέναν βιότυπο, επομένως η σχετικά μειωμένη ευαισθησία ορισμένων βιότυπων στο glyphosate δε φαίνεται να οφείλεται σε μεταφορά του ζιζανιοκτόνου σε κυτταρικά οργανίδια (χυμοτόπιο) όπου το ζιζανιοκτόνο παραμένει αδρανές.

Λέξεις κλειδιά: *Lolium rigidum*, ανθεκτικότητα, ζιζανιοκτόνα, ALS - AHAS, ACCase, EPSPS, M10

ABSTRACT

Rigid ryegrass or annual ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud.) is an annual, winter, grassy weed which causes severe problems mainly in winter cereal crops and, to a less extent, in other winter and early spring crops. Rigid ryegrass is nowadays present in almost every country in the world and it is also met in high frequency in Greece. The effective control of this weed is a matter of great importance to the cereal crop farmers because it has developed several mechanisms of resistance towards the most commonly used herbicides in a global level.

The aim of this study is double. On the one hand, the investigation of the efficacy of some widely applied herbicides that are used to restrict eight *Lolium rigidum* populations. For this reason, annual ryegrass plants were collected from several different regions across Greece, from wheat fields. The herbicides that were used are mesosulfuron + iodosulfuron (sulfonylureas), clodinafop-propargyl (aryloxy-fenoxy-alcanoic acids) and glyphosate (glycines). The characterization was based upon morphological trait measurements (net and dry weight, height and leaf number of plants). On the other hand, the investigation of the molecular mechanisms involved in the glyphosate sensitivity (shikimate level measurement, EPSPS and M10 gene expression).

In this study, all biotypes, except for No. 58, have shown to have reduced sensitivity to clodinafop-propargyl, while No.61 has given an indication of a relatively reduced sensitivity. Biotypes No.52, No.64 and No.70 have shown low sensitivity to the sulfonylureas mixture, No.50, No.63 and No.72 have shown indications of reduced sensitivity to the mixture, while No.58 and No.61 seemed to preserve their sensitivity yet.

There are only indications of a relatively low sensitivity of several *L. rigidum* populations to glyphosate, such as No. 52 and No.70, as they are shown by dose-response experiments and without this to be confirmed by statistically important differences in shikimic acid levels. As a consequence, it is recommended that further experiments are conducted to confirm or reject the findings of this study, so that we can speak with absolute certainty of their level of sensitivity to glyphosate. Several biotypes, such as No.61 and No.72, appeared to preserve their high sensitivity to glyphosate.

It seemed that there is a difference in the level of expression of the gene that codifies the EPSPS enzyme between the several biotypes, but there was no statistically important difference between the treatments within each biotype and no difference as well in the interaction between the biotype and the treatment.

There was no induction of the expression of the gene that codifies the M10 ABC- transporter in all rigid ryegrass biotypes tested. So, it seems that the reduced sensitivity of several biotypes to glyphosate is not attributed/related to glyphosate transportation to the vacuole, where the herbicide remains inactive.

Key Words: *Lolium rigidum*, resistance, herbicides, ALS - AHAS, ACCase, EPSPS, M10

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	iii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iv
ABSTRACT	v
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	vi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	xiii
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.	3
1.1. Τα ζιζάνια ως εχθροί των φυτών.	3
1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τον ανταγωνισμό των ζιζανιών με τα καλλιεργούμενα φυτά.	4
1.3. Κατάταξη ζιζανίων.	5
1.3.1. Ετήσια ζιζάνια.	6
1.3.2. Διετή ζιζάνια.	6
1.3.3. Πολυετή ζιζάνια.	7
1.4. Περιγραφή του ζιζανίου <i>Lolium rigidum</i> Gaud.	7
1.4.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά.	8
1.4.2. Εισαγωγή και διάδοση.	12
1.4.3. Βιολογία και Οικολογία.	12
1.4.3.1. Γενετική.	12
1.4.3.2. Φυσιολογία και Φαινολογία.	13
1.5. Έλεγχος ζιζανίων.	14
1.6. Ανθεκτικότητα των ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα.	17
1.6.1. Γενικά.	17
1.6.2. Απλή ανθεκτικότητα.	19
1.6.3. Σταυρανθεκτικότητα.	19
1.6.4. Πολλαπλή ανθεκτικότητα.	19
1.6.5. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας.	20
1.6.6. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας.	21
1.6.7. Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα –αναστολείς του PSI.	21
1.6.8. Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς του PSII.	22
1.6.9. Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης καροτενοειδών (ένζυμο PDS).	22
1.6.10. Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης χλωροφύλλης (ένζυμο PPG-O).	23
1.6.11. Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης αμινοξέων με	

διακλαδισμένη αλυσίδα (ένζυμο ALS ή AHAS).	23
1.6.12. Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων (ένζυμο EPSPS).	25
1.6.12.1. Χρήσεις του glyphosate.	25
1.6.12.2. Μηχανισμός δράσης του glyphosate.	26
1.6.12.3. Βασικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας.	28
1.6.12.3.1. Target-site resistance.	28
1.6.12.3.1.1. Μεταλλάξεις στο ένζυμο EPSPS.	28
1.6.12.3.1.2. Υπερέκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο EPSPS.	29
1.6.12.3.2. Non target site resistance.	29
1.6.12.3.2.1. Μεταφορά και απομόνωση του glyphosate στο χυμοτόπιο.	29
1.6.13. Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων (ένζυμο ACCase).	30
1.6.14. Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης μεγάλου μήκους αλυσίδας λιπαρών οξέων (VLCFAs).	31
1.6.15. Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της μίτωσης.	31
1.6.16. Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα με δράση αυξίνης.	32
1.7. Σκοπός της μελέτης	34
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.	35
2.1. Γενικά-Φυτικό υλικό.	35
2.2. Περιγραφή του πειράματος.	36
2.3. Ζιζανιοκτόνα που εφαρμόστηκαν.	37
2.4. Μέτρηση σικιμικού οξέος.	38
2.4.1 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς.	38
2.4.2. Η εργαστηριακή μέθοδος μέτρησης.	40
2.5. Μοριακός χαρακτηρισμός-Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης.	42
2.5.1. Γενικά-Φυτικό υλικό.	42
2.5.2. Εξαγωγή RNA.	43
2.5.3. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του RNA.	44
2.5.4. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής –δημιουργία cDNA.	45
2.5.5. Σχεδιασμός των εκκινητών.	46
2.5.6. Παρασκευή των διαλυμάτων των εκκινητών.	48
2.5.6.1. Παρασκευή των stock διαλυμάτων των εκκινητών.	48
2.5.6.2. Παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας των εκκινητών.	48
2.5.7. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων με Real Time PCR.	48
2.5.8. Το πρόγραμμα της Real Time PCR.	52
2.6. Στατιστική ανάλυση.	53

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.	54
3.1. Συνολική στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.	54
3.2. Διαγράμματα των βιότυπων του <i>L. rigidum</i> μετά την εφαρμογή των ζιζανιοκτόνων στις συνιστώμενες δόσεις.	56
3.2.1. Ύψος.	56
3.2.2. Ξηρό Βάρος-21 ημέρες μετά τον ψεκασμό.	62
3.2.3. Ξηρό Βάρος-28 ημέρες μετά τον ψεκασμό.	68
3.3. Διαγράμματα των βιοτύπων του <i>L. rigidum</i> μετά την εφαρμογή του glyphosate σε διάφορες δόσεις.	74
3.3.1. Ξηρό Βάρος-28 ημέρες μετά τον ψεκασμό.	74
3.4. Καμπύλες Δόσης-Απόκρισης (Dose-Response Curves) στο glyphosate.	78
3.5. Μετρήσεις σικιμικού οξέος και καθαρότητας/ποσότητας RNA δειγμάτων.	81
3.6. Μετρήσεις της σχετικής έκφρασης του γονιδίου του EPSPS και του M10 στους βιότυπους.	85
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.	87
4.1. Το πρόβλημα της εμφάνισης ανθεκτικών βιότυπων ζιζανίων.	87
4.2. Σύγκριση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.	88
4.3. Αξιολόγηση για πολλαπλή ανθεκτικότητα.	89
4.4. Σύγκριση αποτελεσμάτων – Συζήτηση.	91
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.	96
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.	105
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ.	105

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 2.4.4.1. Καμπύλη αναφοράς και εξίσωση της σχέσης συγκέντρωσης σικιμικού οξέος και απορρόφησης.	39
Διάγραμμα 3.2.1.1. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 50	58
Διάγραμμα 3.2.1.2. Ζιζανιοκτόνα,, ύψος, βιότυπος 52	58
Διάγραμμα 3.2.1.3. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 58	59
Διάγραμμα 3.2.1.4. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 61	59
Διάγραμμα 3.2.1.5. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 63	60
Διάγραμμα 3.2.1.6. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 64	60
Διάγραμμα 3.2.1.7. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 70	61
Διάγραμμα 3.2.1.8. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 72	61
Διάγραμμα 3.2.2.1. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 50	62
Διάγραμμα 3.2.2.2. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 52	62
Διάγραμμα 3.2.2.3. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 58	63
Διάγραμμα 3.2.2.4. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 61	63
Διάγραμμα 3.2.2.5. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 63	64
Διάγραμμα 3.2.2.6. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 64	64
Διάγραμμα 3.2.2.7. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 70	65
Διάγραμμα 3.2.2.8. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 72	65
Διάγραμμα 3.2.2.9. Meso- & Iodo-sulfuron, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, όλοι οι βιότυποι	66
Διάγραμμα 3.2.2.10. Clodinafop-propargyl, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, όλοι οι βιότυποι	66

Διάγραμμα 3.2.3.1. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 50.	68
Διάγραμμα 3.2.3.2. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 52.	68
Διάγραμμα 3.2.3.3. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 58.	69
Διάγραμμα 3.2.3.4. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 61.	69
Διάγραμμα 3.2.3.5. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 63.	70
Διάγραμμα 3.2.3.6. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 64.	70
Διάγραμμα 3.2.3.7. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 70.	71
Διάγραμμα 3.2.3.8. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 72.	71
Διάγραμμα 3.2.3.9. Glyphosate, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, όλοι οι βιότυποι. ..	72
Διάγραμμα 3.2.3.10. Meso- & Iodo-sulfuron, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, όλοι οι βιότυποι.	72
Διάγραμμα 3.2.3.11. Clodinafop-propargyl, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, όλοι οι βιότυποι.	73
Διάγραμμα 3.3.1.1. Δόσεις glyphosate, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 50.	74
Διάγραμμα 3.3.1.2. Δόσεις glyphosate, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 52.	74
Διάγραμμα 3.3.1.3. Δόσεις glyphosate, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 58.	75
Διάγραμμα 3.3.1.4. Δόσεις glyphosate, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 61.	75
Διάγραμμα 3.3.1.5. Δόσεις glyphosate, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 63.	76
Διάγραμμα 3.3.1.6. Δόσεις glyphosate, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 64.	76
Διάγραμμα 3.3.1.7. Δόσεις glyphosate, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 70.	77
Διάγραμμα 3.3.1.8. Δόσεις glyphosate, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 72.	77

Διάγραμμα 3.4.1. Καμπύλη δόσης-απόκρισης, νωπό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 58.	78
Διάγραμμα 3.4.2. Καμπύλη δόσης-απόκρισης, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 58.	78
Διάγραμμα 3.4.3. Καμπύλη δόσης-απόκρισης, νωπό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 63.	79
Διάγραμμα 3.4.4. Καμπύλη δόσης-απόκρισης, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 63.	79
Διάγραμμα 3.4.5. Καμπύλη δόσης-απόκρισης, νωπό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 70.	80
Διάγραμμα 3.4.6. Καμπύλη δόσης-απόκρισης, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμο, βιότυπος 70.	80
Διάγραμμα 3.5.1. Έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο EPSPS σε αψέκαστα και ψεκασμένα με τη συνιστώμενη δόση glyphosate φυτά ήρας, όλοι οι βιότυποι.	86

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Περιγραφή των χαρακτηριστικών που είναι παρόντα στα περισσότερα ζιζάνια.	4
Πίνακας 2. Κατανομή του <i>L. rigidum</i> σε παγκόσμιο επίπεδο.	10
Πίνακας 3. Μερικές από τις σπουδαιότερες ομάδες ζιζανιοκτόνων με τα κυριότερα είδη ζιζανίων που ανέπτυξαν ανθεκτικότητα.	18
Πίνακας 4. Τα κυριότερα είδη αγροστωδών ζιζανίων και τα ζιζανιοκτόνα στα οποία έχουν εμφανίσει ανθεκτικότητα.	19
Πίνακας 5. Ποσότητα σικιμικού οξέος και αντίστοιχη μέτρηση απορρόφησης από το φασματοφωτόμετρο.	39
Πίνακας 6. Αλληλουχίες νουκλεοτιδίων των εκκινητών 5'-3' και οι θερμοκρασίες πρόσδεσής τους (Annealing temperatures, T.an.).	48
Πίνακας 7. Συστατικά για την αντίδραση μέτρησης της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς CCR.....	50
Πίνακας 8. Συστατικά για την αντίδραση μέτρησης της έκφρασης του γονιδίου EPSPS.	50
Πίνακας 9. Συστατικά για την αντίδραση μέτρησης της έκφρασης του γονιδίου M10.	51
Πίνακας 10. Ανάλυση της παραλλακτικότητας (Two Way ANOVA) της επίδρασης των βιότυπων και των ζιζανιοκτόνων στο ύψος των φυτών, στον αριθμό των φύλλων και στον νωπό και ξηρό τους βάρος στις 21 και 28 ημέρες μετά την επέμβαση.	54
Πίνακας 11. Ανάλυση της παραλλακτικότητας (Two Way ANOVA) της επίδρασης των βιότυπων και των διαφόρων δόσεων του glyphosate στο ύψος των φυτών, στον αριθμό των φύλλων και στο νωπό και ξηρό τους βάρος στις 21 και 28 ημέρες μετά την επέμβαση.	56
Πίνακας 12. Μετρήσεις σικιμικού οξέος. Ενδείξεις φασματοφωτόμετρου και ποσοτήτες σικιμικού οξέος.	81
Πίνακας 13. Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two Way ANOVA) της επίδρασης των βιότυπων και των επεμβάσεων (μάρτυρας, συνιστώμενη δόση glyphosate) στην ποσότητα του συσσωρευμένου σικιμικού οξέος.	82
Πίνακας 14. Μετρήσεις ελέγχου καθαρότητας/ποσότητας δειγμάτων RNA.	83
Πίνακας 15. Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two Way ANOVA) της επίδρασης των βιότυπων και των επεμβάσεων (μάρτυρας, συνιστώμενη δόση glyphosate) στην έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο EPSPS.	85

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Αγρός σιταριού στην Αυστραλία προσβεβλημένος σε μεγάλο βαθμό από το <i>L. rigidum</i>	7
Εικόνα 2. Φύλλα και βλαστοί του <i>L. rigidum</i>	9
Εικόνα 3. Φύλλα και στάχεις του <i>L. rigidum</i>	9
Εικόνα 4. Σταχύδια του <i>L. rigidum</i>	10
Εικόνα 5. Πυραμίδα – μέτρα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης ζιζανίων	17
Εικόνα 6. Τρόπος δράσης ζιζανιοκτόνων και μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών στα ζιζανιοκτόνα.	20
Εικόνα 7. Πορεία ανακάλυψης ζιζανιοκτόνων με νέο μηχανισμό δράσης.	21
Εικόνα 8. Μεταλλάξεις του ενζύμου ALS και αριθμός ζιζανίων που οφείλουν την ανθεκτικότητά τους στις μεταλλάξεις αυτές.	24
Εικόνα 9. Τα αρωματικά αμινοξέα.	26
Εικόνα 10. Κατάλυση της αντίδρασης S3P + PEP προς παραγωγή του EPSP και ανόργανου P από το ένζυμο EPSPS.	27
Εικόνα 11. Το βιοχημικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος.	27
Εικόνα 12. Παγκόσμια αύξηση των ειδών ζιζανίων που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο glyphosate, πορεία από το 1996 έως το 2014.	30
Εικόνα 13. Αριθμός ανθεκτικών ειδών ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα με διαφορετικό μηχανισμό δράσης, πορεία από το 1955 έως και το 2014.	32
Εικόνα 14. Αριθμός ανθεκτικών ειδών ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα με διαφορετικό μηχανισμό δράσης, στην Ευρώπη, από το 1970 περίπου έως το 2014.	33
Εικόνα 15. Φυτά <i>L. rigidum</i> σε μεγάλες γλάστρες και μικρές γλάστρες. Αγρός του εργαστηρίου Γεωργίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.	36
Εικόνα 16. Το σύστημα ηλεκτρονικού υπολογιστή-φασματοφωτόμετρου και το λογισμικό Spectra Manager V-530 για το μοντέλο της JASCO Inc.	41
Εικόνα 17. Καμπύλες φασματοφωτομέτρησης με μέγιστο απορρόφησης σε $\lambda=382$ nm. για το σικιμικό οξύ.	42
Εικόνα 18. Blast program, NCBI Database.	47

Εικόνα 19. Συσκευή StepOnePlus, Real – Time PCR της AB – Applied Biosystems με θήκη υποδοχής των strips για τα προς πολλαπλασιασμό δείγματα cDNAs.	49, 50
Εικόνα 20. Αριθμός ειδών ζιζανίων με ανθεκτικότητα σε περισσότερους από έναν μηχανισμούς δράσης ζιζανιοκτόνων (πολλαπλή ανθεκτικότητα). Πορεία εμφάνισης πολλαπλής ανθεκτικότητας από το 1980 μέχρι το 2014.	89
Εικόνα 21. Είδη ζιζανίων (πλήρες όνομα) με πολλαπλή ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα. Το <i>L. rigidum</i> είναι το πρώτο στην κατάταξη με ανθεκτικότητα σε 11 διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης ζιζανιοκτόνων.	90

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τα ζιζάνια ως εχθροί των φυτών

Με τον όρο ζιζάνιο περιγράφουμε κάθε φυτό που αναπτύσσεται εκεί όπου δεν είναι επιθυμητό. Οπότε, με βάση τον ορισμό αυτό, όλα τα καλλιεργούμενα ή αυτοφυή φυτά μπορούν να θεωρηθούν ζιζάνια όταν αναπτύσσονται σε χώρους και χρονικά διαστήματα όπου ο άνθρωπος επιθυμεί άλλα φυτά ή δεν επιθυμεί κανένα φυτό (δρόμοι, γραμμές τρένων, βιομηχανικοί χώροι κ.ά.).

Ο όρος αυτός δεν έχει απόλυτη έννοια, αλλά σχετική, και ως εκ τούτου όλα τα ζιζάνια εκτός από το χώρο και το χρόνο όπου δεν είναι επιθυμητά μπορεί να είναι φυτά με επιθυμητές και ευεργετικές επιδράσεις. Για παράδειγμα, αυτό συμβαίνει με την παρουσία αυτοφυών ή καλλιεργούμενων φυτών σε σπυρώνες και αμπελώνες που βρίσκονται σε επικλινή εδάφη. Η παρουσία τέτοιων φυτών στη διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού είναι ανεπιθύμητη εξαιτίας του ανταγωνισμού με τα δένδρα και τα πρέμνα του αμπελώνα σε νερό, φως και θρεπτικά στοιχεία αλλά κι επειδή δυσκολεύουν τις καλλιεργητικές φροντίδες. Αντίθετα, η παρουσία τους το χειμώνα είναι επιθυμητή γιατί προστατεύει το έδαφος από τη διάβρωση αλλά κι επειδή η ενσωμάτωσή τους νωρίς την άνοιξη βελτιώνει τη δομή του εδάφους και το εμπλουτίζει με θρεπτικά στοιχεία. Ακόμη, πολλά ζιζάνια έχουν θεραπευτική-φαρμακευτική δράση (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Επομένως, τα ζιζάνια δεν είναι πάντα και παντού ανεπιθύμητα φυτά, αλλά χαρακτηρίζονται έτσι όταν προκαλούν μία ή περισσότερες από τις παρακάτω ανεπιθύμητες δράσεις στα καλλιεργούμενα φυτά, στον άνθρωπο ή/και στα ζώα. Αυτές είναι:

- α) Ο ανταγωνισμός με τα καλλιεργούμενα φυτά για θρεπτικά στοιχεία, νερό και φως, το αποτέλεσμα του οποίου είναι η μείωση της απόδοσης και η ποιοτική υποβάθμιση των παραγόμενων προϊόντων,
- β) Η αλληλοπαθητική επίδραση, όπου τοξικές ουσίες εκκρίνονται από το ριζικό σύστημα των ζιζανίων στο έδαφος και επηρεάζουν την ανάπτυξη/αναπαραγωγή των γύρω φυτών
- γ) Ο παρασιτισμός των καλλιεργούμενων φυτών (οροβάγχη, κουσκούτα)
- δ) Ενδέχεται να είναι ξενιστές επιβλαβών εντόμων και παθογόνων μικροοργανισμών των καλλιεργούμενων φυτών
- ε) Προκαλούν δυσχέρειες κατά την εγκατάσταση των καλλιεργούμενων φυτών και κατά την εκτέλεση των μετέπειτα καλλιεργητικών φροντίδων
- στ) Η οψίμηση της παραγωγής των προϊόντων και η δυσχέρεια κατά τη συγκομιδή τους
- ζ) Οι δηλητηριάσεις σε ζώα και ανθρώπους

η) Η μείωση της ταχύτητας της ροής του νερού σε αρδευτικά και στραγγιστικά κανάλια (υδροχαρή ζιζάνια)

θ) Η μείωση της ορατότητας σε στροφές και διασταυρώσεις δρόμων

ι) Η αύξηση της πιθανότητας πυρκαγιάς

ια) Η μείωση της αποτελεσματικής χρήσης βιομηχανικών χώρων και

ιβ) Τα προβλήματα στις σιδηροδρομικές γραμμές

ιγ) Η υποβάθμιση της αισθητικής αξίας των χώρων αναψυχής και η υποβάθμιση της λειτουργικής αξίας των χώρων αθλητισμού (ποδοσφαιρικά γήπεδα, γήπεδα γκολφ).

Δηλαδή, οι ζημιές που προκαλούν τα ζιζάνια δεν περιορίζονται μόνο στα καλλιεργούμενα φυτά, αλλά επεκτείνονται και στα φυσικά λιβάδια, στα ζώα και στις ανθρώπινες δραστηριότητες (Ελευθεροχωρινός, 2008).

1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον ανταγωνισμό των ζιζανίων με τα καλλιεργούμενα φυτά

Το μέγεθος της ζημιάς των καλλιεργούμενων φυτών εξαιτίας του ανταγωνισμού των ζιζανίων επηρεάζεται από τους παρακάτω παράγοντες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Αναφορικά μόνο, οι παράγοντες που σχετίζονται με το ζιζάνιο είναι: α) το είδος του ζιζανίου, η πυκνότητά του πληθυσμού του, γ) η ομοιομορφία στην κατανομή στον αγρό και δ) ο χρόνος εμφάνισης και παραμονής εντός του καλλιεργούμενου φυτού.

Οι παράγοντες που σχετίζονται με το καλλιεργούμενο φυτό είναι: α) το είδος του φυτού, β) η ποικιλία ή το υβρίδιο που χρησιμοποιείται, γ) η πυκνότητά του και δ) οι καλλιεργητικές του φροντίδες (τύπος εδάφους, λίπανση και άρδευση) (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Όσον αφορά στο/στα είδος/η του ζιζανίου/ων, στον πίνακα 1 περιγράφονται τα ιδιαίτερα μορφολογικά/βιολογικά/οικολογικά χαρακτηριστικά που καθιστούν ορισμένα φυτά ζιζάνια των καλλιεργειών.

Πίνακας 1. Περιγραφή των χαρακτηριστικών που είναι παρόντα στα περισσότερα ζιζάνια *

Χαρακτηριστικό	Περιγραφή του χαρακτηριστικού
Γρήγορη ανάπτυξη σπορόφυτου	Επιτρέπει τη μέγιστη πρόσληψη φωτός, νερού και θρεπτικών συστατικών
Σύντομη βλαστική περίοδος	Κάτω από συνθήκες που οδηγούν τα φυτά να βλαστήσουν αργά στην περίοδο ανάπτυξής τους, ένα φυτό μπορεί ακόμη να ολοκληρώσει το βιολογικό του κύκλο και να παράγει βιώσιμους σπόρους.

Μη καθορισμένη ανάπτυξη	Η άνθιση είναι συνεχής, διαρκεί για μεγάλη χρονική και περίοδο και πραγματοποιείται ενώ το φυτό συνεχίζει τη βλαστική του ανάπτυξη
Αυτοσυμβατότητα	Επιτρέπει τη γενετική απόκλιση από προηγούμενες γενεές, αλλά τα φυτά δε χρειάζονται ειδικούς επικονιαστές όπως μέλισσες ή άλλα έντομα για να παράγουν βιώσιμο σπόρο
Μεγάλη παραγωγή σπόρου	Τα ζιζάνια παράγουν πολλούς σπόρους που διασπείρονται τόσο τοπικά όσο και χρονικά. Για παράδειγμα, τα φυτά της <i>Conyza canadensis</i> παράγουν μέχρι και 500.000 σπόρους ανά φυτό.
Διασπορά του σπόρου σε μεγάλες αποστάσεις	Σπόροι που επιπλέουν στο νερό ή μεταφέρονται με τον αέρα λόγω ειδικών κατασκευών που διαθέτουν (πχ. Πάππος) διασπείρονται ευρέως, σε μεγάλες αποστάσεις γύρω από το φυτό. Για παράδειγμα, οι σπόροι του <i>Taraxacum officinale</i> και της <i>Conyza canadensis</i> .
Ανταγωνιστικό με το καλλιεργούμενο φυτό	Τα ζιζάνια ανταγωνίζονται τα καλλιεργούμενα φυτά για φως, νερό και θρεπτικά συστατικά και συνεπώς, μπορούν να μειώσουν την απόδοση. 54 φυτά του <i>Setaria faberii</i> για κάθε 0.3 μέτρα γραμμής σποράς μπορεί να μειώσουν την απόδοση σε σπόρο της σόγιας και του καλαμποκιού κατά 24% και 28% αντίστοιχα (Knake & Slife, 1962)
Βαθύ ριζικό σύστημα	Το βαθύ ριζικό σύστημα επιτρέπει στα ζιζάνια να ευδοκούν σε συνθήκες ξηρασίας. Για παράδειγμα, οι ρίζες του <i>Convolvulus arvensis</i> εισχωρούν μέχρι και 3 μέτρα μέσα στο έδαφος.
Διακοπτόμενος λήθαργος	Οι σπόροι των ζιζανίων μπορεί να βρίσκονται σε λήθαργο σε μη ευνοικά περιβάλλοντα για μεγάλο χρονικό διάστημα, επιτρέποντας έτσι το φύτεμα μόλις οι περιβαλλοντικές συνθήκες το επιτρέψουν. Το <i>Chenopodium album</i> διαθέτει ευρείς μηχανισμούς ληθάργου.
Μεγάλη περιβαλλοντική προσαρμοστικότητα	Ένα φυτό μπορεί να αλλάξει τον τρόπο ανάπτυξής του σε αντίδραση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Παράδειγμα αποτελεί το <i>Eleusine indica</i> που έχει όρθια ανάπτυξη σε συνθήκες αγρού αλλά αναπτύσσει έρπουσα μορφή όταν κοπεί (όπως για παράδειγμα σε ένα γήπεδο γκολφ). Και οι δύο τύποι του φυτού παράγουν βιώσιμο σπόρο.
Διπλός τρόπος αναπαραγωγής	Αν και τα περισσότερα ζιζάνια αναπαράγονται εγγενώς με σπόρο, υπάρχουν πολλά που αναπαράγονται και εγγενώς και αγενώς (πχ. Το <i>Cynodon dactylon</i> δημιουργεί και στόλνες εκτός από σπόρο). Αυξάνονται έτσι οι πιθανότητες επιβίωσης και συνέχισης της ύπαρξης του φυτού στο χρόνο.
Αλληλοπάθεια	Τα φυτά παράγουν χημικές ουσίες που καθυστερούν ή/και αποτρέπουν εντελώς την ανάπτυξη άλλων φυτών ή/και σκοτώνουν τα ήδη ανεπτυγμένα φυτά

* Προσαρμοσμένο από: Baker, 1965; Zimdahl, 1993; Anderson, 1996

1.3 Κατάταξη ζιζανίων

Η κατάταξη των ζιζανίων γίνεται με πολλούς και διάφορους τρόπους. Ανάλογα με τον τύπο ανάπτυξής τους διακρίνονται σε ποώδη, θαμνώδη και δενδρώδη, ανάλογα με τη μορφολογία των φύλλων τους σε στενόφυλλα και πλατύφυλλα, σύμφωνα με το οικολογικό περιβάλλον όπου και αναπτύσσονται διακρίνονται σε ζιζάνια καλλιεργειών, βοσκών, δασών και ζιζάνια υδατοσυλλογών και ανάλογα με τα βοτανικά τους χαρακτηριστικά κατατάσσονται σε οικογένειες, είδη, υποείδη, βιότυπους ή πληθυσμούς.

Ωστόσο, ο πιο χρήσιμος τρόπος κατάταξής τους στη γεωπονική πρακτική γίνεται βάση της διάρκειας του βιολογικού τους κύκλου. Έτσι, τα ζιζάνια χωρίζονται σε ετήσια, διετή και πολυετή (Ελευθεροχωρινός, 2008).

1.3.1 Ετήσια ζιζάνια

Τα ετήσια ζιζάνια συμπληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο σε χρονική διάρκεια μικρότερη του ενός έτους και χωρίζονται περαιτέρω σε χειμερινά και θερινά.

Τα χειμερινά ζιζάνια φυτρώνουν το φθινόπωρο ή το χειμώνα και συμπληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο μέχρι την άνοιξη ή μέχρι τις αρχές του καλοκαιριού. Η ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου σηματοδοτείται από την παραγωγή του σπόρου. Στην κατηγορία των χειμερινών ζιζανίων ανήκουν είδη όπως είναι για παράδειγμα η αγριοβρώμη (*Avena sterilis*), η ήρα (*Lolium rigidum*), η μεγαλόκαρπη και μικρόκαρπη κολλητσίδα (*Gallium aparine* και *Gallium spurium* αντίστοιχα), το χαμομήλι (*Chamomilla recutita*) και η κοινή παπαρούνα (*Paraver rhoeas*).

Τα θερινά ζιζάνια φυτρώνουν την άνοιξη και συμπληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο μέχρι το φθινόπωρο. Ορισμένα από τα πιο σημαντικά ζιζάνια που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι το τραχύ βλήτο (*Amarathus retroflexus*), ο τάτουλας (*Datura stramonium*), η λουβουδιά (*Chenopodium album*), η αγριοβαμβακιά (*Abutilon theophrasti*), η αγριοτοματιά (*Solanum nigrum*) και η μουχρίτσα (*Echinochloa crus-galli*) (Ελευθεροχωρινός, 2008).

1.3.2 Διετή ζιζάνια

Τα διετή ζιζάνια ολοκληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο σε δύο έτη και έχουν έναν ιδιαίτερο τρόπο ανάπτυξης. Αναπτύσσονται σε ροζέττα κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους, ενώ στο δεύτερο έτος ανθίζουν, παράγουν σπόρο και πεθαίνουν. Τα ζιζάνια αυτά είναι σχετικά λίγα και μερικά παραδείγματα αποτελούν το βερμπάσκο (*Verbascum spp.*), το αγριοκαρότο (*Daucus carota*), το διετές κίρσιο (*Cirsium vulgare*) και ο μελίλωτος (*Melilotus spp.*) (Ελευθεροχωρινός, 2008).

1.3.3 Πολυετή ζιζάνια

Ο βιολογικός κύκλος των πολυετών ζιζανίων είναι μεγαλύτερος από δύο έτη. Τα περισσότερα από αυτά αναπαράγονται τόσο με σπόρο όσο και με όργανα αγενούς αναπαραγωγής. Μερικά από τα πιο σπουδαία πολυετή ζιζάνια είναι η αγριάδα (*Cynodon dactylon*), η κύπερη (*Cyperus rotundus*), ο βέλιουρας (*Sorghum halepense*), η περιπλοκάδα (*Convolvulus arvensis*) και το πολυετές κίρσιο (*Cirsium arvense*) (Ελευθεροχωρινός, 2008)

1.4 Περιγραφή του ζιζανίου *Lolium rigidum* Gaud.

Το *Lolium rigidum* (στα ελληνικά: λεπτή ήρα, στα αγγλικά: rigid ryegrass) ανήκει στην οικογένεια Poaceae και είναι ετήσιο χειμερινό ζιζάνιο που απαντάται με μεγάλη συχνότητα κυρίως στις καλλιέργειες σιτηρών και με μικρότερη συχνότητα σε λοιπές χειμερινές, πρώιμες ανοιξιάτικες και πολυετείες καλλιέργειες. Φυτρώνει το φθινόπωρο και νωρίς την άνοιξη (Ελευθεροχωρινός & Γιαννοπολίτης, 2009).

Στην Εικόνα 1 φαίνεται πολύ παραστατικά η προσβολή ενός σιταροχώραφου από το εν λόγω ζιζάνιο.



Εικόνα 1. Αγρός στον οποίο καλλιεργείται σιτάρι στην Αυστραλία, ο οποίος έχει προσβληθεί σε μεγάλο βαθμό από το *Lolium rigidum*. (Πηγή: GRDC – Grains Research and Development Corporation, <https://grdc.com.au>)

1.4.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το φυτό είναι συνήθως όρθιας ανάπτυξης, ευθυτενές, αλλά ενδέχεται ορισμένες φορές να είναι και έρπον. Τα φύλλα των νεαρών φυτών είναι στενά και όρθια, έχουν ύψος από 5 έως 25 εκατοστά και πλάτος 3 έως 5 χιλιοστά. Το έλασμα των φύλλων στην κάτω επιφάνεια είναι τραχύ, αυλακωτό και γυαλιστερό, ενώ στην άνω επιφάνειά του είναι γυαλιστερό, επίπεδο και λείο με διαμήκεις φλέβες. Το φυτό οπτικά δίνει την αίσθηση ότι γυαλίζει. Ο κολεός των φύλλων είναι τραχύς και χωρίς τρίχες. Το γλωσσίδιο είναι μεμβρανώδες-ημιδιαφανές, βραχύ και τριγωνικό, ενώ τα ωτίδια είναι μεγάλα, περιβάλλουν τον κολεό και είναι στενά. Ο βλαστός (στέλεχος ή αλλιώς καλάμι) είναι κυλινδρικός, τραχύς, ημιπλάγιος-όρθιος, με πολλά αδέρφια, έχει γόνατα και είναι πορφυρός στη βάση του.

Η λεπτή ήρα ανθίζει από Μάρτιο μέχρι Μάιο και η ταξιανθία της είναι ένας επιμήκης στάχυς χρώματος γκρι-μωβ με μήκος 20-30 εκατοστά, στενός και λεπτός. Τα σταχύδια είναι πολυανθή (από 4 έως 8 ανθίδια ανά σταχύδιο), επιμήκη, λογχοειδή και τοποθετημένα στη ράχη του στάχους, αραιά και με τη στενή πλευρά και κάθε ανθίδιο έχει τρεις κίτρινους ανθήρες. Ο χιτώνας των ανθιδίων δεν καταλήγει σε άγανο. Οι σπόροι είναι μικροί, ελαφριοί και σχετικά επίπεδοι, έχουν μήκος 4 έως 6 χιλιοστά και πλάτος 1 χιλιοστό και μπορούν πολύ εύκολα να μεταφερθούν με τον αέρα. Το χρώμα τους είναι αυτό του αχύρου, ενώ το έμβρυό τους είναι ορατό μέσα από τα εξωτερικά τοιχώματα. Τα άνθη συγκρατούνται ισχυρά στην ταξιανθία. (Ελευθεροχωρινός, 2008; Ελευθεροχωρινός & Γιαννοπολίτης, 2009)

Μερικά από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ζιζανίου φαίνονται στις Εικόνες 2,3 και 4.



Εικόνα 2. Φύλλα και βλαστοί του *Lolium rigidum*.

(πηγή: https://keyserver.lucidcentral.org/weeds/data/media/Html/lolium_rigidum.htm)



Εικόνα 3. Φύλλα και στάχεις του *Lolium rigidum*.

(πηγή: <https://plantpro.gr/herbs/Gramineae/p/Lolium>)



Εικόνα 4. Σταχύδια του *Lolium rigidum*.

(πηγή: http://www.floraofqatar.com/lolium_rigidum.htm)

Εξάπλωση του φυτού

Το *L. rigidum* είναι φυτό ιθαγενές της Μεσογειακής λεκάνης. Στον Πίνακα 2 περιγράφεται η κατανομή του φυτού παγκοσμίως.

Πίνακας 2. Κατανομή του *L. rigidum* σε παγκόσμιο επίπεδο. (πηγή: CABI – Centre for Agriculture and Biosciences International-

<https://www.cabi.org/isc/datasheet/31167#None>)

Χώρα	Εξάπλωση	Ιθαγενές ή ξενικό είδος
ΑΣΙΑ		
Αφγανιστάν	Παρόν	Ιθαγενές
Αρμενία	Παρόν	Ιθαγενές
Αζερμπαϊτζάν	Παρόν	Ιθαγενές
Γεωργία	Παρόν	Ιθαγενές
Ινδία	Παρόν	Ιθαγενές
Ιράν	Παρόν	Ιθαγενές
Ιράκ	Παρόν	Ιθαγενές

Ισραήλ	Παρόν	Ιθαγενές
Ιορδανία	Παρόν	Ιθαγενές
Κουβέιτ	Παρόν	Ιθαγενές
Λίβανος	Παρόν	Ιθαγενές
Πακιστάν	Παρόν	Ιθαγενές
Σαουδική Αραβία	Παρόν	Ιθαγενές
Συρία	Παρόν	Ιθαγενές
Τουρκία	Παρόν	Ιθαγενές
Τουρκμενιστάν	Παρόν	Ιθαγενές
Ουζμπεκιστάν	Παρόν	Ιθαγενές
ΑΦΡΙΚΗ		
Αλγερία	Παρόν	Ιθαγενές
Αίγυπτος	Παρόν	Ιθαγενές
Λιβύη	Παρόν	Ιθαγενές
Μαρόκο	Παρόν	Ιθαγενές
Νότια Αφρική	Παρόν	Ξενικό
Τυνησία	Λίαν διαδεδομένο	Ιθαγενές
ΒΟΡΕΙΑ ΑΜΕΡΙΚΗ		
Μεξικό	Παρόν	Ξενικό
ΗΠΑ		
-Αριζόνα	Παρόν	Ξενικό
-Καλιφόρνια	Παρόν	Ξενικό
-Χαβάη	Παρόν	Ξενικό
-Λουιζιάνα	Παρόν	Ξενικό
-Μισούρι	Παρόν	Ξενικό
-Όρεγκον	Παρόν	Ξενικό
-Τέξας	Παρόν	Ξενικό
ΝΟΤΙΑ ΑΜΕΡΙΚΗ		
Αργεντινή	Παρόν	Ξενικό
Χιλή	Παρόν	Ξενικό
ΕΥΡΩΠΗ		

Αλβανία	Παρόν	Ιθαγενές
Βουλγαρία	Παρόν	Ιθαγενές
Γαλλία	Παρόν	Ξενικό
-Κορσική	Παρόν	Ξενικό
Ελλάδα	Παρόν	Ιθαγενές
Ιταλία	Παρόν	Ιθαγενές
Πορτογαλία	Παρόν	Ιθαγενές
Ρωσία	Παρόν	Ιθαγενές
Ισπανία	Παρόν	Ιθαγενές
Ελβετία	Παρόν	Ιθαγενές
Ουκρανία	Παρόν	Ιθαγενές
Γιουγκοσλαβία	Παρόν	Ιθαγενές
ΩΚΕΑΝΙΑ		
Αυστραλία	Λίαν διαδεδομένο	Ξενικό
-Νέα Νότια Ουαλία	Παρόν	Ξενικό
-Κουίνσλαντ	Παρόν	Ξενικό
-Νότια Αυστραλία	Παρόν	Ξενικό
-Τασμανία	Παρόν	Ξενικό
-Βικτώρια	Παρόν	Ξενικό
-Δυτική Αυστραλία	Παρόν	Ξενικό

1.4.2 Εισαγωγή και διάδοση

Το *L. rigidum* είναι ιθαγενές φυτό των Μεσογειακών χωρών, της Νότιας Ευρώπης και της Βόρειας Αφρικής, του Ασιατικού Κόλπου και της Ινδικής υπο-ηπείρου. Έχει εισαχθεί ή διαδοθεί στη Βόρεια και Νότια Αμερική, στη Νότια Αφρική και στην Αυστραλία. Εισήχθη εκ προθέσεως στην Αυστραλία ως επιθυμητό είδος στους λειμώνες για βοσκή κατά τη διάρκεια του 19^{ου} αιώνα και από τότε εξελίχθηκε σε σημαντικό καλλιεργητικό ζιζάνιο στη Νότια Αυστραλία. Είναι πολύ εύκολο να εξαπλωθεί από σπόρους σιτηρών που κρατήθηκαν από τους καλλιεργητές και συχνά απαντάται σε καλλιέργειες της Αυστραλίας (Niknam et al, 2002).

1.4.3 Βιολογία και Οικολογία

1.4.3.1 Γενετική

Το *L. rigidum* είναι ένα αυτοασυμβίβαστο, διπλοειδές είδος, με χρωμοσωμικό αριθμό $n=7$ ($2n=14$). Παρουσιάζει μεγάλη προσαρμοστικότητα και φαινοτυπική πλαστικότητα και παραλλακτικότητα, ανάλογα με τις κλιματικές, εδαφικές και γεωργικές συνθήκες στις οποίες θα βρεθεί (Kloot, 1983). Για παράδειγμα, στην Αυστραλία, έχουν τεκμηριωθεί πληθυσμοί του *L. rigidum* με μεγάλες διαφορές στη φαινολογική τους ανάπτυξη, επιδεικνύοντας αξιοσημείωτη προσαρμογή στα τοπικά περιβάλλοντα από τότε που το είδος εισήχθη για πρώτη φορά σε αυτή την ήπειρο (Gill et al., 1996).

