

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΥ
ΜΥΚΗΤΑ *BOTRYTIS CINEREA* ΣΕ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ ΤΗΣ
ΟΜΑΔΑΣ ΒΕΝΖΙΜΙΔΑΖΟΛΙΚΩΝ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ BOSCALID
ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΑΠΟ ΤΗΝ
ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΚΡΗΤΗΣ



ΜΑΛΑΓΑΡΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΟΛΟΣ 2014

Η πτυχιακή αυτή εργασία αφιερώνεται στους γονείς μου, που με στήριξαν τόσα χρόνια στις σπουδές και μου παρείχαν πάντα, όλα όσα μου χρειαζόνταν, ώστε να παρακολουθώ απρόσκοπτα τα μαθήματα μου. Θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Κο Ευάγγελο Βέλλιο , για την ανάθεση της εργασίας, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθώς και για τις γνώσεις που απέκτησα στο διάστημα της συνεργασίας μας. Επίσης να ευχαριστήσω τον Κο Γούναρη και τον Κο Τσιρόπουλο, μέλη της τριμελούς επιτροπής, οι οποίοι αφιέρωσαν χρόνο για την ορθή αξιολόγηση της συγκεκριμένης εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κο Χατζιδημόπουλο για την καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και για την πολύτιμη βοήθειά του.

Πίνακας περιεχομένων

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1.1	ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ	7
1.1.2	Εδαφοκλιματολογικές συνθήκες	8
1.1.3	ΤΕΦΡΑ ΣΗΨΗ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ- <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	10
1.1.4	ΤΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ-ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ.....	11
1.1.5	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ <i>Botrytis cinerea</i>	14
1.1.6	ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ.....	16
1.1.7	ΜΕΘΟΔΟΣ HRM (HIGH RESOLUTION MELT) ΚΑΙ HRMA (HIGH RESOLUTION MELT ANALYSIS)	24
1.1.8	BOTY-FLIPPER, ΤΑ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	26
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	34
3.1.1	Αποτελέσματα HRM αναφορικά με την ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά. 34	
3.1.2	Αποτελέσματα HRM αναφορικά με την ανθεκτικότητα στο boscalid	35
3.1.3	Αποτελέσματα PCR αναφορικά με την ύπαρξη των μεταθετών στοιχείων BOTY-FLIPPER	39
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	45

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενός εύχρηστου στην εφαρμογή πρωτοκόλλου και παράλληλα χαμηλού κόστους για τον καθορισμό και τη μελέτη γενετικών μεταλλάξεων με μεγάλη ακρίβεια σε φυτοπαθογόνα. Η συγκεκριμένη εργασία χωρίζεται σε δύο σκέλη. Το πρώτο σκέλος περιλαμβάνει τη μελέτη των μεταλλάξεων από δείγματα *Botrytis cinerea* με τη βοήθεια της HRM και HRM Analysis, από θερμοκηπιακή καλλιέργεια τομάτας από το νησί της Κρήτης. Στην προκειμένη περίπτωση ελέγχθηκαν μεταλλάξεις σε βενζιμιδαζολικά και boscalid καθώς υπήρχαν συγκρίσιμα αποτελέσματα από προηγούμενες παρατηρήσεις από μονόσπορες καλλιέργειες *Botrytis cinerea* που λήφθηκαν από άλλες περιοχές της Ελλάδας. Η HRM αποτελεί μία καινούρια μέθοδος PCR εύκολη, γρήγορη η οποία μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα, ενώ επίσης μπορεί να έχει εφαρμογές στο χώρο της ποιότητας τροφίμων.

Το δεύτερο σκέλος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η μελέτη των μεταθετών στοιχείων Boty- Fliper, τα οποία έχουν εντοπιστεί σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας και σε ένα μεγάλο αριθμό ξενιστών. Η παρουσία ή η απουσία των στοιχείων αυτών, έχει συνδεθεί με την ανθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα καθώς επίσης συνδέεται και με τη μορφολογία του παθογόνου μύκητα.

Το συγκεκριμένο φυτοπαθογόνο παρουσιάζει μία γενετική παραλλακτικότητα και πλαστικότητα, ενώ επίσης ο σύντομος βιολογικός του κύκλος, η σποριοποίηση, σύντομος βιολογικός κύκλος καθώς και το μεγάλο εύρος ξενιστών το καταστούν πρώτο στη λίστα των παθογόνων υψηλών κινδύνου. Η ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα είναι η σταθερή και κληρονομούμενη προσαρμογή του μύκητα στο μυκητοκτόνο, που έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ευαισθησία του μύκητα στο μυκητοκτόνο. Η ανθεκτικότητα μπορεί να προέρχεται από μετάλλαξη ενός γονιδίου ή πολλών. Οι ανθεκτικές απομονώσεις προκύπτουν σε πολύ χαμηλές συχνότητες και δεν μπορούν να ελεγχθούν ή να παρεμποδιστούν από τις εγκεκριμένες δόσεις εφαρμογής του μυκητοκτόνου. Επειδή οι συνεχείς εφαρμογές του μυκητοκτόνου, καταπολεμούν μόνο τις ευαίσθητες απομονώσεις, ενώ οι ανθεκτικές καθίστανται κυρίαρχες στο πληθυσμό του παθογόνου και το τελικό αποτέλεσμα που προκύπτει είναι αποτυχίες στην καταπολέμηση της ασθένειας (Elad, 2007)

1.1.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ

1.1.1.1 Βοτανικοί χαρακτήρες

Η γνωστή σε όλους μας τομάτα, *Lycopersicon esculentum*, ανήκει στην οικογένεια *Solanaceae*, στην οποία ανήκουν η πατάτα, η μελιτζάνα, η πιπεριά, ο καπνός, η μελαντόνα και ένας μεγάλος αριθμός αυτοφυών φυτών. Ο βιολογικός κύκλος της τομάτας, εξαρτάται πρωτίστως από τις κλιματολογικές συνθήκες και κατά δεύτερον από την ποικιλία. Στις τροπικές χώρες είναι πολυετής και στην Ευρώπη μονοετής καλλιέργεια με διάρκεια 5-7 μήνες. Ευνοϊκές θερμοκρασίες για την τομάτα είναι 18°-27 °C, αλλά αντέχει σε θερμοκρασίες 12°-38 °C(Κομνάκου, 2000).

1.1.1.2 Ρίζα, βλαστός, φύλλα

Το ριζικό σύστημα αναπτύσσεται ανάλογα με την πρακτική της καλλιέργειας. Σε επιτόπου σπορά το ριζικό σύστημα των φυτών προχωρεί σε βάθος και η αύξηση μπορεί να φτάσει τα 2-3 εκ. ημερησίως ενώ στη μεταφύτευση το ριζικό σύστημα αναπτύσσεται πλάγια και όχι σε βάθος.

Το στέλεχος του φυτού της τομάτας προχωρεί σε ύψος. Πάνω στο στέλεχος αναπτύσσονται τα φύλλα εναλλάξ. Το φυτό της τομάτας μπορεί να έχει φύλλα σύνθετα και μπορεί να είναι 7-9 και πολλές φορές φέρει 11 απλά φύλλα. Τα χαρακτηριστικά των φύλλων προσδιορίζονται από την ποικιλία της τομάτας και διαφοροποιούνται ανάλογα με τις κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες καθώς και από τις καλλιεργητικές πρακτικές (Κομνάκου, 2000).

Στη μασχάλη κάθε φύλλου αναπτύσσεται ένας βλαστός που εξελίσσεται σε κανονικό στέλεχος με φύλλα, άνθη και καρπούς. Η αφαίρεση των βλαστών των πρώτων φύλλων του στελέχους των φυτών της τομάτας επηρεάζει θετικά την ανάπτυξη του φυτού σε ύψος ενώ το τελικό ύψος του φυτού προσδιορίζεται στα πλαίσια των κληρονομικών χαρακτηριστικών της ποικιλίας της τομάτας. Όλα τα πράσινα μέρη του φυτού της τομάτας καλύπτονται από τριχίδια που αφήνουν μια χαρακτηριστική οσμή (Κομνάκου, 2000).

1.1.1.3 Άνθη

Η ταξιανθία μπορεί να είναι απλή, διχαλωτή ή διακλαδισμένη. Η άνθηση δεν

γίνεται ταυτόχρονα , εκτός ορισμένων ποικιλιών μηχανοσυλλογής που γίνεται σχεδόν στην ίδια χρονική περίοδο. Τα άνθη φέρουν 5 πέταλα, 5 στήμονες, ωοθήκη, στύλο και στίγμα . Είναι ερμαφρόδιτα και αυτογονιμοποιούμενα. Σταυρογονιμοποίηση συμβαίνει σπάνια. Η γονιμοποίηση επηρεάζεται σημαντικά από τις καιρικές συνθήκες, όπως τη βροχή, τον αέρα, τη χαμηλή θερμοκρασία, κάτω από 12 °C και πάνω από 36 °C και από την παθολογική κατάσταση του άνθους. Μετά τη γονιμοποίηση η ανάπτυξη και ωρίμανση του καρπού γίνεται στις 45-60 ημέρες, ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες (Κομνάκου, 2000).

1.1.1.4 Καρπός

Ο καρπός της τομάτας είναι ράγα χρώματος κόκκινου, ρόδινου ή κίτρινου και χωρίζεται σε 4-10 χώρους και αποτελείται από το φλοιό, τη σάρκα, τους ιστούς και τους σπόρους.