Το *L. rigidum* είναι ικανό να υβριδίζει (να διασταυρώνεται) ελεύθερα με τα συγγενή του είδη *L. multiflorum* και *L. perenne*, αλλά και να σχηματίζει υβρίδια με έναν αρκετά μεγάλο αριθμό ειδών *Festuca* (Terrell, 1968). Μορφολογικές μελέτες μπόρεσαν να διαφοροποιήσουν τα είδη *Lolium*, αν και ήταν εμφανής η σημαντική παρεμπόδιση μεταξύ των ειδών, ιδιαίτερα των *L. rigidum* και *L. multiflorum* (Bennett et al., 2000,2002).

Ακόμη, σε σχετική μελέτη του είδους *Lolium* από την Ιταλία, ένα μεγάλο ποσοστό της τάξης του 40%-60% των ατόμων ήταν υβρίδια (Dinelli et al., 2002). Επίσης, βρέθηκε ένα υψηλό επίπεδο ενδο-πληθυσμιακής παραλλακτικότητας στο *L. rigidum* και διαπιστώθηκε ότι η ροή των γονιδίων που πραγματοποιήθηκε μέσω της γύρης μεταξύ των πληθυσμών αυτών ήταν 2,2 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τη ροή των γονιδίων από τη μετακίνηση με σπόρους (Balfourier et al., 2000)

1.4.3.2 Φυσιολογία και φαινολογία

Οι φρέσκοι διασκορπισμένοι σπόροι του *L. rigidum* παρουσιάζουν ενδογενή λήθαργο, ενώ απαιτούν μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο μετά την ωρίμανσή τους για να βλαστήσουν. Η διακοπή του λήθαργου σε πληθυσμούς προερχόμενους από τη Δυτική Αυστραλία έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται άμεσα με την αύξηση της θερμοκρασίας μετά την ωρίμανση με κάποια διακύμανση που σημειώθηκε στο βαθμό του λήθαργου κατά τη διάρκεια της διασποράς (Steadman et al., 2003).

Ένας εναλλακτικός μηχανισμός διακοπής του λήθαργου στο *L. rigidum* έδειξε ότι οι σπόροι ανταποκρίνονται στην ενυδάτωση στο σκοτάδι. Ένα μέρος των σπόρων δηλαδή μπορεί να εμφανίζει αναγκαστικό σκοτεινό λήθαργο, σε ποσοστό 10-20%, γεγονός που οδηγεί στη βραχυπρόθεσμη επιμονή των θαμμένων σπόρων να διατηρούν τη βλαστικότητά τους (Gramshaw & Stearn, 1977). Επίσης, βρέθηκε βέλτιστη βλάστηση και εμφάνιση φυταριών από σπόρους που είχαν τοποθετηθεί κοντά στην επιφάνεια του εδάφους (Pearce & Quinlivan, 1971) και έχει αναφερθεί μειωμένη εγκατάσταση σπόρων που είχαν τοποθετηθεί κάτω από αυτό το βάθος, με πλήρη αναστολή σε βάθος 11-14 εκατοστών (Gramshaw & Stearn, 1977). Αναφέρθηκε ακόμη ετήσια μείωση της τράπεζας σπόρων της τάξης του 70-80% για το *L. rigidum* (Peltzer & Matson, 2002).

Η λεπτή ήρα είναι ζιζάνιο που αναπαράγεται αποκλειστικά με σπόρους και γι'αυτό σαν φυτικό είδος παράγει πολλούς σπόρους. Σε μια καλλιέργεια σίτου έχει αναφερθεί αριθμός παραγωγής σπόρων 31.000-45.000 ανά τετραγωνικό μέτρο (Rerkasem et al., 1980).

1.5 Έλεγχος ζιζανίων

Υπάρχουν αρκετά μέτρα που μπορεί να πάρει ο παραγωγός για τον έλεγχο των ζιζανίων στο χωράφι του και αυτά περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω.

Προληπτικά μέτρα

Τα κυριότερα από τα προληπτικά μέτρα είναι η χρησιμοποίηση πιστοποιημένου σπόρου σποράς, κοπριάς και λοιπών υλικών απαλλαγμένα από σπόρους ή όργανα αγενούς αναπαραγωγής των ζιζανίων και ο προσεκτικός καθαρισμός των μηχανημάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε περιοχές μολυσμένες από ζιζάνια πριν να χρησιμοποιηθούν σε αμόλυντους αγρούς.

Βοτάνισμα

Με το βοτάνισμα γίνεται αφαίρεση των ζιζανίων με το χέρι ή καταστροφή τους με εργαλεία όπως είναι η τσάπα και το σκαλιστήρι. Η εφαρμογή του βοτανίσματος σαν μέτρο ελέγχου των ζιζανίων είναι περιορισμένη διότι είναι χρονοβόρα, επίπονη, με μεγάλο κόστος εφαρμογής και δυσκολία εφαρμογής σε γραμμικές καλλιέργειες.

Μηχανική μέθοδος

Με τη μηχανική μέθοδο, τα ζιζάνια αντιμετωπίζονται με τη χρήση εργαλείων κατεργασίας του εδάφους, όπως είναι το άροτρο, ο καλλιεργητής, η δισκοσβάρνα, η φρέζα και το σκαλιστήρι, ή με χορτοκοπτικές μηχανές.

Καλλιεργητικά μέτρα

Το πιο σημαντικό από τα καλλιεργητικά μέτρα είναι η αμειψισπορά. Άλλα μέτρα είναι η καλή προετοιμασία της σποροκλίνης, η επιλογή σπόρου ομοιόμορφου μεγέθους και η πυκνότερη και σε ομοιόμορφο βάθος σπορά (μέτρα που συντελούν στην γρηγορότερη και ομοιόμορφη εγκατάσταση μιας εύρωστης και ανταγωνιστικής σε σχέση με τα ζιζάνια φυτείας). Επίσης, η ορθολογική χρήση των εισροών (άρδευση, λίπανση) και η αποτελεσματική και έγκαιρη αντιμετώπιση φυτικών εχθρών και ασθενειών. Τέλος, η χρήση πιο ανταγωνιστικών ειδών, ποικιλιών ή υβριδίων των καλλιεργούμενων φυτών.

Κάψιμο των ζιζανίων

Χρησιμοποιούνται ειδικοί καυστήρες που φέρονται σε ελκυστήρες ή φλογοβόλα χειρός. Η φλόγα κατευθύνεται στα ζιζάνια που αναπτύσσονται μεταξύ των γραμμών σποράς ή και επί των γραμμών σποράς, σε γραμμικές καλλιέργειες.

Κάλυψη του εδάφους

Η κάλυψη αυτή γίνεται με πριονίδι, άχυρο ή φυτικά υπολείμματα και σαν στόχο έχει τη συγκράτηση της υγρασίας και την άνοδο της θερμοκρασίας του εδάφους ούτως ώστε να γίνει πρῶιμη ανάπτυξη των καλλιεργούμενων φυτών και να είναι πιο ανταγωνιστικά.

Κατάκλυση ή αποστράγγιση

Εφαρμόζεται αποστράγγιση ή κατάκλυση ανάλογα αν τα ζιζάνια που χρειάζεται να αντιμετωπιστούν είναι υδροχαρή ή όχι. Στα μεν υδροχαρή που αναπτύσσονται σε κανάλια άρδευσης ή λιμνάζουσες περιοχές χρησιμοποιείται η αποστράγγιση, οπότε και με τη στέρηση του νερού τα ζιζάνια νεκρώνονται., στα δε μη υδροχαρή, η εφαρμογή κατάκλυσης δημιουργεί συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, οπότε νεκρώνονται και αυτά.

Ηλιοαπολύμανση του εδάφους

Με την ηλιοαπολύμανση αυξάνεται η θερμοκρασία του εδάφους μετά από την κάλυψή του με διαφανή ή αδιαφανή (μαύρα) πλαστικά, σε περίοδο που η ηλιακή ακτινοβολία είναι έντονη και συνεχής. Τα ζιζάνια αντιμετωπίζονται στο στάδιο του φυτρώματος ή της βλάστησης των σπόρων τους ή των οργάνων αγενούς αναπαραγωγής τους.

Βιολογική μέθοδος

Η αντιμετώπιση των ζιζανίων γίνεται με τη χρήση άλλων οργανισμών. Με βάση το είδος των οργανισμών που χρησιμοποιούνται και τον τρόπο εφαρμογής τους, η βιολογική μέθοδος χωρίζεται στην: α) κλασσική μέθοδο, β) χρήση βιοζιζανιοκτόνων και γ) αλληλοπάθεια.

Κλασσική βιολογική μέθοδος

Συνίσταται στην εισαγωγή ή απελευθέρωση φυσικών εχθρών ή παρασίτων των ζιζανίων, με σκοπό τη μείωση του πληθυσμού τους. Τέτοιοι εχθροί ή παράσιτα μπορεί να είναι έντομα, μύκητες, ακάρεια, βακτήρια, νηματώδεις σκώληκες, πτηνά ή ψάρια, που θα πρέπει να βρεθούν, να παραχθούν μαζικά πριν την απελευθέρωσή τους αλλά και να εξεταστεί η πιθανή συμπεριφορά τους στο περιβάλλον.

Χρήση βιοζιζανιοκτόνων

Χρησιμοποιούνται μόνο μικροοργανισμοί, μύκητες και βακτήρια, που εφαρμόζονται με ψεκαστικά μηχανήματα. Τα βιοσυσκευάσματα που περιέχουν αυτούς τους μικροοργανισμούς χαρακτηρίζονται ως βιοζιζανιοκτόνα.

Αλληλοπάθεια

Η αντιμετώπιση γίνεται με ανώτερα φυτά (καλλιεργούμενα φυτά) τα οποία έχουν την ιδιότητα να εκκρίνουν γύρω από το χώρο ανάπτυξής τους ουσίες-προϊόντα του

δευτερογενούς μεταβολισμού- που αναστέλλουν το φύτερωμα ή την ανάπτυξη διάφορων ζιζανίων.

Χημική μέθοδος

Χρησιμοποιούνται χημικά μέσα (ζιζανιοκτόνα) για τον έλεγχο των ζιζανίων. Ανάλογα της προέλευσης της δραστικής ουσίας των ζιζανιοκτόνων, τα ζιζανιοκτόνα χωρίζονται σε μια από τις επόμενες τρεις κατηγορίες.

Χημικώς συντιθέμενα ζιζανιοκτόνα

Είναι τα ζιζανιοκτόνα που περιέχουν ανόργανες ή οργανικές ενώσεις που η ανακάλυψή τους έγινε στο εργαστήριο. Σαν παραδείγματα ζιζανιοκτόνων αυτής της κατηγορίας αναφέρονται εδώ αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα: Το glyphosate (γλυκίνες), το iodosulfuron και το mesosulfuron (σουλφονουλουρίες) και το clodinafop-propargyl (αρυλοξυφαινοξυαλκανοικά).

Φυσικώς συντιθέμενα ζιζανιοκτόνα

Είναι φυσικές τοξίνες με ζιζανιοκτόνο δράση που προέρχονται από ανώτερα φυτά ή μικροοργανισμούς. Παράδειγμα αποτελεί η ουσία anisomycin που παράγεται από το μικροοργανισμό *Streptomyces spp.* και καταπολεμά αποτελεσματικά τα ζιζάνια μουχρίτσα (*Echinochloa crus-galli*) και *Digitaria spp.*

Παράγωγα φυσικών τοξινών

Τα ζιζανιοκτόνα αυτά συντέθηκαν στο εργαστήριο και βασίζονται στη χημεία των φυσικών τοξινών. Παράδειγμα είναι η ουσία methoxyphenone που μιμείται τη δράση της anisomycin ενάντια στη μουχρίτσα.

Ολοκληρωμένη αντιμετώπιση ζιζανίων

Είναι ένα σύστημα αντιμετώπισης των ζιζανίων και ελέγχου του πληθυσμού τους με τη συνδυασμένη εφαρμογή διαφόρων μεθόδων αντιμετώπισης: προληπτικά και καλλιεργητικά μέτρα και μηχανικές, βιολογικές και χημικές μεθόδους (Εικόνα 5). Στην εφαρμογή της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης οδήγησε η διαπίστωση πως η εφαρμογή μιας μόνο κατηγορίας μεθόδων αδυνατεί να είναι πολύ αποτελεσματική. Ακόμη, σε κάποιες άλλες περιπτώσεις, δημιουργούνται και προβλήματα, όπως για παράδειγμα είναι η εμφάνιση ανθεκτικών βιότυπων ζιζανίων στα ζιζανιοκτόνα λόγω της αλλόγιστης και μονομερούς χρήσης τους (Ελευθεροχωρινός, 2008).

INTEGRATED WEED MANAGEMENT



Εικόνα 5. Ολοκληρωμένη αντιμετώπιση ζιζανίων σημαίνει συνδυασμός όλων των μεθόδων αντιμετώπισης, με έμφαση στα μέτρα πρόληψης και λιγότερο συχνή τη χρήση ζιζανιοκτόνων (πηγή: <http://www.weedscience.org>)

1.6 Ανθεκτικότητα των ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα

1.6.1 Γενικά

Ο όρος *ανθεκτικότητα* (resistance) αναφέρεται στην «κληρονομική ιδιότητα μερικών βιότυπων ενός ζιζανίου να επιβιώνουν μετά την εφαρμογή, ακόμα και μεγαλύτερης από της συνιστώμενης δόσης, κάποιου ζιζανιοκτόνου, στο οποίο ο αρχικός πληθυσμός ήταν ευαίσθητος» (LeBaron & Gressel, 1982).

Η ανθεκτικότητα ζιζανίων στα ζιζανιοκτόνα αναπτύχθηκε μετά από μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ότι συνέβη με τα άλλα φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Για παράδειγμα, ενώ τα ζιζανιοκτόνα της οικογένειας των χλωροτριαζινών άρχισαν να χρησιμοποιούνται στο τέλος της δεκαετίας του 1950, η πρώτη περίπτωση ανθεκτικότητας αναφέρθηκε γύρω στο 1970. Ειδικότερα, ένας πληθυσμός του *Senecio vulgaris* ανθεκτικός σε χλωροτριαζίνες (atrazine, simazine) απομονώθηκε από έναν αγρό στην Ουάσινγκτον, όπου το ζιζανιοκτόνο simazine είχε χρησιμοποιηθεί συνεχώς για πολλά χρόνια (Ryan, 1970)

Ο αριθμός των ανθεκτικών ζιζανίων έχει από τότε αυξηθεί δραματικά, αφού έχουν καταγραφεί παγκοσμίως 194 ανθεκτικά είδη ζιζανίων στα ζιζανιοκτόνα (Hear, 2010).

Στον Πίνακα 3 περιγράφονται μερικές από τις σπουδαιότερες ομάδες ζιζανιοκτόνων με τα κυριότερα είδη ζιζανίων που ανέπτυξαν ανθεκτικότητα (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Πίνακας 3. Μερικές από τις σπουδαιότερες ομάδες ζιζανιοκτόνων με τα κυριότερα είδη ζιζανίων που ανέπτυξαν ανθεκτικότητα

Ζιζανιοκτόνα	Είδη ζιζανίων
Αρυλοξυφαινοξυαλκανοικά Κυκλοεξανδιόνες	<i>Lolium rigidum</i> , <i>Lolium multiflorum</i> , <i>Avena sterilis</i> , <i>Avena fatua</i> , <i>Alopecurus myosuroides</i> , <i>Phalaris minor</i> , <i>Echinochloa crus-galli</i> , <i>Setaria viridis</i> , <i>Sorghum halepense</i> , <i>Digitaria sanguinalis</i>
Σουλφονουρίες	<i>Stellaria media</i> , <i>Lactuca serriola</i> , <i>Kochia scoparia</i> , <i>Alisma plantago-aquatica</i> , <i>Papaver rhoeas</i> , <i>Bilderdykia convolvulus</i> , <i>Sonchus oleraceus</i> , <i>Conyza spp.</i> , <i>Amaranthus spp.</i> , <i>Lolium rigidum</i>
Τριαζίνες	<i>Solanum nigrum</i> , <i>Chenopodium album</i> , <i>Chenopodium polyspermum</i> , <i>Amaranthus retroflexus</i> , <i>Amaranthus lividus</i> , <i>Amaranthus hybridus</i> , <i>Senecio vulgaris</i> , <i>Conyza canadensis</i> , <i>Stellaria media</i> , <i>Sonchus asper</i> , <i>Bilderdykia convolvulus</i> , <i>Polygonum persicaria</i> , <i>Polygonum lapathifolium</i>
Διπυριδία	<i>Conyza canadensis</i> , <i>Epilobium ciliatum</i> , <i>Poa annua</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Solanum nigrum</i> , <i>Hordeum spp.</i>
Φαινοξυαλκανοικά	<i>Stellaria media</i> , <i>Cirsium arvense</i> , <i>Papaver rhoeas</i>
Δινιτροανιλίνες	<i>Setaria viridis</i> , <i>Eleusine indica</i> , <i>Amaranthus palmeri</i>

Στον πίνακα 4 αναφέρονται τα κυριότερα είδη αγρωστωδών ζιζανίων και τα ζιζανιοκτόνα στα οποία έχει επιβεβαιωθεί ανθεκτικότητα (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Πίνακας 4. Τα κυριότερα είδη αγροστωδών ζιζανίων και τα ζιζανιοκτόνα στα οποία έχουν εμφανίσει ανθεκτικότητα

Είδη αγροστωδών ζιζανίων	Ζιζανιοκτόνα
<i>Lolium rigidum</i>	diclofop, tralkoxydim, chlorsulfuron, sethoxydim, fluazifop, haloxyfop, glyphosate
<i>Avena sterilis</i>	diclofop, tralkoxydim, sethoxydim
<i>Avena fatua</i>	diclofop, fenoxaprop, tralkoxydim, sethoxydim
<i>Alopecurus myosuroides</i>	chlorotoluron, isoproturon, diclofop, clodinafop, fenoxaprop, fluazifop, sethoxydim, tralkoxydim
<i>Phalaris minor</i>	isoproturon, diclofop, fenoxaprop, sethoxydim
<i>Echinochloa crus-galli</i>	propanil, quinclorac
<i>Setaria viridis</i>	trifluralin, sethoxydim, fluazifop, haloxyfop, fenoxaprop, quizalofop, diclofop, tralkoxydim
<i>Sorghum halepense</i>	fluazifop, quizalofop, fenoxaprop, sethoxydim

1.6.2 Απλή ανθεκτικότητα

Η απλή ανθεκτικότητα (simple resistance) ορίζεται «η ανθεκτικότητα ενός ζιζανίου σε ένα και μόνο ένα ζιζανιοκτόνο, που φυσικά έχει ένα συγκεκριμένο μηχανισμό δράσης» (Ελευθεροχωρινός, 2008).

1.6.3 Σταυρανθεκτικότητα

Η σταυρανθεκτικότητα (cross resistance) ορίζεται ως «η ανθεκτικότητα ενός ζιζανίου σε περισσότερα από ένα ζιζανιοκτόνα που ανήκουν στην ίδια ή σε διαφορετικές οικογένειες με ίδιο μηχανισμό δράσης ή μεταβολισμού». Η ανθεκτικότητα αυτής της μορφής ελέγχεται από ένα μόνο γονίδιο (Ελευθεροχωρινός, 2008; Hear, 2010).

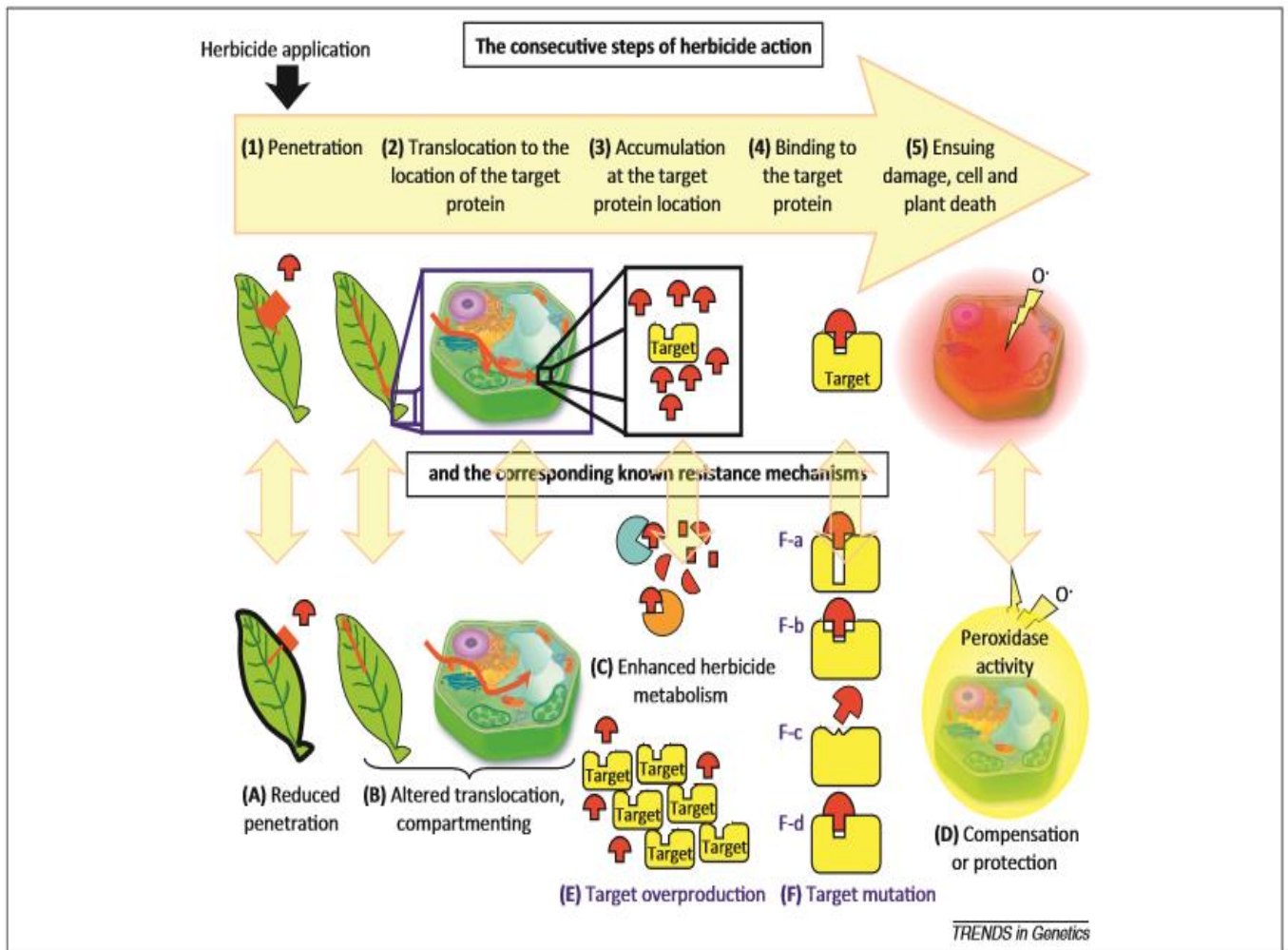
1.6.4 Πολλαπλή ανθεκτικότητα

Η πολλαπλή ανθεκτικότητα (multiple resistance) αναφέρεται στην «ανθεκτικότητα ενός ζιζανίου σε περισσότερα από ένα ζιζανιοκτόνα που ανήκουν σε οικογένειες με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης ή μεταβολισμού». Η ανθεκτικότητα αυτής της μορφής ελέγχεται από πολλά γονίδια (Ελευθεροχωρινός, 2008; Hear, 2010).

1.6.5 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Οι δύο πιο κοινοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας των φυτών είναι αφενός η ικανότητά τους να μεταβολίζουν το ζιζανιοκτόνο και αφετέρου η γενετική τροποποίηση της πρωτεΐνης ή του ένζυμο-στόχου του ζιζανιοκτόνου (Hatzios, 2001; Gressel, 2002)

Στην Εικόνα 6, περιγράφεται παραστατικά ο τρόπος με τον οποίο δρα ένα ζιζανιοκτόνο μέσα στο κύτταρο, όπως επίσης και οι διάφοροι μηχανισμοί που μπορεί να έχουν αναπτύξει οι ανθεκτικοί βιότυποι ενός ζιζανιού στα ζιζανιοκτόνα.

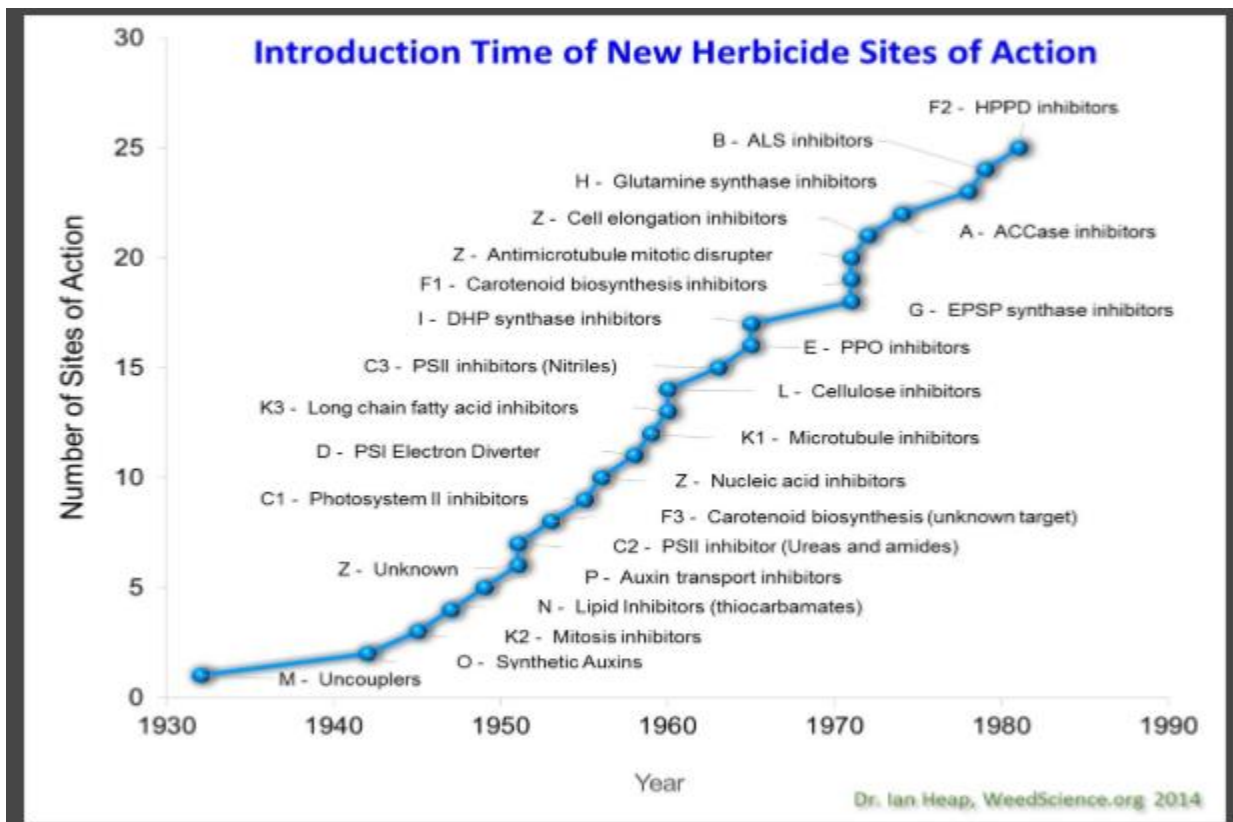


Εικόνα 6. Πάνω (κίτρινο βέλος): Ο τρόπος δράσης των ζιζανιοκτόνων από τη στιγμή που θα εισέλθουν εντός του φυτού μέχρι και την καταστροφή του κυττάρου και το θάνατο του φυτού. Εισχώρηση στο φυτό, μεταφορά στο ένζυμο-στόχο, συσσώρευση του ζιζανιοκτόνου στην πρωτεΐνη-στόχο, πρόσδεση στο ένζυμο και απενεργοποίησή του, κυτταρική ζημιά και θάνατος του φυτού. Κάτω: Πολλοί είναι οι μηχανισμοί της ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα και περιλαμβάνουν (Α) Μειωμένη απορρόφηση του ζιζανιοκτόνου στο σημείο ψεκασμού (υπέργειο μέρος) λόγω μορφολογικών χαρακτηριστικών του φυτού (πχ: αυξημένο πάχος εφυμενίδας των φύλλων), (Β) Απομάκρυνση και απομόνωση του ζιζανιοκτόνου σε ιστούς του φυτού και οργανίδια εντός του κυττάρου, μακριά από το ένζυμο-στόχο του ζιζανιοκτόνου, (Γ) Αυξημένος ρυθμός μεταβολισμού του ζιζανιοκτόνου σε λιγότερο τοξικά παραπροϊόντα, (Δ) Εξουδετέρωση κυτταροτοξικών μορίων που παράγονται από τη δράση των ζιζανιοκτόνων (πχ: ελεύθερες ρίζες οξυγόνου) από αποτοξικοποιητικά μόρια, όπως είναι οι υπεροξειδάσες, (Ε) Η υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν το ένζυμο-στόχο, πράγμα που οδηγεί στην εφαρμογή ακόμη μεγαλύτερης ποσότητας ζιζανιοκτόνου ώστε να θανατωθούν τα φυτά, (ΣΤ) Μεταλλαγές που οδηγούν σε διαφοροποίηση της τριτοταγούς δομής του ενζύμου, που συνεπάγεται αδυναμία πρόσδεσης του μορίου του ζιζανιοκτόνου επάνω στο ένζυμο. (Πηγή: Delye et al., 2013).

1.6.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας

Το είδος της ανθεκτικότητας (απλή, διασταυρωτή και πολλαπλή ανθεκτικότητα), καθώς και ο ρυθμός ανάπτυξής της επηρεάζονται από παράγοντες του ίδιου του ζιζανίου, του ζιζανιοκτόνου που εφαρμόζεται και της εφαρμοζόμενης γεωργικής πρακτικής (Gasquez, 1997; Naylor, 2002; Ελευθεροχωρινός, 2008).

Η Εικόνα 7 δείχνει την πορεία ανακάλυψης ζιζανιοκτόνων με νέο μηχανισμό δράσης. Όπως φαίνεται στην εικόνα, τα ζιζανιοκτόνα-αναστολείς των ενζύμων ALS, ACCase και EPSPS είναι σχετικά πιο καινούρια κι όμως, έχουν ήδη αναπτυχθεί πολλές ανθεκτικότητες στα ζιζανιοκτόνα αυτά.



Εικόνα 7. Πορεία ανακάλυψης ζιζανιοκτόνων με νέο μηχανισμό δράσης.

(Πηγή: Heap, 2014, www.weedscience.org)

1.6.7 Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς του PS I

Σε αυτή την κατηγορία ζιζανιοκτόνων ανήκουν τα διπυριδιλία (diquat, paraquat, κα.) (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2010).

Ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας 39 ανθεκτικών βιότυπων που ανήκουν σε 24 είδη ζιζανίων δεν είναι απόλυτα γνωστός (Heap, 2010), ωστόσο έχουν προταθεί σαν πιθανοί μηχανισμοί οι εξής: 1) η μειωμένη απορρόφηση και η περιορισμένη μετακίνηση των

ζιζανιοκτόνων στη θέση δράσης, 2) ο μεταβολισμός αυτών σε αδρανείς χημικές ουσίες, 3) η τροποποίηση της θέσης δράσης των ζιζανιοκτόνων, 4) η εξουδετέρωση των παραγόμενων από τα ζιζανιοκτόνα ελεύθερων ριζών (μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου-H₂O₂- και υπεροξειδίου-O₂-) και 5) η τροποποίηση της ενδοκυτταρικής κατανομής αυτών και ειδικότερα η μεταφορά τους στα κυτταρικά τοιχώματα, στο κυτταρόπλασμα ή τα χυμοτόπια και όχι στους χλωροπλάστες (όπου είναι δηλαδή ο χώρος δράσης τους (Hear, 2010).

1.6.8 Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς του PS II

Σε αυτή την ομάδα των ζιζανιοκτόνων ανήκουν οι τριαζίνες (χλωροτριαζίνες, μεθυλοθειοτριαζίνες, μεθοξυτριαζίνες), οι τριαζιόνες, οι ουρακίλες, οι πυριδαζιόνες, τα φαινυλοκαρβαμιδικά, οι τριαζολιόνες, τα νιτρίλια, τα παράγωγα ουρίας και τα αμίδια φυλλώματος (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2010).

Η χρήση των παραπάνω ζιζανιοκτόνων για περισσότερα από 50 έτη συνέβαλε στην ανάπτυξη 313 ανθεκτικών βιότυπων ζιζανίων. Συγκεκριμένα, 257 βιότυποι που ανήκουν σε 67 είδη ζιζανίων είναι ανθεκτικοί στις τριαζίνες, στις τριαζιόνες, στις ουρακίλες και στα φαινυλοκαρβαμιδικά, 55 βιότυποι που ανήκουν σε 21 είδη ζιζανίων είναι ανθεκτικοί στα παράγωγα ουρίας και στα αμίδια φυλλώματος, ενώ ένας βιότυπος ενός είδους ζιζανίου είναι ανθεκτικός στο bromoxynil (νιτρίλιο). Το συνολικό άθροισμα των ανθεκτικών ειδών στα παραπάνω ζιζανιοκτόνα δεν είναι 89 αλλά 74, επειδή μερικά είδη ζιζανίων έχουν ανθεκτικούς βιότυπους σε τριαζίνες και παράγωγα ουρίας ταυτόχρονα.

Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας στις περισσότερες από τις παραπάνω περιπτώσεις οφείλεται σε τροποποίηση της θέσης δράσης των ζιζανιοκτόνων (πρωτεΐνη D1). Μόνο σε βιότυπους έξι ειδών ζιζανίων η ανθεκτικότητα οφείλεται στην ικανότητα των φυτών να μεταβολίζουν τα ζιζανιοκτόνα. Συγκεκριμένα, για το *L. rigidum*, η ανθεκτικότητα ορισμένων βιότυπων του οφείλεται στην ικανότητα μεταβολισμού των ζιζανιοκτόνων μέσω συμπλόκου με γλουταθειόνη (η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο τρανσφεράς της γλουταθειόνης, GST) (Hear, 2010).

1.6.9 Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης καρροτενοειδών (ένζυμο PDS)

Σε αυτή την ομάδα ζιζανιοκτόνων ανήκουν οι πυριδαζιόνες και τα πυριδινοκαρβοξαμίδια (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2010).

Οι ανθεκτικοί βιότυποι που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε αυτή την ομάδα ζιζανιοκτόνων ανήκουν σε έξι είδη ζιζανίων (Hear, 2010). Πιθανότατα οφείλεται σε τροποποίηση του ενζύμου (θέση δράσης) αποκορεσμού του φυτοενίου (PDS), το οποίο κωδικοποιείται εντός του πυρήνα από το γονίδιο *pds* και είναι ένζυμο-κλειδί για τη βιοσύνθεση του α- και β-καροτενίου. Η τροποποίηση αφορά σε αντικατάσταση του

αμινοξέος αργινίνη (Arg) στη θέση 304 της πρωτεϊνικής αλυσίδας από το αμινοξύ σερίνη (Ser) ή από το αμινοξύ ιστιδίνη (His) (Puri et al., 2007).

1.6.10 Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης χλωροφύλλης (ένζυμο PPG-O)

Εδώ ανήκουν οι διφαινυλικοί αιθέρες, τα θειοδιαζολικά, οι οξαδιαζόλες, οι οξαζολιδινεδιόνες, οι πυριμιδινεδιόνες, οι τριαζολινόνες, τα φαινυλοπυραζολικά και τα φαινυλοφθαλιμίδια (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2010).

Ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας δεν έχει προσδιοριστεί επακριβώς (Heap, 2010). Σαν πιθανά αίτια για την ερμηνεία της ανθεκτικότητας των ζιζανίων έχουν προταθεί: 1) η μειωμένη απορρόφηση ή/και η περιορισμένη μετακίνηση των ζιζανιοκτόνων στη θέση δράσης, 2) ο μεταβολισμός αυτών, 3) η αποδιέγερση των παραγόμενων τοξικών μορίων ενεργού μορφής οξυγόνου O_2 -ελεύθερων ριζών-, 4) η μη ευαισθησία του ενζύμου οξειδάση του πρωτοπορφυρογόνου (PPG-O) των χλωροπλαστών στη δράση του ζιζανιοκτόνου-ένζυμο κλειδί για τη βιοσύνθεση της χλωροφύλλης), 5) η τροποποίηση στην ενδοκυτταρική δομή των ζιζανιοκτόνων, 6) η ταχεία καταστροφή του πρωτοπορφυρινογόνου ή της πρωτοπορφυρίνης στο κυτταρόπλασμα, 7) η αδρανοποίηση του ενζύμου υπεροξειδάση που μετατρέπει το πρωτοπορφυρινογόνο σε πρωτοπορφυρίνη στο κυτταρόπλασμα και 8) η υπερέκφραση του γονιδίου της οξειδάσης του πρωτοπορφυρογόνου των χλωροπλαστών ή των μιτοχονδρίων (Shoup et al., 2003).

1.6.11 Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης αμινοξέων με διακλαδισμένη αλυσίδα (ένζυμο ALS ή AHAS)

Το ένζυμο οξικογαλακτική συνθετάση (ή αλλιώς συνθετάση του οξικογαλακτικού οξέος) αποτελεί τη θέση δράσης των σουλφονουλουριών (Chaleff & Mauvais, 1984), των ιμιδαζολινών (Shaner et al., 1984), των τριαζολοπυριμιδινών (Gerwick et al., 1990), των πυριμιδινυλοθειοβενζοϊκών (Stidham, 1991) και των σουλφονυλαμινοκαρβονυλοτριαζολινών (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Το ένζυμο αυτό καταλύει δύο παράλληλες αντιδράσεις κατά τη βιοσύνθεση των αμινοξέων με διακλαδισμένη αλυσίδα άνθρακα, δηλαδή της Βαλίνης, της Λευκίνης και της Ισολευκίνης (Umbarger, 1978).

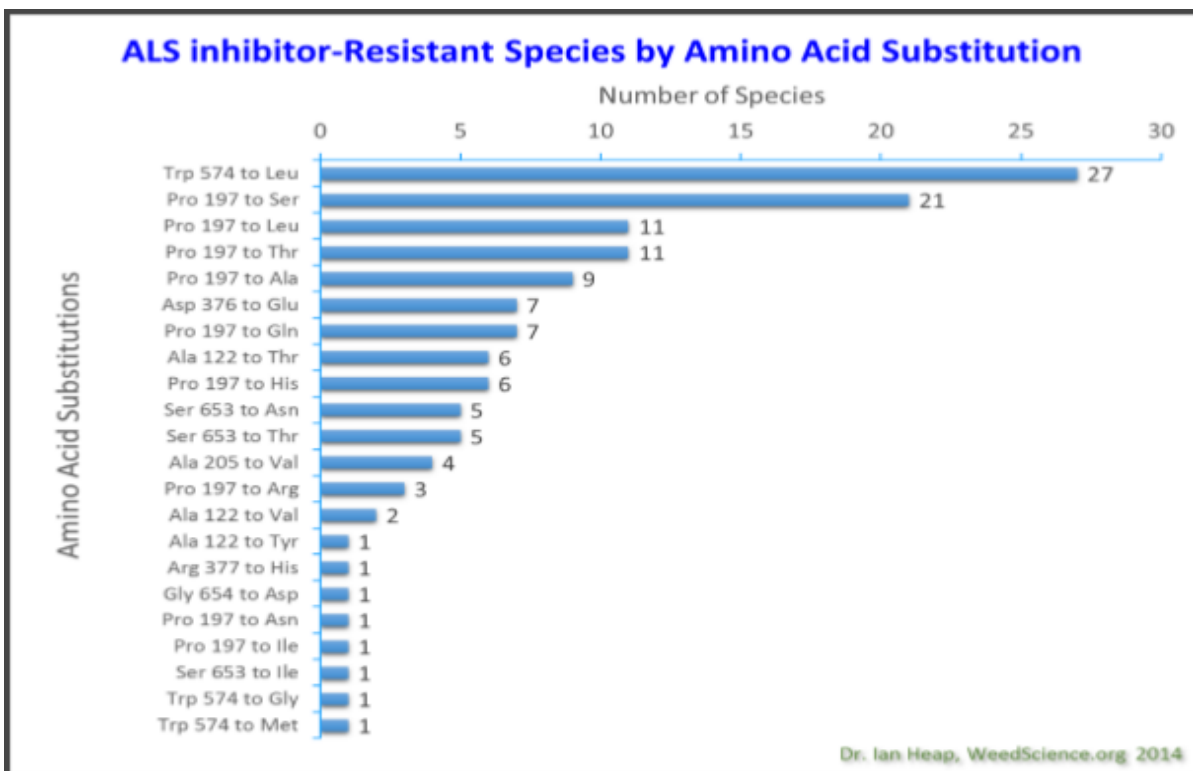
Η σημαντικότερη ομάδα των ζιζανιοκτόνων αυτών είναι οι σουλφονουλουρίες. Ο βασικός χημικός τύπος των σουλφονουλουριών αποτελείται από μια αρυλο-ομάδα, τη σουλφονουλουρονική γέφυρα και μια ετεροκυκλική αρωματική ομάδα. Η πρώτη δραστική ουσία αυτής της ομάδας ζιζανιοκτόνων ανακαλύφθηκε στα εργαστήρια της DuPont το 1977. Δέκα χρόνια αργότερα, η ομάδα των σουλφονουλουριών περιλάμβανε 230 δραστικές ουσίες από τις οποίες οι 169 (74%) αναπτύχθηκαν στα εργαστήρια της DuPont. Το chlorsulfuron ήταν η πρώτη σουλφονουλουρία που πήρε έγκριση κυκλοφορίας στις ΗΠΑ και στη Μ.Βρετανία το 1982, ενώ στην Ελλάδα εγκρίθηκε το 1985 (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Οι αγρότες προτιμούν εδώ και πολλά χρόνια ζιζανιοκτόνα αυτής της ομάδας επειδή είναι αποτελεσματική εναντίον πολλών πλατύφυλλων αλλά και ορισμένων αγρωστωδών ζιζανίων, αλλά και λόγω της χαμηλής δόσης εφαρμογής, της μεγάλης υπολειμματικής διάρκειας, της εκλεκτικότητας και της χαμηλής τοξικότητας στα καλλιεργούμενα φυτά (Mazur & Falco, 1989, Saari et al., 1994). Αυτά τα ζιζανιοκτόνα εφαρμόζονται σε δόσεις 10-100 φορές μικρότερες από τα περισσότερα από τα ήδη χρησιμοποιούμενα, ωστόσο ο χρόνος παραμονής μερικών σουλφονουριών (chlorsulfuron, metsulfuron, triasulfuron) συχνά είναι μεγαλύτερος από 12 μήνες, αν και οι συνιστώμενες δόσεις τους είναι πολύ μικρές (1-2g. δ.ο/στρ.) (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Η χρήση των παραπάνω ζιζανιοκτόνων για περισσότερα από 25 έτη συνέβαλε στην ανάπτυξη 334 ανθεκτικών βιότυπων που ανήκουν σε 107 είδη αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων (Heap, 2010).

Η πρώτη καταγραφή ζιζανίων με ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα-αναστολείς του ενζύμου ALS έγινε στις ΗΠΑ πέντε χρόνια μετά τη χρήση τους (Preston & Mallory-Smith, 2001)

Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας των περισσότερων βιότυπων οφείλεται στην τροποποίηση της θέσης δράσης των ζιζανιοκτόνων αυτών, δηλαδή του ενζύμου ALS ή AHAS, το οποίο κωδικοποιείται εντός του πυρήνα και μέσω ενός πεπτιδίου-μεταφορέα μεταφέρεται εντός των χλωροπλαστών, όπου και γίνεται η σύνθεση των τριών αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας άνθρακα (Εικόνα 8, Heap, 2014).



Εικόνα 8. Μεταλλάξεις του ενζύμου ALS και αριθμός ανθεκτικών ειδών ζιζανίων που οφείλουν την ανθεκτικότητά τους στις μεταλλάξεις αυτές. Πηγή: (Heap, 2014, www.weedscience.org)

Υπάρχουν ωστόσο και ορισμένοι βιότυποι ζιζανίων των οποίων η ανθεκτικότητα οφείλεται στο μεταβολισμό των ζιζανιοκτόνων μέσω υδροξυλίωσης και στη συνέχεια μέσω σχηματισμού ενός συμπλόκου με γλυκόζη (Preston & Mallory-Smith, 2001; Tranel & Wright, 2002). Λόγω αυτού του μεταβολισμού, έχει αναφερθεί πως ένας βιότυπος του ζιζανίου *L. rigidum* είναι ήδη ανθεκτικός στο ζιζανιοκτόνο chlorsulfuron (Christopher et al., 1991).

1.6.12 Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων (ένζυμο EPSPS)

Στην κατηγορία αυτή των ζιζανιοκτόνων υπάγονται οι γλυκίνες ή φωσφονογλυκίνες. Συγκεκριμένα, οι ενώσεις του glyphosate με τη μορφή αλάτων του. Για παράδειγμα, στο εμπόριο το glyphosate κυκλοφορεί σαν άλας της ισοπροπυλαμίνης (glyphosate-isopropylammonium, Roundup), σαν άλατα αμμωνίου (glyphosate-ammonium και glyphosate diammonium), άλατα καλίου (glyphosate-potassium), νατρίου (glyphosate-sodium) και θείου (glyphosate-trimesium, γνωστό σαν sulfosate) (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2010).

1.6.12.1 Χρήσεις του glyphosate

Το glyphosate είναι σήμερα το πιο διαδεδομένο και ευρέως χρησιμοποιούμενο ζιζανιοκτόνο παγκοσμίως, κι αυτό λόγω του ότι έχει μεγάλη αποτελεσματικότητα απέναντι σε ένα πολύ μεγάλο εύρος ειδών ζιζανίων (είναι μη εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο), είναι σχετικά οικονομικό και σχετικά ασφαλέστερο από άλλα ζιζανιοκτόνα για το περιβάλλον (Dill et al., 2008, Duke and Powles, 2008).

Από τη χρονιά που εισήχθη στις αγορές, το 1974, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των ζιζανίων τόσο σε γεωργικά όσο και σε αστικά και σε φυσικά οικοσυστήματα. Χρήσεις του αναφέρονται τόσο για έλεγχο των ζιζανίων σε καλλιέργειες όσο και σε αστικές και βιομηχανικές περιοχές (πρανή δρόμων, σιδηροδρομικές γραμμές, κ), αστικά πάρκα και άλλες περιοχές (Powles, 2008).

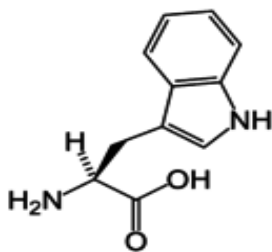
Αρχικά, πριν την εμφάνιση των διαγονιδιακών καλλιεργούμενων φυτών ανθεκτικών στο glyphosate, χρησιμοποιείτο ακριβώς πριν τη σπορά του καλλιεργούμενου φυτού. Επίσης, η χρήση του γίνεται και μεταξύ των γραμμών σε πολυετείς καλλιέργειες όπως είναι οι οπωρώνες και οι αμπελώνες. Σε μονοετείς καλλιέργειες, λόγω της μη εκλεκτικότητάς του, δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μεταξύ των γραμμών σποράς όταν το καλλιεργούμενο φυτό είχε ήδη φυτρώσει.

Όμως, από το 1996 με την εισαγωγή των διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικά στο glyphosate που περιέχουν ένα γονίδιο που τους προσδίδει την ανθεκτικότητα (Dill et al. 2008), γίνεται εφαρμογή του και μεταφυτρωτικά για έλεγχο των ζιζανίων χωρίς να ζημιώνεται η

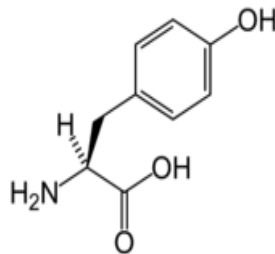
καλλιέργεια, μία, δύο ή και περισσότερες φορές μέσα στην καλλιεργητική περίοδο. Άλλα πλεονεκτήματα πλέον, μετά την εμφάνιση των διαγονιδιακών φυτών, είναι η πρώιμη σπορά και η ακαλλιέργεια του εδάφους για έλεγχο ζιζανίων (James, 2006). Όμως, η εισαγωγή διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικών στο glyphosate συνέβαλλε επίσης στη μείωση της χρήσης ζιζανιοκτόνων με διαφορετικό μηχανισμό δράσης, γεγονός που αύξησε την πίεση επιλογής για την εμφάνιση ανθεκτικών βιότυπων ζιζανίων, αλλά και γενικότερα συνέβαλλε στην αλλαγή των πρακτικών της φυτικής παραγωγής σε διάφορες καλλιέργειες, όπως το βαμβάκι και η σόγια (Young, 2006).

1.6.12.2 Μηχανισμός δράσης του glyphosate:

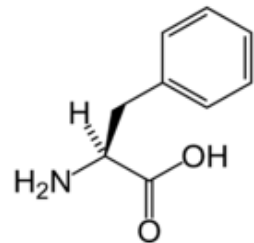
Το glyphosate δρα ως ανταγωνιστικός παρεμποδιστής του ενζύμου Σύνθεσης του 5-ενολοπυρουβιλσικιμικού-3-φωσφορικού οξέος (EPSP Synthase, EPSPS), με την προσκόλλησή του πάνω στο ένζυμο αυτό. Η απενεργοποίηση του ενζύμου EPSPS έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης του 5-ενολοπυρουβιλσικιμικού-3-φωσφορικού οξέος (EPSP), το οποίο αποτελεί την πρόδρομη ουσία σε πολλά μονοπάτια βιοσύνθεσης συστατικών των κυττάρων και ειδικότερα εμπλέκεται στο μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των αρωματικών αμινοξέων τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη (Εικόνα 9).



α) Τρυπτοφάνη



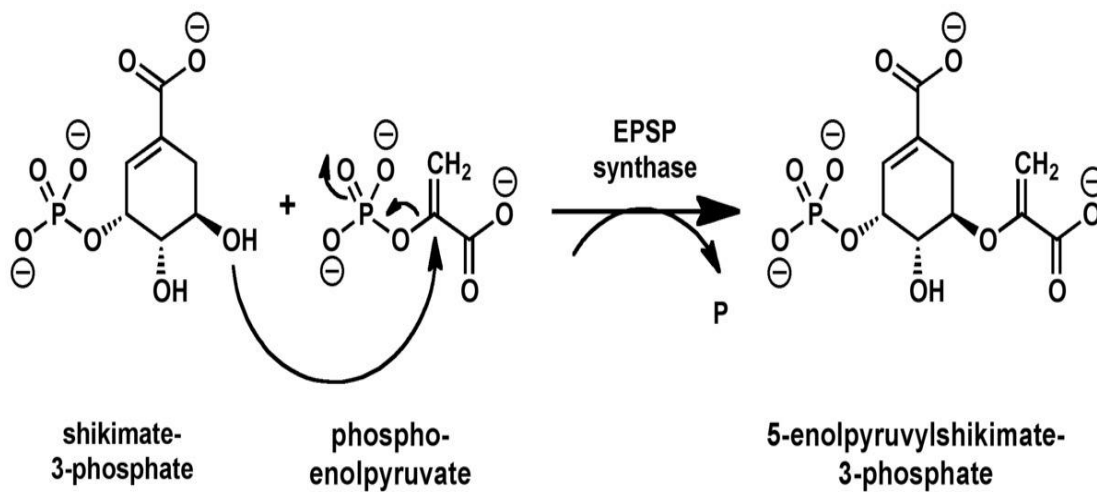
β) Τυροσίνη



γ) Φαινυλαλανίνη

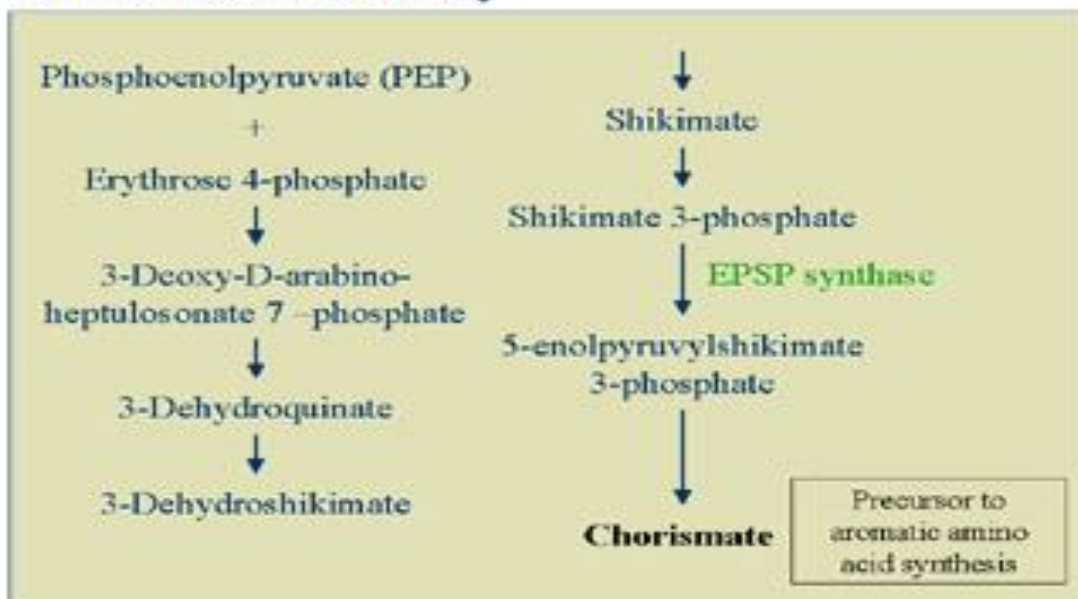
Εικόνα 9. Τα αρωματικά αμινοξέα: α) Τρυπτοφάνη, β) Τυροσίνη και γ) Φαινυλαλανίνη (πηγή: Βουλγαρίδης, 2014).

Το EPSPS είναι το ένζυμο-κλειδί στο λεγόμενο βιοχημικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος, καταλύει την σύνθεση του EPSP (με ταυτόχρονη παραγωγή ανόργανου φωσφόρου) από τις εξής πρόδρομες ενώσεις: Σικιμικό-3-φωσφορικό οξύ (S3P) και φωσφοενολοπυρουβικό οξύ (PEP) (Εικόνες 10, 11). Αν και το ένζυμο κωδικοποιείται εντός του πυρήνα των φυτικών κυττάρων, στη συνέχεια μεταφέρεται με τη βοήθεια ενός πεπτιδίου-μεταφορέα (CTP, Chloroplast Transit Peptide) εντός του χλωροπλάστη, και κατά συνέπεια στον χλωροπλάστη γίνεται η σύνθεση των παραπάνω αρωματικών αμινοξέων.



Εικόνα 10. Κατάλυση της αντίδρασης S3P + PEP προς παραγωγή του EPSP και ανόργανου P από το ένζυμο EPSPS (πηγή: Μουρκίδου, 2008)

Shikimate Pathway



Εικόνα 11. Το βιοχημικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος. (Gibson, 2001)

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 11, η παρεμπόδιση της ενζυμικής λειτουργίας του ενζύμου EPSPS συνεπάγεται τη συσσώρευση σικιμικού οξέος (shikimate). Για το λόγο αυτό, μια πρώτη ισχυρή ένδειξη (τρεις μέρες μετά την εφαρμογή του glyphosate) για το αν ένα φυτό είναι ανθεκτικό ή όχι στο ζιζανιοκτόνο είναι η μέτρηση των επιπέδων σικιμικού οξέος στα φύλλα του. Αυξημένα επίπεδα σικιμικού οξέος υποδηλώνουν ευπάθεια, ενώ μειωμένα έως καθόλου δείχνουν πως το φυτό είναι μάλλον ανθεκτικό (Culprepper et al., 2006).

1.6.12.3 Βασικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας:

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που έχουν αναπτύξει τα φυτά απέναντι στο glyphosate μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται οι μηχανισμοί που αναφέρονται στο ένζυμο EPSPS (target site resistance), ενώ στη δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται γενικότεροι μηχανισμοί αποτοξίνωσης από το ζιζανιοκτόνο που δεν έχουν σχέση με το ένζυμο-στόχο (non target site resistance) (Sammons and Gaines, 2014).

1.6.12.3.1 Target-site resistance:

Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την ανθεκτικότητα ορισμένων φυτών απέναντι στο glyphosate και έχουν σχέση με το ένζυμο-στόχο του ζιζανιοκτόνου είναι:

α) Μια μεταλλαγή στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, οπότε και το μόριο του glyphosate δε μπορεί να προσδεθεί και να το απενεργοποιήσει. Ο μηχανισμός αυτός έχει βρεθεί σε διάφορα φυτά, όπως είναι η ελευσίνη (*Eleusine indica*) (Baerson et al. 2002; Ng et al. 2003) και η ήρα (*Lolium sp.*) (Perez-Jones et al., 2007; Simarmata and Penner, 2008; Wakelin and Preston, 2006).

β) Υπερέκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το EPSPS, οπότε και το ζιζανιοκτόνο στη συνιστώμενη δόση εφαρμογής δεν είναι πλέον αποτελεσματικό, αλλά απαιτούνται πολύ μεγαλύτερες ποσότητες για τον έλεγχο των ζιζανίων. Ο δεύτερος αυτός μηχανισμός ανθεκτικότητας έχει βρεθεί ιδιαίτερα σε ζιζάνια του είδους *Conyza sp.* (Dinelli et al. 2006, 2008).

1.6.12.3.1.1 Μεταλλάξεις στο ένζυμο EPSPS:

Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο EPSPS περιέχει μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων που κωδικοποιούν τα αμινοξέα που συνθέτουν την πρωτεΐνη-ένζυμο. Έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο glyphosate και μια από αυτές είναι η αντικατάσταση του υδρόφοβου αμινοξέος προλίνη στη θέση 106 της αλληλουχίας των αμινοξέων της πρωτοταγούς δομής του EPSPS από τα υδρόφοβα αμινοξέα αλανίνη ή λευκίνη ή από τα υδρόφιλα αμινοξέα σερίνη ή θρεονίνη. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν ανιχνευθεί σε 6 είδη, πιο συχνά σε είδη του γένους *Lolium sp.* (*L. rigidum*, *L. multiflorum*) (Bell et al. 2013, Nandula et al. 2013).

Οι μεταλλάξεις αυτές προκαλούν μια αλλαγή στη στερεοδιάταξη του ενζύμου στο χώρο (τριτοταγής δομή) και ειδικότερα στο ενεργό του κέντρο, με αποτέλεσμα να μειώνεται η συγγένεια μεταξύ του ενεργού κέντρου και του μορίου του glyphosate. Όμως η αλλαγή αυτή δεν είναι τόσο μεγάλη ώστε να μην προσδένονται τα μόρια του PEP. Επομένως το PEP αποκτά ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στην πρόσδεσή του στο ενεργό κέντρο του EPSPS σε σχέση με το glyphosate και κατά συνέπεια η αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο συμβαίνει κανονικά (Baerson et al. 2002; Healy-Fried et al. 2007).

1.6.12.3.1.2 Υπερέκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το EPSPS:

Όταν ένα διπλασιασμένο γονίδιο περιέχει μεταγραφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των εκκινήτων, το άμεσο αποτέλεσμα είναι η αυξημένη έκφραση (υπερέκφραση) mRNA και πρωτεΐνης. Ειδικά στους μηχανισμούς ανθεκτικότητας στο glyphosate, έχουν αναφερθεί παραδείγματα προσαρμογής με διπλασιασμό των γονιδίων όταν τα φυτά βρεθούν κάτω από περιβαλλοντικό στρες (Kondrashov 2012).

Συμπερασματικά, η ανθεκτικότητα απέναντι στο glyphosate φαίνεται να αυξάνει σε αρκετές περιπτώσεις όταν υπάρχει αυξημένος αριθμός γενετικών αντίγραφων του EPSPS. Για παράδειγμα, σε *Lolium multiflorum*, η δόση που απαιτείται για να επιτευχθεί 50% μείωση στη φυτική ανάπτυξη, αυξήθηκε γραμμικά με την αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του EPSPS (Salas et al. 2012).

1.6.12.3.2 Non-Target site resistance:

Με τους γενικότερους μηχανισμούς αποτοξίνωσης που διαθέτει το φυτό απέναντι στο glyphosate, η κατάληξη είναι να φθάνει μια μη θανατηφόρα δόση του ζιζανιοκτόνου πάνω στο ένζυμο-στόχο, που όπως αναφέρθηκε είναι το EPSPS. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν:

α) Μειωμένη απορρόφηση από το φυτό και μειωμένη μετακίνηση του ζιζανιοκτόνου εντός του φυτού-Παραμονή του glyphosate στο σημείο εφαρμογής (De Prado et al. 2005; Vila-Aiub et al. 2012),

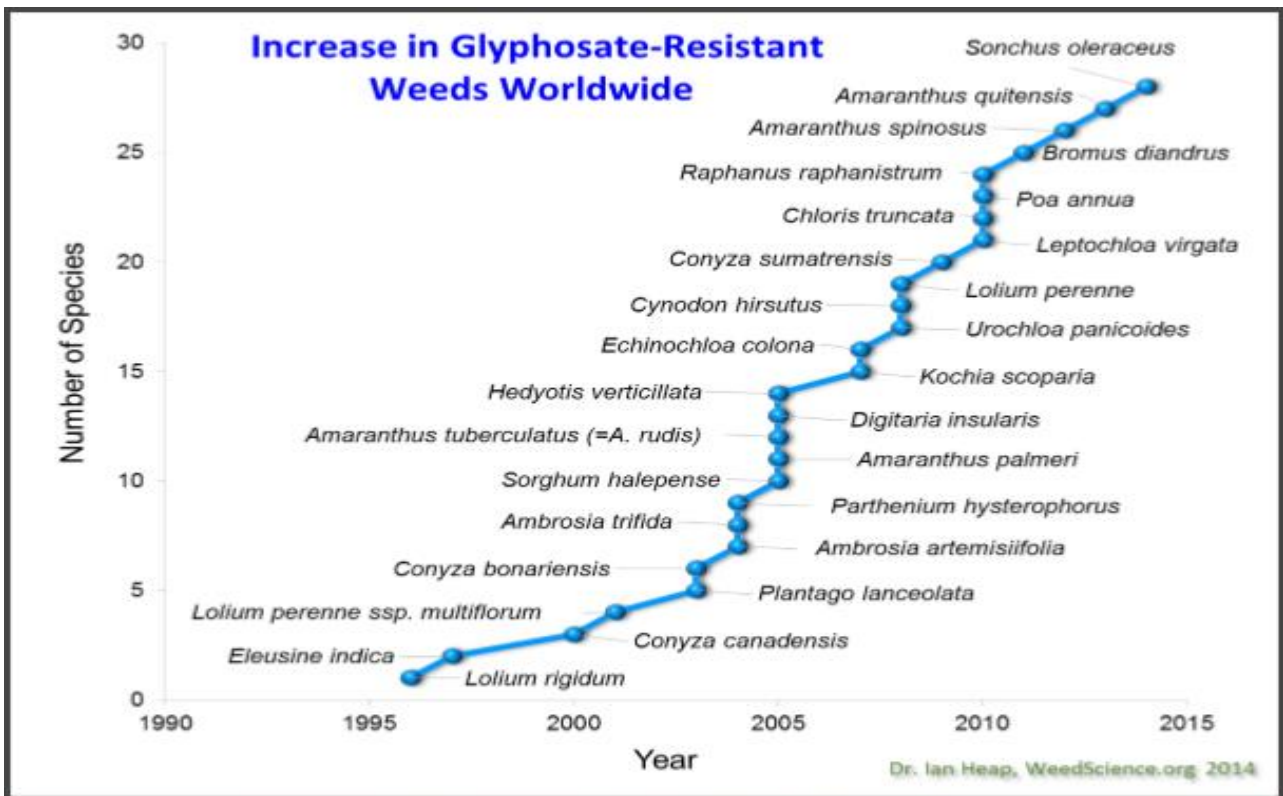
β) Μεταφορά και απομόνωση του ζιζανιοκτόνου σε κυτταρικά οργανίδια όπως είναι το χυμοτόπιο, όπου το glyphosate παραμένει ανενεργό (Ge et al. 2010) και

γ) Γρήγορο μεταβολισμό του ζιζανιοκτόνου, οπότε το μόριο του glyphosate διασπάται και παράγονται μεταβολίτες που είναι αβλαβείς για το φυτό (Busi et al. 2011; de Carvalho et al. 2012; De Prado et al. 2005; Gonzalez-Torralva et al. 2012).

1.6.12.3.2.1 Μεταφορά και απομόνωση του glyphosate στο χυμοτόπιο

Γίνεται μέσω πρωτεϊνών-μεταφορέων (ABC transporters) του τονοπλάστη (Martinoia et al., 1993).

Στην Εικόνα 12 περιγράφεται η ολοένα αυξανόμενη εμφάνιση ειδών ζιζανίων ανθεκτικών στο glyphosate. Παρατηρείται πως η εμφάνιση ανθεκτικών βιότυπων λεπτής ήρας έγινε αρκετά νωρίς σε σχέση με άλλα είδη ζιζανίων.



Εικόνα 12. Παγκόσμια αύξηση των ειδών ζιζανίων που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο glyphosate, πορεία από το 1996 έως το 2014. (Πηγή: Heap, 2014, www.weedscience.org)

1.6.13 Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων (ένζυμο ACCase)

Σε αυτή την κατηγορία ζιζανιοκτόνων ανήκουν τα αρυλοφαινοξυαλκανοικά οξέα, γνωστά και ως –fops, (clodinafor, cyhalafop, diclofor, isoxargrifop, κ.α.) οι κυκλοεξανδιόνες, γνωστές και ως –dims, (alloxydim, butroxydim, cycloxydim, clefoxydim, κ.α.) και οι φαινυλοπυραζολίνες (ripxaden). Τα ζιζανιοκτόνα αυτά χρησιμοποιούνται μεταφυτρωτικά για την καταπολέμηση ετήσιων και πολυετών αγρωστωδών ζιζανίων. Τα περισσότερα χρησιμοποιούνται σε πλατύφυλλες καλλιέργειες, ορισμένα μόνο σε καλλιέργειες χειμερινών σιτηρών (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2010).

Τα ζιζανιοκτόνα της ομάδας αυτής απορροφούνται κυρίως από τα φύλλα και μετακινούνται ταχύτατα προς όλους τους υπόγειους και υπέργειους μεριστωματικούς ιστούς των ζιζανίων. Οι κυκλοεξανδιόνες και τα αρυλοξυφαινοξυαλκανοικά οξέα συμπεριφέρονται στο έδαφος ως ασθενή οξέα οπότε η προσρόφησή τους στα εδαφικά κolloειδή είναι μικρή και η πιθανότητα για έκπλυσή τους είναι μεγάλη. Οι φαινυλοπυραζολίνες συμπεριφέρονται στο έδαφος σαν μη ιονιζόμενα μόρια. Η δράση τους εκδηλώνεται λίγες μέρες μετά την εφαρμογή τους και ο θάνατος των φυτών επέρχεται μετά από 2-3 βδομάδες (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Η ανάπτυξη ανθεκτικών βιότυπων σε ζιζανιοκτόνα που αναστέλλουν το ένζυμο καρβοξυλάση του ακετυλο-συνένζυμου Α (ACCase) οφείλεται κυρίως στην τροποποίηση

της θέσης δράσης (ένζυμο) και δευτερευόντως στο μεταβολισμό του ζιζανιοκτόνου. Πιο συγκεκριμένα, το ζιζάνιο *Alopecurus myosuroides* είναι αυτό που έχει μελετηθεί περισσότερο σε βιοχημικό και μοριακό επίπεδο και για το οποίο έχει βρεθεί ο μεγαλύτερος αριθμός μεταλλάξεων στο ACCase ένζυμο (Delye et al., 2002a, 2002b; Moss et al., 2003).

Η ανθεκτικότητα των βιότυπων που σχετίζεται με το ένζυμο ACCase βρέθηκε πως οφείλεται είτε στην αυξημένη δράση τη ευαίσθητης μορφής του ενζύμου είτε στην αδυναμία σύνδεσής του με τα ζιζανιοκτόνα. Για παράδειγμα, η ανθεκτικότητα ενός βιότυπου *Eleusine indica* σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς του ενζύμου ACCase οφειλόταν σε τροποποίηση-μετάλλαξη της θέσης δράσης (Leach et al., 1995). Ακόμη, ένας βιότυπος του *Setaria viridis* στον Καναδά (Marles et al., 1993) και ένας βιότυπος του *Setaria faberi* (Shukla et al., 1997) ήταν ανθεκτικοί στις κυκλοεξανδιόνες λόγω ανθεκτικού ACCase.

1.6.14 Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της βιοσύνθεσης μεγάλου μήκους αλυσίδας λιπαρών οξέων (VLCFAs)

Σε αυτή την κατηγορία των ζιζανιοκτόνων ανήκουν τα θειοκαρβαμιδικά και τα χλωροακεταμίδια (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2010).

Έχουν βρεθεί 13 βιότυποι οκτώ (8) ανθεκτικών αγρωστωδών ειδών ζιζανίων στα θειοκαρβαμιδικά και 6 βιότυποι τριών (3) ανθεκτικών αγρωστωδών ζιζανίων στα χλωροακεταμίδια. Ωστόσο, ο μηχανισμός ανθεκτικότητάς τους δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί επαρκώς (Monaco et al., 2002; Hear, 2010).

1.6.15 Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα-αναστολείς της μίτωσης

Μερικά από τα ζιζανιοκτόνα που ανήκουν σε αυτή την ομάδα είναι οι δινιτροανιλίνες, τα βενζαμίδια, τα φωσφοροαμιδικά, οι πυριδίνες και τα βενζοϊκά οξέα. Η δράση τους έγκειται στην παρεμπόδιση της κυτταρικής διαίρεσης με διάφορους τρόπους, όπως είναι για παράδειγμα η παρεμπόδιση του πολυμερισμού της τουμπουλίνης (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2010).

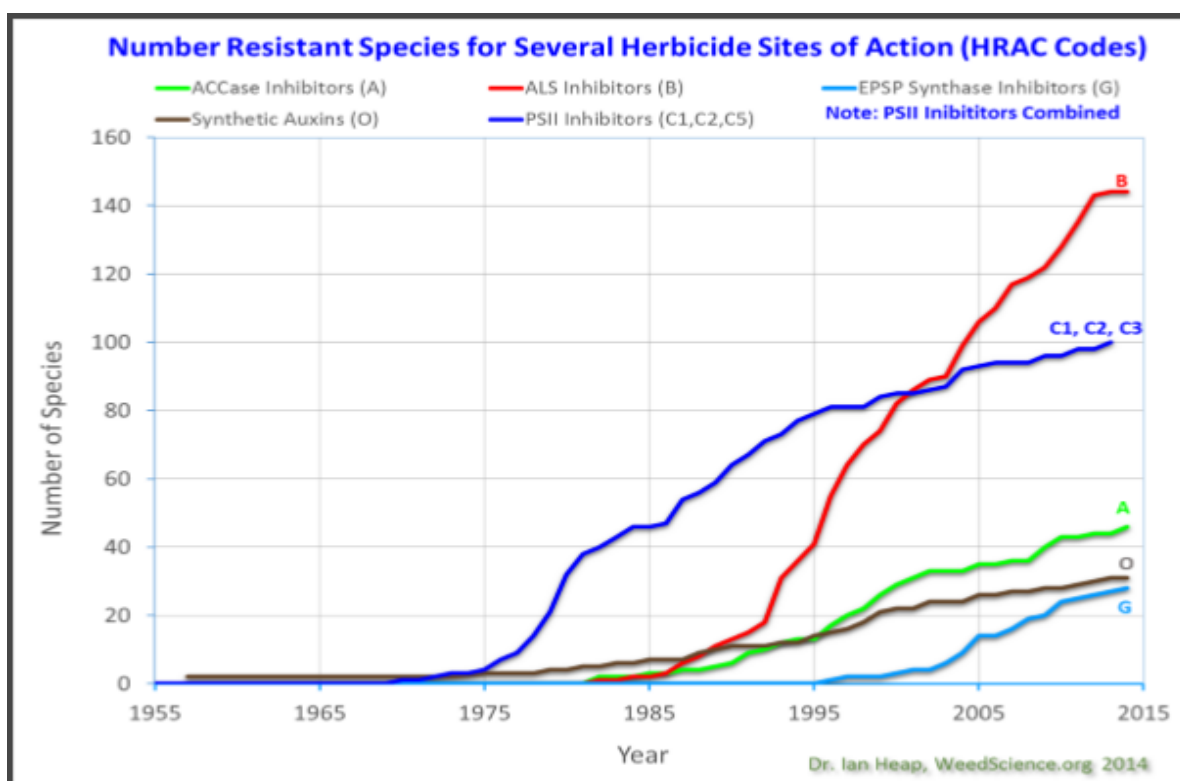
Έχουν βρεθεί 27 ανθεκτικοί βιότυποι που ανήκουν σε 10 είδη ζιζανίων, 8 αγρωστωδών και 2 πλατύφυλλων, στα ζιζανιοκτόνα της οικογένειας των δινιτροανιλινών. Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας που έχουν αναπτύξει οφείλεται σε τροποποιημένη (ανθεκτική) σωληνίνη (θέση δράσης) της οποίας η έκφραση-κωδικοποίηση ελέγχεται από ένα γονίδιο (Preston & Mallory-Smith, 2001; Monaco et al, 2002; Hear, 2008))

1.6.16 Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα με δράση αυξίνης

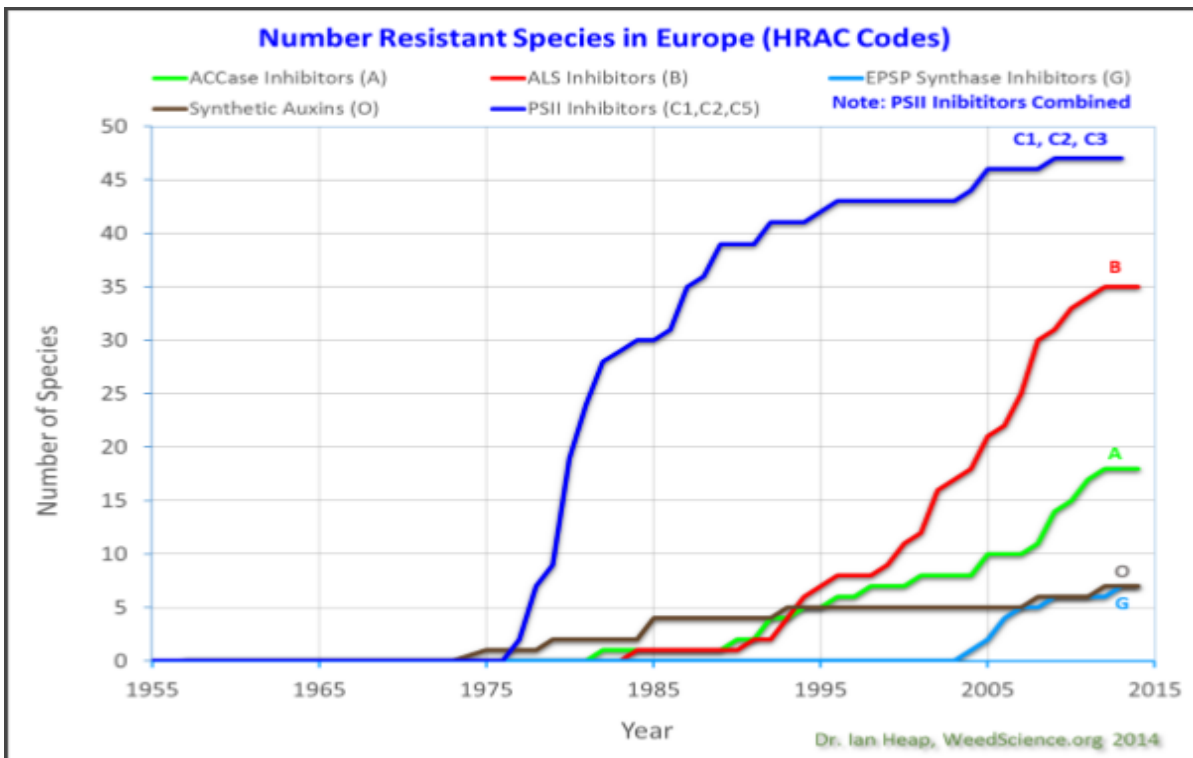
Σε αυτή την ομάδα ζιζανιοκτόνων ανήκουν τα φαινοξυαλκανοικά, τα βενζοϊκά, τα πυριδινοκαρβοξυλικά και άλλες ενώσεις όπως το quinclorac, το quinclorac και το benazolin (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2010).

Έχουν βρεθεί 38 ανθεκτικοί βιότυποι που ανήκουν σε 26 είδη ζιζανίων, κυρίως πλατύφυλλων και δευτερευόντως αγρωστωδών, στα ζιζανιοκτόνα με δράση αυξίνης, όμως ο μηχανισμός ανθεκτικότητας δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Οι ελάχιστες περιπτώσεις όπου έγιναν ενδελεχείς έρευνες, έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα των ζιζανίων αυτών οφείλεται σε μεταβολισμό των ζιζανιοκτόνων ή σε τροποποίηση της θέσης δράσης τους (Preston & Mallory-Smith, 2001; Monaco et al., 2002, Hear, 2010).

Στην Εικόνα 13 φαίνεται η πορεία ανάπτυξης ανθεκτικών βιότυπων ειδών ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα με διάφορους μηχανισμούς δράσης, ενώ στην Εικόνα 14 η εμφάνιση ανθεκτικών βιότυπων ειδών ζιζανίων μόνο στην Ευρώπη.



Εικόνα 13. Αριθμός ανθεκτικών ειδών ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα με διαφορετικό μηχανισμό δράσης, πορεία από το 1955 έως και το 2014. (Πηγή: Hear, 2014, www.weedscience.org)



Εικόνα 14. Αριθμός ανθεκτικών ειδών ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα με διαφορετικό μηχανισμό δράσης, στην Ευρώπη, από το 1970 περίπου έως το 2014. (Πηγή: Heap, 2014, www.weedscience.org)

1.7 Σκοπός της μελέτης

Το *Lolium rigidum* είναι σημαντικός εχθρός των χειμερινών σιτηρών και έχουν πολύ συχνά αναφερθεί και καταγραφεί προβλήματα των καλλιεργητών όσον αφορά την αδυναμία ή τη μερική μόνο αποτελεσματικότητα των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για να αντιμετωπιστεί το ζιζάνιο (και ιδιαίτερα της χημικής μεθόδου αντιμετώπισης). Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι αφενός η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας οκτώ βιότυπων του ζιζανίου Ήρα έναντι τριών ζιζανιοκτόνων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο του ζιζανίου αυτού στην Ελλάδα και αφετέρου η αξιολόγηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην πιθανή ανθεκτικότητα των βιότυπων αυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικά - Φυτικό υλικό:

Το πείραμα διεξήχθη στο μεγαλύτερο μέρος του στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στους χώρους των εργαστηρίων Γεωργίας και Βελτίωσης Φυτών. Επιπλέον, ορισμένες από τις μετρήσεις (σικιμικού οξέος) πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Ζιζανιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Χρησιμοποιήθηκαν φυτά που ανήκουν σε ελληνικούς βιότυπους του ζιζανίου «Ήρα» (*Lolium rigidum*) από διάφορες περιοχές της χώρας. Συλλέχθηκαν σπόροι οι οποίοι βλάστησαν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες σε γλαστράκια και στη συνέχεια μεταφυτεύθηκαν σε μεγαλύτερες γλάστρες (Εικόνα 15).



α) Μεγάλες γλάστρες



β) Μικρές γλάστρες

Εικόνα 15. Φυτά *L. rigidum* σε: α) μεγάλες γλάστρες και β) μικρές γλάστρες. Αγρός του εργαστηρίου Γεωργίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

2.2 Περιγραφή του πειράματος:

Αρχικά, σε κάθε γλαστράκι τοποθετήθηκαν πέντε σπόροι ήρας και όλα τα γλαστράκια τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών θερμοκρασίας και φωτισμού (12 ώρες φως στους 20°C και 12 ώρες σκότος στους 15°C). Η συχνότητα ποτίσματος ήταν τρεις φορές την εβδομάδα και ανάλογα με τις ανάγκες των φυτών καθόλη τη διάρκεια της εβδομάδας.

Τα φυτά μεταφυτεύθηκαν σε μεγαλύτερες γλάστρες και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν έξω στον αγρό σε φυσικές συνθήκες περιβάλλοντος. Οι θερμοκρασίες ανάπτυξής τους έξω στον αγρό ήταν οι θερμοκρασίες ημέρας και νύχτας που επικρατούσαν στην περιοχή του Βοτανικού στην Αθήνα Αττικής τους μήνες Οκτώβριο-Νοέμβριο-Δεκέμβριο-Ιανουάριο. Για το έτος 2017 οι μέσες θερμοκρασίες αυτές ήταν οι εξής: Οκτώβριος Τ μέρας: 23,3°C, Οκτώβριος Τ νύχτας: 13,4°C, Νοέμβριος Τ μέρας: 18,1°C, Νοέμβριος Τ νύχτας: 9,8°C, Δεκέμβριος Τ μέρας: 14,1°C, Δεκέμβριος Τ νύχτας: 6,8°C, Ιανουάριος Τ μέρας: 12,5°C, Ιανουάριος Τ νύχτας: 5,2°C.

Πιο συγκεκριμένα, οι βιότυποι 50 και 52 μεταφυτεύτηκαν και τοποθετήθηκαν εξώ στον αγρό στις 31/10. Ο βιότυπος 58 στις αρχές του Οκτώβρη, ο 61 και ο 63 στις 21/11, ο 64 στις 23/11 και οι βιότυποι 70 και 72 την 1/12.

Εξήντα ημέρες μετά τη σπορά πραγματοποιήθηκε ο **ψεκασμός** των φυτών με τα τρία ζιζανιοκτόνα. Για όλα τα σκευάσματα χρησιμοποιήθηκε η συνιστώμενη δόση. Τα φυτά

χωρίστηκαν ανά επέμβαση. Η επέμβαση C (control) είναι ο μάρτυρας, στην οποία δεν εφαρμόστηκε κανένα ζιζανιοκτόνο, στην επέμβαση G εφαρμόστηκε το glyphosate (DominatorMega 480 SL) με συνιστώμενη δόση $x = 720 \text{ g a.e./ha}$, στην επέμβαση M εφαρμόστηκε το μίγμα mesosulfuron & iodosulfuron (Hussar Maxx WG) με συνιστώμενη δόση $x = 25 \text{ g/στρ.}$ και στην επέμβαση Cl εφαρμόστηκε το clodinafor-propargyl (Topik) με συνιστώμενη δόση $x = 27 \text{ ml/στρ.}$

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις που αφορούσαν μορφολογικούς χαρακτήρες. Συγκεκριμένα, το ύψος, τον αριθμό των φύλλων, το νωπό και το ξηρό τους βάρος. Η πρώτη μέτρηση πραγματοποιήθηκε είκοσι μία ημέρες μετά τον ψεκασμό. Έπειτα, τα φυτά τοποθετήθηκαν σε φούρνο για τρεις ημέρες (72 ώρες) στους $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Μετά το πέρας των τριών ημερών (24 ημέρες μετά τον ψεκασμό) τα φυτά βγήκαν από το φούρνο και μετρήθηκε το ξηρό τους βάρος. Η δεύτερη μέτρηση (ύψος, αριθμός φύλλων, νωπό και ξηρό βάρος) έγινε είκοσι οκτώ ημέρες μετά τον ψεκασμό.