Το πάχος του φλοιού αυξάνει κατά το πρώτο στάδιο της ανάπτυξης του καρπού και στη συνέχεια μειώνει σε πάχος και απλώνει κατά το στάδιο της ωρίμανσης. Η σάρκα σχηματίζεται στους χώρους των κελιών ενώ διαφοροποιείται ανάλογα με την ποικιλία, είναι πλούσια σε χυμό, ο οποίος χρησιμοποιείται στη μεταποίηση από τις βιομηχανίες κονσερβών. Οι σπόροι βρίσκονται μέσα στους χώρους με μία ζελατινώδη κάλυψη ενώ ο αριθμός είναι ανάλογος με την ποικιλία. Οι ώριμοι σπόροι έχουν σχήμα ωοειδές και είναι πλευρικά πεπιεσμένοι. Το μήκος του σπόρου κυμαίνεται από 3-5 χιλ. και το πλάτος 2-4 χιλ. Ο χρωματισμός των καρπών της τομάτας οφείλεται στην καροτίνη (προσδίδει κίτρινο χρώμα) και την λικοπίνη (προσδίδει κόκκινο χρώμα) και επηρεάζεται από τη σχέση των χρωστικών αυτών και της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος. Η καλύτερη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του κόκκινου χρώματος είναι 18 °-25 °C (Κομνάκου, 2000).

1.1.2 Εδαφοκλιματολογικές συνθήκες

1.1.2.1 Έδαφος

Η τομάτα μπορεί να καλλιεργηθεί σε όλα σχεδόν τα εδάφη αλλά προτιμά εδάφη μέσης σύστασης, ελαφρά, βαθιά, γόνιμα και με καλή στράγγιση.

Καλύτερες αποδόσεις επιτυγχάνονται σε εδάφη που το pH είναι ελαφρά όξινο ή

ουδέτερο 5.8-6.7, ενώ η παραγωγή σε πολύ αλκαλικά ή όξινα εδάφη δυσκολεύει τη βλάστηση των φυτών. Σε χαμηλό pH ελαττώνεται η αφομοίωση του φωσφόρου και δημιουργούνται τροφοπενίες Ca, Mg και K, ενώ σε πολύ υψηλό pH σημειώνεται έλλειψη σιδήρου και μαγγανίου.

Η περιεκτικότητα σε χούμο του εδάφους επηρεάζει την απόδοση και την ποιότητα της καλλιέργειας θετικά. Η κοπριά (2-3 τόνοι ανά στρέμμα) ή τα οργανικά λιπάσματα, βοηθούν την καλλιέργεια (Κομνάκου, 2000).

Η υγρασία πρέπει να είναι κανονική για την ιδανική ανάπτυξη και απόδοση των φυτών. Η υπερβολική υγρασία του εδάφους επιδρά δυσμενώς στην ανάπτυξη των φυτών και ευνοεί την εμφάνιση μυκητολογικών ασθενειών. Παρατεταμένη έλλειψη υγρασίας μπορεί να επιφέρει ξήρανση.

Η φυσική σύσταση του εδάφους συνδέεται με το βαθμό συγκράτησης της υγρασίας και το ποσοστό του διαθέσιμου για τα φυτά νερού. Οι τρεις σταθερές που προσδιορίζουν την υγρασία του εδάφους είναι το ισοδύναμο υγρασία, το σημείο μάρανσης και η διαθέσιμη υγρασία του εδάφους (Κομνάκου, 2000).

Η άρδευση του χωραφιού μπορεί να γίνει με ελεύθερη ροή σε αυλάκια, με τεχνητή βροχή, που πρέπει να γίνεται πρωινές ώρες, για να στεγνώνουν τα φυτά κατά τη διάρκεια της ημέρας ή με στάγδην άρδευση με ειδικούς σταλακτήρες (Κομνάκου, 2000).

1.1.2.2 Κλίμα

Η θερμοκρασία είναι σημαντικός παράγοντας για τη φυσιολογική και παραγωγική εξέλιξη των φυτών. Το φύτευμα των σπόρων επιτυγχάνεται με θερμοκρασία εδάφους 18 °C -24 °C ενώ θερμοκρασίες 10-18 °C καθυστερούν την ανάπτυξη. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης είναι 21-24 °C. Θερμοκρασίες κάτω από τους 12 °C κατά τη διάρκεια της νύχτας και πάνω από 38 °C κατά τη διάρκεια της ημέρας για πολλές ώρες δυσκολεύουν τη γονιμοποίηση (Κομνάκου, 2000).

Το τμήμα των καρπών το οποίο είναι εκτεθειμένο στον ήλιο να παίρνει χρώμα ωχρό, πορτοκαλί και σε ορισμένες περιπτώσεις, κίτρινο, με ανάλογη διαφοροποίηση στο χρώμα, γέυση και της σάρκας του καρπού (Κομνάκου, 2000).

1.1.2.3 Λίπανση

Τα βασικά λιπαντικά στοιχεία είναι το άζωτο (N) , ο φώσφορος (P₂O₅) και το κάλιο (K₂O). Η υπερβολική λίπανση μπορεί να επιδράσει αρνητικά στην ανάπτυξη των φυτών και στην ποιότητα του προϊόντος (Κομνάκου, 2000).

Σε μικρή ποσότητα τα ιχνοστοιχεία επιδρούν στις διεργασίες των λιπαντικών στοιχείων για την κανονική ανάπτυξη και παραγωγή των φυτών της τομάτας.

Αυτά είναι το Μαγνήσιο (MgO), το Βόριο (B), το Μαγγάνιο (Mn), ο ψευδάργυρος (Zn) κ.α. Η έλλειψη των ιχνοστοιχείων μπορεί να είναι επιφέρει τροφопενίες στα φυτά και να έχει αντίκτυπο στην εμπορική αξία του προϊόντος (Κομνάκου, 2000)

..

1.1.3 ΤΕΦΡΑ ΣΗΨΗ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ- *BOTRYTIS CINEREA*

Ο *Botrytis cinerea* αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για τις θερμοκηπιακές καλλιέργειες καθώς μπορεί να επιφέρει σημαντική μείωση στην ποιοτική και εμπορική αξία των προϊόντων. Οι θερμοκηπιακές καλλιέργειες λαχανικών στο νησί της Κρήτης είναι εντατικές και έχουν ιδιαίτερη σημασία για την οικονομία του νησιού. Τα θερμοκήπια είναι μη θερμαινόμενα και κάθε χρόνο παρατηρείται κατά τους χειμερινούς μήνες, η γνωστή σε όλους, «τεφρά σήψη» που οφείλεται στο φυτοπαθογόνο *Botrytis cinerea*. (Myresiotis et al., 2007)

1.1.3.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* (τέλεια μορφή *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) προσβάλλει περισσότερα από 200 διαφορετικά φυτικά είδη σε όλο τον κόσμο. Ταξινομικά το είδος *B. fuckeliana* ανήκει στην οικογένεια *Sclerotiniaceae*, της κλάσης *Leotiomycetes*, του φύλου *Ascomycota*. Το μυκήλιο του μύκητα όταν είναι νεαρό είναι υαλόχρωο ενώ το παλιό είναι γκρίζο και διογκωμένο κοντά στα septa. Οι κονιδιοφόροι έχουν χρώμα τεφρό, είναι επιμήκεις και διακλαδίζονται όπως ο βότρυς. Στην άκρη των διακλαδώσεων σχηματίζονται τα κονίδια. Τα κονίδια έχουν σχήμα ωοειδές ή σφαιρικό , χρώμα τεφρό ή υαλώδες κι είναι μονοκύτταρα με διαστάσεις 9,7-11,1 x 7,3-8 μm. Όταν οι κονιδιοφόροι ωριμάσουν απελευθερώνουν τα κονίδια με ένα απλό τίναγμα, τα οποία ως ξηροσπόρια που είναι, μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις με τη βοήθεια του ανέμου ή με σταγόνες νερού. Ο *B. cinerea* σχηματίζει πάνω ή μέσα στους ιστούς του ξενιστή, τα σκληρώτια, τα οποία είναι σκληρά, ανθεκτικά χρώματος καφέ ή μαύρου και σχήματος

στρογγυλού ή ακανόνιστου. Το εσωτερικό τους είναι ανοιχτότερου χρώματος και αποτελείται από πυκνή μάζα υφών του μύκητα. Το μέγεθος τους είναι μεγαλύτερο από 3mm στο μήκος, στις πλείστες των περιπτώσεων 5mm και μέγιστο μέγεθος είναι τα 10mm. Τα σκληρώτια κάτω από ευνοϊκές συνθήκες είναι συνήθως μικρά και λεπτά και όταν βλαστάνουν δίνουν μυκήλιο ή κονιδιοφόρους. Πολύ σπάνια όμως κάτω από ειδικές συνθήκες μπορούν να δώσουν τα αποθήκια που είναι εγγενής καρποφορίες του μύκητα. Τα αποθήκια έχουν χρώμα καστανό και σχήμα κυπέλλου με μίσχο. Πάνω σε αυτά υπάρχουν οι ασκοί, οι οποίοι είναι κυλινδρικοί έως ωοειδής, συχνά ανακατεμένοι με παραφύσεις. Τα ασκοσπόρια έχουν σχήμα ωοειδές και ελευθερώνονται βίαια από τους ασκούς (Elad, Y., 2007).

Άλλα όργανα του μύκητα είναι τα απρεσσόρια τα οποία δημιουργούνται καμιά φορά από τα βλαστάνοντα κονίδια, στην επιφάνεια του φυτού ξενιστή. Όταν η επιφάνεια του ξενιστή είναι μαλακή τότε δεν σχηματίζονται απρεσσόρια. Η μορφή τους ποικίλει από διογκωμένες έως πολυδιακλαδισμένες άκρες στις βλαστικές υφές. Αυτοί οι σχηματισμοί δημιουργούνται από επαναλαμβανόμενη διχοτομική διακλάδωση των ακρών των υφών (Elad, Y., 2007)

1.1.4 ΤΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ-ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Η είσοδος του παθογόνου γίνεται διαμέσου γερασμένων ή ώριμων ιστών δικοτυλήδονων φυτών και παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση για σημαντική χρονική περίοδο, έως ότου οι συνθήκες του περιβάλλοντος και η φυσιολογία του ξενιστή αλλάξουν, συμβάλλοντας στην ταχύτατη σήψη των ιστών (Williamson et al., 2007). Πολλές φορές σοβαρές απώλειες συμβαίνουν λόγω μετασυλλεκτικών σήψεων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και μεταφοράς των προϊόντων. Επίσης ο *B. cinerea* μπορεί να προκαλέσει μαζικές απώλειες παραγωγής σε καλλιέργειες κηπευτικών τόσο στον αγρό όσο και σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες, πριν τη συγκομιδή ή ακόμα και σε νεαρά φυτά (Williamson et al., 2007). Είναι σε ενεργή μορφή ακόμη και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες όπως στους 0 °C και γι' αυτό μπορεί να προκαλέσει ζημιές σε αποθηκευμένα προϊόντα. Οι προσβολές εκδηλώνονται με τη μορφή σήψης, σε υπέργεια τμήματα των φυτών που προσβάλλει, καθώς επίσης μπορεί να εκδηλωθεί και στο λαιμό διάφορων κηπευτικών με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της υγιούς φυλλικής επιφάνειας. Σημαντικές απώλειες επίσης προκαλεί σε σπόρους, βολβούς και σε πολλαπλασιαστικό υλικό

(Elad et al., 2007). Τα συμπτώματα εκδηλώνονται με αποδιοργάνωση της σάρκας του καρπού, μαλακή σήψη και σποριοποίηση ή ανάπτυξη μυκηλίου σε ένα άκρο του καρπού (Michailides and Elmer, 2000). Στους προσβεβλημένους καρπούς μπορούμε να παρατηρήσουμε ανάπτυξη γκριζόλευκου μυκηλίου, κονιδιοφόρους με κονίδια και σκληρώτια. Σχηματισμός σκληρωτίων μπορεί να παρατηρηθεί τόσο στους καρπούς όσο και σε άλλα όργανα (Elad, Y., 2007).

1.1.4.1 ΛΑΙΜΟΣ

Οι πρώτες προσβολές εμφανίζονται συνήθως στο λαιμό των νεαρών φυταρίων του σπορείου. Οι προσβεβλημένοι ιστοί μαλακώνουν και συρρικνώνονται. Παρατηρείται ξηρό έλκος στο λαιμό του φυταρίου, χρώματος μπεζ, που καλύπτεται από γκριζό χνουδί. Οι ιστοί νεκρώνονται και καλύπτονται τελείως από την εξάνθηση του μύκητα. Η μόλυνση μπορεί να επιφέρει μέχρι και ξήρανση των φυτών ενώ σπάνια παρατηρούνται προσβολές πάνω από το λαιμό του φυταρίου. Σε νεαρά φυτά τα συμπτώματα είναι παρόμοια με αυτών των φυταρίων. Τα φυτά εμφανίζουν μαλακό, αφυδατωμένο και συρρικνωμένο λαιμό χρώματος καστανού και τελικά νεκρώνονται (Παναγόπουλος, 1995).

1.1.4.2 ΑΝΘΗ

Πρώτα προσβάλλονται τα σέπαλα και πολύ σύντομα ολόκληρο το άνθος. Η μόλυνση του άνθους επεκτείνεται σε όλη την ταξιανθία αλλά και στον κεντρικό βλαστό του φυτού. Το άνθος το οποίο έχει μολυνθεί αποκτά ένα χρυσοκάστανο χρώμα και νεκρώνεται (Παναγόπουλος, 1995)..

1.1.4.3 ΚΑΡΠΟΙ

Η μόλυνση στους καρπούς συνήθως ξεκινά από τα νεκρά υπολείμματα του άνθους, τα σέπαλα και τα πέταλα, αλλά και από το σημείο πρόσφυσης του ποδίσκου στον καρπό. Συχνά όμως η προσβολή μπορεί να αρχίσει από το σημείο επαφής δύο καρπών ενώ σπανιότερα από πληγές της επιδερμίδας του καρπού (Elad, Y., 2007)..

Ο *B. cinerea* προκαλεί στους καρπούς τυπικές σήψεις. Αρχικά εμφανίζονται κηλίδες ανοιχτού πράσινου χρώματος που εξελίσσονται σε καστανές. Οι ιστοί του γίνονται μαλακοί και παρατηρείται πυκνή, τεφρού χρώματος εξάνθηση του μύκητα. Η μόλυνση μπορεί να προχωρήσει και να οδηγήσει ακόμη και σε πτώση των καρπών.

Ένα άλλο σύμπτωμα το οποίο εμφανίζεται στους καρπούς της τομάτας είναι οι κηλίδες φάντασμα (ghost spots). Οι κηλίδες φάντασμα είναι λευκοπράσινοι δακτύλιοι που εμφανίζονται στην επιφάνεια των πράσινων καρπών και έχουν διάμετρο 3-8mm ενώ μερικές φορές μπορεί να συνενωθούν. Σε ώριμους καρπούς έχουν κίτρινη απόχρωση. Οι κηλίδες αυτές αν και δεν προκαλούν σήψη μειώνουν την εμπορική αξία του προϊόντος και περιορίζουν την εμπορευσιμότητα του (Βελούκας Θ., 2011)..

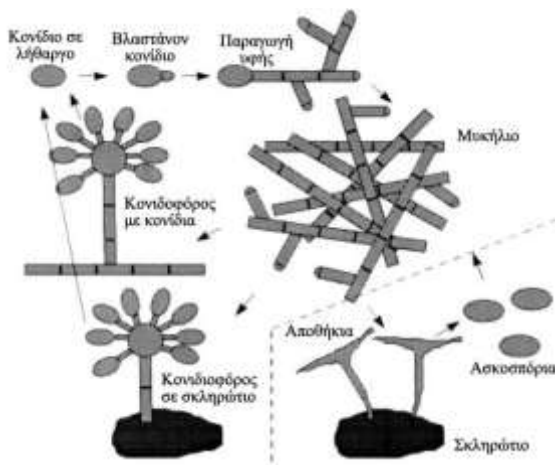
1.1.4.4 ΦΥΛΛΑ

Οι προσβολές αρχίζουν από γηρασμένους ιστούς ή από τραύματα. Αν προσβληθεί κάποιο φυλλίδιο η προσβολή επεκτείνεται και στα υπόλοιπα φυλλίδια του σύνθετου φύλλου, στο μίσχο και από εκεί στο στέλεχος του φυτού. Αρχικά εμφανίζεται σαν κηλίδα η οποία έχει ανοιχτό πράσινο χρώμα ενώ αργότερα αποκτά πρασινοκίτρινο χρώμα, οι ιστοί μαλακώνουν και σαπίζουν. Συχνά παρατηρείται η εξάνθηση του μύκητα (Παναγόπουλος, 1995)..

1.1.4.5 ΣΤΕΛΕΧΟΣ

Στο σημείο της προσβολής του στελέχους παρατηρείται έλκος καστανού χρώματος και επεκτείνεται σταδιακά κατά μήκος και γύρω από τον βλαστό. Μία γκρίζα εξάνθηση καλύπτει το προσβεβλημένο σημείο, περιβάλλει ολόκληρο το βλαστό και νεκρώνει το υπερκείμενο κομμάτι του φυτού. Ανάλογα με το ύψος στο οποίο εμφανίζεται η κηλίδα το φυτό μπορεί να ξεραθεί τελείως, το μισό ή μόνο η κορυφή του. Οι κηλίδες συχνά έχουν ομόκεντρους κύκλους και αυτό οφείλεται στις απότομες διακυμάνσεις της υγρασίας. Συχνά συγχέεται με την αλτερναρίωση (*Alternaria solani*), όμως οι κηλίδες της τεφράς σήψης βρίσκονται σε φύλλα κάθε ηλικίας και έχουν γκρίζο χρώμα ενώ αυτές της αλτερναρίωσης μόνο σε παλιά και έχουν καστανό χρώμα. Γερασμένοι βλαστοί είναι λιγότερο ανθεκτικοί σε προσβολές του μύκητα σε σύγκριση με νεότερους βλαστούς (Παναγόπουλος, 1995).

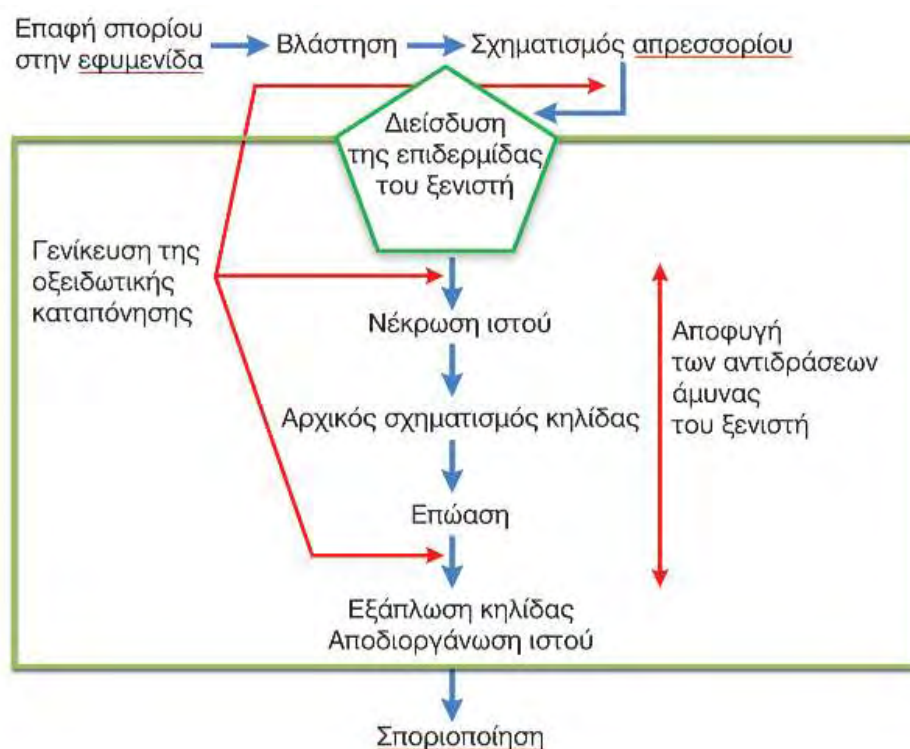
1.1.5 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ *Botrytis cinerea*



Εικόνα 1. Κύκλος ασθένειας του Βοτρύτη.