2.3 Ζιζανιοκτόνα που εφαρμόστηκαν:

Τα φυτά ψεκάστηκαν με τα διάφορα ζιζανιοκτόνα στο στάδιο των 3 έως 6 φύλλων και οι μέρες που μεσολάβησαν από τη σπορά έως τον ψεκασμό ποικίλλαν ανάλογα με το βιότυπο του ζιζανίου και τις καιρικές συνθήκες που επικρατούσαν.

Τα ζιζανιοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα είναι τα παρακάτω:

1) DominatorMega 480 SL.

Είναι ένα διασυστηματικό, μη εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο με σχετικά γρήγορη απορρόφηση από τα φύλλα και τους τρυφερούς βλαστούς των ζιζανίων και σχετικά γρήγορη μετακίνηση προς όλα τα αναπτυσσόμενα μέρη του φυτού (μερίστωμα βλαστού και ριζών). Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση ετήσιων και πολυετών (αγρωστωδών, πλατύφυλλων ζιζανίων) και υδροχαρών ζιζανίων, ξυλωδών φυτών καθώς και για την καταπολέμηση της οροβάγχης του καπνού. Παρεμποδίζει το ένζυμο EPSPS αναστέλλοντας τη βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων.

Δραστική ουσία: **glyphosate** 48% β/ο (υπό μορφή άλατος διμεθυλαμίνης (DMA): 60,8% β/ο). Βοηθητικές ουσίες: 50,12% β/β. Είδος σκευάσματος: Πυκνό διάλυμα (SL). Αριθμός έγκρισης κυκλοφορίας: 70047/21.05.2013

2) Topik

Είναι ζιζανιοκτόνο που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της άγριας βρώμης καθώς και άλλων ζιζανίων σε καλλιέργειες σιταριού, σκληρού σιταριού, σίκαλης και τριτικάλε.

Δραστική ουσία: 240 g/l **clodinafop-propargyl**. Αριθμός άδειας: MAPP/MAFF No.: 15123

3) **Hussar Maxx WG**

Εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο. Σύνθεση: **mesosulfuron-methyl**: 3% β/β (ισοδύναμο σε mesosulfuron 2,9% β/β), **iodosulfuron-methyl-sodium**: 3% β/β (ισοδύναμο σε iodosulfuron 2,8% β/β), mefenpyr-diethyl(αντιφυτοτοξικός παράγοντας): 9% β/β. Βοηθητικές ουσίες: 83,85% β/β.

Κατηγορία και τρόπος δράσης: Εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο για την καταπολέμηση αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων σε σκληρό και μαλακό σιτάρι. Είναι διασυστηματικό, εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο της ομάδας των σουλφονουριών. Δρα παρεμποδίζοντας το ένζυμο ALS. Απορροφάται κυρίως από τα φύλλα και σε πολύ μικρό βαθμό από τις ρίζες και στη συνέχεια μεταφέρεται τόσο με τον ανιόντα όσο και με τον κατιόντα χυμό. Μερικές μέρες μετά τον ψεκασμό η ανάπτυξη των καταπολεμούμενων ζιζανίων έχει ήδη σταματήσει και τα πρώτα συμπτώματα αρχίζουν να εμφανίζονται. Πλήρης νέκρωση επέρχεται σε διάστημα 4-6 εβδομάδων.

Τύπος σκευάσματος: Εναιωρηματοποιήσιμοι κόκκοι (WG)

Καλλιέργειες: Σιτάρι (μαλακό και σκληρό)

Συσκευασία: Φιάλη 300 γρ. X 20 σε χ/β, Φιάλη 600γρ. X 10 σε χ/β, Δοχείο 3 κιλών X 4 σε χ/β

Τρόπος εφαρμογής: Ψεκασμός της φυλλικής επιφάνειας με ακροφύσια τύπου σκούπας

Για τις μοριακές αναλύσεις:

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 2 επεμβάσεις. Η πρώτη επέμβαση συνιστά το μάρτυρα και σε αυτή ανήκουν τα φυτά τα οποία δεν ψεκάστηκαν με ζιζανιοκτόνο. Στη δεύτερη επέμβαση έγινε ψεκασμός με διάλυμα που περιείχε τη συνιστώμενη δόση του ζιζανιοκτόνου glyphosate για τον έλεγχο του ζιζανίου και που η δόση αυτή είναι 720m³ έτοιμου ψεκαστικού υγρού ανά στρέμμα.

2.4 Μέτρηση σικιμικού οξέος

Για τη μέτρηση του σικιμικού οξέος στα δείγματα από όλους τους βιότυπους ακολουθήθηκε η μέθοδος (Culpreper et al. 2006), με μερικές τροποποιήσεις.

2.4.1 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς:

Χρησιμοποιήθηκε σικιμικό οξύ (Shikimic acid) καθαρότητας 99% από την εταιρία Sigma-Aldrich και προστέθηκε σε αυτό απιονισμένο νερό για να παρασκευαστεί το stock solution συγκέντρωσης 200mmol, σε δοσολογία σύμφωνα με τις οδηγίες παρασκευής εντός του προϊόντος. Από κει και

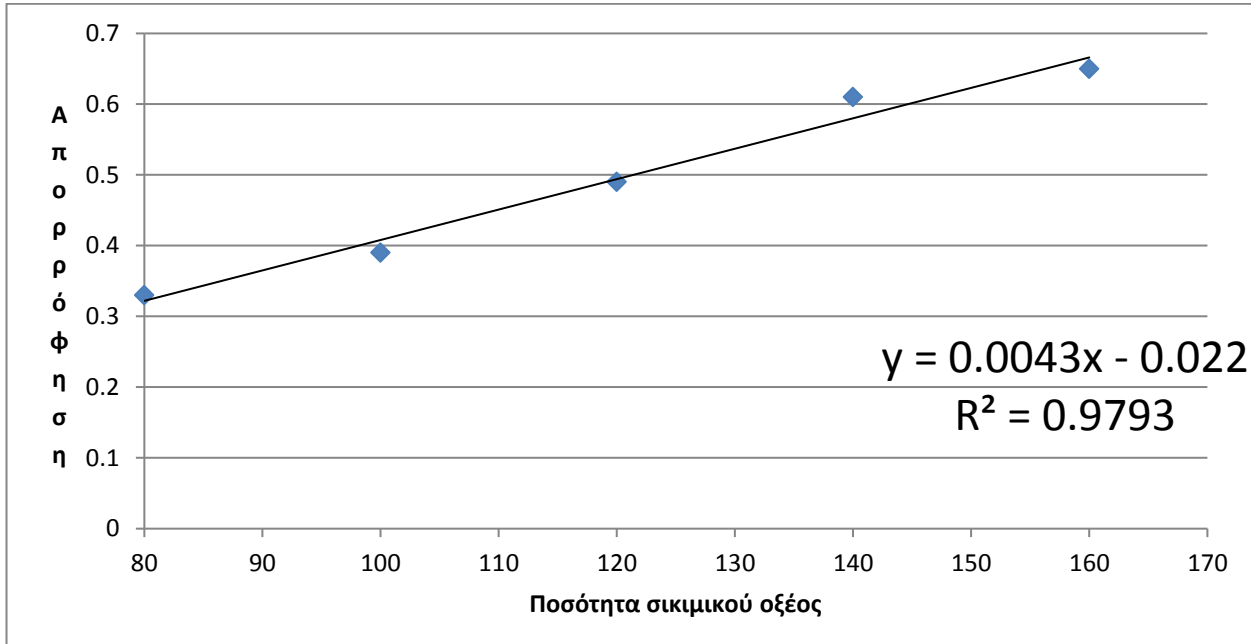
έπειτα, έγιναν 5 περαιτέρω αραιώσεις και 5 διαφορετικές μετρήσεις απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο έτσι ώστε να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς για την απορρόφηση του σικιμικού οξέος. Συγκεκριμένα, οι 5 συγκεντρώσεις και οι αντίστοιχες 5 μετρήσεις του φασματοφωτόμετρου είναι οι εξής (Πίνακας 5):

Πίνακας 5. Ποσότητα σικιμικού οξέος και αντίστοιχη μέτρηση απορρόφησης από το φασματοφωτόμετρο.

Ποσότητα σικιμικού οξέος	Απορρόφηση
80 μL	0.33
100 μL	0.39
120 μL	0.49
140 μL	0.61
160 μL	0.65

Συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα οι παραπάνω ποσότητες σικιμικού οξέος και προστέθηκε απιονισμένο νερό έτσι ώστε κάθε φορά η ποσότητα του τελικού διαλύματος να είναι 500μL.

Με βάση λοιπόν τα παραπάνω, με το πρόγραμμα Microsoft Excel κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς και βρέθηκε η γραμμική εξίσωση της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης σικιμικού οξέος και απορρόφησης (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 2.4.1.1: Καμπύλη αναφοράς και εξίσωση της σχέσης συγκέντρωσης σικιμικού οξέος και απορρόφησης

Από την εξίσωση αυτή, λύνοντάς την ως προς τη μεταβλητή X, βρέθηκαν οι ποσότητες σικιμικού οξέος σε κάθε εξεταζόμενο ιστό ($X = Y + 0,022 / 0,0043$). Τα αποτελέσματα αναφέρονται αναλυτικά στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων.

2.4.2 Η εργαστηριακή μέθοδος μέτρησης:

Ημέρα 1^η:

Τα δείγματα ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας ώστε το βάρος κάθε δείγματος να είναι ίσο με 0,1 γραμμάρια. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε γουδί όπου έγινε λειοτριβήση με ταυτόχρονη προσθήκη 1mL διαλύματος HCl 1N. Τέλος, τα λειοτριβημένα δείγματα (λιωμένος ιστός) τοποθετήθηκαν σε μικροσωληνίους (Eppendorf tubes) όγκου 1.5mL και παρέμειναν για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Ημέρα 2^η:

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο, ρυθμισμένη στις 3000 στροφές και για χρονική διάρκεια ενός λεπτού. Για κάθε δείγμα που πέρασε πρώτα από φυγόκεντρο, παραλήφθηκαν 250μL από το υπερκείμενο υγρό και προστέθηκαν ακόμη μαζί με αυτό σε ξεχωριστό tube 250μL. απιονισμένο νερό και 500μL. οξειδωτικό διάλυμα (διάλυμα 1:1 (v/v) 0,5% (w/v) periodic acid και 0,5% (w/v) sodium metaperiodate.

Συνολικός όγκος τελικού διαλύματος: 1mL.

Τα tubes παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες.

Στο τέλος της οξείδωσης, μετά το πέρας των τριών ωρών, από κάθε δείγμα παραλήφθηκαν 50μL. (υλικό για μέτρηση) και στην κυψελίδα του φασματοφωτόμετρου προστέθηκαν μαζί με αυτό 950μL. απιονισμένο νερό, 400μL. sodium sulfate 0,0056M και 600 μL. NaOH 1N.

Συνολικός όγκος τελικού διαλύματος μέσα σε κυψελίδα φασματοφωτόμετρου: 2mL.

Με το φασματοφωτόμετρο μετρήθηκε στα 382nm. η οπτική πυκνότητα του διαλύματος.

Τα επίπεδα του σικιμικού οξέος μετρούνται σε μικρογραμμάρια σικιμικού οξέος 1M ως προς 1mL. διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (μg. Shikimic acid 1M/ ml. HCl)

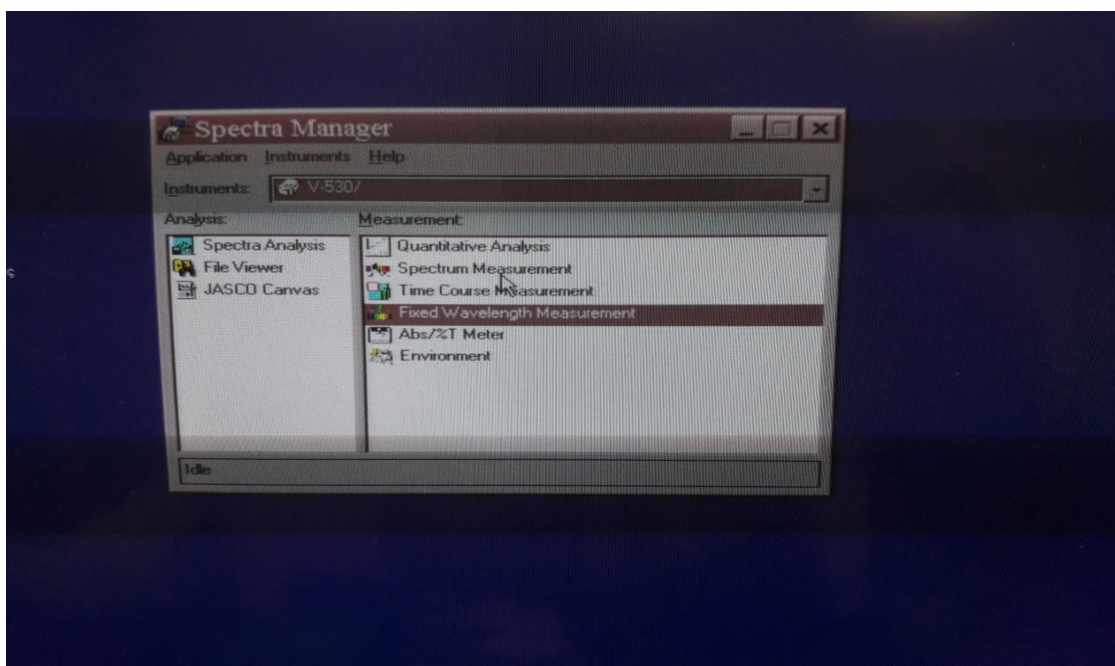
Πριν τις μετρήσεις, αναπτύχθηκε στο φασματοφωτόμετρο μια καμπύλη αναφοράς προσθέτοντας γνωστές ποσότητες καθαρού σικιμικού οξέος σε κυψελίδες που δεν περιείχαν λιωμένο φυτικό ιστό.

Για κάθε δείγμα, έγιναν 2 επαναλήψεις στη μέτρηση.

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το Spectra Manager του μοντέλου φασματοφωτόμετρου V-530 της εταιρίας JASCO Inc. (Εικόνες 16 και 17)

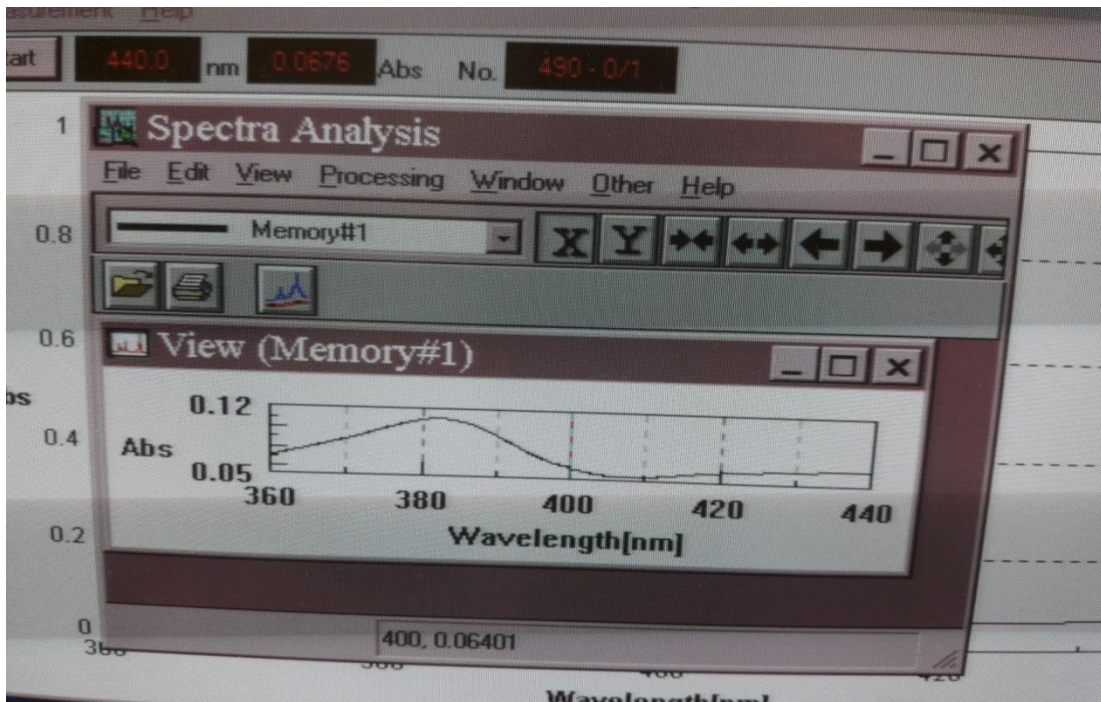


α

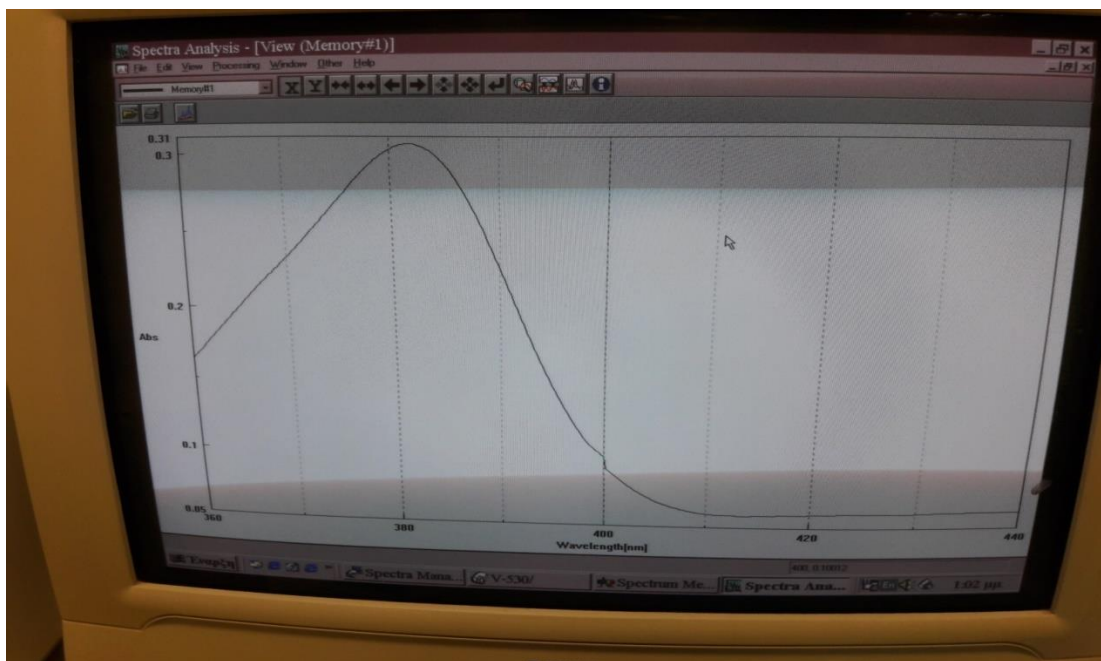


β

Εικόνα 16. Το σύστημα α) ηλεκτρονικού υπολογιστή-φασματοφωτόμετρου και β) το λογισμικό Spectra Manager V-530 για το μοντέλο της JASCO Inc.



α



β

Εικόνα 17. α) Καμπύλες φασματοφωτομέτρησης με β) μέγιστο απορρόφησης σε $\lambda=382$ nm. για το σικιμικό οξύ.

2.5 Μοριακός χαρακτηρισμός – Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης

2.5.1 Γενικά - Φυτικό υλικό

Για το μοριακό χαρακτηρισμό χρησιμοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις ανά βιότυπο. Οι επεμβάσεις που δέχθηκαν τα ζιζάνια έχουν περιγραφεί προηγουμένως.

Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, συλλέχθηκε φυλλικός ιστός από φυτά *L. rigidum* 24 ώρες μετά την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου, με χρήση υγρού αζώτου, ώστε στη συνέχεια να γίνει η απομόνωση του RNA. Συλλέχθηκαν 2-3 από τα νεότερα φύλλα από κάθε φυτό (με εξαίρεση το κορυφαίο φύλλο), τα οποία τοποθετήθηκαν σε φάκελους από αλουμινόχαρτο και στη συνέχεια σε μικρές πλαστικές σακούλες. Οι φάκελοι από αλουμινόχαρτο και οι σακούλες είχαν επισημανθεί από πριν με τις πληροφορίες του κάθε δείγματος (βιότυπος ζιζανίου, επέμβαση, επανάληψη, ημερομηνία συλλογής, όνομα συλλέκτη).

Στη συνέχεια, τα δείγματα φυλάχθηκαν σε θάλαμο στους -80°C μέχρι να γίνει η λειοτρίβηση του ιστού και η εξαγωγή του RNA.

Η λειοτρίβηση του φυλλικού ιστού έγινε με μικρά γουδιά διαμέτρου 8cm., τα οποία είχαν αποστειρωθεί με χρήση ατμού σε χύτρα αποστείρωσης.

Η σκόνη από τη λειοτρίβηση κάθε φυλλικού δείγματος (~100mg) μεταφερόταν με αποστειρωμένες σπάτουλες σε αποστειρωμένους μικροσωληνίσκους (Eppendorf tubes) των 1,5mL. και γινόταν άμεσα η τοποθέτησή τους στο υγρό άζωτο και φύλαξη στους -80°C ή , σε κάποιες περιπτώσεις, η σκόνη χρησιμοποιείτο απευθείας για απομόνωση RNA χωρίς προηγούμενη φύλαξη.

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης έγινε για τα γονίδια που εκφράζονται μόνο στην περίπτωση της επέμβασης με το ζιζανιοκτόνο Glyphosate.

2.5.2 Εξαγωγή RNA - Διαδικασία εξαγωγής του RNA για κάθε δείγμα:

Πριν την εξαγωγή του RNA, τα ακρορύγχια(tips), οι μικροσωληνίσκοι(Eppendorf tubes) και τα λοιπά εργαλεία (σπάτουλες, λαβίδες) αποστειρώθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία με χρήση της χύτρας αποστείρωσης. Οι πιπέτες, τα γουδιά και τα γουδοχέρια αποστειρώθηκαν με χρήση διαλύματος αιθανόλης 93% v/v. Το μεγαλύτερο μέρος της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε σε απαγωγό εστία για αποφυγή εισπνοής των χημικών αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν.

Η διαδικασία της εξαγωγής του RNA για κάθε δείγμα είναι η εξής:

- 1) Λειοτρίβηση φυτικού ιστού βάρους περίπου 100mg. σε γουδί με συνεχή προσθήκη υγρού αζώτου ώστε ο ιστός να μην αποψυχθεί. Τοποθέτηση του λειοτριβημένου φυτικού ιστού (σκόνης) με χρήση σπάτουλας σε μικροσωληνίσκο όγκου 1.5mL. όπου στη συνέχεια τοποθετήθηκε 1mL. έτοιμο διάλυμα TRIzol™ Reagent. Ακολούθησε ανακίνηση του μικροσωληνίσκου και γρήγορη τοποθέτηση σε VORTEX.
- 2) Μεταφορά του μικροσωληνίσκου μέσα σε πάγο και τοποθέτηση σε φυγόκεντρο ρυθμισμένη στα 12000G για χρόνο 10' σε θερμοκρασία 4°C . Παραλαβή του υπερκείμενου διαλύματος με πιπέτα 1000P και τοποθέτησή του σε νέο μικροσωληνίσκο όγκου 1.5mL. Παραμονή για χρόνο 5' σε θερμοκρασία δωματίου.

- 3) Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200μL. χλωροφόρμιου, έγινε καλή ανακίνηση του μικροσωληνίσκου (με το χέρι) και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για χρόνο 3'.
- 4) Μεταφορά δείγματος σε φυγόκεντρο ρυθμισμένη στα 12000G για χρόνο 15' σε θερμοκρασία 4° C. Στη συνέχεια, παραλαβή του υπερκείμενου υγρού όγκου περίπου 500μL. και τοποθέτησή του σε νέο μαρκαρισμένο μικροσωληνίσκο.
- 5) Προστέθηκαν 500μL. ισοπροπανόλης και έγινε καλή ανακίνηση του μικροσωληνίσκου με το χέρι. Ο μικροσωληνίσκος αποθηκεύτηκε στους -20°C για συνέχιση της διαδικασίας την επόμενη ημέρα ή τοποθετήθηκε στους -80°C για χρόνο 30' για συνέχιση της διαδικασίας την ίδια ημέρα. Η τοποθέτηση στην κατάψυξη ευνοεί την κατακρήμνιση του RNA.
- 6) Τοποθέτηση σε φυγόκεντρο ρυθμισμένη σε 12000G για χρόνο 10' στους 4°C και απλό πέταμα του υπερκείμενου υγρού χωρίς τη χρήση πιπέτας. Φύλαξη του ιζήματος (pellet). Στη συνέχεια, προστέθηκε 1.5mL. διαλύματος αιθανόλης 75% v/v, ανακίνηση του μικροσωληνίσκου και τοποθέτησή του στο VORTEX μέχρι την αποκόλληση του pellet.
- 7) Τοποθέτηση σε φυγόκεντρο ρυθμισμένη στα 7500G για χρόνο 5' στους 4°C, απομάκρυνση αιθανόλης με πιπέτα, SPIN στη φυγόκεντρο (ρύθμιση PULSE) και εκ νέου απομάκρυνση αιθανόλης με χρήση πιπέτας. Αν χρειαστεί, ο μικροσωληνίσκος παραμένει ανοικτός κάτω από την απαγωγό εστία έτσι ώστε να εξατμιστεί η επιπλέον αιθανόλη.
- 8) Στη συνέχεια προστέθηκαν 50μL. μοριακό νερό (RNase free molecular water) στο μικροσωληνίσκο, έγινε καλή ανάδευση με την πιπέτα και παρέμεινε για χρόνο 10' σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 60 ° C.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η αποθήκευση των δειγμάτων στους -80° C μέχρι την επαναχρησιμοποίησή τους στο επόμενο στάδιο.

2.5.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του RNA - Διαδικασία χρήσης του φασματοφωτόμετρου Nanodrop 1000 και του λογισμικού N.D.-1000 v. 3.3.1. για κάθε δείγμα:

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του εκλουόμενου RNA έγινε με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου Nanodrop 1000 και του λογισμικού N.D.-1000 v 3.3.1. .

Με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου έγινε η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του δείγματος στα 230, 260 και 280 nm. Η καθαρότητα του κάθε δείγματος εκτιμήθηκε από το λόγο A_{260}/A_{280} ο οποίος και δείχνει την επιμόλυνση με πρωτεΐνες, και από το λόγο A_{260}/A_{230} ο οποίος δείχνει την επιμόλυνση με υψηλή συγκέντρωση αλάτων ή φαινολικών ουσιών.

Οι αποδεκτές τιμές για το λόγο A_{260}/A_{280} κυμαίνονται από 1.8 έως 2.0, ενώ οι αποδεκτές τιμές για το λόγο A_{260}/A_{230} είναι γύρω στο 1.0. Οι δύο αυτές τιμές υποδεικνύουν ότι το δείγμα έχει ικανοποιητική καθαρότητα.

Όσον αφορά τη διαδικασία χρήσης του φασματοφωτόμετρου, συνοπτικά είναι η εξής:

Από το παράθυρο εργασιών του πίνακα του λογισμικού N.D. -1000 v 3.3.1. έγινε η επιλογή στη ρύθμιση νουκλεοτίδια(nucleic acids), RNA(RNA-40). Η μέτρηση του κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε τοποθετώντας στο «βάθρο» του φασματοφωτόμετρου 1.0 με 1.5μL δείγματος RNA και πατώντας την ένδειξη MEASUREMENT στο παράθυρο εργασιών. Κάθε φορά γινόταν, πριν την τοποθέτηση επόμενου δείγματος, καθαρισμός του «βάθρου» ώστε να μην υπάρξει κάποια πρόσμιξη και αλλοίωση των αποτελεσμάτων.

2.5.4 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης για τη δημιουργία cDNA:

Αφού έγινε η αποστείρωση των μικροσωληνίσκων 1,5mL. και 0,2mL., των πιπετών και των ακρορυγχίων σε UV ακτινοβολία, έγινε η προετοιμασία για τη δημιουργία του cDNA (complementary DNA). Το cDNA είναι μια μονόκλωνη αλληλουχία DNA, συμπληρωματική του mRNA του φυτού.

Το πρώτο βήμα πριν να ξεκινήσει η παρασκευή του cDNA είναι ο υπολογισμός του όγκου του δείγματος RNA που χρησιμοποιήθηκε για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση RNA 0,5 μg για κάθε αντίδραση παρασκευής cDNA.

Τα υλικά των αντιδράσεων για την κατασκευή του cDNA περιέχονται στο “PrimeScript™ RT Reagent KIT with gDNA Eraser” της TAKARA BIO INC.

Όλα τα υλικά (δείγματα RNA, υλικά των αντιδράσεων από το KIT) βρίσκονται πάντα μέσα σε πάγο κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας.

Αφού υπολογίστηκε για κάθε δείγμα ο όγκος RNA που απαιτείται ώστε να έχω τελική συγκέντρωση RNA ίση με 0,5μg. στο τελικό διάλυμα της αντίδρασης, ακολούθησε η απομάκρυνση του γενωμικού DNA που τυχόν υπήρχε στα δείγματα του RNA σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (step 1):

- 5X gDNA Eraser Buffer: 2μL
- gDNA Eraser: 1μL
- Total RNA: ~ της αρχικής συγκέντρωσης RNA (Nanodrop), ώστε τελική συγκ. 0,5μg
- RNase Free dH₂O: 7μL. – Total RNA (σε μL.)
- TOTAL SOLUTION: 10μL.

* Τα δύο πρώτα συστατικά της αντίδρασης αποτελούν το MasterMix 1, η ποσότητά τους υπολογίζεται για όλα τα δείγματα cDNA που θα κατασκευαστούν και στη συνέχεια μοιράζονται από 3μL. του MM1 σε κάθε μικροσωληνίσκο. Το RNA προστίθεται τελευταίο στη σειρά και ακολουθεί καλό πιπετάρισμα για καλή ανάμειξη των υλικών.

Στη συνέχεια, μεταφέρονται (πάντα μέσα σε τριμμένο πάγο) στο θερμοκυκλοποιητή όπου και παραμένουν σε θερμοκρασία 42°C για 2 λεπτά. Αφού περάσει ο χρόνος αυτός, οι μικροσωληνίσκοι τοποθετούνται πάλι μέσα στον πάγο για συνέχιση της διαδικασίας. Η απομάκρυνση του γενωμικού DNA έχει ολοκληρωθεί.

Μετά την επιτυχή απομάκρυνση του γενωμικού DNA, συνεχίζουμε με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription- RT), όπου χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά (step 2):

- Reaction solution from Step 1: 10μL.
- 5X PrimeScript Buffer 2 (for Real Time): 4μL.
- PrimeScript RT Enzyme Mix 1: 1μL.
- RT Primer Mix: 1μL.
- RNase Free dH₂O: 4μL.
- TOTAL SOLUTION: 20μL.

* Με εξαίρεση το διάλυμα από την αντίδραση 1, τα υπόλοιπα συστατικά αποτελούν το MasterMix 2, η ποσότητά τους υπολογίζεται συνολικά για όλα τα δείγματα cDNA που θα κατασκευαστούν και στη συνέχεια μοιράζεται ποσότητα MM2 ίση με 10μL. σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί καλή ανάδευση με την πιπέτα.

Στη συνέχεια, οι μικροσωληνίσκοι μεταφέρονται εκ νέου στο θερμοκυκλοποιητή όπου και παραμένουν σε θερμοκρασία 37°C. για 15 λεπτά. Αφού περάσει αυτός ο χρόνος, η διαδικασία μέσα στο θερμοκυκλοποιητή τελειώνει με την παραμονή των μικροσωληνίσκων για άλλα 5 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 85°C.

Με την αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η κατασκευή των cDNAs, τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν αργότερα σαν εκμαγείο στην αντίδραση της real time pcr.

Οι μικροσωληνίσκοι παραμένουν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C μέχρι την επαναχρησιμοποίησή τους.

2.5.5 Σχεδιασμός των εκκινήτων:

Για το σχεδιασμό των εκκινήτων του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μεταφορέα, χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεταφορέα (M10) στο φυτό της κόνυζας (*Conyza canadensis*). Την αλληλουχία αυτή την «έτρεξα» στη βάση δεδομένων του NCBI-NCBI Database- (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) , προκειμένου να βρεθεί κάποια ομολογία(ομοιότητα), κάποιο αντίστοιχο EST στο αντίστοιχο γονιδίωμα του φυτού *L. rigidum* (Εικόνα 18).

Κατά το σχεδιασμό των primers (forward και reverse), δώθηκε προσοχή στα εξής:

- Οι εκκινητές να μην υβριδίζουν με τον εαυτό τους, παρά μόνο με το τμήμα του DNA που θέλουμε να αντιγράψουμε.
- Η θερμοκρασία μετουσίωσης των εκκινητών να είναι γύρω στους 60°C.
- Να μην κάνουν loops μεταξύ τους (αριθμός loops ίσος με τη μονάδα).
- Προσοχή στη θερμοκρασία στην οποία υβριδίζουν με το DNA, η οποία θα είναι και η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών με το μονόκλωνο cDNA κατά τη διαδικασία της real time-q-pcr.
- Η περιοχή που πολλαπλασιάζουν να είναι σχετικά μεγάλη ώστε το προϊόν του πολλαπλασιασμού να είναι specific. Ωστόσο, το μέγεθος του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος είναι καλό να μην ξεπερνάει τα 200bp (ζεύγη βάσεων).

Όσον αφορά το σχεδιασμό των εκκινητών των γονιδίων που κωδικοποιούν το ένζυμο EPSPS και το ένζυμο αναφοράς για τον ενδογενή έλεγχο, CCR, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές με βάση το άρθρο των Salas et al. (2012), χρησιμοποιήθηκαν δηλαδή τα ζεύγη των εκκινητών που αναφέρονται στο εν λόγω άρθρο.

Εικόνα 18. Blast program, NCBI Database. (Πηγή: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών 5'-3' και οι θερμοκρασίες πρόσδεσής τους (Annealing temperatures) φαίνονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Αλληλουχίες νουκλεοτιδίων των εκκινητών 5'-3' και οι θερμοκρασίες πρόσδεσής τους (Annealing temperatures, T.an.)

Γονίδιο	Forward Primer	Reverse Primer	T.an.
CCR	GATGTCGAACCAGAAGCTCCA (21)	GCAGCTAGGGTTTCCTTGTC (21)	59.8 – 61.8
EPSPS	CTGATGGCTGCTCCTTTAGCTC (22)	CCCAGCTATCAGAATGCTCTGC (22)	62.1 – 62.1
M10	TATGTTGTGGCTGACACGCT (20)	ATCGGCGTTGTGCAAGAAAT (20)	57.3 – 55.3

2.5.6 Παρασκευή των διαλυμάτων των εκκινητών

Πρώτα παρασκευάστηκαν τα διαλύματα stock και στη συνέχεια τα διαλύματα εργασίας.

2.5.6.1 Παρασκευή των stock solutions (διαλύματα stock) των εκκινητών

Αφού παραλήφθηκαν οι σωληνίσκοι με τους εκκινητές υπό μορφή σκόνης, έγινε προσθήκη μοριακού νερού (ελεύθερου των ενζύμων DNase και RNase), τέτοιας ποσότητας έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του κάθε εκκινητή στο τελικό διάλυμα να είναι ίση με 100pmol/μL. Σε κάθε εκκινητή προστέθηκε διαφορετική ποσότητα μοριακού νερού, ανάλογα με τις υποδείξεις της κατασκευαστικής τους εταιρίας (Eurofins Genomics). Ακολούθησε αμέσως VORTEX για καλή ανάμειξη των υλικών και αποθήκευση των σωληνίσκων στους -20°C.

2.5.6.2 Παρασκευή των working solutions (διαλύματα εργασίας) των εκκινητών

Τα διαλύματα stock των εκκινητών τοποθετήθηκαν αρχικά σε VORTEX και φυγόκεντρο (SPIN-PULSE) για να σταθεροποιηθεί η συγκέντρωση του κάθε εκκινητή στο διάλυμα μέσα στο σωληνίσκο. Στη συνέχεια, και για κάθε εκκινητή, τοποθετήθηκαν 90μL μοριακού νερού και 10μL εκκινητή stock (δηλαδή η αναλογία εκκινητή-νερού ήταν 1:9). Ακολούθησε καλή ανάμειξη με πιπέτα και VORTEX και αποθήκευση των διαλυμάτων εργασίας στους -20°C μέχρι την επαναχρησιμοποίησή τους.

2.5.7 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων με Real Time PCR:

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Εικόνα 19). Τα δείγματα τοποθετούνται σε plates τα οποία με τη σειρά τους τοποθετούνται στην υποδοχή του μηχανήματος και μέσα στα κελιά των plates περιέχεται το cDNA και το ένζυμο Cyber Select Buffer.

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιείται με τη μέθοδο της Real Time quantitative PCR (RTq-PCR), η οποία μετρά το προϊόν της PCR σε κάθε κύκλο με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών ουσιών. Ο φθορισμός αυξάνεται σε αναλογία με την ενίσχυση του προϊόντος και τα οπτικά μέσα του μηχανήματος συλλέγουν τον εναπομείναντα φθορισμό που εκπέμπεται από τα πηγάδια σε ένα σταθερό χρονικό διάστημα και τα αποτελέσματα αυτά αντιστοιχούν στο εύρος μήκους κύματος εκπομπής. Με τη χρήση δηλαδή της Real time-q-PCR επιτυγχάνεται η

ποσοτικοποίηση του RNA και η ποσοτικοποίηση αυτή δείχνει τη μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του mRNA το οποίο ερμηνεύεται ως συμπληρωματικό DNA (cDNA).

Η σχετική ποσοτικοποίηση που έγινε στο πείραμα, βασίζεται στο γονίδιο αναφοράς *Cinamol-C-a-reductase* (CCR) το οποίο και εκφράζεται σταθερά σε όλους τους βιότυπους του *Lolium rigidum*, ακόμη και κάτω από το stress της επέμβασης με Glyphosate. Η ποσοτικοποίηση του γονιδίου αναφοράς βοηθάει στον προσδιορισμό των διαφορών στην έκφραση των γονιδίων-στόχων, που στο συγκεκριμένο πείραμα είναι το EPSPS και το M10.

Το πείραμα έγινε με τη μέθοδο των σχετικών C_T (Crossing Temperatures) κατά την οποία μπορεί να γίνει προσδιορισμός της σχετικής ποσότητας ενός γονιδίου στόχου στα δείγματα. Η ποσοτικοποίηση, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, δείχνει μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA, το οποίο ερμηνεύεται ως συμπληρωματικό DNA (cDNA). Δηλαδή, στη σχετική ποσοτικοποίηση, η ποσότητα των γονιδίων-στόχων μελετάται σε σύγκριση με την ποσότητα του μάρτυρα-γονιδίου αναφοράς.

Ακόμη, για τη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε δείγμα και ένας μάρτυρας που δεν περιείχε DNA δείγματος, για το κάθε γονίδιο.



α) StepOnePlus



β) Θήκη υποδοχής strips

Εικόνα 19. α) Συσκευή StepOnePlus, Real – Time PCR της AB – Applied Biosystems με β) θήκη υποδοχής των strips για τα προς πολλαπλασιασμό δείγματα cDNAs.

Για την πραγματοποίηση της RT-q-PCR χρησιμοποιήθηκαν τα συστατικά που αναφέρονται στους Πίνακες 7, 8, 9.

Πίνακας 7. Συστατικά για την αντίδραση μέτρησης έκφρασης του γονιδίου αναφοράς CCR

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση	Όγκος για 20 μL αντίδραση
SYBR™ Select Master Mix	2X	10.0 μL
CCR – Forward Primer	200 nM	0.2 μL
CCR – Reverse Primer	200 nM	0.2 μL
H ₂ O*		7.6 μL
Δείγμα cDNA**	10X	2.0 μL
Συνολικός όγκος		20.0 μL

Πίνακας 8. Συστατικά για την αντίδραση μέτρησης έκφρασης του γονιδίου EPSPS

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση	Όγκος για 20 μL αντίδραση
SYBR™ Select Master Mix	2X	10.0 μL
EPSPS – Forward Primer	200 nM	0.2 μL
EPSPS – Reverse Primer	200 nM	0.2 μL
H ₂ O*		7.6 μL
Δείγμα cDNA**	10X	2.0 μL
Συνολικός όγκος		20.0 μL

Πίνακας 9. Συστατικά για την αντίδραση μέτρησης έκφρασης του γονιδίου M10

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση	Όγκος για 20 μ L αντίδραση
SYBR™ Select Master Mix	2X	10.0 μ L
M10 – Forward Primer	200 nM	0.2 μ L
M10 – Reverse Primer	200 nM	0.2 μ L
H ₂ O*		7.6 μ L
Δείγμα cDNA**	10X	2.0 μ L
Συνολικός όγκος		20.0 μ L

* Το H₂O είναι νερό μοριακής καθαρότητας, DNase-RNase Free

**Το cDNA δείγμα είναι το δείγμα που κατασκευάστηκε έχοντας σαν εκμαγείο το απομονωμένο RNA, και δεν υπέστη περαιτέρω αραίωση

Τα συστατικά της αντίδρασης, με εξαίρεση τους εκκινητές και το cDNA δείγμα, περιέχονται στο SYBR™ Select Master Mix της *ThermoFischer Scientific*. Η φθορίζουσα χρωστική είναι η SYBR GreenER™ dye.