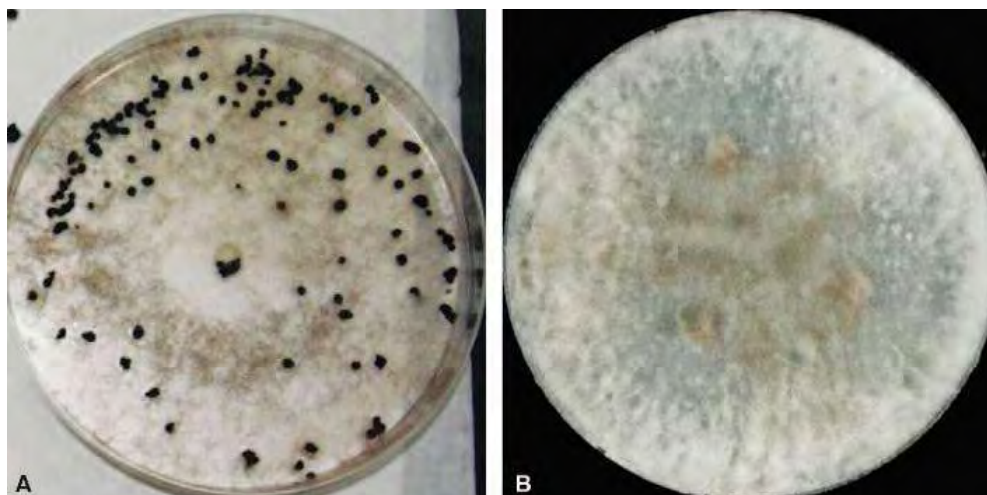
Ο βιολογικός κύκλος του *B. cinerea*, ξεκινά με την μεταφορά και την προσκόλληση ενός κονιδίου στην επιφάνεια της εφυμενίδας του ξενιστή. Μετά την προσκόλληση, το κονίδιο βλαστάνει στην επιφάνεια των ιστών και σχηματίζει βλαστικό σωλήνα, ο οποίος λίγο πριν την είσοδό του στον ιστό διαφοροποιείται σε απρεσόριο και στην συνέχεια εισέρχεται στον ιστό του ξενιστή. Τα γειτονικά κύτταρα νεκρώνονται και εμφανίζεται έτσι νεκρωτική κηλίδα. Σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρείται μία λανθάνουσα περίοδος κατά την οποία δεν παρατηρείται εξάπλωση του μύκητα και αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό των ξενιστών που μολύνονται στο στάδιο της ανθοφορίας. Κατά τη διαδικασία προσκόλλησης του κονιδίου στο φυτικό ιστό, διακρίνονται δύο στάδια, όπου στο πρώτο γίνεται η εφύγρανση του κονιδίου και αναπτύσσονται υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επιφανείας του κονιδίου και του ξενιστή. Μετά το πρώτο στάδιο, η κορυφή του βλαστικού σωλήνα καλύπτεται από ένα είδος εξωκυτταρικών λεπτών ινιδίων με αποικοδομητικά ένζυμα του μύκητα, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες που προστατεύουν την υφή μόλυνσης από

την υδρόλυση και τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή (Βελούκας Θ., 2011).



Εικόνα 2. Απεικόνιση διαφορετικών σταδίων της διαδικασίας μόλυνσης του *Botrytis cinerea*.

Η επιτυχία της μόλυνσης απαιτεί παρουσία νερού ή υψηλής σχετικής υγρασίας, θρεπτικών στοιχείων. Τα σκληρώτια αναπτύσσονται στους νεκρούς ιστούς του ξενιστή και βοηθούν στην επιβίωση του μύκητα. Διαφέρουν ως προς το μέγεθος και δεν είναι εμφανή σε πολλές ευαίσθητες καλλιέργειες .



Εικόνα 3. Σχηματισμός σκληρωτίων (Α) και μυκηλίου (Β) του *Botrytis cinerea* σε υπόστρωμα PDA. (Βελούκας Θ., 2011) Η βλάστηση των σκληρωτίων στις εύκρατες ζώνες ξεκινά νωρίς την άνοιξη, παράγοντας κονιδιοφόρους με κονίδια, τα οποία αποτελούν και την πρωταρχική πηγή μόλυσματος. Προσβεβλημένοι νεκροί ιστοί, υπολείμματα καλλιεργειών, μουμιοποιημένοι καρποί μπορούν να αποτελέσουν εστία μόλυσματος.

Η παραγωγή και η διασπορά των κονιδίων κατά τη διάρκεια της ημέρας, ρυθμίζεται από τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και υγρασίας. Όταν τα κονίδια βρεθούν σε νερό, η βλάστηση τους στους 22 °C ξεκινά μετά από 4 ώρες επώασης. Το 50% των κονιδίων βλαστάνει μετά από 7 ώρες και το 95% στις 11 ώρες (Βελούκας Θ., 2011) .

Τα κονίδια στις κονιδιοφόρους μεταφέρονται με τη βοήθεια του ανέμου ή του νερού, μολύνοντας έτσι τους ξενιστές. Η μόλυνση ξεκινάει από τις βλαστικές υφές των κονιδίων που είτε διαχειμάσαν σαπροφυτικά είτε αναπτύχθηκαν πάνω σε σκληρώτια. Αναπτύσσεται νέο μυκήλιο το οποίο με τη σειρά του θα δώσει νέους κονιδιοφόρους ή σκληρώτια (Βελούκας Θ., 2011) .

Στους 20 °C η βλάστηση των κονιδίων γίνεται σε 5 ώρες, η προσβολή του ξενιστή από το παθογόνο επιτυγχάνεται σε 15 ώρες κι η ανάπτυξη του μυκηλίου και η παραγωγή των σπορίων του μύκητα πραγματοποιούνται σε 75 ώρες. (Βελούκας Θ., 2011)

1.1.6 ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ

Πέρα από τα προστατευτικά μυκητοκτόνα με πολυθεσικό τρόπο δράσης, υπάρχουν μυκητοκτόνα με εξειδικευμένο βιοχημικό τρόπο δράσης τα οποία είναι τα εξής:

- 1) Βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα (Παρεμποδιστές της μιτωτικής διαίρεσης),
- 2) Δικαρβοξαμιδικά μυκητοκτόνα (Επιδρούν στη δομή και λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών),
- 3) Ανιλινοπυριμιδίνες (Αναστολείς βιοσύνθεσης αμινοξέων),
- 4) Παρεμποδιστές της απομεθυλίωσης του C-14 (Demethylation inhibitors - DMIs) και το υδροξυανιλίδιο fenhexamid,
- 5) Μυκητοκτόνα που επιδρούν στην αναπνοή του μύκητα και μπορούν να διαχωριστούν σε
 - Παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας (Quinone outside inhibitors- Qois),
 - Παρεμποδιστές του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας και

- Αποδεσμευτές της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης από τη σύνθεση του ATP – Αρυλαμιδοπυριμιδίνες, και 6) φαινυλοπυρρόλια (Παρεμποδιστές της μετάδοσης μηνυμάτων) (Μουρκίδου – Παπαδοπούλου, 2008).

Τα πρώτα διασυστηματικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα βενζιμιδαζολικά, τα οποία δεν έχουν επίδραση στη βλάστηση των σπορίων αλλά παρεμποδίζουν την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα. Παρεμβαίνουν στον πολυμερισμό της τουμπουλίνης παρεμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό της ατράκτου και αυτός είναι ο λόγος που θεωρούνται αναστολείς της μίτωσης.

Το carpendazim παρεμποδίζει την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα. Εισερχόμενο στον πυρήνα του κυττάρου προσδένεται στη β- υπομονάδα της τουμπουλίνης εμποδίζοντας έτσι τον διμερισμό των υπομονάδων α και β. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μην σχηματίζεται λειτουργική μονάδα τουμπουλίνης. Τα ανθεκτικά στελέχη του *B. cinerea*, έχουν μεταλλαγμένες β- υπομονάδες με μειωμένη έλξη στα βενζιμιδαζολικά (Μουρκίδου – Παπαδοπούλου, 2008).



Εικόνα 5. Χημικές δομές μυκητοκτόνων της ομάδας των βενζιμιδαζολικών.

Η χρήση των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων, τα οποία είναι μεταλλαξογόνα, οδήγησε στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του *B. cinerea*. Στελέχη του *B. cinerea* που είναι ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά παρατηρούνται ακόμα, παρά το γεγονός ότι η χρήση των σκευασμάτων αυτών έχει περιοριστεί σημαντικά και έχουν αντικατασταθεί με άλλα βοτρυδιοκτόνα.