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι η *StepOnePlus, Real - Time PCR System της AB – Applied Biosystems*.

Μετά την τοποθέτηση των παραπάνω υλικών ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο και τοποθέτηση των κελιών στην υποδοχή του μηχανήματος. Τα αποτελέσματα της σχετικής έκφρασης των γονιδίων εξάγονται μετά από 2,5 περίπου ώρες λειτουργίας του μηχανήματος.

Επισημαίνεται πως όλα τα υλικά ήταν τοποθετημένα σε πάγο καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος προκειμένου να μην αλλοιωθούν και πως οι πάγκοι εργασίας και οι πιπέτες είχαν απολυμανθεί πριν τη χρήση τους με καθαρή αλκοόλη. Ακόμη, όλα τα tips που χρησιμοποιήθηκαν είχαν αποστειρωθεί σε χύτρα αποστείρωσης. 15°C

2.5.8 Το πρόγραμμα της Real-Time pcr

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής:

- 1.) Αποδιάταξη στους 95 βαθμούς Κελσίου για 10 λεπτά
- 2.) Εφαρμόστηκαν 40 κύκλοι σε 2 βήματα:
 - α) αποδιάταξη στους 95 βαθμούς Κελσίου για 15 δευτερόλεπτα
 - β) υβριδισμός και επιμήκυνση του εκκινητή στους 60 βαθμούς Κελσίου για 1 λεπτό
- 3.) Σχηματισμός της καμπύλης “melting curve”, η οποία φανερώνει αφενός τη θερμοκρασία όπου μετουσιώνεται το 50% των προϊόντων της Real-Time και αφετέρου τη σωστή διαδικασία ποσοτικοποίησης (ποσοτικοποίηση του συγκεκριμένου προϊόντος).
 - α) στους 95 βαθμούς Κελσίου για 15 δευτερόλεπτα
 - β) στους 60 βαθμούς Κελσίου για 1 λεπτό
 - γ) τέλος, στους 95 βαθμούς Κελσίου για 15 δευτερόλεπτα. Από τους 60 βαθμούς και μέχρι τους 95 βαθμούς Κελσίου, κάθε 0,3 βαθμοί Κελσίου, λαμβάνονται νέες τιμές για εμφάνιση άλλων προϊόντων.

2.6. Στατιστική ανάλυση

Όλες οι μετρήσεις (τα δεδομένα) του πειράματος για τα ύψη των φυτών της ήρας και τον αριθμό των φύλλων τους στις 7, 14 και 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό τους καθώς και για το νωπό και ξηρό βάρος στις 21 και 28 ημέρες μετά από τον ψεκασμό με τα διάφορα ζιζανιοκτόνα που εφαρμόστηκαν, επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος **Microsoft Excel 2010** και προέκυψαν τα αντίστοιχα γραφήματα (σημειογράμματα, ραβδογράμματα).

Οι καμπύλες Dose-Response για την πορεία εξέλιξης του νωπού και του ξηρού βάρους των φυτών σε διαδοχικές αυξανόμενες δόσεις του ζιζανιοκτόνου Glyphosate κατασκευάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος **GraphPad Prism 7**.

Η συνολική στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και η εύρεση της σημαντικότητάς τους σε στατιστικό επίπεδο (με επίπεδο σημαντικότητας 5%) έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα **JMP**.

Για τη στατιστική ανάλυση των μετρήσεων της ποσότητας του σικιμικού οξέος χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο **SigmaPlot**.

Για τη στατιστική ανάλυση για τα Cts (κύκλους επανάληψης του προγράμματος της real time pcr) για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων ανθεκτικότητας των βιότυπων της ήρας στο ζιζανιοκτόνο Glyphosate χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο **Statgraphics**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Συνολική στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Το παρόν πείραμα είναι διπαραγοντικό. Ο πρώτος παράγοντας είναι οι διάφοροι βιότυποι του ζιζανίου *L. rigidum* και ο δεύτερος παράγοντας είναι, στην πρώτη περίπτωση, τα ζιζανιοκτόνα που εφαρμόστηκαν στις συνιστώμενες δόσεις, και, στη δεύτερη περίπτωση, οι διάφορες αυξανόμενες δόσεις του ζιζανιοκτόνου glyphosate. Οι ακριβείς δόσεις όλων των ζιζανιοκτόνων που εφαρμόστηκαν αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2.

Για την ανάλυση της παραλλακτικότητας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας JMP. Στους Πίνακες 10 και 11 παρουσιάζεται η ανάλυση παραλλακτικότητας (Two Way ANOVA) για τα διάφορα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν.

Πίνακας 10. Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two Way ANOVA) της επίδρασης των βιότυπων και των ζιζανιοκτόνων στο ύψος των φυτών, τον αριθμό των φύλλων, το νωπό και ξηρό τους βάρος στις 21 και 28 ημέρες μετά την επέμβαση.

Παράγοντας	Ύψος			Αριθμός Φύλλων			Νωπό Βάρος 21 Ημ.	Ξηρό Βάρος 21 Ημ.	Νωπό Βάρος 28 Ημ.	Ξηρό Βάρος 28 Ημ.
	7	14	21	7	14	21				
Ζιζανιοκτόνο	ns	*	*	ns	ns	*	*	*	*	*
Βιότυπος	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Αλληλεπίδραση Ζιζανιοκτόνο * Βιότυπος	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*

Όπου ns: στατιστικώς μη σημαντικό, ****: $P < 0.05$

Από τον Πίνακα 10 φαίνεται ότι:

Όσον αφορά το **ύψος**, στις πρώτες 7 ημέρες μετά τον ψεκασμό, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα για την επίδραση του ζιζανιοκτόνου, ενώ η επίδραση του βιότυπου ήταν στατιστικά σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Η αλληλεπίδραση όμως ζιζανιοκτόνου και βιότυπου ήρας συνολικά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Ωστόσο, με το πέρασμα των ημερών, τόσο στις 14 όσο και στις 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, τόσο η επίδραση του ζιζανιοκτόνου και του βιότυπου όσο και οι αλληλεπιδράσή τους βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικές.

Όσον αφορά στον **αριθμό των φύλλων**, στις πρώτες 7 ημέρες μετά τον ψεκασμό, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση του ζιζανιοκτόνου, ενώ η επίδραση του βιότυπου είναι στατιστικά σημαντική. Όμως, όπως και στο ύψος, η αλληλεπίδραση ζιζανιοκτόνου και βιότυπου συνολικά δεν είναι στατιστικά σημαντική. Στις 14 ημέρες μετά τον ψεκασμό, οι επιδράσεις του κάθε παράγοντα ξεχωριστά είναι ακριβώς οι ίδιες όπως ήταν και στις 7 ημέρες, ωστόσο εδώ η αλληλεπίδρασή τους επέδρασε σημαντικά σε στατιστικό επίπεδο με επίπεδο σημαντικότητας 5%. Τέλος, στις 21 ημέρες, ο αριθμός των φύλλων των φυτών διέφερε στατιστικά σημαντικά τόσο για κάθε παράγοντα ξεχωριστά όσο και για την αλληλεπίδρασή τους,

Όσον αφορά στα **νωπά και ξηρά βάρη** των φυτών της ήρας 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό και τα νωπά και ξηρά βάρη των φυτών 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό τους με ζιζανιοκτόνο, οι επιδράσεις του ζιζανιοκτόνου που εφαρμόστηκε κάθε φορά, οι επιδράσεις του βιότυπου που αναπτύχθηκε αλλά και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης στα βάρη, ήταν παντού στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Πίνακας 11. Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two Way ANOVA) της επίδρασης των βιότυπων και των διάφορων δόσεων του glyphosate στο ύψος των φυτών, τον αριθμό των φύλλων, το νωπό και ξηρό τους βάρος στις 21 και 28 ημέρες μετά την επέμβαση.

Παράγοντας	Ύψος			Αριθμός Φύλλων			Νωπό Βάρος 21 Ημ.	Ξηρό Βάρος 21 Ημ.	Νωπό Βάρος 28 Ημ.	Ξηρό Βάρος 28 Ημ.
	7	14	21	7	14	21				
Δόση glyphosate	*	*	*	ns	ns	*	*	*	*	*
Βιότυπος	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Αλληλεπίδραση Δόση glyphosate * Βιότυπος	ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*

Όπου ns: στατιστικώς μη σημαντικό, ****: $P < 0.05$

Από τον Πίνακα 11 φαίνεται ότι:

Όσον αφορά στο **ύψος**, στις πρώτες 7 ημέρες μετά τον ψεκασμό, ενώ τόσο η επίδραση των δόσεων του glyphosate που εφαρμόστηκαν όσο και η επίδραση του βιότυπου της ήρας ξεχωριστά επηρέασαν στατιστικώς σημαντικά το ύψος των φυτών, η αλληλεπίδρασή τους ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Με το πέρασμα όμως του χρόνου, τόσο στις 14 όσο και στις 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, τόσο οι επιδράσεις και των δύο παραγόντων του πειράματος ξεχωριστά όσο και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης, ήταν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

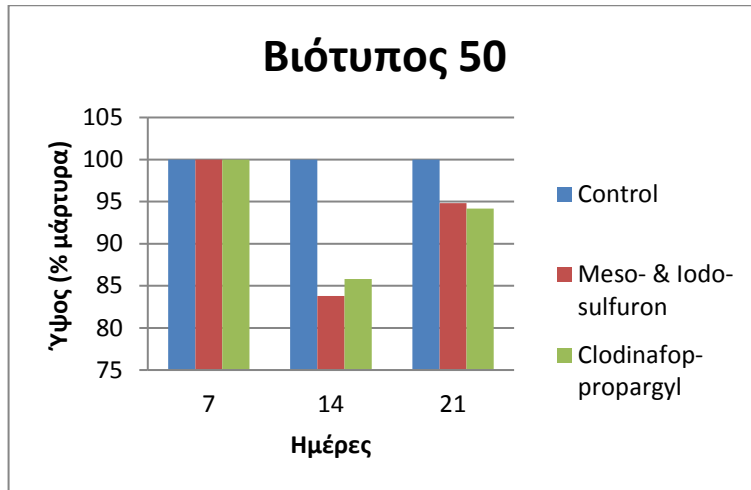
Όσον αφορά τον **αριθμό των φύλλων**, στις 7 ημέρες που ακολούθησαν του ψεκασμού, η επίδραση της κάθε δόσης του glyphosate που εφαρμόστηκε δεν επέδρασε στατιστικά σημαντικά στον αριθμό των φύλλων των φυτών της ήρας, ενώ ο βιότυπος ήταν παράγοντας στατιστικά σημαντικός. Η αλληλεπίδρασή τους όμως στατιστικά δεν διέφερε σημαντικά. Στις 14 ημέρες μετά τον ψεκασμό, η επίδραση των δόσεων του glyphosate συνέχισε να μην επηρεάζει στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, ενώ αντίθετα, ο βιότυπος ήταν παράγοντας στατιστικά σημαντικός όπως επίσης και η αλληλεπίδραση «δόση glyphosate * βιότυπος». Τέλος, στις 21 ημέρες, όλοι οι παράγοντες

ξεχωριστά αλλά και η αλληλεπίδρασή τους επηρέασαν στατιστικά σημαντικά τον αριθμό των φύλλων των φυτών.

Όσον αφορά στα **νωπά και ξηρά βάρη** των φυτών της ήρας 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό και τα νωπά και ξηρά βάρη των φυτών 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό τους με το ζιζανιοκτόνο glyphosate, οι επιδράσεις των δόσεων του glyphosate που εφαρμόστηκαν, οι επιδράσεις του βιότυπου της ήρας που αναπτύχθηκε κάθε φορά αλλά και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης (δόση glyphosate*βιότυπος) στα βάρη, ήταν παντού στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, υπήρξαν δηλαδή στατιστικά σημαντικές διαφορές.

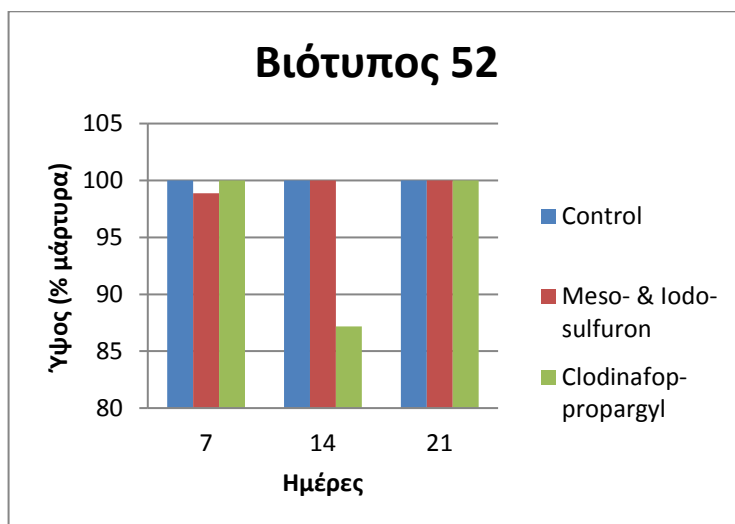
3.2 Διαγράμματα των βιότυπων του *L. rigidum* μετά την εφαρμογή των ζιζανιοκτόνων στις συνιστώμενες δόσεις

3.2.1 Ύψος



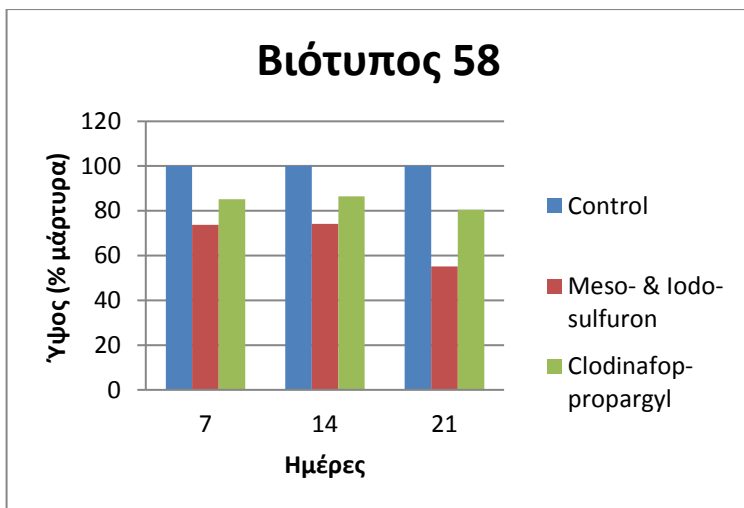
Διάγραμμα 3.2.1.1. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 50

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ύψος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 50 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται πως ο εν λόγω βιότυπος είχε χαμηλή ευαισθησία και στα δύο ζιζανιοκτόνα, με το ύψος των ψεκασμένων φυτών να βρίσκεται στο 94% του αψέκαστου μάρτυρα τόσο για το μίγμα meso- & iodo-sulfuron όσο και για το clodinafop στις 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό.



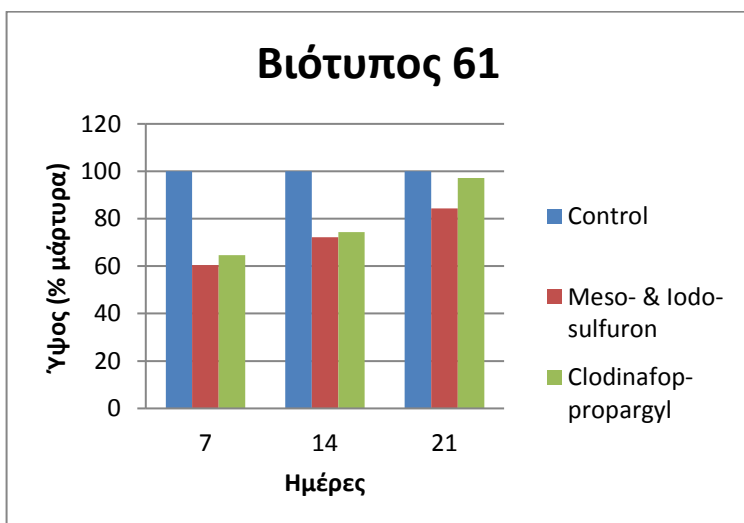
Διάγραμμα 3.2.1.2. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 52

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ύψος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 52 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται πως ο εν λόγω βιότυπος είχε χαμηλή ευαισθησία και στα δύο ζιζανιοκτόνα. Ειδικότερα, το ύψος των ψεκασμένων φυτών στο μίγμα των σουλφονουλουριών και στο clodinafop δε διαφέρει καθόλου από το ύψος των φυτών του αψέκαστου μάρτυρα (βρίσκεται δηλαδή στο 100% του αψέκαστου μάρτυρα), στις 21 ημέρες μετά την εφαρμογή των ζιζανιοκτόνων.



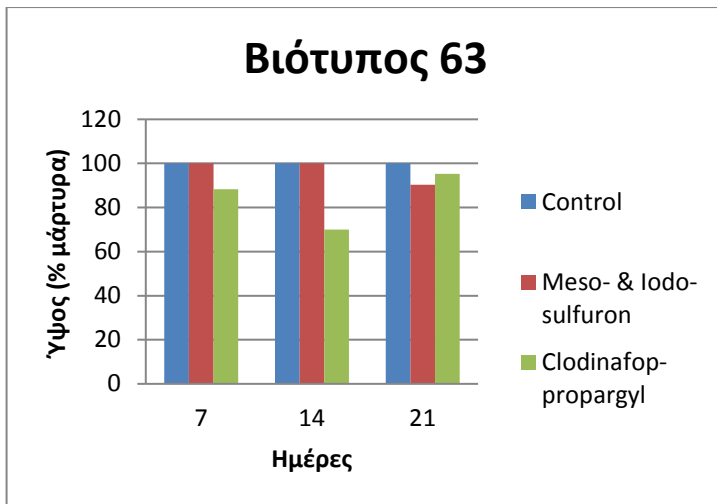
Διάγραμμα 3.2.1.3. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 58

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ύψος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 58 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται πως ο εν λόγω βιότυπος είχε χαμηλή ευαισθησία στο ζιζανιοκτόνο clodinafop με το ύψος των ψεκασμένων φυτών να βρίσκεται στο 80% του αψέκαστου μάρτυρα, ενώ ο βιότυπος έδειξε ένδειξη μειωμένης ευαισθησίας στο μίγμα meso- & iodo-sulfuron με το ύψος των ψεκασμένων φυτών να βρίσκεται στο 55% του αψέκαστου μάρτυρα στις 21 ημέρες μετά από την εφαρμογή των ζιζανιοκτόνων.



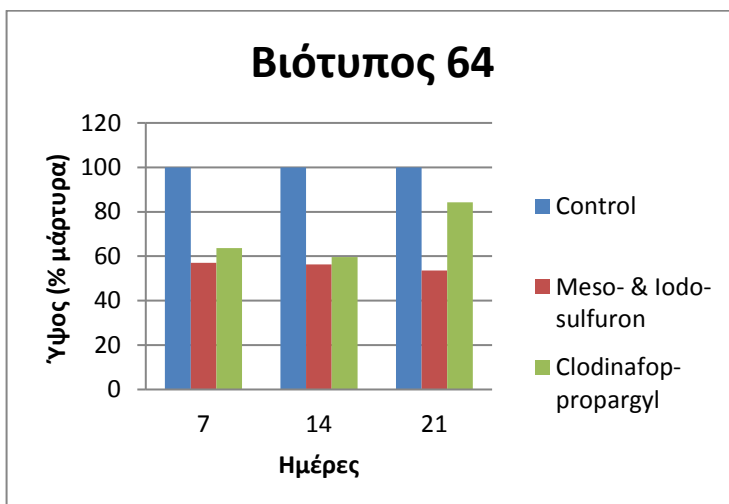
Διάγραμμα 3.2.1.4. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 61

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ύψος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 61 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται πως ο εν λόγω βιότυπος είχε σχετικά χαμηλή ευαισθησία στο μίγμα των σουλφονουλουριών και στο ζιζανιοκτόνο clodinafop, με το ύψος των ψεκασμένων φυτών να βρίσκεται στο 84% και στο 97% αντίστοιχα του αψέκαστου μάρτυρα στις 21 ημέρες μετά την εφαρμογή των ζιζανιοκτόνων.



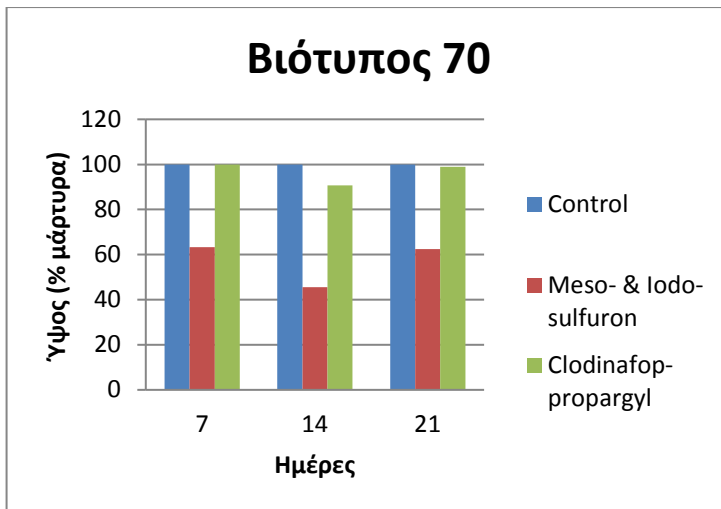
Διάγραμμα 3.2.1.5. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 63

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ύψος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 63 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται πως ο εν λόγω βιότυπος είχε χαμηλή ευαισθησία και στα δύο ζιζανιοκτόνα με το ύψος των ψεκασμένων φυτών να καταλήγει να βρίσκεται στο 90% του ύψους των φυτών του αψέκαστου μάρτυρα για το μίγμα meso- & iodo-sulfuron και στο 95% για το clodinafor στις 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό τους.



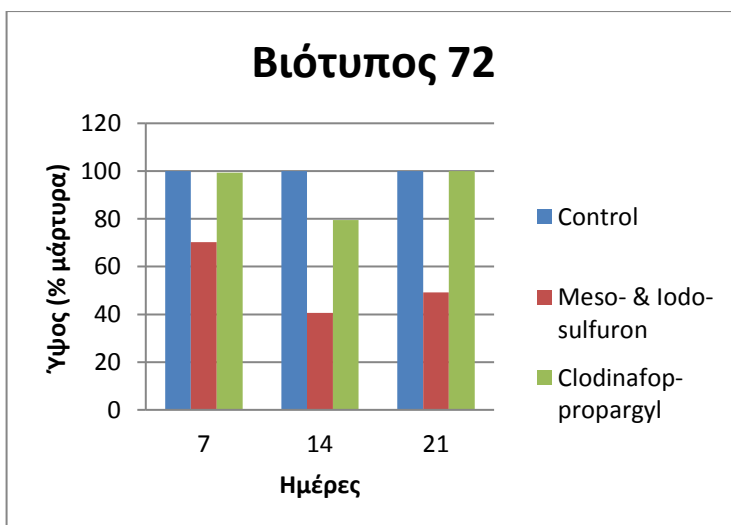
Διάγραμμα 3.2.1.6. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 64

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ύψος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 64 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται πως ο εν λόγω βιότυπος έδειξε μειωμένη ευαισθησία στο clodinafor με το ύψος των φυτών να βρίσκεται στο 84% του αψέκαστου μάρτυρα, ενώ παρουσίασε ένδειξη χαμηλής ευαισθησίας στο μίγμα των σουλφονουριών με το ύψος των ψεκασμένων φυτών να βρίσκεται στο 53,5% του αψέκαστου μάρτυρα στις 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό.



Διάγραμμα 3.2.1.7. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 70

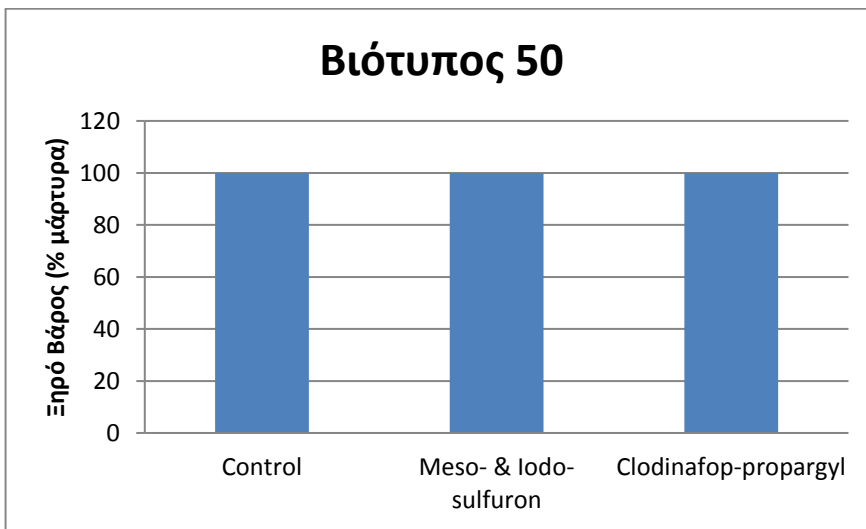
Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ύψος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 70 σε σχέση με τον απέκαστο μάρτυρα φαίνεται πως ο εν λόγω βιότυπος είχε ιδιαίτερα χαμηλή ευαισθησία στο clodinafop αφού το ύψος των ψεκασμένων φυτών κυμαίνεται από 91% έως 100% σε σχέση με τον απέκαστο μάρτυρα, ενώ ήταν λίγο λιγότερο ευαίσθητος στο μίγμα σουλφονουλουριών με το ύψος να βρίσκεται στο 62% του απέκαστου μάρτυρα στις 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό.



Διάγραμμα 3.2.1.8. Ζιζανιοκτόνα, ύψος, βιότυπος 72

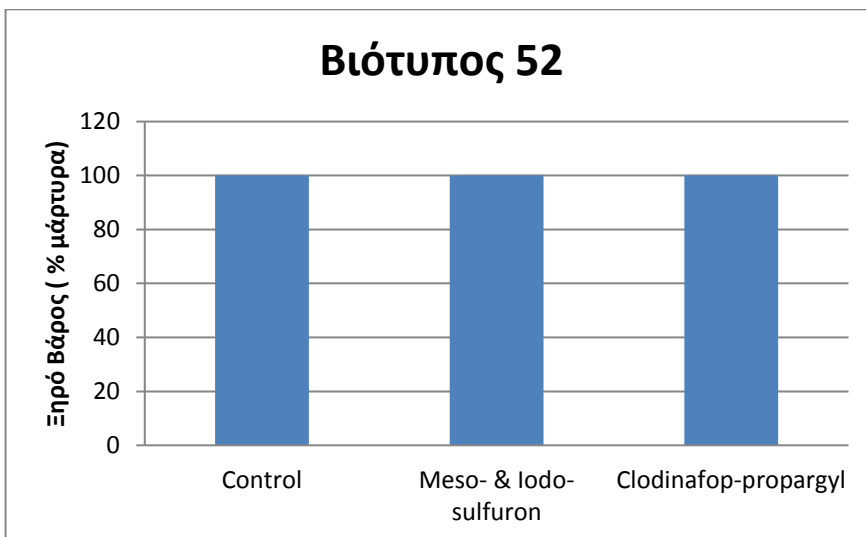
Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ύψος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 72 σε σχέση με τον απέκαστο μάρτυρα φαίνεται πως ο εν λόγω βιότυπος είχε ιδιαίτερα μικρή ευαισθησία στο ζιζανιοκτόνο clodinafop με το ύψος των ψεκασμένων φυτών να μη διαφέρει καθόλου από το αντίστοιχο ύψος των φυτών του απέκαστου μάρτυρα, ενώ ο βιότυπος έδειξε ένδειξη μειωμένης ευαισθησίας στο μίγμα meso- & iodo-sulfuron με το ύψος των φυτών να βρίσκεται στο 49% του απέκαστου μάρτυρα στις 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό.

3.2.2 Ξηρό Βάρος – 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό



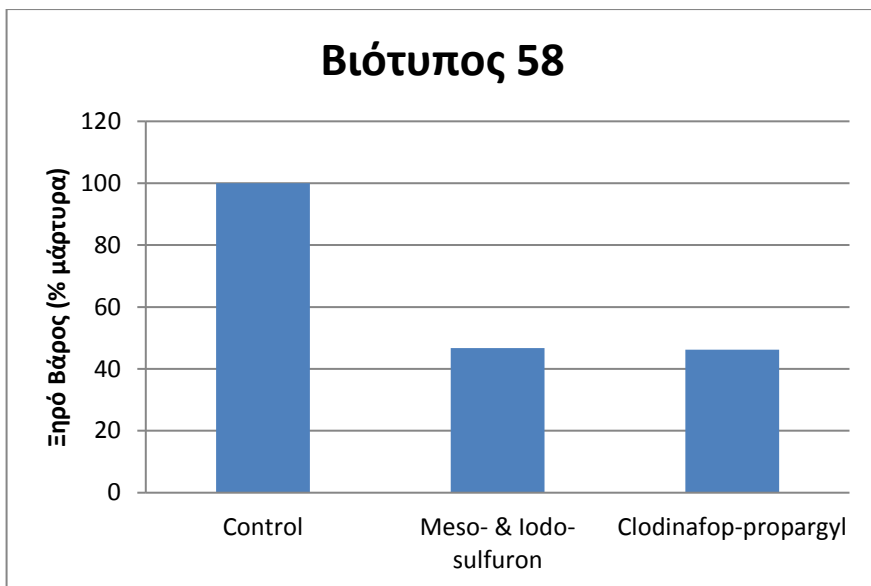
Διάγραμμα 3.2.2.1. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό θάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 50

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 50 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος είχε εξαιρετικά μειωμένη ευαισθησία και στα δύο ζιζανιοκτόνα που εφαρμόστηκαν. Συγκεκριμένα, το ξηρό βάρος των φυτών που μεταχειρίστηκαν με το μίγμα των σουλφονουλουριών και το clodinafop δεν παρουσίασε καμία διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα.



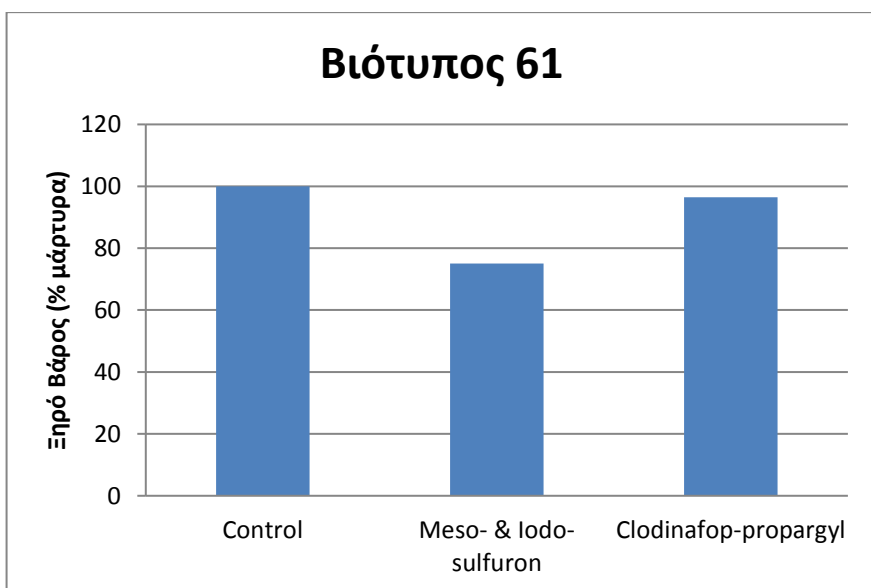
Διάγραμμα 3.2.2.2. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό θάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 52

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 52 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος είχε εξαιρετικά μειωμένη ευαισθησία και στα δύο είδη ζιζανιοκτόνων που εφαρμόστηκαν, αφού το ξηρό βάρος των φυτών της ήρας βρίσκεται και για τις δύο επεμβάσεις στο 100% του αψέκαστου μάρτυρα.



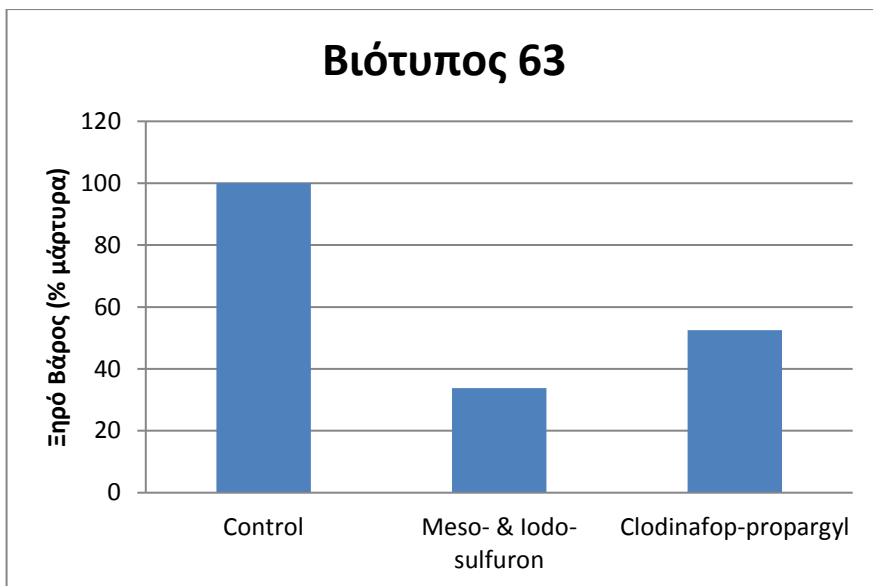
Διάγραμμα 3.2.2.3. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 58

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 58 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος παρουσίασε σχετικά αυξημένη ευαισθησία στο μίγμα meso- & iodo-sulfuron και στο clodinafop με το ξηρό βάρος των φυτών της ήρας να βρίσκεται στο 47% και στο 46% του αψέκαστου μάρτυρα αντίστοιχα.



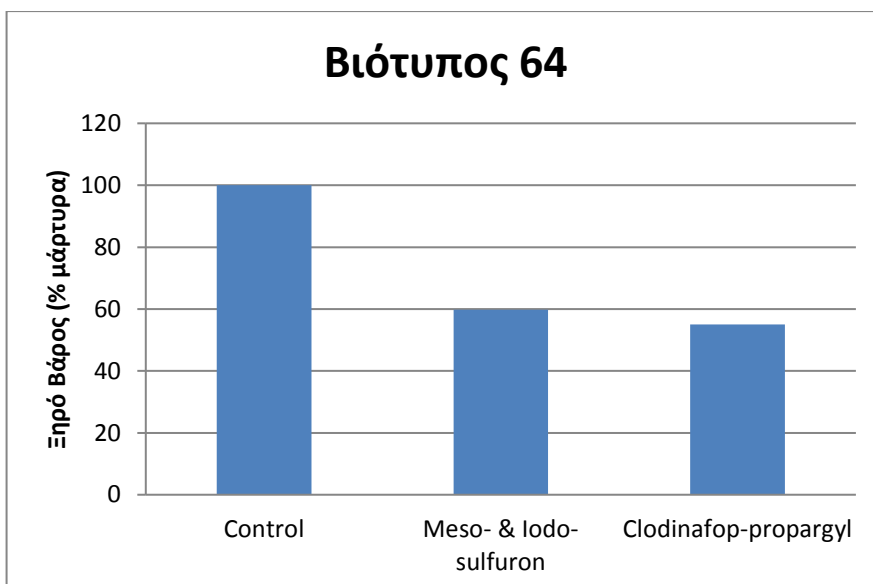
Διάγραμμα 3.2.2.4. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 61

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 61 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία και στο μίγμα meso- & iodo-sulfuron και στο clodinafop, με το ξηρό βάρος των φυτών να βρίσκεται στο 75% και στο 96% του μάρτυρα αντίστοιχα.



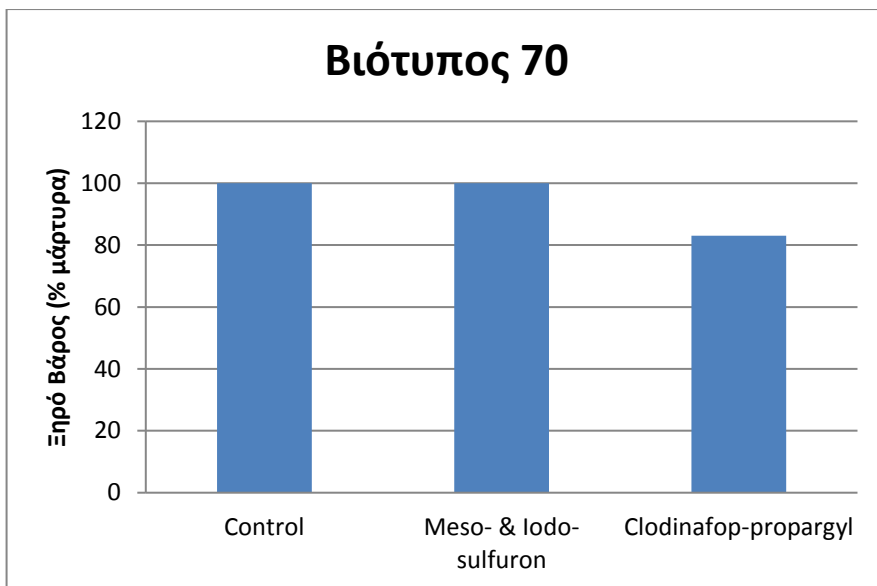
Διάγραμμα 3.2.2.5. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 63

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 63 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος είναι σχετικά ευαίσθητος στο μίγμα meso- & iodo-sulfuron, με το ξηρό βάρος των φυτών να βρίσκεται στο 34% του αψέκαστου μάρτυρα αντίστοιχα, ενώ υπάρχει ένδειξη σχετικής ανθεκτικότητας στο ζιζανιοκτόνο clodinafop, με το ξηρό βάρος των φυτών της ήρας να βρίσκεται στο 52.5% του αψέκαστου μάρτυρα.



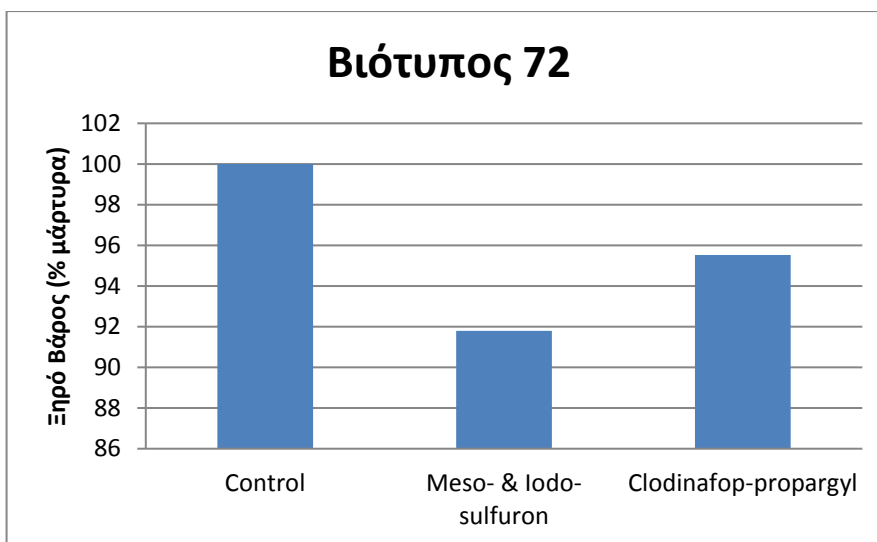
Διάγραμμα 3.2.2.6. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 64

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 64 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος είχε σχετικά μέτρια ευαισθησία τόσο στο μίγμα meso- & iodo-sulfuron όσο και στο clodinafop, με το ξηρό βάρος των φυτών της ήρας να βρίσκεται στο 60% και στο 55% του αψέκαστου μάρτυρα αντίστοιχα.



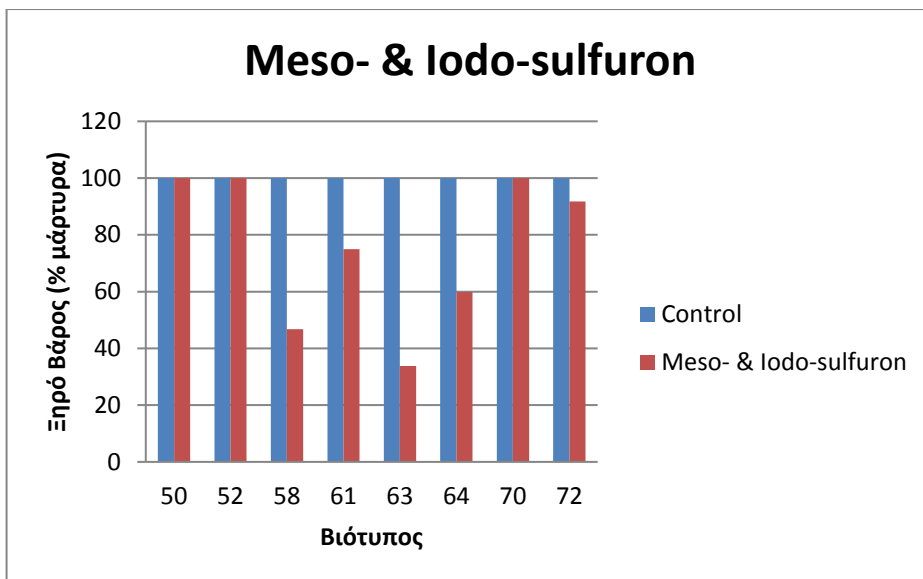
Διάγραμμα 3.2.2.7. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 70

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 70 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος είχε εξαιρετικά μειωμένη ευαισθησία και στα δύο ζιζανιοκτόνα, αφού το ξηρό βάρος των φυτών της ήρας που μεταχειρίστηκαν με μίγμα meso- & iodo-sulfuron δεν παρουσιάζει καμία διαφορά με το ξηρό βάρος των φυτών του μάρτυρα, ενώ το ξηρό βάρος των φυτών της επέμβασης με clodinafop βρίσκεται στο 83% του αψέκαστου μάρτυρα.



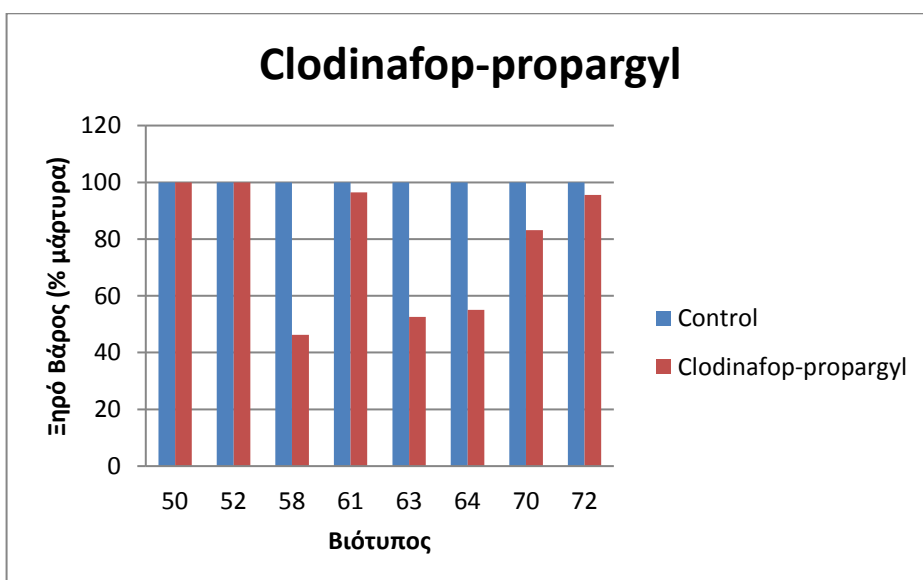
Διάγραμμα 3.2.2.8. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 72

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 72 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος είχε εξαιρετικά μειωμένη ευαισθησία και στα δύο ζιζανιοκτόνα. Πιο συγκεκριμένα, το ξηρό βάρος των φυτών της ήρας που μεταχειρίστηκαν με μίγμα meso- & iodosulfuron και clodinafop βρίσκεται στο 92% και στο 95.5% του αψέκαστου μάρτυρα αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3.2.2.9. Meso- & Iodo-sulfuron, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκάσμό, όλοι οι βιότυποι

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών όλων των βιότυπων σε σχέση με τον αφέκαστο μάρτυρά τους, φαίνεται πως οι βιότυποι 50, 52 και 70 ήταν οι λιγότερο ευαίσθητοι, με το ξηρό τους βάρος να βρίσκεται στο 100% του αφέκαστου μάρτυρα, ενώ με μειωμένη ευαισθησία βρέθηκαν να είναι οι βιότυποι 72, 61 και 64 με ξηρό βάρος 92%, 75% και 60% του αφέκαστου μάρτυρα αντίστοιχα. Επίσης, λίγο πιο αυξημένη ευαισθησία έδωσε ο βιότυπος 58 με ξηρό βάρος στο 47% του αφέκαστου μάρτυρα, ενώ ο πλέον ευαίσθητος στο μίγμα meso- & iodo-sulfuron βρέθηκε ο βιότυπος 63 με ξηρό βάρος στο 34% σε σχέση με το μάρτυρα.

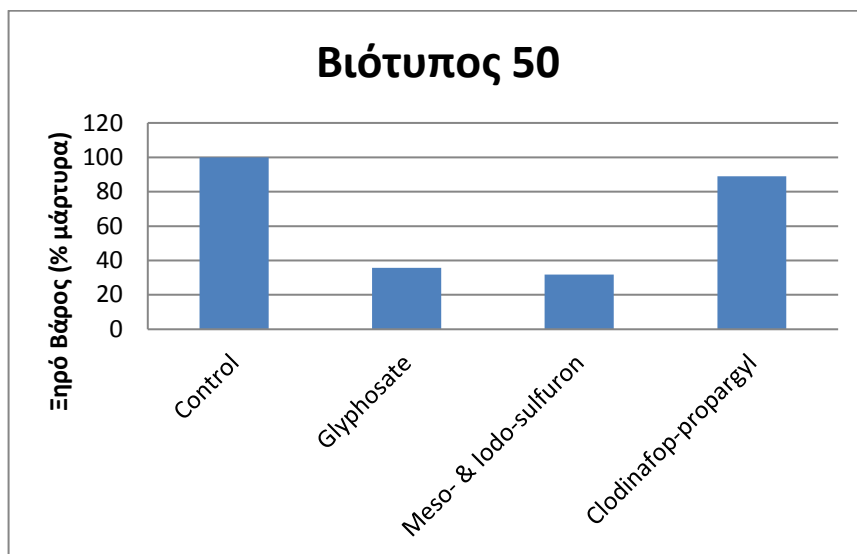


Διάγραμμα 3.2.2.10. Clodinafop-propargyl, ξηρό βάρος, 21 ημέρες μετά τον ψεκάσμό, όλοι οι βιότυποι

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών όλων των βιότυπων σε σχέση με τον αφέκαστο μάρτυρά τους, φαίνεται πως οι βιότυποι 50, 52, 61 και 72 ήταν οι λιγότερο ευαίσθητοι, με το ξηρό βάρος των 50 και 52 να μη διαφέρει καθόλου από το αντίστοιχο του αφέκαστου

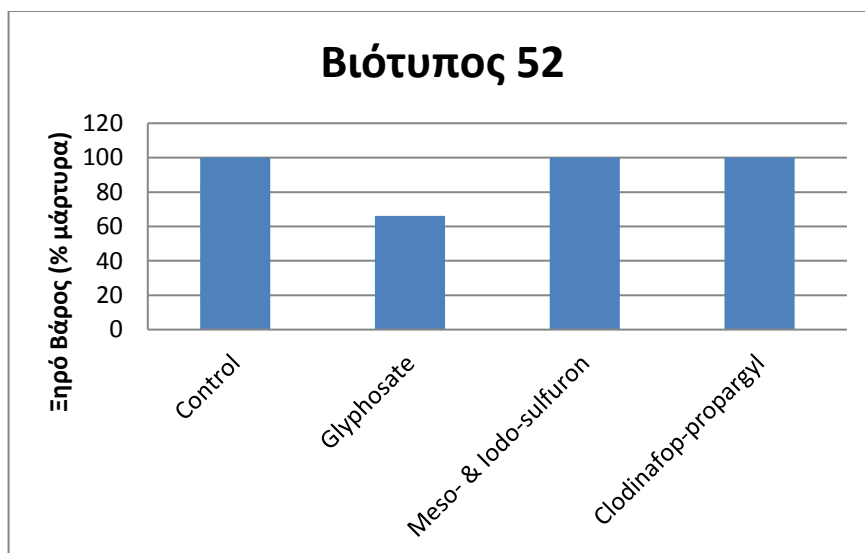
μάρτυρα, ενώ οι 61 και 72 με ξηρό βάρος στο 96% (και οι δύο) του αψέκαστου μάρτυρα. Στη σειρά αυξημένης ευαισθησίας ακολουθεί ο βιότυπος 70 με ξηρό βάρος στο 83% του αψέκαστου μάρτυρα, ενώ όλοι οι υπόλοιποι βιότυποι (58, 63 και 64) παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερη ευαισθησία στο ζιζανιοκτόνο clodinafor με το ξηρό τους βάρος να βρίσκεται στο 46%, 52.5% και 55% του μάρτυρα.

3.2.3 Ξηρό Βάρος – 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό



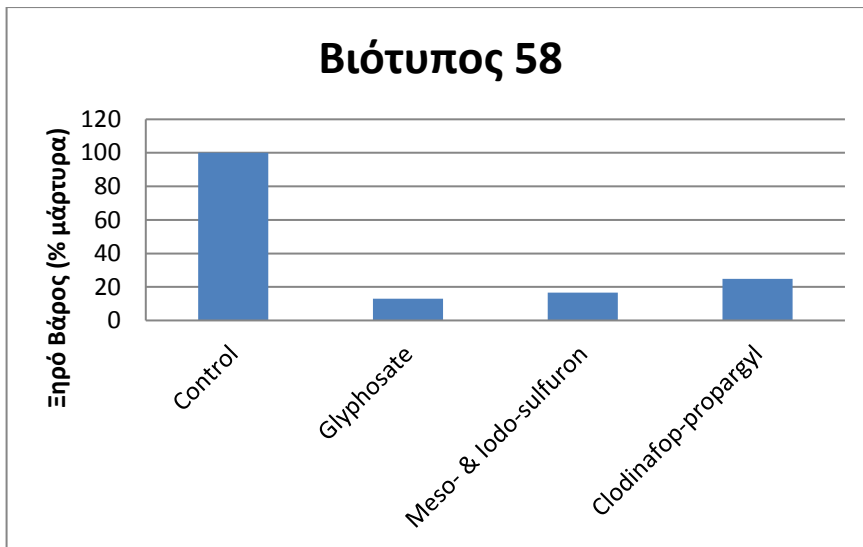
Διάγραμμα 3.2.3.1. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 50

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 50 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος έχει μεγαλύτερη ευαισθησία στο glyphosate και στο μίγμα των σουλφονουλουριών, με το ξηρό βάρος των φυτών να βρίσκεται στο 36% και στο 32% του αψέκαστου μάρτυρα αντίστοιχα, ενώ αντίθετα, φαίνεται πως έχει πολύ χαμηλότερη ευαισθησία στο ζιζανιοκτόνο clodinafor, όπου το ξηρό βάρος των φυτών της ήρας βρίσκεται στο 89% του αψέκαστου μάρτυρα.



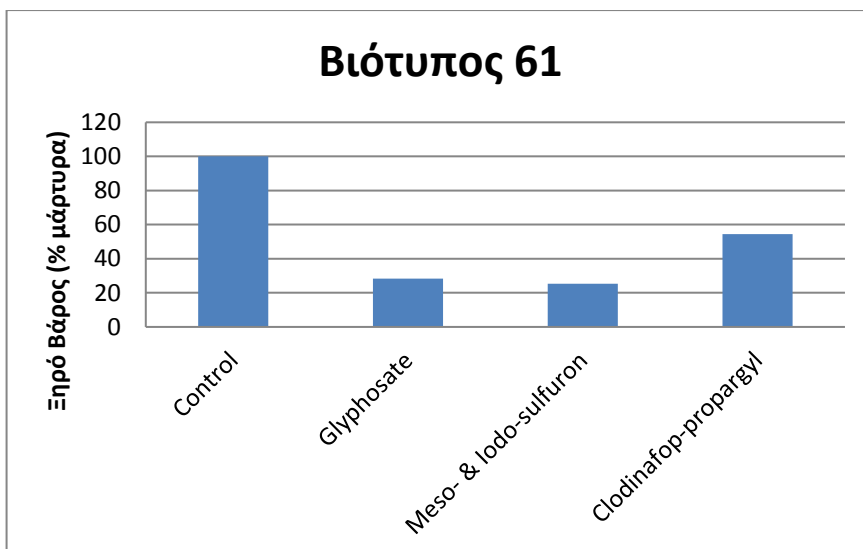
Διάγραμμα 3.2.3.2. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 52

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 52 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος παρουσιάζει σχετικά μέτρια ευαισθησία στο glyphosate, με το ξηρό βάρος των φυτών να βρίσκεται στο 66% του αψέκαστου μάρτυρα, ενώ φάνηκε ότι παρουσιάζει πάρα πολύ χαμηλή ευαισθησία στο μίγμα meso- & iodo-sulfuron και στο clodinafor, όπου το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών της ήρας δεν παρουσίασε καμία διαφορά σε σχέση με αυτό του αψέκαστου μάρτυρα.



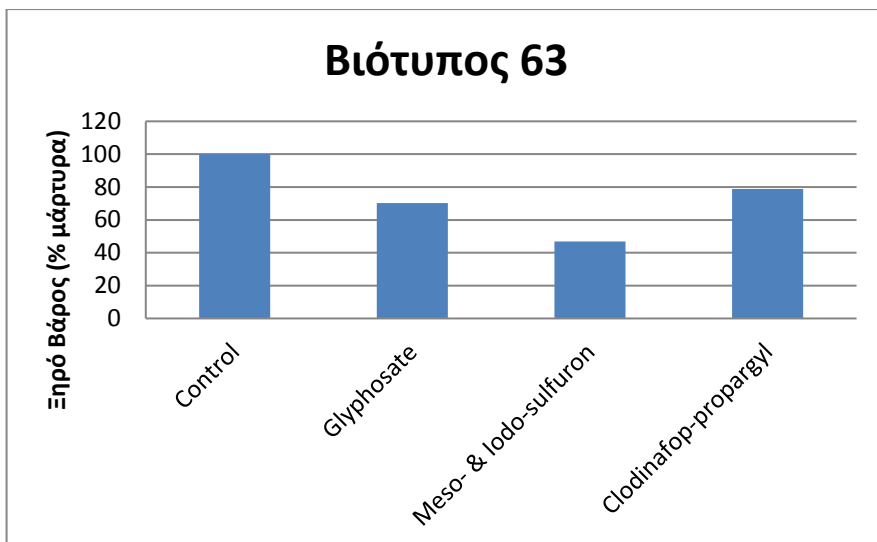
Διάγραμμα 3.2.3.3. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό θάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 58

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 58 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος είναι πολύ ευαίσθητος και στα τρία είδη ζιζανιοκτόνων. Συγκεκριμένα, το ξηρό βάρος των φυτών της ήρας που ψεκάστηκαν με glyphosate βρίσκεται στο 13% του αψέκαστου μάρτυρα, ενώ τα αντίστοιχα ξηρά βάρη των φυτών για το μίγμα meso- & iodo-sulfuron και clodinafor είναι 16.5% και 25% αντίστοιχα του αψέκαστου μάρτυρα.



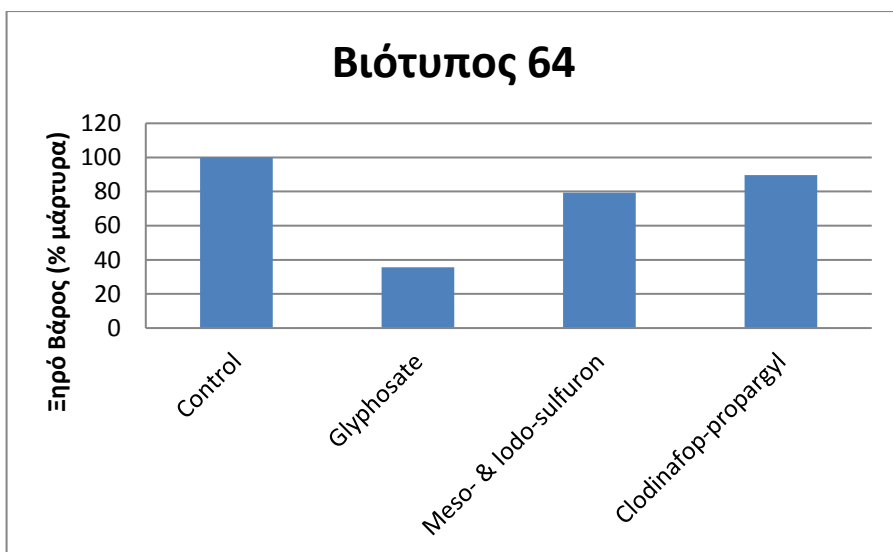
Διάγραμμα 3.2.3.4. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό θάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 61

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 61 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος είναι ευαίσθητος στο glyphosate και στο μίγμα meso- & iodo-sulfuron, όπου το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών βρίσκεται στο 28% και στο 25% του αψέκαστου μάρτυρα αντίστοιχα, ενώ αντίθετα, παρουσιάζει μικρότερη ευαισθησία στο ζιζανιοκτόνο clodinafor με το ξηρό βάρος των φυτών της ήρας να βρίσκεται στο 54% του αψέκαστου μάρτυρα.



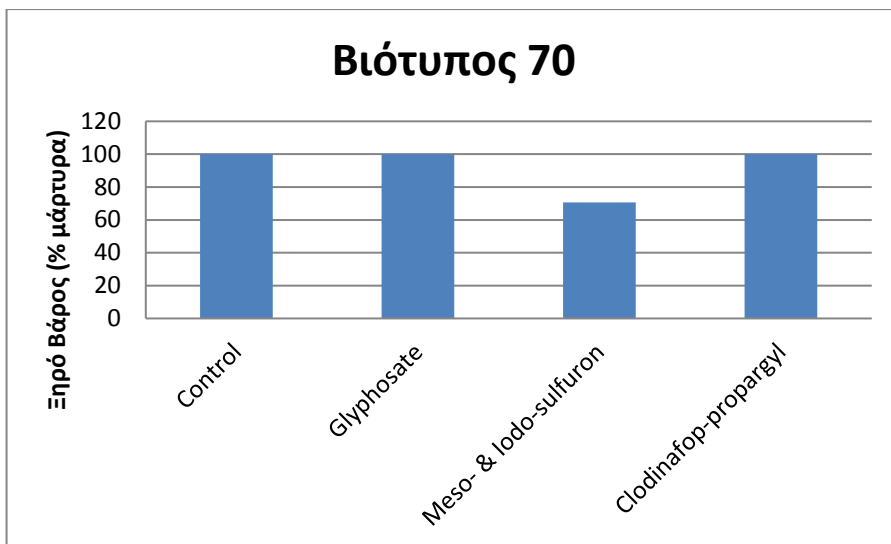
Διάγραμμα 3.2.3.5. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμό, βιότυπος 63

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 63 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος έχει χαμηλή ευαισθησία στο glyphosate και στο clodinafor, με το ξηρό βάρος των φυτών της ήρας να βρίσκεται στο 70% και στο 79% του αψέκαστου μάρτυρα αντίστοιχα, ενώ υπάρχει σχετικά μεγαλύτερη ευαισθησία στο μίγμα σουλφονουλουριών όπου το ξηρό βάρος των φυτών βρίσκεται στο 47% του αψέκαστου μάρτυρα.



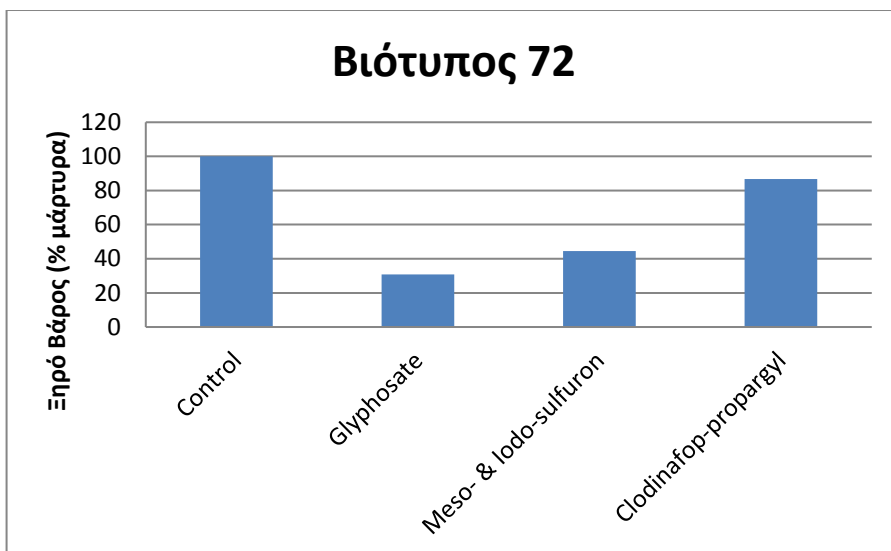
Διάγραμμα 3.2.3.6. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμό, βιότυπος 64

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 64 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος είναι σχετικά πολύ ευαίσθητος στο glyphosate με το ξηρό βάρος των φυτών να βρίσκεται στο 36% του αψέκαστου μάρτυρα, ενώ αντίθετα, φαίνεται να είναι λιγότερο ευαίσθητος στο μίγμα meso- & iodo-sulfuron και στο clodinafor, όπου το ξηρό βάρος των φυτών της ήρας βρίσκεται στο 79% και στο 90% του αψέκαστου μάρτυρα.



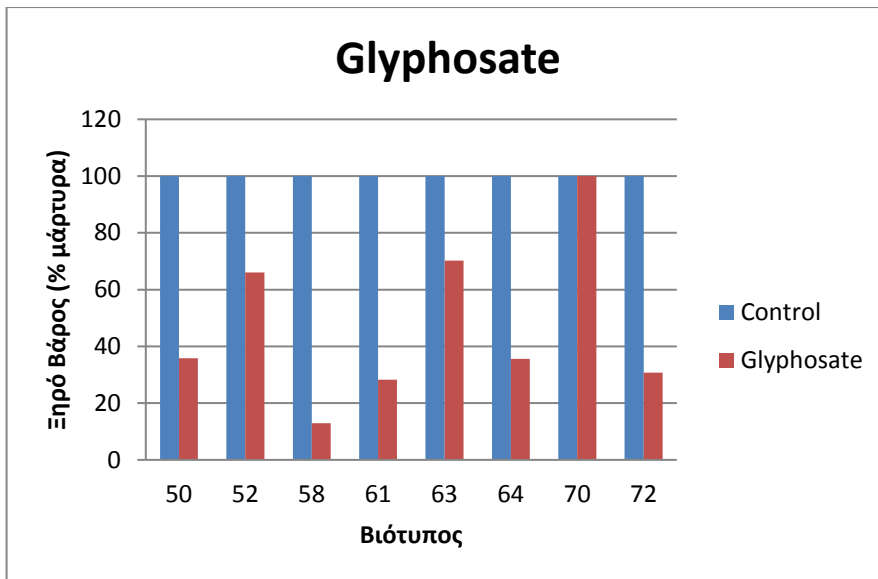
Διάγραμμα 3.2.3.7. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 70

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 70 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος είχε εξαιρετικά χαμηλή ευαισθησία στα ζιζανιοκτόνα glyphosate και clodinafor με το ξηρό βάρος των φυτών της ήρας να βρίσκεται στο 100% του αψέκαστου μάρτυρα και στις δύο περιπτώσεις, ενώ είχε σχετικά μεγαλύτερη ευαισθησία στο μίγμα meso- & iodo-sulfuron όπου το ξηρό βάρος των φυτών βρίσκεται στο 71% του αψέκαστου μάρτυρα.



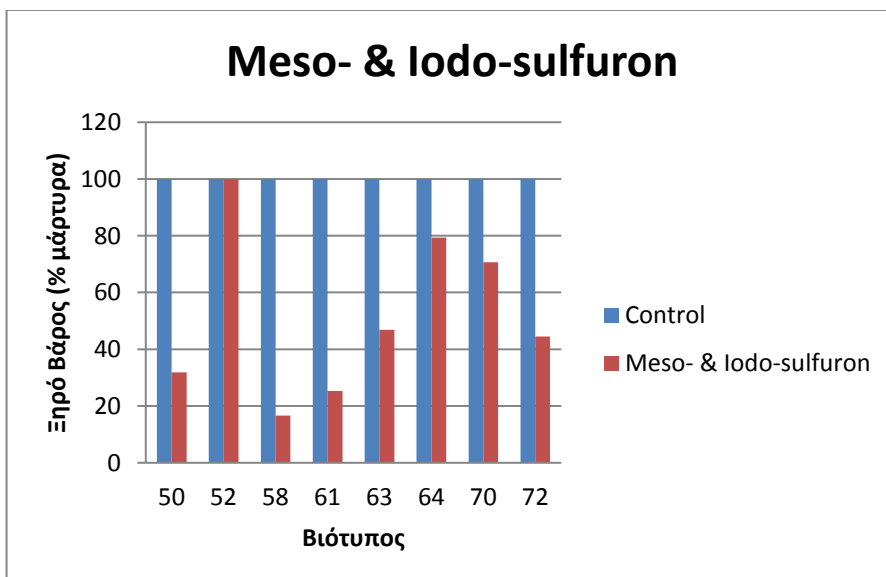
Διάγραμμα 3.2.3.8. Ζιζανιοκτόνα, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 72

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 72 σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρα φαίνεται ότι ο εν λόγω βιότυπος είναι ευαίσθητος στο glyphosate με το ξηρό βάρος των φυτών να βρίσκεται στο 31% του αψέκαστου μάρτυρα. Στο μίγμα meso- & iodo-sulfuron υπάρχει μικρότερη σχετικά ευαισθησία των φυτών (ξηρό βάρος 44% του μάρτυρα), ενώ στο ζιζανιοκτόνο clodinafor ο βιότυπος φαίνεται να έχει ιδιαίτερα χαμηλή ευαισθησία, με το ξηρό βάρος των φυτών να βρίσκεται στο 87% του αψέκαστου μάρτυρα.



Διάγραμμα 3.2.3.9. Glyphosate, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, όλοι οι βιότυποι

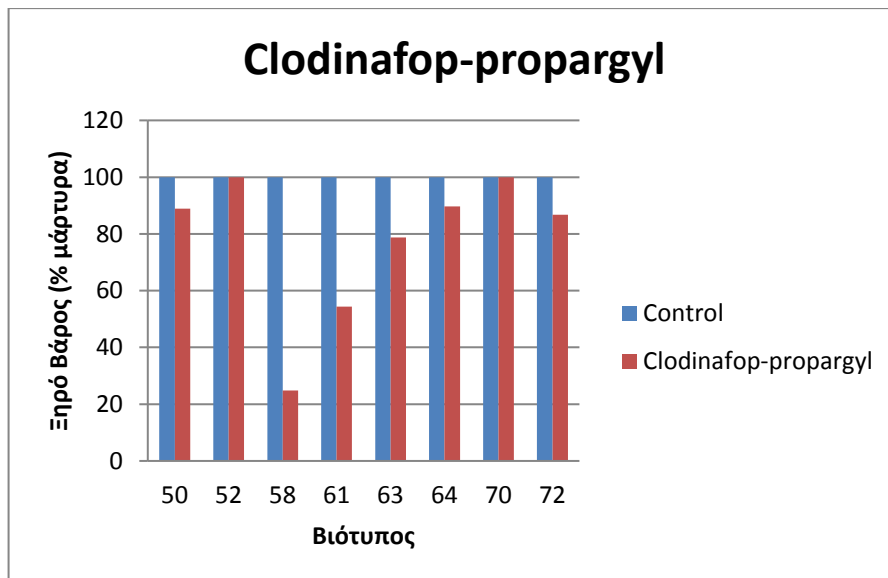
Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών όλων των βιότυπων σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρά τους, φαίνεται πως ο βιότυπος 70 ήταν ο λιγότερο ευαίσθητος στο ζιζανιοκτόνο glyphosate με το ξηρό του βάρος να μη διαφέρει από αυτό του αψέκαστου μάρτυρα. Οι βιότυποι 52 και 63 ήταν περισσότερο ευαίσθητοι, με ξηρό βάρος στο 66% και 70% του αψέκαστου μάρτυρα ενώ οι πλέον ευαίσθητοι στο glyphosate, κατά αύξουσα σειρά ευαισθησίας ήταν οι 50, 64, 72, 61 και 58 (ο πλέον ευαίσθητος βιότυπος) με ξηρό βάρος στο 36%, 36%, 31%, 28% και 13% αντίστοιχα του μάρτυρα.



Διάγραμμα 3.2.3.10. Meso- & Iodo-sulfuron, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, όλοι οι βιότυποι

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών όλων των βιότυπων σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρά τους, φαίνεται πως ο βιότυπος 52 ήταν ο λιγότερο ευαίσθητος στο μίγμα meso- & iodo-sulfuron με το ξηρό του βάρος να βρίσκεται στο 100% του αψέκαστου μάρτυρα,

ενώ και οι βιότυποι 64 και 70 ήταν και αυτοί πολύ λίγο ευαίσθητοι στο μίγμα των σουλφονουλουριών με ξηρό βάρος στο 79% και 71% του αψέκαστου μάρτυρα. Οι βιότυποι 63 και 72 έδειξαν μια μεγαλύτερη ευαισθησία, με ξηρό βάρος στο 47% και 44% αντίστοιχα του αψέκαστου μάρτυρα, ενώ οι βιότυποι 61 και 58 ήταν οι πλέον ευαίσθητοι με ξηρό βάρος στο 25% και 17% του μάρτυρα.

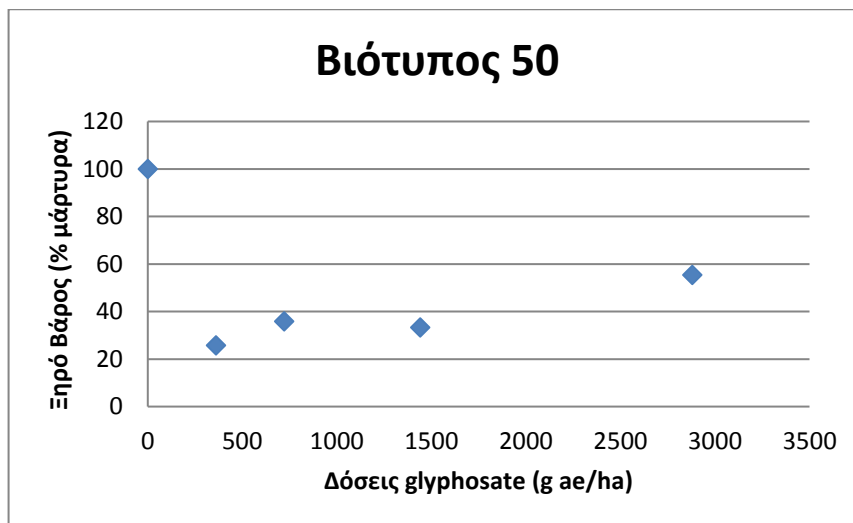


Διάγραμμα 3.2.3.11. Clodinafop-propargyl, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, όλοι οι βιότυποι

Από το διάγραμμα που απεικονίζει το ξηρό βάρος των ψεκασμένων φυτών όλων των βιότυπων σε σχέση με τον αψέκαστο μάρτυρά τους, φαίνεται πως οι βιότυποι 52 και 70 ήταν οι λιγότερο ευαίσθητοι στο ζιζανιοκτόνο clodinafop, αφού το ξηρό τους βάρος δε διαφέρει από αυτό του αψέκαστου μάρτυρα. Μειωμένη ευαισθησία έχουν επίσης οι βιότυποι 50, 63, 64 και 72 με το ξηρό τους βάρος να βρίσκεται στο 89%, 79%, 90% και 87% αντίστοιχα του αψέκαστου μάρτυρα. Ο βιότυπος 61 έδειξε μια σχετικά μεγαλύτερη ευαισθησία στο clodinafop, με ξηρό βάρος στο 54% του μάρτυρα, ενώ βιότυπος 58 ήταν ο πλέον ευαίσθητος στο clodinafop με ξηρό βάρος στο 25% του αψέκαστου μάρτυρα.

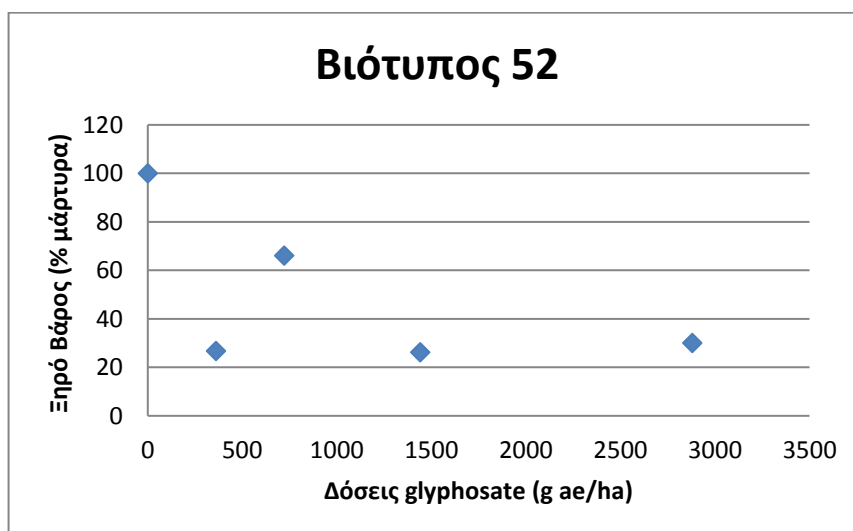
3.3 Διαγράμματα των βιοτύπων του *L. rigidum* μετά την εφαρμογή του glyphosate σε διάφορες δόσεις

3.3.1 Ξηρό Βάρος – 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό



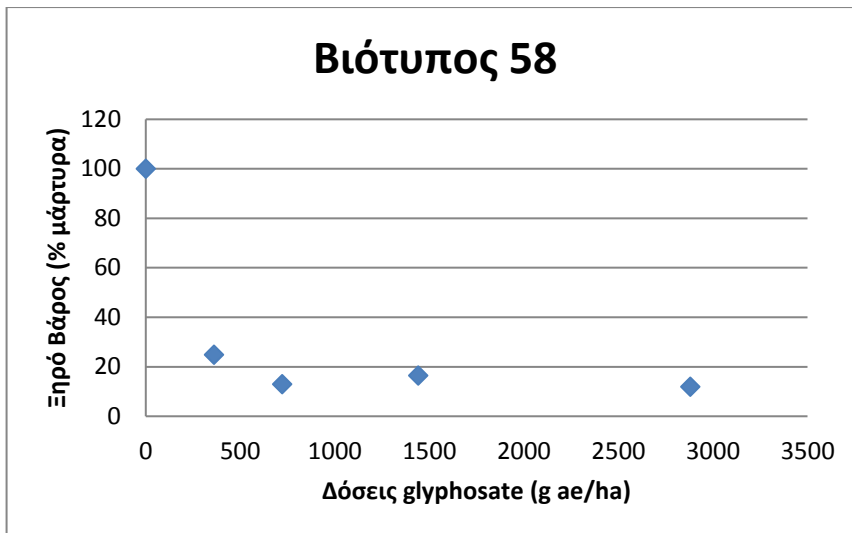
Διάγραμμα 3.3.1.1. Δόσεις glyphosate, ξηρό θάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 50

Από το διάγραμμα που απεικονίζει την πορεία εξέλιξης του ξηρού βάρους των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 50 με διαδοχικές αυξανόμενες δόσεις του ζιζανιοκτόνου glyphosate φαίνεται πως ο βιότυπος αυτός δεν ήταν ιδιαίτερα ευαίσθητος στο εν λόγω ζιζανιοκτόνο, αφού η συνιστώμενη δόση των 720 g ae/ha στις 28 ημέρες από την εφαρμογή μείωσε το ξηρό βάρος του ζιζανίου στο 36% σε σύγκριση με τον αψέκαστο μάρτυρα.



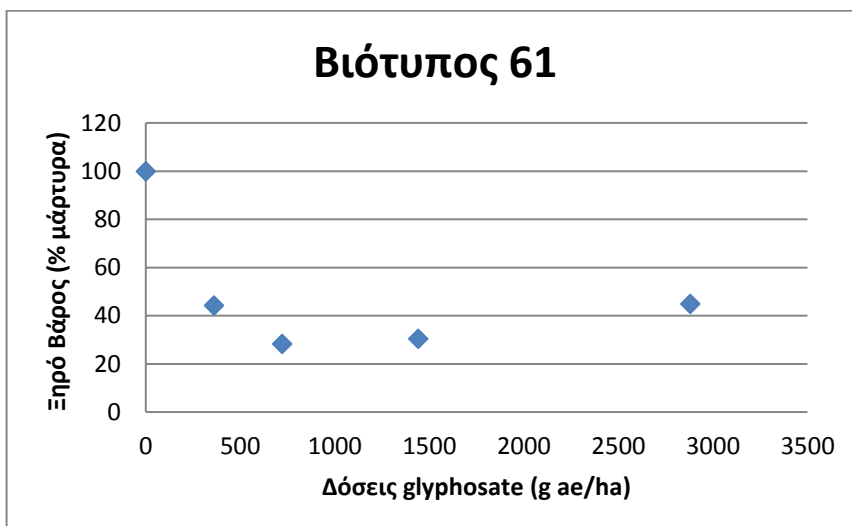
Διάγραμμα 3.3.1.2. Δόσεις glyphosate, ξηρό θάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 52

Από το διάγραμμα που απεικονίζει την πορεία εξέλιξης του ξηρού βάρους των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 52 με διαδοχικές αυξανόμενες δόσεις του ζιζανιοκτόνου glyphosate φαίνεται πως ο βιότυπος αυτός είχε χαμηλή ευαισθησία στο glyphosate, αφού η συνιστώμενη δόση των 720 g ae/ha στις 28 ημέρες από την εφαρμογή μείωσε το ξηρό βάρος του ζιζανίου στο 66% σε σύγκριση με τον αψέκαστο μάρτυρα και το ξηρό βάρος κατέληξε να βρίσκεται στην ανώτατη δόση εφαρμογής (2.880 g ae/ha) στο 30% του αψέκαστου μάρτυρα (γενικά υψηλό %).



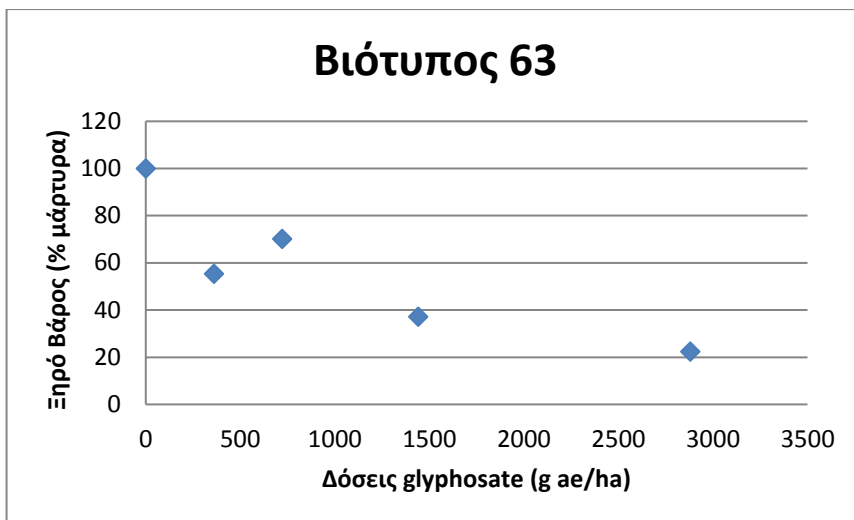
Διάγραμμα 3.3.1.3. Δόσεις glyphosate, ξηρό θάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 58

Από το διάγραμμα που απεικονίζει την πορεία εξέλιξης του ξηρού βάρους των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 58 με διαδοχικές αυξανόμενες δόσεις του ζιζανιοκτόνου glyphosate φαίνεται πως ο βιότυπος αυτός είχε υψηλή ευαισθησία στο εν λόγω ζιζανιοκτόνο, αφού η συνιστώμενη δόση των 720 g ae/ha στις 28 ημέρες από την εφαρμογή μείωσε το ξηρό βάρος του ζιζανίου στο 13% σε σύγκριση με τον αψέκαστο μάρτυρα.



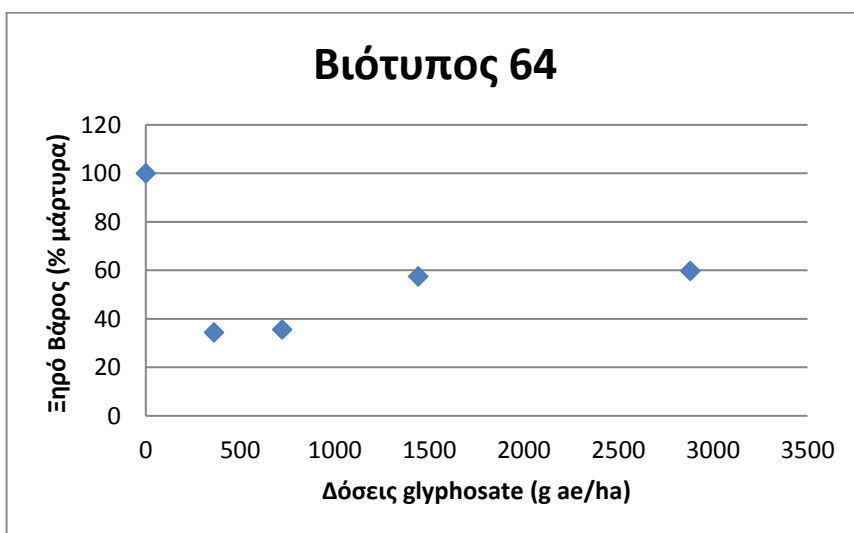
Διάγραμμα 3.3.1.4. Δόσεις glyphosate, ξηρό θάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 61

Από το διάγραμμα που απεικονίζει την πορεία εξέλιξης του ξηρού βάρους των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 61 με διαδοχικές αυξανόμενες δόσεις του ζιζανιοκτόνου glyphosate φαίνεται πως ο βιότυπος αυτός παρουσιάζει είχε μάλλον αυξημένη ευαισθησία στο glyphosate, αφού η συνιστώμενη δόση των 720 g ae/ha στις 28 ημέρες από την εφαρμογή μείωσε το ξηρό βάρος του ζιζανίου στο 28% σε σύγκριση με τον αψέκαστο μάρτυρα.