Οι παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDHis) ή καρβοξαμίδικά μηκυτοκτόνα παρείχαν νέες δυνατότητες στην αντιμετώπιση του παθογόνου *Botrytis cinerea*. Το boscalid παρεμποδίζει την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα και τη βλάστηση των σπορίων ενώ απορροφάται άμεσα από τα φύλλα και μεταφέρεται με το αγωγό σύστημα του φυτού. Πολλές φορές εφαρμόζεται σε μείγμα με pyraclostrobin, το οποίο είναι παρεμποδιστή του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας (Qoi), διευρύνοντας έτσι το φάσμα δράσης του σκευάσματος (Σαμουήλ, 2011)

1.1.6.1 Βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα (Παρεμποδιστές της μιτωτικής διαίρεσης)

Είναι τα παράγωγα της βενζιμιδαζόλης (benzimidazole). Το benomyl και ο μεταβολίτης αυτού το carbendazim ήταν το πρώτο διασυστηματικό μυκητοκτόνο με εξειδικευμένο μηχανισμό δράσης. Ανθεκτικά στελέχη εμφανίστηκαν σε πολλές περιοχές του κόσμου και σχετικά νωρίς με συνέπεια τα βενζιμιδαζολικά να χάσουν την αποτελεσματικότητά τους (Elad, 2007).

Ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα έχει αναφερθεί σε πολλά είδη μυκήτων και στις περισσότερες περιπτώσεις η ανθεκτικότητα σχετιζόταν με σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο της β-τουμπουλίνης, με αποτέλεσμα την αλλαγή της αλληλουχίας των αμινοξέων στη θέση πρόσδεσης των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων. Τα στελέχη του *B. cinerea* που παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε βενζιμιδαζολικά μηκυτοκτόνα έφεραν μεταλλάξεις στις θέσεις 198 και 200 του γονιδίου της β- τουμπουλίνης. Πιο συγκεκριμένα έχουν βρεθεί 3 τύποι στελεχών που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα : τα στελέχη που έφεραν την μετάλλαξη E198A, παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα στο carbendazim. Τα στελέχη που έφεραν την μετάλλαξη F200Y παρουσίασαν μέτρια ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά , ενώ τα στελέχη με τη μετάλλαξη E198K παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά. Τα τρία αυτά στελέχη παρουσιάζουν επίσης διαφορές και στους φαινότυπους τους.

Τα στελέχη με τις μεταλλάξεις F200Y και E198K παρουσίασαν διπλή ανθεκτικότητα σε carbendazim και diethofencarb (Σαμουήλ, 2011).

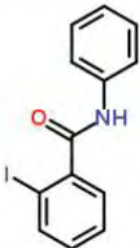
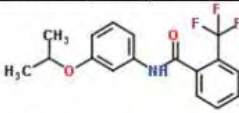
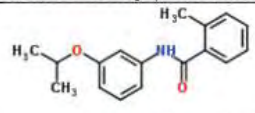
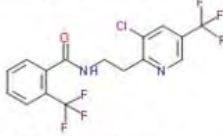
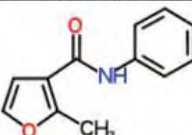
1.1.6.2 Καρβοξαμιδία- παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDHIS)

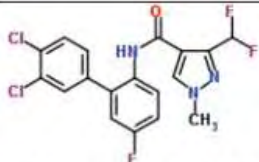
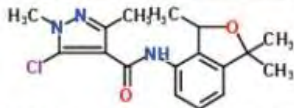
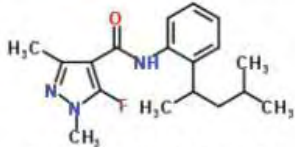
Αρχικά τα καρβοξαμιδικά χρησιμοποιήθηκαν σαν επενδυτικά σπόρων σιτηρών, βαμβακιού και πατάτας. Το 2003 εμφανίστηκε στην αγορά το boscalid, που ανήκει στα καρβοξαμιδικά νέας γενιάς και ακολούθησαν τα penhiopyrad, penflufen, bixafen, fluxapyroxad, sedaxane, fluopyram και isopyrazam. Τα σκευάσματα αυτά παρουσιάζουν βιολογική δράση εναντίον Βασιδιομηκύτων, Ασκομηκύτων καθώς και Ατελών μηκύτων. (Bardas et al., 2010)

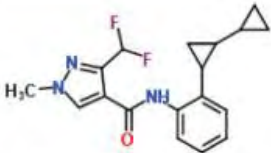
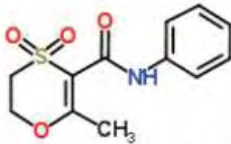
Τα SDHis (Succinate Dextrohydrogenase inhibitors)- παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος παρεμποδίζουν την λειτουργία της sdh στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων ή σύμπλοκο II ή σύμπλοκο της “αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος” ή “αναγωγή του ηλεκτρικού –UQ”. Για το boscalid έχει αναφερθεί ότι παρεμποδίζει τη βλάστηση των σπορίων καθώς επίσης και την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα. (Bardas et al., 2010)

Η διεύριση του φάσματος της βιολογικής δράσης έγκειται στην αντικατάσταση του 1,4-οξαθειϊνικού δακτυλίου με ένα πυριδινικό τμήμα με ταυτόχρονη εισαγωγή φαινυλικής ομάδας στη 2' θέση του ανιλινικού δακτυλίου. Τα καρβοξαμιδικά νέας γενιάς περιέχουν πυριδινικό ή πυραζολικό δακτύλιο αζώτου που αυξάνει την συγγένεια πρόσδεσης μέσω π-π αλληλεπιδράσεων καθώς επίσης συμβάλλονται περισσότεροι δεσμοί υδρογόνου.

Έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα στο boscalid σε απομονώσεις του *B. cinerea* σε ένα πλήθος ξενιστών. Διαπιστώθηκε ότι μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τις μονάδες της sdh είναι υπαίτιες για την ανθεκτικότητα που εμφανίζει το παθογόνο στο συγκεκριμένο σκεύασμα. Πιο συγκεκριμένα, η συχνότερη μετάλλαξη που παρουσιάζεται είναι στη Β υπομονάδα όπου η ιστιδίνη (H) στο κωδικόνιο 272 αντικαθίσταται από τυροσίνη (Y) και συνεπώς φέρει τη μετάλλαξη H272Y. Άλλες μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί είναι επίσης η αντικατάσταση της ιστιδίνης (H) στο κωδικόνιο 272 από λευκίνη (L) - μετάλλαξη H272L) και αργινίνη (R)- μετάλλαξη H272R. (Avenot et al., 2008 ; Bardas et al., 2010).

Χημική ομάδα	Κοινό όνομα	Χημική δομή Ονοματολογία IUPAC
Φαίνυλο - βενζαμίδια	benodanil	 2-Iod-N-phenylbenzamid
	flutolanil	 N-(3-Isopropoxyphenyl)-2-(trifluoromethyl)benzamide
	mepronil	 N-(3-Isopropoxyphenyl)-2-methylbenzamide
Πυρίδινο – αιθυλο - βενζαμίδια	fluopyram	 N-{2-[3-Chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl]ethyl}-2-(trifluoromethyl)benzamide
Φούρανο - καρβοξαμίδια	fenfuram	 2-Methyl-N-phenyl-3-furamide
Θειάζολο - καρβοξαμίδια	thifluzamide	 N-[2,6-Dibromo-4-(trifluoromethoxy)phenyl]-2-methyl-4-(trifluoromethyl)-1,3-thiazole-5-carboxamide

Πυράζολο - καρβοξαμίδια	bixafen	 N-(3',4'-Dichloro-5-fluoro-2-biphenyl)-3-(difluoromethyl)-1-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide
	fluxapyroxad	 3-(Difluoromethyl)-1-methyl-N-(3',4',5'-trifluoro-2-biphenyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide
	furametpyr	 5-Chloro-1,3-dimethyl-N-(1,1,3-trimethyl-1,3-dihydro-2-benzofuran-4-yl)-1H-pyrazole-4-carboxamide
	isopyrazam	 3-(Difluoromethyl)-N-(11-isopropyltricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-2,4,6-trien-3-yl)-1-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide
	penflufen	 5-Fluoro-1,3-dimethyl-N-[2-(4-methyl-2-pentanyl)phenyl]-1H-pyrazole-4-carboxamide
	penthiopyrad	 1-Methyl-N-[2-(4-methyl-2-pentanyl)-3-thienyl]-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide

	sedaxane	 N-{2-[1,1'-Bi(cyclopropyl)-2-yl]phenyl}-3-(difluoromethyl)-1-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide
Πυρίδινο - καρβοξαμίδια	boscalid	 2-Chloro-N-(4'-chloro-2-biphenyl)nicotinamide
Οξαθεϊνο - καρβοξαμίδια	carboxin	 2-Methyl-N-phenyl-5,6-dihydro-1,4-oxathiine-3-carboxamide
	oxycarboxin	 2-Methyl-N-phenyl-5,6-dihydro-1,4-oxathiine-3-carboxamide 4,4-dioxide

Εικόνα 8. Πίνακας μυκητοκτόνων (Βελούκας, 2011)