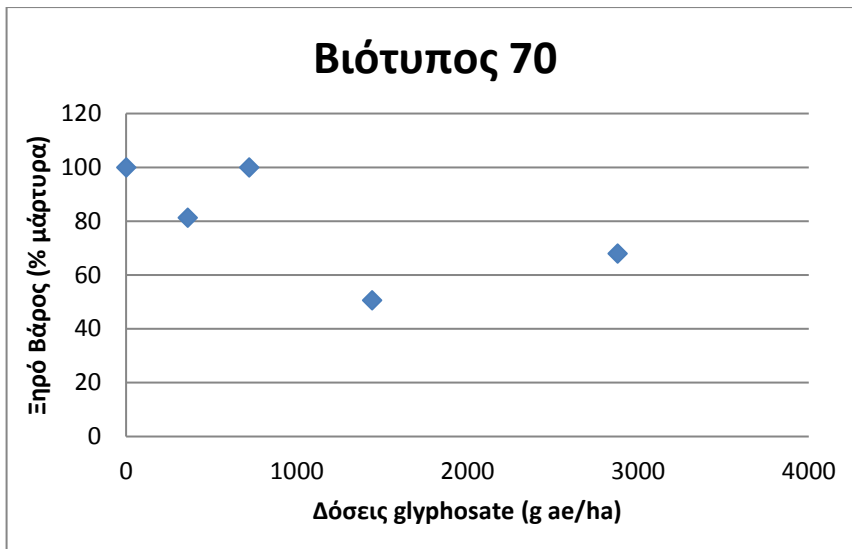
Διάγραμμα 3.3.1.5. Δόσεις glyphosate, ξηρό θάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμό, βιότυπος 63

Από το διάγραμμα που απεικονίζει την πορεία εξέλιξης του ξηρού βάρους των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 63 με διαδοχικές αυξανόμενες δόσεις του ζιζανιοκτόνου glyphosate φαίνεται πως ο βιότυπος αυτός δεν ήταν ιδιαίτερα ευαίσθητος στο glyphosate, αφού η συνιστώμενη δόση των 720 g ae/ha στις 28 ημέρες από την εφαρμογή μείωσε το ξηρό βάρος του ζιζανίου στο 70% σε σύγκριση με τον αψέκαστο μάρτυρα και το ξηρό βάρος κατέληξε να βρίσκεται στην ανώτατη δόση εφαρμογής (2.880 g ae/ha) στο 22% του αψέκαστου μάρτυρα.



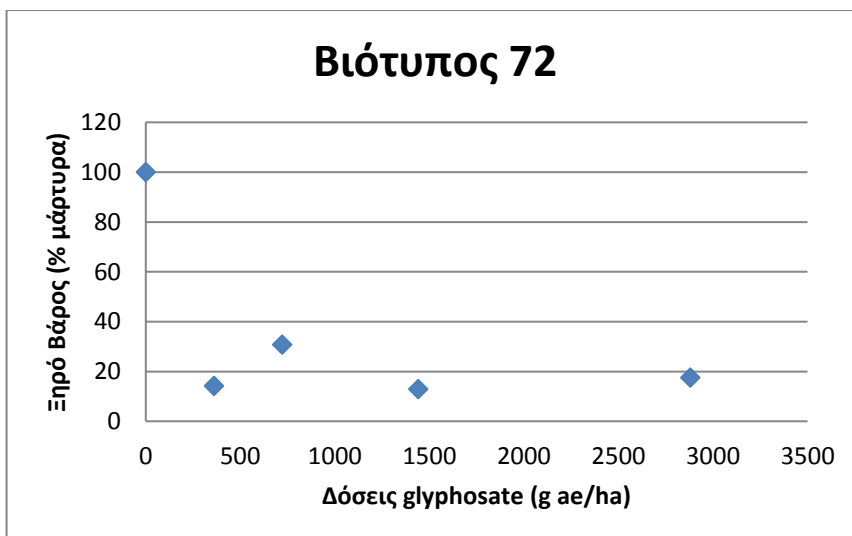
Διάγραμμα 3.3.1.6. Δόσεις glyphosate, ξηρό θάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμό, βιότυπος 64

Από το διάγραμμα που απεικονίζει την πορεία εξέλιξης του ξηρού βάρους των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 64 με διαδοχικές αυξανόμενες δόσεις του ζιζανιοκτόνου glyphosate φαίνεται πως ο βιότυπος αυτός είχε χαμηλή ευαισθησία στο glyphosate, αφού η συνιστώμενη δόση των 720 g ae/ha στις 28 ημέρες από την εφαρμογή μείωσε το ξηρό βάρος του ζιζανίου στο 36% σε σύγκριση με τον αψέκαστο μάρτυρα.



Διάγραμμα 3.3.1.7. Δόσεις glyphosate, ξηρό θάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 70

Από το διάγραμμα που απεικονίζει την πορεία εξέλιξης του ξηρού βάρους των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 70 με διαδοχικές αυξανόμενες δόσεις του ζιζανιοκτόνου glyphosate φαίνεται πως ο βιότυπος αυτός είχε πολύ χαμηλή ευαισθησία στο εν λόγω ζιζανιοκτόνο αφού η συνιστώμενη δόση των 720 g ae/ha στις 28 ημέρες από την εφαρμογή δε μείωσε καθόλου το ξηρό βάρος του ζιζανίου σε σύγκριση με τον αψέκαστο μάρτυρα (100%).

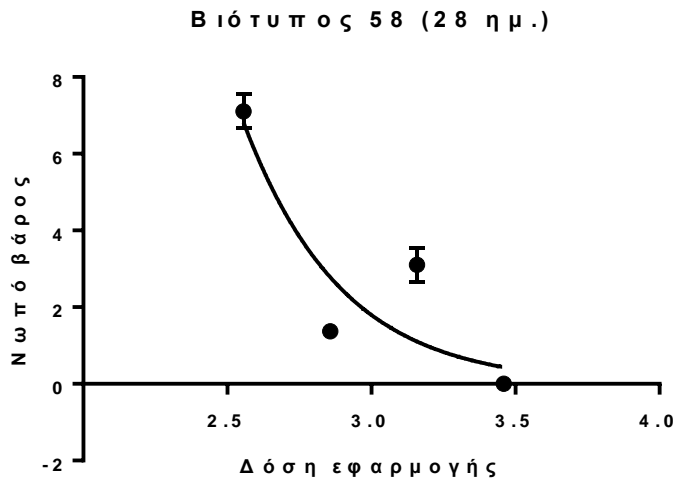


Διάγραμμα 3.3.1.8. Δόσεις glyphosate, ξηρό θάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 72

Από το διάγραμμα που απεικονίζει την πορεία εξέλιξης του ξηρού βάρους των ψεκασμένων φυτών του βιότυπου 72 με διαδοχικές αυξανόμενες δόσεις του ζιζανιοκτόνου glyphosate φαίνεται πως ο βιότυπος αυτός είχε μάλλον μεγάλη ευαισθησία στο glyphosate, , αφού η συνιστώμενη δόση των 720 g ae/ha στις 28 ημέρες από την εφαρμογή μείωσε το ξηρό βάρος του ζιζανίου στο 31% σε σύγκριση με τον αψέκαστο μάρτυρα και το ξηρό βάρος κατέληξε να βρίσκεται στην ανώτατη δόση εφαρμογής (2.880 g ae/ha) στο 17,5% του αψέκαστου μάρτυρα.

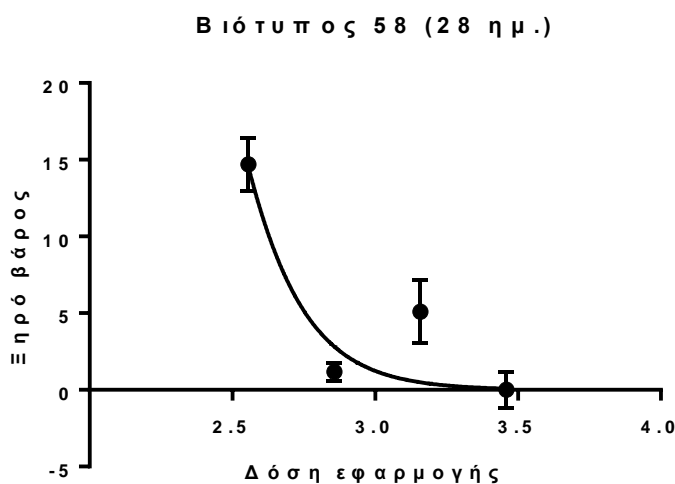
3.4 Καμπύλες Δόσης- Απόκρισης (Dose – Response Curves) στο glyphosate.

Κατασκευάστηκαν οι καμπύλες δόσης-απόκρισης που δείχνουν την πορεία εξέλιξης του νωπού και ξηρού βάρους των φυτών της ήρας σε αυξανόμενες δόσεις του ζιζανιοκτόνου glyphosate, στις 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό τους με το ζιζανιοκτόνο. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται ορισμένες από τις καμπύλες δόσης-απόκρισης.



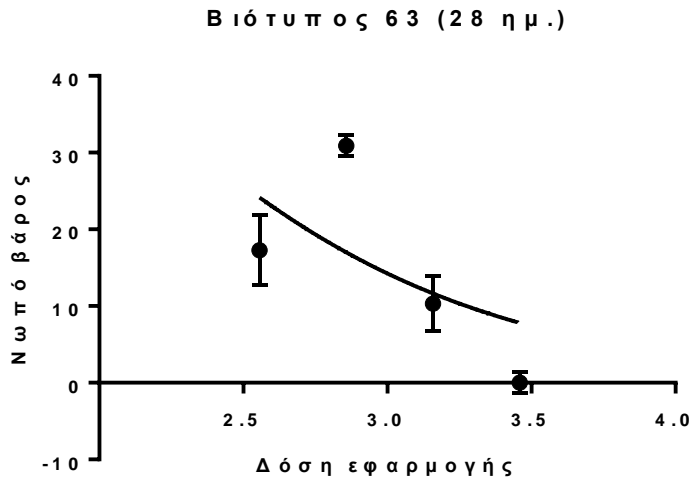
Διάγραμμα 3.4.1. Dose-response καμπύλη, νωπό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 58

LogEC50: 1.718 Hill Slope: -1.356 EC50: 52.29



Διάγραμμα 3.4.2. Dose-response καμπύλη, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 58

LogEC50: 2.255 Hill Slope: -2.552 EC50: 179.8

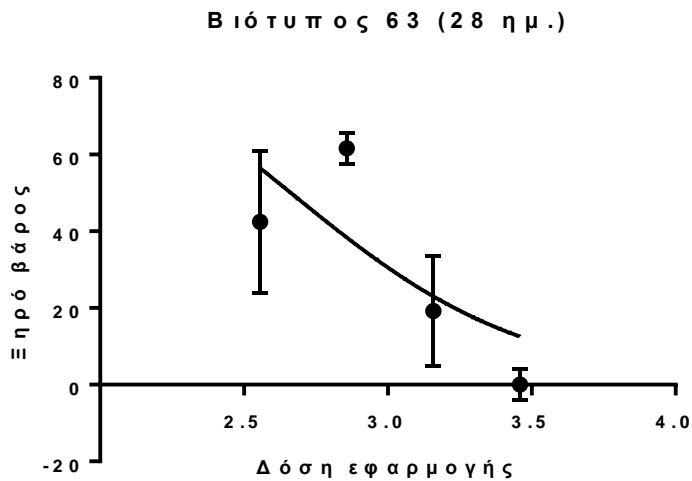


Διάγραμμα 3.4.3. Dose-response καμπύλη, νωπό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 63

LogEC50: 1.776

Hill Slope: -0.637

EC50: 59.76

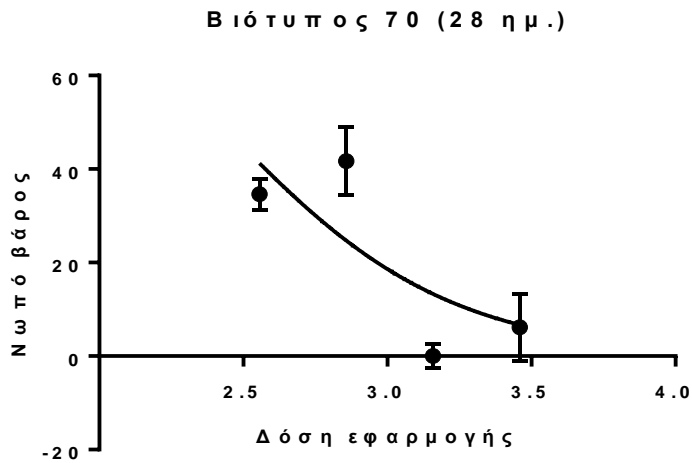


Διάγραμμα 3.4.4. Dose-response καμπύλη, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό, βιότυπος 63

LogEC50: 2.663

Hill Slope: -1.058

EC50: 460.3

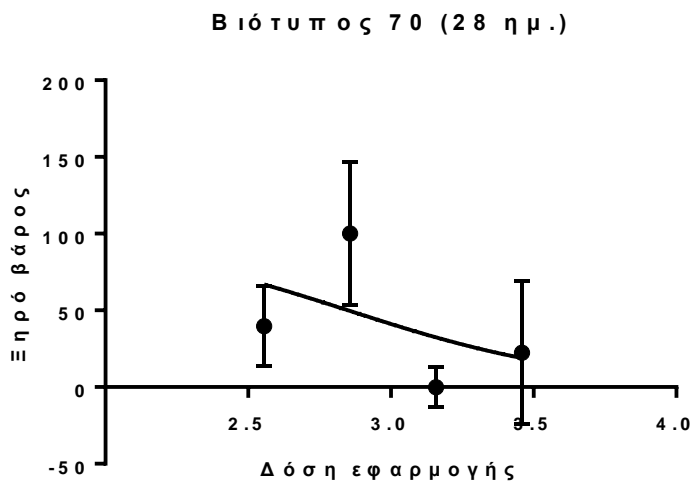


Διάγραμμα 3.4.5. Dose-response καμπύλη, νωπό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμό, βιότυπος 70

LogEC50: 2.416

Hill Slope: -1.097

EC50: 260.6



Διάγραμμα 3.4.6. Dose-response καμπύλη, ξηρό βάρος, 28 ημέρες μετά τον ψεκάσμό, βιότυπος 70

LogEC50: 2.851

Hill Slope: -1.038

EC50: 709.1

3.5 Μετρήσεις σικιμικού οξέος και καθαρότητας/ποσότητας RNA δειγμάτων

Στον πίνακα 12 που ακολουθεί παρακάτω περιγράφονται για κάθε βιότυπο ξεχωριστά οι ενδείξεις του φασματοφωτόμετρου για τη μέτρηση της ποσότητας του σικιμικού οξέος, καθώς και οι πραγματικές ποσότητες σικιμικού οξέος που υπολογίστηκαν με τον τρόπο που περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.

Πίνακας 12. Μετρήσεις σικιμικού οξέος. Ενδείξεις φασματοφωτόμετρου και ποσότητες σικιμικού οξέος.

	Ένδειξη φασμ/τρου	Ένδειξη φασμ/τρου
Βιότυπος	Μάρτυρας	Επέμβαση
50	0,45	0,41
52	0,4	0,34
58	0,19	0,41
61	0,54	0,78
63	0,35	0,67
64	0,52	0,49
70	0,4	0,31
72	0,45	0,58
	Ποσότητα σικιμικού (μL.)	Ποσότητα σικιμικού (μL.)
50	109,76	100,46
52	98,14	84,18
58	49,3	100,46
61	130,7	186,51
63	86,51	160,93
64	126,04	119,07
70	98,14	77,21
72	109,77	140

Πίνακας 13. Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two Way ANOVA) της επίδρασης των βιότυπων και των επεμβάσεων (μάρτυρας, συνιστώμενη δόση glyphosate) στην ποσότητα του συσσωρευμένου σικιμικού οξέος.

Παράγοντας	DF	SS	MS	F	P
Βιότυπος	7	248,378	35,483	5,716	<0,001
Επέμβαση	1	2,539	2,539	0,409	0,527
Αλληλ/δραση Βιότυπος * Επέμβαση	7	28,52	4,074	0,656	0,707
ΥΠΟΛΟΙΠΟ	32	198,644	6,208		
ΣΥΝΟΛΟ	47	478,082	10,172		

Από τον πίνακα 13 φαίνεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($P < 0,001$) στην ποσότητα σικιμικού οξέος που συσσωρεύει κάθε βιότυπος, δηλαδή γενικά, ανεξάρτητα της επέμβασης, κάθε ένας βιότυπος του *L. rigidum* συσσωρεύει διαφορετική ποσότητα σικιμικού οξέος.

Όμως, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο ανάμεσα στις μεταχειρίσεις (ψεκασμένα ή μη ψεκασμένα φυτά) όσο και στις αλληλεπιδράσεις βιότυπου * μεταχείριση. Επομένως, οι μετρήσεις του σικιμικού οξέος δεν φαίνεται να δείχνουν ευαισθησία κάποιου βιότυπου στο glyphosate αφού μέσα από την επεξεργασία με το στατιστικό πρόγραμμα δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Επομένως, υπάρχουν μόνο κάποιες ενδείξεις για σχετικά μειωμένη ευαισθησία ορισμένων βιότυπων, όπως ο 52 ή ο 70, όπως αυτές προκύπτουν από τα dose-response experiments και χωρίς αυτό να επιβεβαιώνεται από σημαντικές διαφορές στη συσσώρευση του σικιμικού οξέος. Οπότε, απαιτείται εκτεταμένη μελέτη και επανάληψη του πειράματος.

Στον πίνακα 14 αναφέρονται οι τιμές ποσότητας και καθαρότητας για τα RNA δείγματα.

Πίνακας 14. Μετρήσεις ελέγχου καθαρότητας/ποσότητας δειγμάτων RNA.

A/A	Δείγμα	260/280	260/230	Ποσότητα (ng/μL)
1	50A (1)	1.70	0.54	188.0
2	50A (2)	1.80	0.79	306.4
3	50C (1)	1.73	0.68	283.8
4	50C (2)	1.53	0.43	189.3
5	52A (1)	1.74	0.72	316.6
6	52A (2)	1.71	0.68	290.6
7	52C (1)	1.71	0.51	200.8
8	52C (2)	1.81	0.57	95.6
9	58A (1)	1.80	0.87	328.3
10	58A (2)	1.58	0.57	113.1
11	58C (1)	1.91	1.22	830.8
12	58C (2)	1.92	1.42	592.5
13	61A (1)	1.83	0.93	273.3
14	61A (2)	1.77	0.54	378.0
15	61C (1)	1.89	0.68	223.1
16	61C (2)	1.72	0.86	351.7
17	63A (1)	1.87	0.61	269.1
18	63A (2)	1.89	0.62	604.1
19	63C (1)	1.86	1.02	621.4
20	63C (2)	1.67	0.71	277.0
21	64A (1)	1.80	0.73	347.5
22	64A (2)	1.88	0.96	434.6
23	64C (1)	1.94	0.84	363.7
24	64C (2)	2.00	1.01	430.7
25	70A (1)	1.70	1.00	432.8
26	70A (2)	1.78	1.21	407.6
27	70C (1)	1.74	0.54	107.5
28	70C (2)	1.74	0.91	413.8
29	72A (1)	1.86	0.55	184.7
30	72A (2)	1.89	0.77	332.4
31	72C (1)	1.78	0.72	321.7

32	72C (2)	1.89	0.83	300.3
----	---------	------	------	-------

*Όπου A: αψέκαστος μάρτυρας, C: ψεκασμένο με τη συνιστώμενη δόση glyphosate

Οι ποσότητες των δειγμάτων RNA κρίθηκαν ικανοποιητικές για τους σκοπούς του πειράματος, όπως επίσης και ο λόγος A260/A280 αφού ήταν πολύ υψηλός σε όλα τα δείγματα. Κυμάνθηκε από 1,70 έως και 2,00, με ελάχιστες μόνο εξαιρέσεις. Επομένως, δεν υπήρχε μεγάλη επιμόλυνση με πρωτεΐνες στα δείγματά μας.

Ο λόγος A260/A230 δεν ήταν απόλυτα ικανοποιητικός καθώς σε πολλές περιπτώσεις κυμάνθηκε αρκετά πιο κάτω από τη μονάδα (παρουσία αλάτων ή φαινολικών ουσιών σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις), όμως δεν κυμάνθηκε και σε τόσο χαμηλά επίπεδα για τους σκοπούς του παρόντος πειράματος ώστε να δικαιολογείται ο περαιτέρω καθαρισμός των δειγμάτων RNA.

Εν κατακλείδι, η ποσότητα και η καθαρότητα όλων των δειγμάτων RNA κρίθηκε ικανοποιητική για την κατασκευή των cDNAs και την περαιτέρω αναλυτική διαδικασία.

3.6. Μετρήσεις της σχετικής έκφρασης του γονιδίου του EPSPS στους βιότυπους.

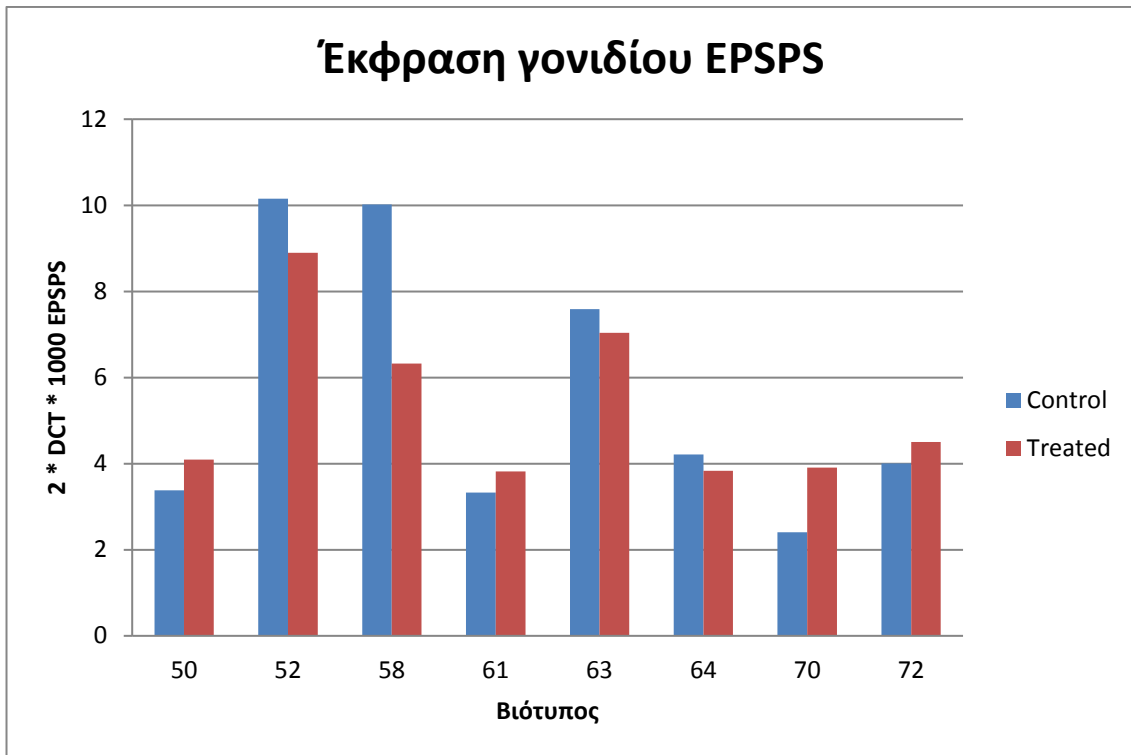
Πίνακας 15. Ανάλυση παραλλακτικότητας (Two Way ANOVA) της επίδρασης των βιότυπων και των επεμβάσεων (μάρτυρας, συνιστώμενη δόση glyphosate) στην έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο EPSPS.

Παράγοντας	DF	SS	MS	F	P
Βιότυπος	7	248,378	35,483	5,716	<0,001
Επέμβαση	1	2,539	2,539	0,409	0,527
Αλληλ/δραση Βιότυπος * Επέμβαση	7	28,52	4,074	0,656	0,707
ΥΠΟΛΟΙΠΟ	32	198,644	6,208		
ΣΥΝΟΛΟ	47	478,082	10,172		

Από τον πίνακα 15 φαίνεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($P < 0,001$) στην έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο EPSPS σε κάθε βιότυπο, δηλαδή γενικά, ανεξάρτητα της επέμβασης, οι βιότυποι του *L. rigidum* εκφράζουν το γονίδιο EPSPS με διαφορετικό τρόπο.

Όμως, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο ανάμεσα στις μεταχειρίσεις (ψεκασμένα ή μη ψεκασμένα φυτά) όσο και στις αλληλεπιδράσεις βιότυπου * μεταχείριση. Επομένως, οι μετρήσεις της έκφρασης του γονιδίου του EPSPS δεν φαίνεται να δείχνουν ότι σχετίζεται με την ευαισθησία ή κάποια σχετική ανθεκτικότητα κάποιου βιότυπου στο glyphosate αφού μέσα από την επεξεργασία με το στατιστικό πρόγραμμα δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Επομένως, υπάρχουν μόνο κάποιες ενδείξεις για σχετικά μειωμένη ευαισθησία ορισμένων βιότυπων, όπως ο 52 ή ο 70, όπως αυτές προκύπτουν από τα dose-response experiments και χωρίς αυτό να επιβεβαιώνεται από σημαντικές διαφορές στην έκφραση του γονιδίου του EPSPS. Οπότε, απαιτείται εκτεταμένη μελέτη και επανάληψη του πειράματος, καθώς και μελέτη της έκφρασης κάποιων άλλων γονιδίων, όπως γονιδίων που εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση (Yanniccari et al., 2012).



Διάγραμμα 3.5.1. Έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο EPSPS σε αφέκαστα και ψεκασμένα (με τη συνιστώμενη δόση glyphosate) φυτά ήρας, όλοι οι βιότυποι

Από το διάγραμμα που απεικονίζει την έκφραση του γονιδίου του EPSPS σε κάθε βιότυπο μεταξύ του αμεταχείριστου μάρτυρα και των ψεκασμένων φυτών ήρας φαίνεται πως το ένζυμο εκφράζεται σε σχετικά μεγαλύτερη ποσότητα στους βιότυπους 52, 58 και 63 και σε σχετικά χαμηλότερη ποσότητα στους βιότυπους 50, 61, 64, 70 και 72. Ωστόσο, εντός του κάθε βιότυπου, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ ψεκασμένων και αφέκαστων φυτών.

Όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη-μεταφορέα M10, στο παρόν πείραμα φάνηκε πως δεν υπήρξε επαγωγή της έκφρασής του σε κανέναν βιότυπο. Επομένως, η σχετικά μειωμένη ευαισθησία ορισμένων βιότυπων στο glyphosate δεν φαίνεται να οφείλεται στον αυξημένο ρυθμό απομάκρυνσης του ζιζανιοκτόνου από το ένζυμο EPSPS προς κυτταρικά οργανίδια (χυμοτόπιο) όπου το glyphosate δεν αντιδρά, αλλά παραμένει ανενεργό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Το πρόβλημα της εμφάνισης ανθεκτικών βιότυπων ζιζανίων

Το πρόβλημα της εμφάνισης ανθεκτικών βιότυπων διαφόρων ζιζανίων στα ζιζανιοκτόνα αποτελεί ένα μείζον θέμα στις μέρες μας. Σε αυτό συνέβαλαν διάφοροι παράγοντες που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο και συνοπτικά οι σημαντικότεροι από αυτούς θα αναφερθούν και εδώ. Η αλόγιστη χρήση των ζιζανιοκτόνων σε συνδυασμό με την απουσία ή την περιστασιακή μόνο χρήση άλλων μεθόδων αντιμετώπισης των ζιζανίων (πχ. προληπτικά μέτρα, μηχανικές και καλλιεργητικές μέθοδοι) σε συνδυασμό με τη χημική φυτοπροστασία συνέβαλλε τα μέγιστα στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Ακόμη, η λανθασμένη πολλές φορές χρήση των ζιζανιοκτόνων, όπως είναι στην περίπτωση της χρήσης τους σε ακατάλληλο στάδιο ανάπτυξης των ζιζανίων ή η λανθασμένη εφαρμοζόμενη δόση, υπέσκαψε το πρόβλημα αυτό ακόμη περισσότερο.

Δεδομένου του ότι η δημιουργία νέων ζιζανιοκτόνων με διαφορετικό τρόπο δράσης είναι, κατά κύριο λόγο, μια πολύ χρονοβόρος διαδικασία και, κατά δεύτερο λόγο, με μεγάλο κόστος, είναι επιτακτικό να σταματήσει ή τουλάχιστον να επιβραδυνθεί αρκετά η εμφάνιση νέων ανθεκτικών βιότυπων. Η ζημιά στα καλλιεργούμενα φυτά και στην παραγωγικότητα των καλλιεργειών γενικότερα (ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση) λόγω παρουσίας και αδυναμίας αντιμετώπισης των ζιζανίων αυξάνουν σημαντικά το κόστος για τον παραγωγό αρχικά και κατ'επέκταση ενδεχομένως και στον καταναλωτή.

Ακόμη, πολύ σημαντική είναι η διαδικασία επιβεβαίωσης της παρουσίας ανθεκτικών βιότυπων ανά ζιζάνιο, ανά ζιζανιοκτόνο και ανά περιοχή σε κάθε χώρα. Πειράματα όπως αυτά της παρούσας εργασίας συμβάλλουν στο να επιβεβαιωθούν ή να απορριφθούν οι υποψίες/ισχυρισμοί των παραγωγών για παρουσία ανθεκτικών βιότυπων στην περιοχή τους. Πολύ χρήσιμη για τους παραγωγούς και για τους ερευνητές είναι επίσης η κατάρτιση (μετά από επαρκή επανάληψη των πειραμάτων και διασταύρωση των αποτελεσμάτων με αντίστοιχες έρευνες) ενός διαδραστικού χάρτη ανθεκτικότητας όπου επισημαίνονται οι ανθεκτικότητες βιότυπων των ζιζανίων σε συγκεκριμένα ζιζανιοκτόνα και ανά περιοχή της κάθε χώρας. Η Ιταλία για παράδειγμα έχει ήδη καταρτίσει έναν λεπτομερέστατο χάρτη ανθεκτικότητας των ζιζανίων στα ζιζανιοκτόνα (που ανανεώνεται πολύ συχνά) και καλύπτει όλη τη χώρα, από τη Βόρεια Ιταλία μέχρι και τη Σικελία.

Έτσι, με τη δημιουργία χάρτη ανθεκτικότητας, αποτρέπονται δύο πράγματα. Πρώτον, η ανώφελη πια χρήση ενός ζιζανιοκτόνου για την αντιμετώπιση ενός ζιζανίου στον αγρό, πράγμα που συνεπάγεται την αποτροπή ενός ανώφελου κόστους και, δεύτερον, αποτρέπεται η ενίσχυση μιας υπάρχουσας ανθεκτικότητας έτσι ώστε βαθμιαία, σε βάθος χρόνου, οι βιότυποι να καταστούν και πάλι ευαίσθητοι με την επίδραση της φυσικής επιλογής (αφού πιθανώς να υπάρχει κόστος προσαρμογής- fitness cost στους ανθεκτικούς βιότυπους και, απουσία πίεσης επιλογής του ζιζανιοκτόνου, σε βάθος χρόνου ενδέχεται να επικρατήσουν ξανά οι βιότυποι που δεν έχουν τις μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα).

Επίσης, δίνεται η συνολική εκτίμηση του μεγέθους του προβλήματος έτσι ώστε να χαραχτεί μια κάποια στρατηγική αντιμετώπισης αυτού σε εθνική ή/και παγκόσμια κλίμακα. Αποτελεί ακόμη μια βάση δεδομένων για τους ερευνητές γεωπόνους-ζιζανιολόγους και για τα πειράματά τους (G.I.R.E. - Gruppo Italiano Resistenza Erbicidi, 2018).

4.2 Σύγκριση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Στο παρόν πείραμα εφαρμόσθηκαν τρία εγκεκριμένα στη χώρα μας ζιζανιοκτόνα, στις συνιστώμενες δόσεις εφαρμογής τους και σε οκτώ πληθυσμούς του ζιζανίου *Lolium rigidum* Gaudin. Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 3, μπορούν να εξαχθούν ορισμένα συμπεράσματα. Ιδιαίτερη αναφορά θα γίνει για το ξηρό βάρος των φυτών στις 21 και στις 28 ημέρες μετά τον ψεκασμό σαν πιο αντιπροσωπευτικό μέγεθος για τον χαρακτηρισμό των βιότυπων ως μειωμένης ή μη μειωμένης ευαισθησίας.

Σχετικά με την επέμβαση με το μίγμα mesosulfuron+iodosulfuron, υπήρξε διαφορετική απόκριση των βιότυπων *L. rigidum* που αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, το **ξηρό βάρος** των φυτών των βιότυπων 50, 52 και 70 στις **21 ημέρες** μετά τον ψεκασμό παρέμεινε στα ίδια επίπεδα με το αντίστοιχο βάρος του αψέκαστου μάρτυρα, των 58, 61 και 64 δε μειώθηκε πολύ, ενώ αντίθετα, μειώθηκε πολύ το ξηρό βάρος των φυτών του βιότυπου 63.

Πιο μετά, στις **28 ημέρες** μετά τον ψεκασμό, το **ξηρό βάρος** των βιότυπων 52, 64 και 70 συνεχίζει να παραμένει σε υψηλά επίπεδα, ενώ μια ένδειξη χαμηλής ευαισθησίας φαίνεται να δείχνουν και οι βιότυποι 50, 63 και 72, ενώ εν τέλει, σαφώς πιο ευαίσθητοι φαίνεται να είναι οι 58 και 61.

Συμπερασματικά, με χαμηλή ευαισθησία στην επέμβαση με σουλφονουλουρίες δείχνουν να είναι οι βιότυποι 52,70 και 64, ενώ ενδείξεις για μειωμένη ευαισθησία φάνηκε να δίνουν οι βιότυποι 50, 63 και 72. Ο 58 και ο 61 φάνηκε να συνεχίζουν να παραμένουν αρκετά ευαίσθητοι.

Σχετικά με την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου clodinafor-propargyl, και εδώ υπήρξε διαφορετική απόκριση των διαφόρων βιότυπων του ζιζανίου, όμως μόνο ένας βιότυπος φάνηκε να είναι πολύ ευαίσθητος στο εν λόγω ζιζανιοκτόνο.

Πιο συγκεκριμένα, το **ξηρό βάρος** των φυτών των βιότυπων 50, 52, 61, 70 και 72 στις **21 ημέρες** μετά τον ψεκασμό τους παρέμειναν στα ίδια ή σχεδόν στα ίδια επίπεδα με τα αντίστοιχα βάρη των φυτών του μάρτυρα, ενώ τα ξηρά βάρη των βιότυπων 58, 63 και 64 είναι μειωμένα, όχι όμως πάρα πολύ, που σημαίνει πως ίσως διαφαίνεται η αργή ανάπτυξη μιας χαμηλής ευαισθησίας και σε αυτούς τους βιότυπους.

Πιο μετά, στις **28 ημέρες** μετά τον ψεκασμό, τα **ξηρά βάρη** των βιότυπων 50, 52, 63, 64, 70 και 72 δεν μειώθηκαν σχεδόν καθόλου, ενώ των βιότυπων 58 και 61 ήταν πιο μειωμένα.

Γενικά, σαν πολύ ευαίσθητος φαίνεται να είναι μόνο ο βιότυπος 58 στην επέμβαση με clodinafor-propargyl, ενώ όλοι οι υπόλοιποι βιότυποι φάνηκε να έχουν χαμηλή ευαισθησία και να χαρακτηρίζονται ως πιθανώς ανθεκτικοί.

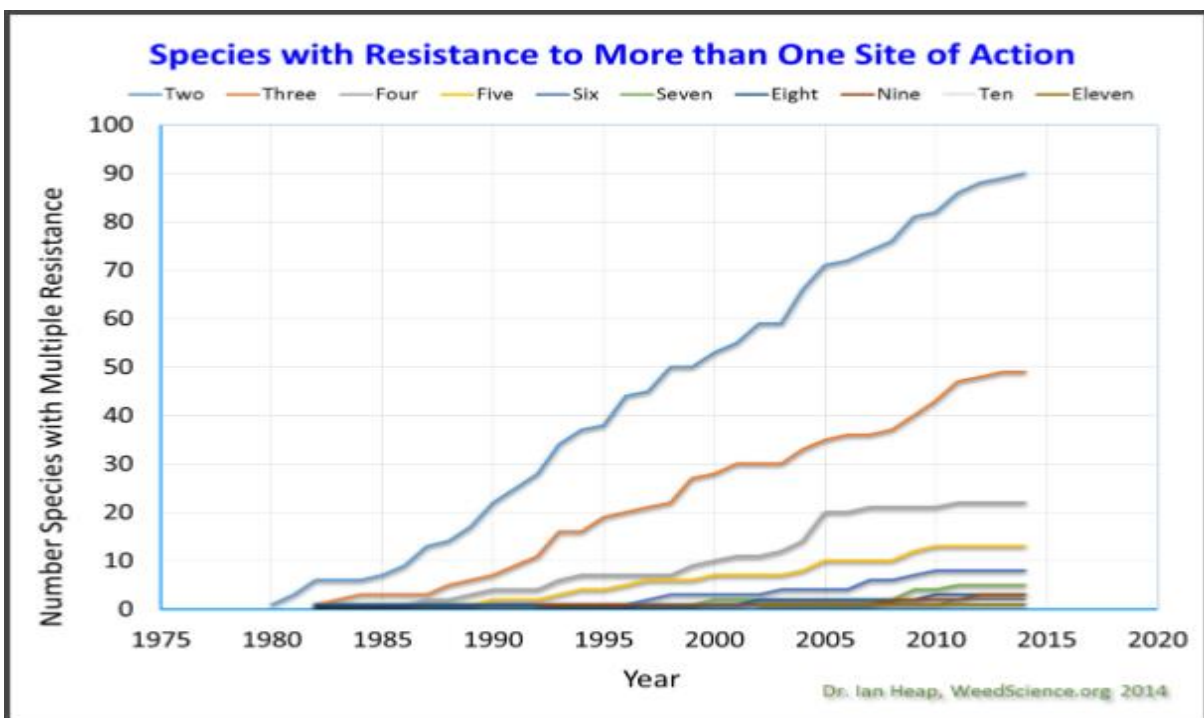
Οι 8 βιότυποι του ζιζανίου *L. rigidum* αντέδρασαν επίσης διαφορετικά στο ζιζανιοκτόνο glyphosate.

Στις **28 ημέρες** μετά τον ψεκασμό, σε υψηλά επίπεδα κυμάνθηκαν τα **ξηρά βάρη** των βιότυπων 52, 63 και 70, ενώ αντίθετα, μειώθηκε πολύ το ξηρό βάρος των βιότυπων 58, 61, 64 και 72 (με εξαίρεση τον 50 και τον 64 που φαίνεται να αποκτούν μια μειωμένη ευαισθησία).

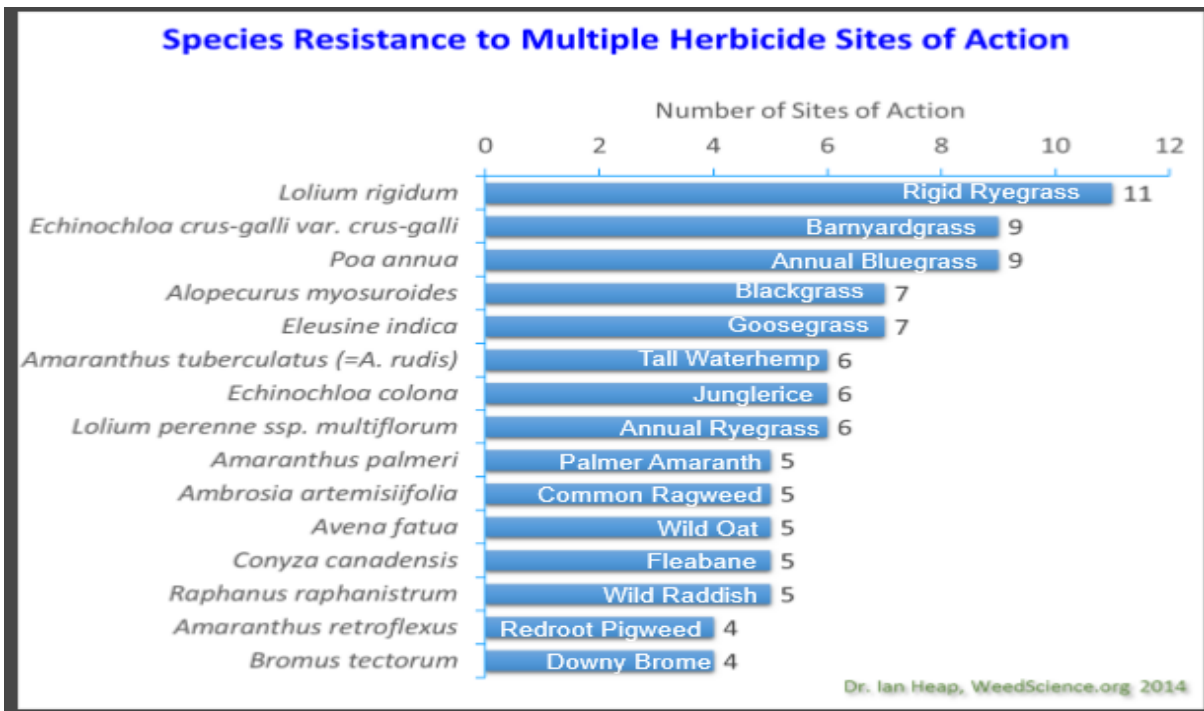
Στο παρόν πείραμα, υπάρχουν μόνο κάποιες ενδείξεις για σχετικά μειωμένη ευαισθησία ορισμένων βιότυπων, όπως ο 52 ή ο 70, όπως αυτές προκύπτουν από τα πειράματα δόσης-απόκρισης (dose-response experiments) και χωρίς αυτό να επιβεβαιώνεται από σημαντικές διαφορές στη συσσώρευση του σικιμικού οξέος. Επομένως, απαιτείται περαιτέρω έρευνα και εκτεταμένη μελέτη και μετρήσεις του σικιμικού οξέος, καθώς στην παρούσα μελέτη δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

4.3 Αξιολόγηση για πολλαπλή ανθεκτικότητα

Όπως έχει αναφερθεί και στο 1^ο κεφάλαιο, οι βιότυποι που έχουν αποκτήσει πολλαπλή ανθεκτικότητα είναι αυτοί που είναι ανθεκτικοί σε περισσότερα από ένα ζιζανιοκτόνα που ανήκουν σε οικογένειες με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης ή μεταβολισμού (Ελευθεροχωρινός, 2008, Εικόνες 20, 21).



Εικόνα 20. Αριθμός ειδών ζιζανίων με ανθεκτικότητα σε περισσότερους από έναν μηχανισμούς δράσης ζιζανιοκτόνων (πολλαπλή ανθεκτικότητα). Πορεία εμφάνισης πολλαπλής ανθεκτικότητας από το 1980 μέχρι το 2014. Με διαφορετικά χρώματα, ανθεκτικότητα σε 2,3,4,5,6,7,8,9, 10 και 11 μηχανισμούς δράσης. (Πηγή: Πηγή: Heap, 2014, www.weedscience.org)



Εικόνα 21. Είδη ζιζανίων (πλήρες όνομα) με πολλαπλή ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα. Το *L. rigidum* είναι το πρώτο στην κατάταξη με ανθεκτικότητα σε 11 διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης ζιζανιοκτόνων. (Πηγή: Πηγή: Heap, 2014, www.weedscience.org)

Και τα τρία ζιζανιοκτόνα που εφαρμόστηκαν στο παρόν πείραμα έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, οπότε βιότυποι που φαίνεται να έχουν ιδιαίτερα χαμηλή ευαισθησία στα δύο από τα τρία ή και σε όλα τα ζιζανιοκτόνα, ίσως να ανήκουν σε αυτούς που απέκτησαν εν τέλει πολλαπλή ανθεκτικότητα. Ορισμένα τέτοια παραδείγματα στην παρούσα μελέτη είναι τα ακόλουθα, χωρίς βέβαια να μπορεί να ειπωθεί με απόλυτη βεβαιότητα πως πρόκειται για πληθυσμούς που ανέπτυξαν πολλαπλή ανθεκτικότητα χωρίς να προηγηθούν περαιτέρω μελέτες:

- 1) Οι βιότυποι 52 και 70 φάνηκε να έχουν ιδιαίτερα χαμηλή ευαισθησία και στα τρία ζιζανιοκτόνα που εφαρμόστηκαν.
- 2) Ο βιότυπος 64 φάνηκε να έχει μειωμένη ευαισθησία στο μίγμα των σουλφονουριών και στο clodinafor-propargyl και έδωσε μια ένδειξη χαμηλής ευαισθησίας στο glyphosate.
- 3) Ο βιότυπος 50 φάνηκε να έχει μειωμένη ευαισθησία στο clodinafor-propargyl, ενώ έδωσε μια ένδειξη χαμηλής ευαισθησίας στο μίγμα mesosulfuron & iodosulfuron και στο glyphosate.
- 4) Ο βιότυπος 63 φάνηκε να έχει μειωμένη ευαισθησία στο clodinafor-propargyl, ενώ έδωσε μια ένδειξη χαμηλής ευαισθησίας στο μίγμα σουλφονουριών, αλλά όχι στο

glyphosate, στο οποίο δε φάνηκε να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο.

- 5) Ο βιότυπος 72 έδειξε να έχει χαμηλή ευαισθησία στο clodinafor-propargyl, ενώ φάνηκε να δίνει μια ένδειξη μειωμένης ευαισθησίας στο μίγμα meso- & iodo-sulfuron, αλλά όχι στο glyphosate, στο οποίο δε φάνηκε να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο.
- 6) Με βάση τα ευρήματα του παρόντος πειράματος, φαίνεται πως ο βιότυπος 58 συνεχίζει και παραμένει πολύ ευαίσθητος και στα τρία ζιζανιοκτόνα που εφαρμόστηκαν, ενώ για το βιότυπο 61 υπάρχει μόνο μια ένδειξη μειωμένης ευαισθησίας στο clodinafor-propargyl. Στην εφαρμογή του glyphosate και του μίγματος των σουλφονουλουριών, ο βιότυπος 61 φάνηκε να διατηρεί την ευαισθησία του.

4.4 Σύγκριση αποτελεσμάτων – Συζήτηση

Όπως αναφέρουν οι Yu et al. (2009), σε άρθρο τους που μελετάει τους μηχανισμούς πολλαπλής ανθεκτικότητας δύο πληθυσμών του *L. rigidum* στην Αυστραλία, στα τρία ζιζανιοκτόνα που μελετάει και το παρόν πείραμα (ζιζανιοκτόνα-παρεμποδιστές των ενζύμων EPSPS, ALS και ACCase), βρέθηκε πως οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας δεν σχετίζονται με μετάλλαξη της θέσης δράσης (non-target resistance). Για το μεν glyphosate, η ανθεκτικότητα βρέθηκε να οφείλεται σε αυξημένο ρυθμό μεταφοράς και απομάκρυνσής του σε ιστούς και κυτταρικά οργανίδια όπου το ζιζανιοκτόνο καθίσταται αβλαβές (vacuole sequestration), ενώ για τους παρεμποδιστές των ACCase και ALS σε αυξημένο ρυθμό μεταβολισμού τους.

Στην εν λόγω μελέτη αναφέρεται ακόμη πως στην επέμβαση με glyphosate, οι ευαίσθητοι πληθυσμοί συσώρευαν σικιμικό οξύ σε ποσότητες τετραπλάσιες έως και εξαπλάσιες σε σχέση με τους δύο ανθεκτικούς πληθυσμούς. Αντίθετα, στο παρόν πείραμα δεν υπήρξαν τόσο μεγάλες διαφορές στις ποσότητες του σικιμικού οξέος. Υπάρχουν μόνο κάποιες ενδείξεις για σχετικά μειωμένη ευαισθησία ορισμένων βιότυπων, όπως ο 52 ή ο 70, όπως αυτές προκύπτουν από τα dose-response experiments και χωρίς αυτό να επιβεβαιώνεται από σημαντικές διαφορές στη συσσώρευση του σικιμικού οξέος. Επομένως, απαιτείται εκτεταμένη μελέτη και επανάληψη του πειράματος και των μετρήσεων του σικιμικού οξέος.

Σε άλλη έρευνα, των Wakelin et al. (2004), βρέθηκε πως η ανθεκτικότητα στο glyphosate σε τέσσερις πληθυσμούς του *L. rigidum* οφείλετο σε μειωμένη μεταφορά του ζιζανιοκτόνου στους μεριστωματικούς ιστούς του φυτού.

Πολλοί ακόμη ερευνητές έχουν μελετήσει τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας του *L. rigidum* στο glyphosate. Οι Lorraine-Colwill et al. (2003), μελέτησαν τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε έναν επιβεβαιωμένο ανθεκτικό πληθυσμό του εν λόγω ζιζανίου, στην Αυστραλία. Τα πειράματά τους έδειξαν πως η ανθεκτικότητα σχετίζεται με αυξημένο ρυθμό μεταφοράς του ζιζανιοκτόνου στις άκρες των φύλλων, και αυτή ήταν και η μόνη ειδοποιός διαφορά μεταξύ ευαίσθητου και

ανθεκτικού πληθυσμού. Ενώ ο ευαίσθητος πληθυσμός συσσωρεύει το ζιζανιοκτόνο στις ρίζες του, τα φυτά του ανθεκτικού πληθυσμού το συσσωρεύουν στις άκρες των φύλλων τους. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του ενζύμου-στόχου του glyphosate, της συνθάσης του EPSP, μεταξύ των δύο πληθυσμών, ενώ η ευαισθησία του ενζύμου ήταν η ίδια και στον ανθεκτικό και στον ευαίσθητο πληθυσμό, δεδομένο που υποδηλώνει την απουσία μετάλλαξης στο EPSPS. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν δηλαδή πως μια αλλαγή στην κυτταρική μεταφορά του glyphosate συμβάλλει στην ανθεκτικότητα.

Σε παρόμοιες μελέτες, βρέθηκε πως η ανθεκτικότητα στο glyphosate οφειλόταν σε μεταλλαγή στο ένζυμο EPSPS, σε συνδυασμό ή όχι με άλλους εμπλεκόμενους μηχανισμούς, όπως ήταν η μειωμένη μεταφορά του ζιζανιοκτόνου εντός των ιστών και των κυττάρων, η απομόνωσή του σε κυτταρικά οργανίδια ή κάποιος άγνωστος συμπληρωματικός μηχανισμός δράσης. Αυτά αναφέρονται σε πλήθος μελετών όπως των Bostamam et al. (2012), Collavo & Sattin (2012), Kaundun et al. (2011), Wakelin & Preston (2006), Simarmata & Penner (2008) και των Yu et al. (2007). Οι τελευταίοι μάλιστα μελέτησαν την πολλαπλή ανθεκτικότητα ενός βιότυπου ήρας στο glyphosate, στο paraquat και στα ζιζανιοκτόνα παρεμποδιστές του ενζύμου ACCase.

Οι Gaines et al. (2010) μελέτησαν την υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν το ένζυμο EPSPS σαν μηχανισμό ανθεκτικότητας στο glyphosate.

Πάντως, ακόμη και οι ανθεκτικοί στο glyphosate πληθυσμοί παρουσιάζουν μειωμένη ανθεκτικότητα στο εν λόγω ζιζανιοκτόνο όταν τα φυτά αναπτύσσονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία από την ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξής τους. Πιο συγκεκριμένα, οι Vila-Aiub et al., (2013), μελέτησαν την ανθεκτικότητα στο glyphosate σε δύο ανθεκτικούς πληθυσμούς του *Lolium rigidum*, που συλλέχθηκαν από οπωρώνα και από αγρό στον οποίο καλλιεργούνται δημητριακά, στην Αυστραλία. Αφού έσπασαν με χημικό τρόπο τον λήθαργο των σπόρων, φυτά φύτεψαν και αναπτύχθηκαν στην ιδανική θερμοκρασία των 19°C και σε μειωμένη θερμοκρασία, στους 8°C και στη συνέχεια, στο στάδιο των δύο φύλλων, ψεκάστηκαν με το ζιζανιοκτόνο στη συνιστώμενη δόση εφαρμογής. Τόσο το ποσοστό επιβίωσης των φυτών όσο και το ξηρό βάρος του υπέργειου μέρους (βιομάζα) των ανθεκτικών φυτών που αναπτύχθηκαν σε μειωμένη θερμοκρασία, ήταν χαμηλότερο σε σχέση με τα φυτά που είχαν αναπτυχθεί στην ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης. Αυτό το αποτέλεσμα επεκτείνεται και σε άλλα είδη φυτών, όπως το *Sorghum halepense*, που επίσης μελετήθηκε στην εν λόγω εργασία.

Γενικά, στην Αυστραλία, ένα χαρακτηριστικό που οδήγησε στην πολλαπλή ανθεκτικότητα του *L. rigidum* στα ζιζανιοκτόνα είναι η ικανότητα να συσσωρεύονται διάφοροι μηχανισμοί ανθεκτικότητας τόσο μέσα στα φυτά ξεχωριστά όσο και μέσα στους πληθυσμούς. Την πολλαπλή ανθεκτικότητα αυτή την έχουν μελετήσει πιο παλιά (το πρόβλημα στην Αυστραλία εμφανίστηκε αρκετά νωρίς) ερευνητές όπως οι Tardif & Powles (1994) και οι Preston et al. (1996) που βρήκαν πως η ανθεκτικότητα των πληθυσμών που μελέτησαν οφείλετο στη συσσωρευση δύο ή και περισσότερων διαφορετικών μηχανισμών.

Πολλοί ακόμη ερευνητές έχουν μελετήσει το ποιοι μηχανισμοί εμπλέκονται στην πολλαπλή ανθεκτικότητα πληθυσμών του *L.rigidum* προερχόμενων από την Αυστραλία στα ζιζανιοκτόνα παρεμποδιστές του ACCase, του ALS αλλά και σε άλλα. Ενδεικτικά μόνο και όχι εξαντλητικά, αναφέρονται εδώ οι εργασίες των Christopher et al. (1992) που βρήκαν πως η ανθεκτικότητα ενός πληθυσμού στους παρεμποδιστές του ALS εμπλέκει τουλάχιστον δύο μηχανισμούς, οι Hall et al. (1994) γενικά για τη διασταυρωτή και την πολλαπλή ανθεκτικότητα, οι Burnet et al. (1994) που μελέτησαν την ανθεκτικότητα ενός πληθυσμού *L.rigidum* σε εννιά διαφορετικά είδη ζιζανιοκτόνων, οι Preston & Powles (1998) που μελέτησαν την ανθεκτικότητα ενός πληθυσμού στο diclofor-methyl (παρεμποδιστής του ACCase) και των Preston & Powles (2002a, 2002b) για τους μηχανισμούς και την εξέλιξη της πολλαπλής ανθεκτικότητας του *L.rigidum*.

Το πρόβλημα της πολλαπλής ανθεκτικότητας πληθυσμών του *L.rigidum* αποδείχθηκε ότι είναι ένα ευρύ και εκτεταμένο πρόβλημα μετά από πολλά πειράματα/εργασίες όπως των Owen et al. (2007) και Llewellyn et al. (2001). Στη Δυτική Αυστραλία, σε έρευνα των Llewellyn και Powles (2001) βρέθηκε πως το 46% και το 64% των πληθυσμών του *L.rigidum* ήταν ανθεκτικοί στο diclofor-methyl και το chlorsulfuron αντίστοιχα, ενώ το 37% αυτών ήταν ανθεκτικό και στα δύο ζιζανιοκτόνα.

Για τις μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο ALS και που ευθύνονται για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των πληθυσμών του *Lolium rigidum* στους παρεμποδιστές του ALS υπάρχουν μελέτες όπως των Tranel et al. (2009), των Tranel & Wright (2002), Yu et al. (2008) και των Preston & Powles (2002).

Για τις μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο ACCase και που ευθύνονται για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας πληθυσμών του *L.rigidum* στους παρεμποδιστές του ACCase υπάρχουν μελέτες όπως των Yu et al. (2007b) που για το πείραμά τους χρησιμοποίησαν το ζιζανιοκτόνο clethodim και των Zhang & Powles σε δύο εργασίες τους (2006a και 2006b). Οι τελευταίοι, στη δεύτερη εργασία τους εντόπισαν έξι συνολικά μεταλλάξεις (αντικαταστάσεις αμινοξέων) σε έναν μόνο ανθεκτικό πληθυσμό τον οποίο και μελέτησαν.

Ακόμη, η πρακτική του να φτάνει επανειλημμένως λιγότερη ποσότητα ζιζανιοκτόνου στα ζιζάνια (σε σχέση με την κανονική δόση εφαρμογής) είτε λόγω λανθασμένων ψεκαστικών χειρισμών είτε λόγω ψεκάσματος σε προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης των ζιζανίων, έχει οδηγήσει στην πολύ γρήγορη ανάπτυξη ανθεκτικότητας πληθυσμών του *L.rigidum* στην Αυστραλία τόσο λόγω της συνεχούς πίεσης επιλογής όσο και του υψηλού ποσοστού επιβίωσης των φυτών μετά την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου. Με αυτό το σημαντικό θέμα καταπιάνονται σε δύο εργασίες τους οι Neve & Powles (2005) και οι Busi & Powles (2009).

Ακόμη, αξίζει να αναφερθεί πως η απόκτηση ανθεκτικότητας σε οποιοδήποτε ζιζανιοκτόνο συνδέεται με ένα fitness cost, δηλαδή συνδέεται με την έλλειψη ανταγωνιστικής ικανότητας ενός ανθεκτικού σε σχέση με έναν ευαίσθητο βιότυπο, όταν στο περιβάλλον οι ατμοσφαιρικές ή οι εδαφικές συνθήκες ανάπτυξης δεν είναι οι ιδανικές. Αυτό συμβαίνει ακόμη περισσότερο όταν η ανθεκτικότητα εντοπίζεται λόγω κάποιας μετάλλαξης στο ένζυμο στόχο.

Πιο συγκεκριμένα, οι Vila-Aiub et al. (2005), σε μελέτη τους μελέτησαν την οικολογική προσαρμογή ενός πληθυσμού *L. rigidum* από την Αυστραλία που είχε πολλαπλή ανθεκτικότητα στο APP και στο CDH (παρεμποδιστές του ACCase), στις σουλφονουλουρίες και στις ιμιδαζολιόνες (παρεμποδιστές του ALS), σε δινιτροανιλίνες και καρβαμιδικά ζιζανιοκτόνα. Οι ανθεκτικότητες οφείλονταν τόσο σε μεταλλαγές στα ένζυμα όσο και στον αυξημένο μεταβολισμό των ζιζανιοκτόνων. Παρατηρήθηκε πως όταν οι συνθήκες φυτρώματος δεν ήταν ευνοϊκές (απουσία φωτός συνδεδεμένη με βαθιά σπορά στο έδαφος - 8εκ. βάθος-), η συνολική φυτρωτικότητα και εμφάνιση των φυταρίων πάνω από το έδαφος ήταν σημαντικά μειωμένη στο φαινότυπο που είχε μεταλλαγή στο ACCase σε σχέση με τον ευαίσθητο φαινότυπο ή τον φαινότυπο του οποίου η ανθεκτικότητα οφείλετο στον αυξημένο μεταβολισμό του ζιζανιοκτόνου.

Για την έλλειψη ανταγωνιστικής ικανότητας των ανθεκτικών στο glyphosate πληθυσμών έναντι των ευαίσθητων στο glyphosate πληθυσμών έχουν ασχοληθεί ερευνητές όπως οι Pedersen et al. (2007).

Έλλειψη ανταγωνιστικής ικανότητας παρουσιάζουν επίσης και οι πληθυσμοί του *L. rigidum* που οφείλουν την ανθεκτικότητά τους σε μεταβολισμό του ζιζανιοκτόνου και όχι σε μεταλλαγές του ενζύμου-στόχου. Με αυτό ασχολούνται σε εργασίες τους οι Vila-Aiub et al. (2005a) και οι Tsujii et al. (2004) σε πληθυσμό ανθεκτικό στους παρεμποδιστές του ACCase λόγω μεταβολισμού στο κυτόχρωμα P450 και σε δύο εργασίες τους οι Vila-Aiub et al. (2009).

Επιπλέον, απουσία της πίεσης επιλογής του ζιζανιοκτόνου, γίνεται εμφανές το fitness cost των ανθεκτικών πληθυσμών, τόσο στην παραγωγή σπόρου και στην παραγωγή βιομάζας όσο και στην γενικότερη ανταγωνιστική ικανότητά τους σε σχέση με τους ευαίσθητους πληθυσμούς, λόγω μειωμένης φωτοσυνθετικής ικανότητας, πράγμα που οφείλεται στην πλειοτροπική δράση διαφόρων γονιδίων (Vila-Aiub et al., 2005).

Όλα τα παραπάνω, για το κόστος στην ανταγωνιστική ικανότητα των ανθεκτικών πληθυσμών, αναφέρονται σε πλήθος μελετών όπως των Pavlicev & Wagner (2012), των Vila-Aiub et al. (2011, 2009) και του Purrington (2000). Πάντως, όπως αναφέρουν και οι Chauvel et al. (2009), οι πλειοτροπικές αρνητικές επιπτώσεις που επιφέρει η ανθεκτικότητα δεν είναι απαραίτητα πολύ έντονες, δεν εκφράζονται δηλαδή σε πολύ μεγάλο βαθμό, πράγμα που εξηγεί το λόγο που η ανθεκτικότητα παραμένει σε πληθυσμούς ζιζανίων ακόμη και όταν έχει για πολλά χρόνια απομακρυνθεί η πίεση επιλογής του ζιζανιοκτόνου.

Επομένως, είναι πλέον αδήριτη ανάγκη να εφαρμοστούν στρατηγικές για τον έλεγχο της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα. Σαν μέρος αυτών των στρατηγικών αναφέρονται οι μέθοδοι της χρήσης μιγμάτων από ζιζανιοκτόνα με διαφορετικό μηχανισμό δράσης και όχι μεμονωμένων ζιζανιοκτόνων ή της εναλλαγής χρήσης των μεμονωμένων ζιζανιοκτόνων κατά την καλλιεργητική περίοδο και φυσικά, η αποφυγή της μονοκαλλιέργειας. Κατά άλλους ερευνητές, η χρήση διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα είναι μια καλή συμπληρωματική λύση, ενώ ορισμένοι τάσσονται απόλυτα κατά της χρήσης διαγονιδιακών φυτών. Περισσότερα για τις

στρατηγικές αυτές και με μελέτες τους δίνουν σε εργασίες τους οι Lagator et al. (2013), Green (2012) και Harkner (2012), Jacquemin et al. (2008) και Beckie (2006).

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει πως ορισμένοι πληθυσμοί του ζιζανίου *Lolium rigidum* Gaudin φαίνεται να έχουν μειωμένη ευαισθησία σε διάφορα ζιζανιοκτόνα.

Καθοριστικό ρόλο για την εμφάνιση της ανθεκτικότητας διαδραμάτισε η εφαρμογή της μονοκαλλιέργειας των σιτηρών από τους παραγωγούς, όπως επίσης και η έλλειψη της εναλλαγής των χρησιμοποιούμενων ζιζανιοκτόνων (δηλαδή ζιζανιοκτόνων με διαφορετικό τρόπο δράσης), αλλά και η λανθασμένη χρήση αυτών των ζιζανιοκτόνων.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson W.P. (1996). *Weed Science: Principles and Applications*. West Publishing Company
- Baerson S.R., Rodriguez D.J., 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 Physiol* 129:1265-1275
- Baker H.G. (1965). Characteristics and modes of origin of weeds. In "The Genetics of Colonizing Species" (Baker H.G. & Stebbins G.L. eds.), pp 147-168, Academic Press
- Balfourier F., Imbert C. & Charmet G. (2000). Evidence for phylogeographic structure in *Lolium* species related to the spread of agriculture in Europe. A cpDNA study. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 131-138
- Beckie H.J. (2006). Herbicide-resistant weeds: management tactics and practices. *Weed Technol.* 20: 793-814
- 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 Sci* 61:460-468
- Bennett S.J., Hayward M.D., Marshall D.F. (2000). Morphological differentiation in four species of the genus *Lolium*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47(3): 247-255
- Bennett S.J., Hayward M.D., Marshall D.F. (2002). Electrophoretic variation as a measure of species differentiation between four species of the genus *Lolium*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 49(1): 59-66
- 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 Sci* 60: 474-479
- Burnet M.W.M., Hart Q., Holtum J.A.M. & Powles S.B. (1994). Resistance to nine herbicide classes in a population of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Science* 42: 369-377.
- Busi R., Vila-Aiub M.M., Powles S.B. (2011). Genetic control of a cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. *Heredity* 106:817-824
- Busi R. & Powles S. (2009). Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses. *Heredity* 103: 318-325
- Chaleff R.S. & Mauvais C.J. (1984). Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science* 224: 1443-1445
- Chauvel B. et al. (2009). Evolution of a herbicide-resistant population of *Alopecurus myosuroides* Huds. in a long term cropping system experiment. *Crop Prot.* 28: 343-349.

- Christopher J.T., Powles S.B., Liljegren D.R. & Holtum J.A.M. (1991). Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). Chlorsulfuron resistance involves a wheat-like detoxification system. *Plant Physiol.* 95: 1036-1043
- Christopher J.T., Powles S.B. & Holtum J.A.M. (1992). Resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*) involves at least two mechanisms. *Plant Physiology* 100: 1909-1913.
- Collavo A. & Sattin M. (2012). Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum* selected in Italian perennial crops: bioevaluation, management and molecular basis of target-site resistance. *Weed Research* 52: 16-24.
- 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
- de Carvalho L.B., Alves P.L., Gonzalez-Torralva F., Cruz-Hipolito H.E., Rojano-Delgado A.M., De Prado R., Gil-Humanes J., Barro F., de Castro M.D. (2012.) Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*. *J Agric Food Chem* 60:615-622
- Delye C., Jaseniuk M. & Le Corre V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics (TIGS)* 1063: 1-10.
- Delye C., Matejiceck A. & Gasquez J. (2002b.) PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud.). *Pest Manag. Sci.* 58: 474-478.
- Delye C., Calmes E. & Matejiceck A. (2002a). SNP markers for blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) genotypes resistant to acetyl CoA carboxylase inhibiting herbicides. *Theor. Appl. Genet.* 104: 1114-1120
- De Prado J.L., Osuna M.D., Heredia A., De Prado R. (2005). *Lolium rigidum*, a pool of resistance mechanisms to ACCase inhibitor herbicides. *J Agric Food Chem* 53:2185-2191
- Dill G.M., CaJacob C.A., Padgett S.R. (2008). Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Manag Sci* 64:326-331
- Dinelli G., Bonetti A., Lucchese C., Catizone P., Bravin F., Zanin G. (2002). Taxonomic evaluation of Italian populations of *Lolium* spp. Resistant and susceptible to diclofop-methyl. *Weed Research (Oxford)*, 42(2): 156-165; 40 ref.
- 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. *Pestic Biochem Physiol* 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. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci* 64:319-325
- Fernandez-Quintanilla C., Barroso J., Recasens J., Sans X., Torner C. & Sanchez del Arco M.J. (2000). Demography of *Lolium rigidum* in winter barley crops: analysis of recruitment, survival and reproduction. *Weed Research (Oxford)*, 40(3): 281-291; 20 ref.
- Gaines T.A., Preston C., Leach J.E., Chisholm S.T., Shaner D.L. et al. (2010). Gene amplification is a mechanism for glyphosate resistance evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 1029-1034
- Gasquez J. (1997). Genetics of herbicide resistance within weeds. Factors of evolution, inheritance and fitness. In De Prado, J. Jorrin and L. Garcia-Torres (ed.). *Weed and Crop Resistance to Herbicides*. Kluwer Academic Publishers: 181-189
- Ge X., d'Avignon D.A., Ackerman J.J.H., Sammons R.D. (2010). Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Manag Sci* 66:345-348
- Gerwick B.C., Subramanian M.V. & Loney-Gallant V.I. (1990). Mechanism of action of the 1,2,4-triazole[1,5-a]pyrimidines. *Pesticide Science* 29: 357-364
- Gill G.S., Dowling P., Medd R. (1996). Ecology of annual ryegrass. Wild oats, annual ryegrass and vulpia. Proceedings of a workshop held at Orange, New South Wales, Australia. *Plant Protection Quarterly* 11: 198-200
- Gonzalez-Torralva F., Rojano-Delgado A.M., Luque de Castro M.D., Mulleder N., De Prado R. (2012). Two non-target site mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.) biotypes. *J Plant Physiol* 169:1673-1679
- Gramshaw D. & Stearn W.R. (1997). Survival of annual ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud.) seed in a Mediterranean type environment. II. Effects of short term burial on persistence of viable seed. *Australian Journal of Agricultural Research*. 28: 93-101.
- Green J.M. (2012). The benefits of herbicide-resistant crops. *Pest Manag. Sci.* 68: 1323-1331
- Gressel J. (2002). *Molecular Biology of Weed Control*. New York: Taylor and Francis
- Hall L.M., Holtum J.A.M. & Powles S.B. (1994). Mechanisms responsible for cross resistance and multiple resistance. *Herbicide Resistance in Plants. Biology and Biochemistry* (eds. S.B. Powles & J.A.M. Holtum), pp. 243-261. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Harker K.N. et al. (2012). Our view. *Weed Sci.* 60: 143-144

Hatzios K.K. (2001). Mechanism of resistance to herbicides. In: R. De Prado and J.V. Jorrin, eds. *Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI*. Cordoba, Spain: Servicio Publicaciones Universidad de Cordoba. pp. 275-287

Healy-Fried M.L., Funke T., Priestman M.A., Han H., Schonbrunn E. (2007). Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro(106) in *Escherichia coli* EPSPS. *J Biol Chem* 282:32949-32955

Heap I. (2010). International Survey of Herbicide Resistant Weeds (ISHRW).
<http://www.weedscience.com>

Jacquemin B. et al. (2008). Modelling binary mixtures of herbicides in populations resistant to one of the components: evaluation for resistance management. *Pest. Manag. Sci.* 65: 113-121.

James C. (2006). Global status of commercialized biotech/GM crops: 2006. ISAAA Briefs No.35. ISAAA, Ithaca, NY

Kaundun S.S., Dale R.P., Zelaya I.A., Dinelli G., Marotti I., McIndoe E. et al. (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. *J. Agric. Food Chem.* 59: 3227-3233

Kloot P.M. (1983) The genus *Lolium* in Australia. *Australian Journal of Botany* 31: 421-435

Knake E.L. & Slife F.W. (1962). Competition of *Setaria faberi* with corn and soybeans. *Weeds* 10, 26-29

Kondrashov FA (2012). Gene duplication as a mechanism of genomic adaptation to a changing environment. *Proc R Soc B Biol Sci* 279:5048-5057

Lagator M. et al. (2013). Herbicide mixtures at high doses slow the evolution of resistance in experimentally evolving populations of *Chlamydomonas reinhardtii*. *New Phytol.* 198: 938-945.

Leach G.E., Devine M.D., Kirkwood R.C. & Marshall G. (1995). Target enzyme-based resistance to acetyl-Coenzyme A carboxylase inhibitors in *Eleusine indica*. *Pestic.Biochem.Physiol.* 51:129-136

LeBaron H.M. & Gressel J. (1982). *Herbicide Resistance in Plants*. Wiley, New York

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. (2003). Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pestic.Biochem.Physiol.* 74: 62-72.

Marles M.A.S., Devine M.D. & Hall J.C. (1993). Herbicide resistance in *Setaria viridis* conferred by a less sensitive form of acetyl coenzyme A carboxylase. *Pestic.Biochem.Physiol.* 46: 7-14

- Martinoia E., Grill E., Tommasini R., Kreuz K. & Amrhein N. (1993). ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247-249
- Mazur B.J. & Falco S.C. (1989). The development of herbicide resistant crops. *Annual Review Plant Physiol. Mol. Biol.* 40: 441-470
- Monaco J.T., Weller S.C. & Ashton F.M. (2002). *Weed Science: Principles and Practises*, 4th ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp. 379-383
- Moss S.R., Cocker K.M., Brown A.C., Hall L. & Field L.M. (2003). Characterization of target-site resistance to ACCase-inhibiting herbicides in the weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *Pest Manag. Sci.* 59: 190-201
- 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 Sci* 61:374-383
- Naylor R.E.L. (2002). *Weed Management Handbook*. Blackwell Science, Oxford. p. 424.
- Neve P. & Powles S.B. (2005). Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. *Theor. Appl. Genet.* 110: 1154-1166
- Neve P. & Powles S.B. (2005). High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. *Heredity* 9: 485-492.
- Ng C.H., Wickneswari R., Salmijah S., Teng Y.T., Ismail B.S. (2003.) Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible biotypes of Eleusine indica from Malaysia. *Weed Research* 43:108-115
- Niknam S.R., Moerkerk M. & Cousens R. (2002). Weed seed contamination in cereal and pulse crops. 13th Australian Weeds Conference: weeds “threats now and forever?”, Sheraton Perth Hotel, Perth, Western Australia, 8-13 September 2002: papers and proceedings, pp 59-62; 3 ref.
- Owen M., Walsh M., Llewellyn R. & Powles S.B. (2007). Widespread occurrence of multiple herbicide resistance in Western Australian annual ryegrass (*Lolium rigidum*) populations. *Aust. J. Agric. Res.* 58: 711-718
- Pavlicev M. & Wagner G.P. (2012). A model of developmental evolution: selection, pleiotropy and compensation. *Trends Ecol.Evol.* 27: 316-322
- Pearce G.A. & Quinlivan B.J. (1971). The control of annual (“Wimmera”) ryegrass in cereal crops. *Journal of Agriculture, Western Australia*, 12: 58-62
- 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 Appl. Ecol.* 8: 258-268

Peltzer S.C. & Matson P.T. (2002). How fast do seedbanks of five annual cropping weeds deplete in the absence of weed seed input? 13th Australian Weed Conference: weeds "threats now and forever?", Sheraton Perth Hotel, Perth, Western Australia, 8-13 September 2002: papers and proceedings, pp 553-555; 12 ref.

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

Preston C., Tardif F.J., Christopher J.T. & Powles S.B. (1996). Multiple resistance to dissimilar chemistries in a biotype of *Lolium rigidum* due to enhanced activity of several herbicide degrading enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 54: 123-134.

Preston C. & Powles S.B. (1998). Amitrole inhibits diclofop metabolism and synergises diclofop-methyl in a diclofop-methyl-resistant biotype of *Lolium rigidum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 62: 179-189.

Preston C. & Mallory-Smith C.A. (2001). Biochemical mechanisms, inheritance and molecular genetics of herbicide resistance in weeds. In: *Herbicide Resistance and World Grains*, S.B. Powles and D.L. Shaner, eds. CRC, Boca Raton. pp. 23-60

Preston C. & Powles S.B. (2002a). Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. *Heredity* 88: 8-13

Preston C. & Powles S.B. (2002b). Mechanisms of multiple resistance in *Lolium rigidum*. *Agrochemical Resistance. Extent, Mechanism and Detection* (eds. J.M. Clark & I. Yamaguchi), pp 150-160. ACS Symposium Series 808. Oxford University Press, Washington D.C.

Preston C., Wakelin A.M., Dolman F.C., Botamam Y. & Boutsalis P. (2009). A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the world: mechanisms, genes, fitness and agronomic management. *Weed Science* 57: 435-441.

Puri A., MacDonald G.E. & Haller W.T. (2007). Stability of Fluridone-Resistant Hydrilla (*Hydrilla verticillata*) Biotypes over Time. *Weed Science* 55(1): 12-15.

Purrington C.B. (2000). Costs of resistance. *Curr.Opin.Plant.Biol* 3, 305-308.

Rerkasem K., Stearn W.R. & Goodchild N.A. (1980). Associated growth of wheat and annual ryegrass (*Lolium rigidum*). Proceedings of the 2nd International Weed Control Congress, Copenhagen, Denmark, Slagelse, Denmark: Department of Weed Control and Pesticide Ecology, pp 407-414.

Ryan G.F (1970). Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Science* 18: 614-616

- Saari L.L, Cotterman J.C. & Thill D.C. (1994). Resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. In: S.B. Powles and J.A.M. Holtum, eds. *Herbicide resistance in plants: Biology and Biochemistry*. Lewis Publishers, CRC Press, Inc., Boca Raton, F: 33431, pp. 83-140.
- Salas R.A., Dayan F.E., Pan Z., Watson S.B., Dickson J.W., Scott R.C. et al. (2012). EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from Arkansas. *Pest Manag Sci* 68:1223-1230
- Sammons R.D., Gaines T.A. (2014). Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Manag Sci*. 70:1366-1367
- Shaner D.L., Anderson P.C. & Stidham M.A. (1984). Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol*. 76: 545-546
- Shoup D.E., Al-Khatib K. & Peterson D.E. (2003). Common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistance to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Weed Science* 51(2): 145-150
- Shukla A., Leach G.E. & Devine M.D. (1997). High-level resistance to sethoxydim conferred by an alteration in target enzyme, acetyl-CoA carboxylase, in *Setaria faberi* and *Setaria viridis*. *Plant Physiol.Biochem*. 35:803-807
- Simarmata M., Penner D. (2008). The basis for glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) from California. *Weed Science* 56:181-188
- Steadman K.J, Crawford A.D. & Gallagher R.S. (2003). Dormancy release in *Lolium rigidum* seeds is a function of thermal after-ripening time and seed water content. *Functional Plant Biology*, 30(3): 345-352; 31 ref.
- Stidham M.A. (1991). Herbicides that inhibit Acetolactate synthase. *Weed Science* 39: 428-434
- Terrell E. (1968). A taxonomic revision of the genus *Lolium*. *Technical Bulletin of the USDA* 1392: 1-65
- Tardif F.J.& Powles S. (1994). Herbicide multiple-resistance in a *Lolium rigidum* biotype is endowed by multiple mechanisms: isolation of a subset with resistant acetyl-CoA carboxylase. *Physiologia Plantarum*, 91: 488-494.
- Tranel P.J., Wright T.R. & Heap I.M. (2009). ALS mutations from herbicide-resistant weeds. <http://www.weedscience.org>
- Tranel P.J & Wright T.R. (2002). Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science* 50:700-712
- Tsuji H., Dillon N. & Ohkawa H. (2004). Molecular functions of cytochrome P450 species involved in herbicide resistance in *Lolium rigidum* biotype WLR2. *Int. Symp. Cyochrome P450: Biodiversity and Biotechnology, 7th*, Hyogo, Japan, p. 69 (Abstr).

- Vila-Aiub M.M., Gundel P.E., Yu Q. & Powles S.B. (2013). Glyphosate resistance in *Sorghum halepense* and *Lolium rigidum* is reduced at suboptimal growing temperatures. *Pest. Manag. Science* 69: 228-232.
- Vila-Aiub M.M., Balbi M.C., Distefano A.J., Fernandez L., Hopp E., Yu Q., Powles S.B. (2012). Glyphosate resistance in perennial *Sorghum halepense* (Johnsongrass), endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake. *Pest Manag Sci* 68:430-436
- Vila-Aiub M.M et al. (2011). A unified approach to the estimation and interpretation of resistance costs in plants. *Heredity* 107: 386-394.
- Vila-Aiub M.M. et al. (2009). Fitness costs associated with evolved herbicide resistance genes in plants. *New Phytol.* 184: 751-767.
- Vila-Aiub M.M., Neve P. & Powles S.B. (2009). Evidence for an ecological cost of enhanced herbicide metabolism in *Lolium rigidum*. *J. Ecol.* 97: 772-780.
- Vila-Aiub M.M., Neve P., Steadman K.J. & Powles S.B. (2005). Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. *Journal of Applied Ecology* 42: 288-0298
- Vila-Aiub M.M., Neve P. & Powles S.B. (2005a). Resistance cost of a cytochrome P450 herbicide metabolism mechanism but not an ACCase target site mutation in a multiple resistant *Lolium rigidum* population. *New Phytol.* 167: 787-796.
- 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 meristomatic zones. *Weed Research* 44: 453-459
- Wakelin A.M., Preston C. (2006). A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. *Weed Research* 46:432-440
- Yannicari M., Tambussi E., Istilart C. & Castro A.M. (2012). Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry.*, vol.57, p. 210-217.
- Young B.G. (2006). Changes in Herbicide Use Patterns and Production Practises Resulting from Glyphosate-Resistant Crops. *Weed Technology* 20(2): 301-307.
- Yu Q., Huang S., Powles S. (2010). Direct measurement of paraquat in leaf protoplasts indicates vacuolar paraquat sequestration as a resistance mechanism in *Lolium rigidum*. *Pestic Biochem Physiol* 98:104-109
- Yu Q., Abdallah I., Han H., Owen M. & Powles S. (2009). Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta*, vol. 230, issue 4, pp. 713-723.

- Yu Q., Han H. & Powles S.B. (2008). Mutations of the ALS gene endowing resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* populations. *Pest Management Sci.* 64: 1229-1236
- Yu Q., Cairns A. & Powles S. (2007a). Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta* 225: 499-513.
- Yu Q., Collavo A., Zheng M.Q., Owen M., Sattin M. & Powles S.B. (2007b). Diversity of acetyl-coenzyme A carboxylase mutations in resistant *Lolium* populations: evaluations using clethodim. *Plant Physiol.* 145: 547-558
- Zhang X.Q. & Powles S.B. (2006a). The molecular basis for resistance to acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase) inhibiting herbicides in two target-based resistant biotypes of annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Planta* 223: 550-557.
- Zhang X.Q. & Powles S.B. (2006b). Six amino acid substitutions in the carboxyl-transferase domain of the plastidic acetyl-CoA carboxylase gene are linked with resistance to herbicides in a *Lolium rigidum* population. *New Phytol.* 172: 636-645.
- Zimdahl R.L. (1993). *Fundamentals of Weed Science*, Academic Press

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βουλγαρίδης Μ. (2014). Μελέτη της συμπεριφοράς του ζιζανιοκτόνου glyphosate στο έδαφος και της δράσης του στα φυτά μετά από απορρόφηση από τις ρίζες. Πτυχιακή εργασία, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης, Ηράκλειο.

Ελευθεροχωρινός Η. (2008). Ζιζανιολογία: Ζιζάνια, Ζιζανιοκτόνα, Περιβάλλον, Αρχές και Μέθοδοι Διαχείρισης. Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα, σελ. 333-359

Ελευθεροχωρινός Η. & Γιαννοπολίτης Κ. (2009). Ζιζάνια: Οδηγός Αναγνώρισης, Εκδόσεις Αγρότυπος, σελ. 144-145

Ζιώγας Β. & Μάρκογλου Α. (2010). Γεωργική Φαρμακολογία: Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήση των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων, Εκδόσεις Ζιώγας & Μάρκογλου, σελ. 513-704

Μουρκίδου Ε.Π. (2008). Χημεία, Φαρμακολογία (Φαρμακοκινητική/Μεταβολισμός/Τρόπος δράσης), Τοξικολογία, Οικοτοξικολογία και Συμπεριφορά στο περιβάλλον. Εκδόσεις Μέθεξης, Θεσσαλονίκη, σελ.569.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

G.I.R.E. (2018). Gruppo Italiano Resistenza Erbicidi.

<http://gire.mlib.cnr.it>

Heap I. (2014, 2010). International Survey of Herbicide Resistant Weeds (ISHRW).

<http://www.weedscience.com>

Εικόνα 1: GRDC – Grains Research and Development Corporation

<https://grdc.com.au/resources-and-publications/iwmhub/common-weeds-of-cropping/annual-ryegrass>

Εικόνα 2: Weeds of Australia, Biosecurity Queensland Edition

https://keyserver.lucidcentral.org/weeds/data/media/Html/lolium_rigidum.htm

Εικόνα 3 : Plant Protection , Υπηρεσία Φυτοπροστασίας

<https://plantpro.gr/herbs/Gramineae/p/Lolium>

Εικόνα 4: Flora of Qatar

http://www.floraofqatar.com/lolium_rigidum.htm

Εικόνες 5, 7, 8 , 12, 13, 14, 20, 21: International Survey of Herbicide Resistant Weeds

<http://www.weedscience.org>

Εικόνα 13: *Iowa State University, Digital Repository*

<http://lib.dr.iastate.edu>

Εικόνα 11: *National Center for Biotechnology Information, Blast Database*

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Πίνακας 2: *Invasive Species Compendium*

<https://www.cabi.org/isc/datasheet/31167#None>