Αντικαταστάσεις αμινοξέων στην <i>sdh</i>		Οργανισμός	Μεταλλαγμένο στέλεχος		Αναφορά
Υπομονάδα	Σημειοτική μεταλλαγή		Φαινότυπος	Απομόνωση	
B	H252L	<i>Ustilago maydis</i>	CabxR ^a	Εργαστηρίου	Keon et al., 1991; Broom-field et al., 1992
	H267Y	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	CabxR	Εργαστηρίου	Skinner et al., 1998
	H239L	<i>Pleurotus ostreatus</i>	CabxR	Εργαστηρίου	Honda et al., 2000
	H228N	<i>Paraccocus denitrificans</i>	CabxR	Εργαστηρίου	Matsson et al., 2001
	H229L	<i>Xanthomonas campestris</i>	CabxR	Εργαστηρίου	Li et al., 2006
	H277Y/R	<i>Alternaria alternata</i>	BosR ^b	Αγρός	Avenot et al., 2008
	H278Y	<i>Corynespora cassicola</i>	BosR	Αγρός	Ishii et al., 2008
	P225L/T/F H272Y/R	<i>Botrytis cinerea</i>	BosR	Αγρός και εργαστήριο	Stammli et al., 2007
	H->Y	<i>Didymella bryoniae</i>	BosR	Αγρός	Stevenson et al., 2008
	H->Y	<i>Podosphaera xanthii</i>	BosR	Αγρός	Miyamoto et al., 2010
	H249Y/I/N	<i>Aspergillus oryzae</i>	CbxR	Εργαστηρίου	Shima et al., 2009
C	N80K	<i>Coprinus cinereus</i>	CbxR	Εργαστηρίου	Ito et al., 2004
	H134R	<i>Alternaria alternata</i>	BosR	Αγρός	Avenot et al., 2009
	S73P	<i>Corynespora cassicola</i>	BosR	Αγρός	Glaettli et al., 2009
	T90I	<i>Aspergillus oryzae</i>	CbxR	Εργαστηρίου	Shima et al., 2009
D	D89G	<i>Paraccocus denitrificans</i>	CbxR	Εργαστηρίου	Matsson et al., 1998
	D123E H133R	<i>Alternaria alternata</i>	BosR	Αγρός	Avenot et al., 2009
	S89P	<i>Corynespora cassicola</i>	BosR	Αγρός	Glaettli et al., 2009
	D132R	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	BosR	Αγρός	Glaettli et al., 2009
	D142E	<i>Aspergillus oryzae</i>	CbxR	Εργαστηρίου	Shima et al., 2009

^a Στελέχη ανθεκτικά στο carboxin

^b Στελέχη ανθεκτικά στο boscalid

Εικόνα 9. Μεταλλαγές στο γονίδιο της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος
διάφορων οργανισμών που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα SDHi μυκητοκτόνα. (Veloukas et al., 2013)

1.1.7 ΜΕΘΟΔΟΣ HRM (HIGH RESOLUTION MELT) ΚΑΙ HRMA (HIGH RESOLUTION MELT ANALYSIS)

Η HRM ανάλυση είναι μια νέα μοριακή μέθοδος για την ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμού στα δείγματα δίκλωνου DNA. Ανακαλύφθηκε και αναπτύχθηκε στο Τεχνολογικό Ίδρυμα του Idaho και στο Πανεπιστήμιο της Γιούτα και παρουσιάζει πολλά. Η HRM βασίζεται στη PCR και χρησιμοποιείται για την μελέτη και τον εντοπισμό γενετικών μεταλλάξεων διακρίνοντας τις αλληλουχίες με βάση τη σύνθεση, το μήκος το περιεχόμενο ποσοστό GC. Η συγκεκριμένη μέθοδος διαφέρει από τις άλλες μεθόδους σε τρία σημεία:

- Χρησιμοποιούνται χρωστικές σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις
- Απαιτεί εξοπλισμό που ανιχνεύει το φθορισμό με λεπτομερέστερη ανάλυση θερμοκρασίας
- Χρησιμοποιείται πιο εξειδικευμένο λογισμικό .

Η μετατροπή του μορίου της διπλής έλικας DNA σε δύο μονές έλικες DNA , έχει χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια για να μελετηθεί η δομή του μορίου και η σύνθεσή του. Πρόσφατες τεχνολογικές προόδους έχουν βελτιώσει τις δυνατότητες της συγκεκριμένης μεθόδου, ιδίως για την ανίχνευση παραλλαγών σε αλληλουχίες . Επίσης η ευαισθησία της μεθόδου αυξήθηκε σημαντικά με τη χρήση DNA χρωστικών ενώ οι τεχνολογικές βελτιώσεις έχουν καταστήσει εφικτή την ταυτόχρονη επεξεργασία πολλών δειγμάτων με χαμηλό κόστος και χωρίς το φόβο επιμολύνσεων των δειγμάτων. Η HRMA αποτελεί ένα αξιόπιστο εργαλείο λόγω της ευκολίας χρήσης, της ευαισθησίας των αποτελεσμάτων και του χαμηλού κόστους (Vossen et al.,2009).

Η περιοχή ενδιαφέροντος του γονιδιώματος ενισχύεται με PCR με την παρουσία μιας φθορίζουσας χρωστικής που προσδένεται στο δίκλωνο DNA . Μετά την PCR , το προϊόν βαθμιαία τήκεται , και ο εκπεμπόμενος φθορισμός μετράται σε ένα εξειδικευμένο μέσο για να δημιουργήσει μία χαρακτηριστική καμπύλη. Χαρακτηριστικά, όπως περιεκτικότητα σε GC , το μήκος , η ακολουθία και η ετεροζυγωτία μπορεί να επηρεάσουν την καμπύλη τήξης (Vossen et al.,2009).

Οι καμπύλες που παρατηρούνται είναι οι εξής:

1 . Καμπύλες τήξης που έχουν παρόμοιο σχήμα , αλλά αυτό είναι διακριτό το ένα από το άλλο από τη διαφορά στη θερμοκρασία τήξης (T_m) του PCR προϊόντος . Τυπικά τέτοια προφίλ δημιουργούνται από ομόζυγα δείγματα που συγκρίνονται με ένα δείγμα άγριου τύπου. Σε τέτοιες περιπτώσεις , η διαφορά μεταξύ των δειγμάτων αυτών οφείλεται σε παραλλαγή στην αλληλουχία βάσεων σε σύγκριση με την αλληλουχία του άγριου τύπου .

2 . Καμπύλες τήξης που εμφανίζουν ξεχωριστή καμπύλη λόγω διαφορών σε ζεύγη βάσεων.

Η καμπύλη τήξης παράγεται από την αργή μετουσίωση (τήξη) του δείγματος DNA μέσω μιας σειράς θερμοκρασιών παρουσία μιας χρωστικής που προσδένεται στο DNA . Η φθορίζουσα ουσία εντοπίζεται από ένα οπτικό σύστημα (Karabiosystems, n.d.) .

Η έκταση της τήξης μετράται από την αλλαγή στον φθορισμό του δείγματος DNA. Σε χαμηλές θερμοκρασίες , το DNA θα είναι δίκλωνο και η βαφή θα φθορίζει έντονα . Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται , ο φθορισμός θα μειωθεί καθώς η βαφή απελευθερώνεται όταν τα δύο σκέλη μετουσιώνονται . Ο ρυθμός μείωσης φθορισμού είναι γενικά μεγαλύτερες πλησίον της θερμοκρασίας τήξης (T_m) του προϊόντος της PCR . Το T_m ορίζεται ως το σημείο στην καμπύλη τήξης , όπου το 50 % του DNA είναι δίκλωνο , και 50 % είναι μονόκλωνο. Η T_m είναι υψηλότερη σε πλούσιες σε GC PCR προϊόντα (Karabiosystems, n.d.) .

Το δείγμα άγριου τύπου, που δε φέρει δηλαδή τη μετάλλαξη παρουσιάζει μία καμπύλη η οποία χρησιμοποιείται ως σημείο αναφοράς και έχει την μορφή της οριζόντιας γραμμής. Τα δείγματα που φέρουν τη μετάλλαξη παρουσιάζουν καμπύλες οι οποίες διαφέρουν από την καμπύλη αναφοράς (Karabiosystems, n.d.).

Τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να έχουν επεξεργαστεί με το ίδιο πρωτόκολλο ή kit. Θα πρέπει να έχουν τις ίδιες συγκεντρώσεις και να μην περιέχουν άλατα. Διαφορές στις συγκεντρώσεις θα επηρεάσουν τα αποτελέσματα των καμπυλών και θα εντοπιστούν διαφορές στα αποτελέσματα (Karabiosystems, n.d.)

Υπάρχουν αρκετά συστήματα υψηλής ανάλυσης καμπύλης τήξης (HRM ή HRMA) . Το πιο ευαίσθητο σύστημα που ισχύει σήμερα και είναι διαθέσιμο το HR - 1 (Idaho Τεχνολογίας Α.Ε. , Salt Lake City , UT) όπου παράγει δεδομένα φθορισμού από 55 - 951C με ένα ρυθμό μεταβολής θερμοκρασίας 0.11C/sec και 200 points/1C δεδομένων . Το HR - 1 χρησιμοποιεί τα τριχοειδή αγγεία και μπορεί να αναλύει μόνο ένα δείγμα κάθε φορά ενώ άλλα συστήματα αναλύουν έως 32 δείγματα. Άλλα συστήματα όπως τα Microtiter είναι πιο δημοφιλής, λόγω της διευκόλυνση της ταυτόχρονης ανάλυσης των 96 ή 384 δειγμάτων, που προσφέρουν (Vossen et al.,2009).

Η HRMA δεν απαιτεί καμία μεγάλη αλλαγή στο εργαστήριο και δεν απαιτεί ειδικές δεξιότητες. Είναι μια απλή PCR που πραγματοποιείται υπό ελαφρά τροποποιημένες συνθήκες και υπό την παρουσία μίας φθορίζουσας βαφής. Η μόνη δυσκολία σε αυτή τη μέθοδο είναι η εκμάθηση του εξοπλισμού . Επιτυγχάνεται επίσης εξοικονόμηση κόστους καθώς η HRMA είναι μια μη καταστρεπτική μέθοδο , και επιτρέπει μετέπειτα ανάλυση των δειγμάτων. Στον έλεγχο αλληλουχίας μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα (Vossen et al.,2009).

Αποτελεί μία ελκυστική λύση για τα τζελ ηλεκτροφόρισης καθώς δεν χρησιμοποιούνται επικίνδυνες ουσίες, ούτε ακολουθούνται χρονοβόρες διαδικασίες και το κυριότερο δεν υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης των δειγμάτων (Vossen et al.,2009).

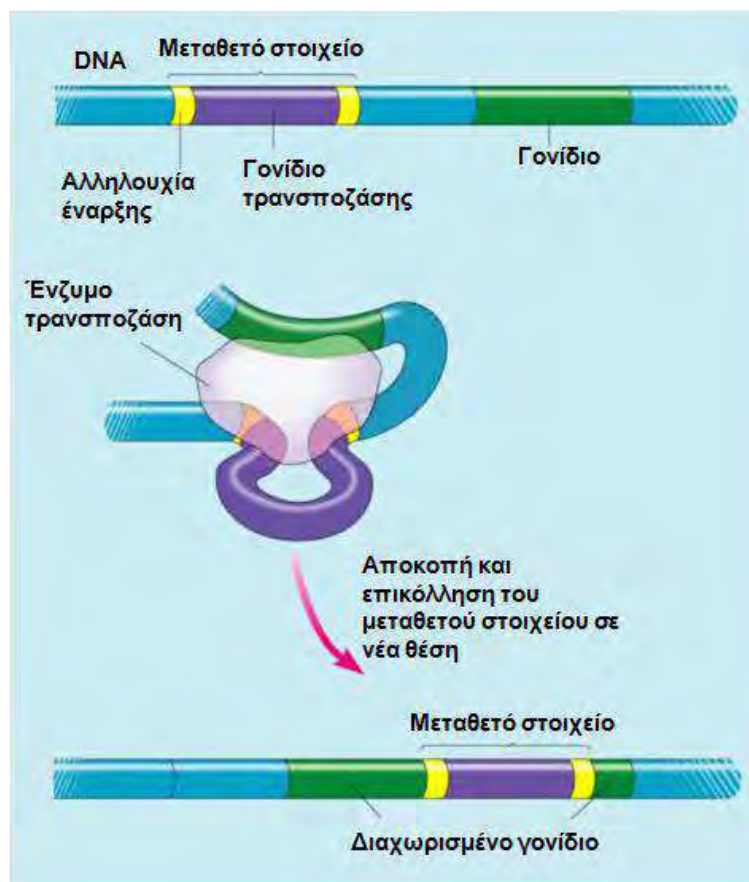
1.1.8 BOTY-FLIPPER, ΤΑ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα μεταθετά στοιχεία είναι αλληλουχίες DNA, οι οποίες κινούνται σε διαφορες θέσεις με μετάθεση (transposition) μέσα στο γονιδίωμα του κυττάρου. Τα στοιχεία αυτά εμφανίζονται τόσο σε ευκαρυωτικούς όσο και σε προκαρυωτικούς πληθυσμούς .

Ανάλογα με τον τρόπο μετάθεσης που χρησιμοποιείται τα κινητά γενετικά στοιχεία χωρίζονται σε κλάση I και II. Τα μεταθετά στοιχεία (TE's) , που ανήκουν στην κλάση I ή αλλιώς ρετρομεταθέτες (retrotransposons), αντιγράφουν αρχικά τον εαυτό τους μεταγραφόμενα σε RNA και στη συνέχεια με αντίστροφη μεταγραφή ξανά σε DNA, με μία διαδικασία αντιγραφής και επικόλλησης. Στην κλάση II τα μεταθετά στοιχεία ή αλλιώς DNA μεταθέτες (DNA transposons) κινούνται μέσα στο γονιδίωμα ακολουθώντας ένα μοτίβο κοπής και επικόλλησης με τη βοήθεια του ενζύμου τρανσποζάση. (Samuel et al., 2012)

Η παρουσία αυτών των στοιχείων μέσα στο γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην έκφραση γονιδίων λόγω παρεμπόδισης της μεταγραφής κάποιου γονιδίου ή μεταβολή

του μοτίβου μεταγραφής, αλλαγές στη νουκλεοτική αλληλουχία των γονιδίων καθώς και χρωμοσωμικές ανακαταξίες. Γενετικά, οι συγκεκριμένες αλλαγές αναφέρονται ως ουδέτερες, ωστόσο μπορούν να οδηγήσουν σε συνδυασμούς οι οποίοι να επιτρέπουν την προσαρμογή του οργανισμού σε ένα συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Στους μύκητες έχει παρατηρηθεί ενεργοποίηση των στοιχείων αυτών σε συνθήκες καταπόνησης και έχει παρουσιαστεί σίγαση τους με επιγενετικές διαδικασίες (Σαμουήλ, 2011).



Εικόνα 10. Διαδικασία μετάθεσης στοιχείων στους DNA μεταθέτες (Veloukas et al, 2013).

Το μεταθετό στοιχείο *Boty*, που ανήκει στην κλάση I, αναφέρθηκε στον *Botrytis cinerea* το 1995 από τους Diolez et al., ενώ το 1997 οι Graud et al διαπίστωσαν την ύπαρξη του μεταθετού στοιχείου Flipper, το οποίο είναι DNA-μεταθέτης, ενώ στη ίδια εργασία έγινε διαχωρισμός των απομονώσεων του *Botrytis cinerea* με βάση την ύπαρξη ή όχι των δύο μεταθετών στοιχείων. Με αυτό το διαχωρισμό προέκυψαν δύο ομάδες, ο *B. cinerea var transposa*, που αφορούσε απομονώσεις που έφεραν και τα δύο μεταθετά στοιχεία και ο *B. cinerea var vacuata* που δεν έφερε σε αυτή την περίπτωση κανένα μεταθετό στοιχείο. Η

γεωγραφική συνύπαρξη των δύο τυπών του *B. cinerea* έχει αποδειχτεί, ενώ ενισχύεται η άποψη ο πληθυσμός του *Botrytis* αποτελείται από ένα σύμπλεγμα ειδών καθώς προκύπτει σημαντική γενετυπική παραλλακτικότητα μεταξύ αυτών. Οι δύο ομάδες, όπως έχει αποδειχτεί από τους Giraud et al (1997), είναι γενετικά απομονωμένες, ενώ η συχνότητα εμφάνισης των Boty και Flipper, διαφέρει στους διάφορους ξενιστές. Σε μελέτες, που έχουν πραγματοποιηθεί στο αμπέλι, έχει παρατηρηθεί επίσης ότι η ύπαρξη των μεταθετών στοιχείων, επηρεάζεται από το στάδιο της καλλιεργητικής περιόδου. Πιο συγκεκριμένα τα vacuma στελέχη παρατηρούνται σε μεγαλύτερη συχνότητα κατά τη διάρκεια της άνθισης και μειώνονται σταδιακά μέχρι τη συγκομιδή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα συγκεκριμένα στελέχη αναπτύσσονται σαπροφυτικά σε αντίθεση με τα transposa, τα οποία αναπτύσσονται ως παράσιτα (Σαμουήλ, 2011).

Επιπλέον, τα δύο στελέχη παρουσιάζουν και φαινοτυπική παραλλακτικότητα, καθώς τα transposa φαίνεται ότι παράγουν μεγαλύτερα μακροκονίδια σε σχέση με τα vacuma, ενώ επίσης παρουσιάζονται και σημαντικές διαφορές μεταξύ του μήκους και εμβαδού των σπορίων για τα δύο στελέχη.

Ότι αφορά την ευαισθησία των στελεχών σε βοτρυδιοκτόνα, παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα σε υψηλά επίπεδα των transposa σε ουσίες όπως carbendazim, diethofencarb και vinclozolin, ενώ τα vacuma παρουσίασαν ανθεκτικότητα στο fenhexamid (Samuel et al., 2012).

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ

Απομονώσεις του *B. cinerea* συλλέχθηκαν από προσβεβλημένα φύλλα τομάτας που προέρχονταν από αγρούς του Ν. Κρήτης. Στην περιοχή η καλλιέργεια είναι ετήσια και αναπτύσσεται σε θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις κατά κύριο λόγο. Οι δειγματοληψίες το έτος 2013. Συνολικά συλλέχθηκαν 35 απομονώσεις του μύκητα τα, οι οποίες συντηρήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA στους 4°C.

2.1.1.2 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι μία τροποποίηση των Doyle and Doyle (1990). Πρόκειται για μία διαδικασία εξαγωγής DNA με βάση το CTAB στην οποία

χρησιμοποιείται το NaCl για την απομάκρυνση των πολυσακχαριδίων και το PVP25 για την απομάκρυνση των πολυφαινολών κατά τη διαδικασία καθαρισμού του DNA.

Για την εκχύλιση του DNA, όλες οι απομονώσεις αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Broth, (1000 ml distilled H₂O, 200gr slashed, peeled potatoes, 20gr dextrose) για τρεις μέρες στους 22°C. Στη συνέχεια, το μυκήλιο ξεπλύθηκε σε falcon στο οποίο προσθέσαμε 10 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό, και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση με ταχύτητα 4500 rpm για 15 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκειμένου και εναπόθεση του μυκηλίου σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί. Αφού απομακρύνθηκε ένα μεγάλο ποσοστό της περιεχόμενης υγρασίας από το μυκήλιο, κονιορτοποιήθηκε στη σε αποστειρωμένο γουδοχέρι με συνεχείς προσθήκες N₂. Εν συνεχεία μεταφέρθηκαν 100 mg κονιορτοποιημένου μυκηλίου σε tube χωρίς να λιώσει ο παγωμένος ιστός και προσθέσαμε 400 µL CTAB isolation buffer και 50 mg PVP25. Ακολούθησε συνεχής ανάμιξη των διαλυμάτων με αναστροφή με ενδιάμεσο flickering και επώαση τους σε υδατόλουτρο στους 60° C για 25 λεπτά με προαιρετικό vortex και flickering. Μετά την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης διεργασίας προστέθηκε ίσος όγκος 1x Phenol-Chloroform (1:1, v:v) και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά με ταχύτητα 13000rpm. Το υπερκείμενο μέρος των δειγμάτων μεταφέρθηκε σε νέο tube στα οποία έγινε προσθήκη 0.5 vol 5M NaCl και 2vol EtOH 95%. Στο στάδιο αυτό υπήρχε η επιλογή της αποθήκευσης στους -20°C για μία ώρα ή η αποθήκευση για ολόκληρη νύχτα. Το επόμενο στάδιο της επεξεργασίας ήταν φυγοκέντρηση με ταχύτητα 13000rpm για 10 λεπτά, όπου μετά το πέρας της οποίας, παραλαμβάνεται το pellet με απομάκρυνση υπερκειμένου. Το pellet, το οποίο απομένει, ξεπλένεται με (1ml) 70% EtOH και φυγοκεντρίται στη συνέχεια για 5 λεπτά στις 13000rpm. Με τη βοήθεια μίας πιπέτας απομακρύνεται το μεγαλύτερο μέρος της EtOH και αφήνονται τα tubes στο χώρο για λίγα λεπτά για να πραγματοποιηθεί η εξάτμιση τυχόν εναπομείνουσας EtOH. Το τελικό στάδιο της διεργασίας εξαγωγής του μυκητιακού DNA είναι η διάλυση του pellet σε 100 ml ενέσιμο νερό (injection water).

2.1.1.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ DNA

Η μέτρηση του συνολικού DNA πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο ενώ επίσης η συγκέντρωση του εξαγόμενου DNA της κάθε απομόνωσης, αξιολογήθηκε οπτικά με τη βοήθεια τζελ αгарόζης 1% και της ηλεκτροφόρησης του. Το τζελ

χρωματίστηκε με 4 μ l βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφήθηκε κάτω από UV ακτινοβολία για την εξαγωγή των συμπερασμάτων.

2.1.1.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ HRM (High Resolution Melt)

Ο έλεγχος των δειγμάτων με την μέθοδο HRM πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογίας Ανάπτυξης, στο Ινστιτούτο Τεχνολογιών Πληροφορικής και Επικοινωνιών.

Μελετήθηκαν 20 δείγματα DNA του παθογόνου Botrytis. Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της SIGMA και ήταν οι εξής:

- Οι H272-R (5'-CCAAACCAGGATTCAATC), H272-F (5'- TGGARAACAGCATGAGTT) οι οποίοι σχεδιάστηκαν και στοχεύουν στις πολυμορφικές περιοχές *sdhB*, δίνοντας ένα προϊόν 84 bp και καθορίζουν την ύπαρξη ανθεκτικότητας στο boscalid
- και οι E198-F (5'-AGCCATATAACGCAACTC), E198-R (5' TATCGTAAAGAGCCTCGT), για τον εντοπισμό των ανθεκτικών απομονώσεων, όπου οφείλονται σε μία σημειακή μετάλλαξη με αλλαγή του γλουταμινικού οξέος στη θέση 198 σε Γλυκίνη (E198G) ή σε Αλανίνη (E198A).

Όλα τα δείγματα είχαν τελικό όγκο 15 μ L και η διαδικασία της HRM πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του Rotor-Gene 6000 real-time 5P HRM PCR Thermocycler , το οποίο έφερε 36 θέσεις δειγμάτων συνολικά. Το κάθε δείγμα που εξετάστηκε περιείχε: 1 μ l genomic DNA της κάθε απομόνωσης , 1X PCR buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 300 nM forward and reverse primers, 1.5 mM Syto® 9 green fluorescent nucleic acid stain 199 (Life Technologies Corp.) και 1 U Kapa Taq DNA polymerase (Kapa Biosystems). Το πρωτόκολλο PCR που ακολουθήθηκε περιλάμβανε αρχικά denaturation στους 95 °C για 3 min και στη συνέχεια ακολούθησαν 45 κύκλοι, οι οποίοι περιλάμβαναν τα εξής βήματα:

1. denaturation στους 95 °C για 20 sec
2. annealing στους 52 °C για 20 sec (H272F/R) ή 44°C για 20 sec (E198F/R)
3. extension στους 72 °C για 20 sec με τελικό extension στους 72 °C για 10 min.

Όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένου και του αγρίου-τύπου, αποτυπώθηκαν και διαχωρίστηκαν σύμφωνα με το προφίλ τήξης τους. Το κάθε προφίλ τήξεως του κάθε δείγματος ξεχωριστά συγκρίθηκε με εκείνο του αγρίου-τύπου, το οποίο εμφανίζεται στο

γράφημα με τη μορφή της οριζόντιας γραμμής και αποτελεί σημείο αναφοράς. Οι καμπύλες που εμφάνισαν σημαντικές αποκλίσεις από το σημείο αναφοράς ήταν ενδεικτικές των σημειακών αλλαγών αλληλουχίας εντός του αμπλικονίου που αναλύθηκε. Δείγματα με καμπύλες τήξης με μεγάλες αποκλίσεις αντιστοιχούν σε απομονώσεις που φέρουν την μετάλλαξη για την οποία ελέγχονται. Χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι και στις δυο μεταλλάξεις παρουσιάστηκαν καμπύλες που έφεραν σε ενδιάμεσα σημεία αποκλίσεις από την καμπύλη αναφοράς. Λόγος ύπαρξης αυτών των καμπυλών αποτελεί το γεγονός ότι τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν δεν αραιώθηκαν περαιτέρω ώστε το περιεχόμενο DNA να είναι 20 ng όπως συνήθως απαιτείται σε άλλες αναλύσεις HRM. Τα δείγματα που παρουσίασαν αυτού του είδους των αποκλίσεων εξετάστηκαν αργότερα με τη μέθοδο της PCR ώστε να επικυρωθούν τα συγκεκριμένα αποτελέσματα.

2.1.1.5 SEQUENCING

Για την επικύρωση των αποτελεσμάτων της HRM, τα δείγματα εξετάστηκαν με τη μέθοδο της PCR για την κάθε μετάλλαξη με τη βοήθεια των primer BcOS1-F (5'-TAG CTC ATG GAGATC TCACAC A). BcOS1-R (5'- GAC TTC TCG CGC AAA TTG TTG) και TUB1- F(5'- GCT TTT GAT CTC CAA GAT CCG) TUB1-R (5'- CTG GTC AAA GGA GCA AAT CC), οι οποίοι σχεδιάστηκαν και δίνουν προϊόν 250 bp και 200 bp για τις περιοχές *sdhB* και β -tubuline αντίστοιχα.

Η κάθε αντίδραση είχε τελικό όγκο 25 μ l και περιείχε 1 μ l μυκητιακού DNA, 12,5 pmol από τον κάθε primer, 5 μ L ενέσιμο νερό και 12.5 μ L Kapa 2G Fast hot-start ready-mix PCR kit (Kapa Biosystems). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε Mastercycler Gradient Thermocycler (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH) και το PCR πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για το ζεύγος των primers BoS-F/R περιλάμβανε αρχική προθέρμανση στους 95 °C για 3 min και στη συνέχεια 35 κύκλους με:

1. αποδιάταξη στους 95 °C for 15 sec,
2. υβριδοποίηση των εκκινητών στους 61 °C (primer pair BcOS1-F/R) για 15 sec,
3. επιμήκυνση στους 72 °C για 10 sec και τερματισμό με τελική επώαση στους 72 °C for 10 min.

Ενώ το PCR πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για το ζεύγος των primers TUB1- F/R περιλάμβανε αρχική προθέρμανση στους 94 °C για 3 min και στη συνέχεια 35 κύκλους με:

1. αποδιάταξη στους 94 °C for 15 sec,
2. υβριδοποίηση στους 55 °C (primer pair BcOS1-F/R) για 15 sec,
3. επιμήκυνση στους 72 °C για 10 sec και τερματισμό με τελική επώαση στους 72 °C for 10 min.

Και στις δύο περιπτώσεις αρνητικός μας μάρτυρας αποτελούσε δείγμα που δεν περιείχε DNA. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια της ηλεκτροφόρησης σε 1,5% τζελ αгарόζης το οποίο βάφτηκε με 7 μl βρωμιούχο αιθίδιο και εκτέθηκε σε ακτινοβολία UV. Τα δείγματα που έφεραν τις μεταλλάξεις αποχωρίστηκαν από το τζελ, καθαρίστηκαν με QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) και απεστάλησαν για sequencing.

2.1.1.6 ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ

Όλα τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν με τη μέθοδο HRM, χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση βιοδοκιμών με στόχο την παρατήρηση του φαινοτύπου τους. Για την μελέτη της ανθεκτικότητας στο boscalid χρησιμοποιήθηκε YBA (yeast bacto acetate) θρεπτικό υλικό, το οποίο έχει χαμηλό pH, με συγκέντρωση 1 και 100 mg/L. Ενώ για την μελέτη της ανθεκτικότητας στο carpendazim χρησιμοποιήθηκε MEA (malt extract agar) θρεπτικό υλικό με συγκέντρωση 10 mg/L. Μετά το πέρας τριών ημερών από την τοποθέτηση των δειγμάτων στα τριβλία, έγινε παρατήρηση των φαινοτύπων και τα δείγματα φωτογραφήθηκαν.

2.1.1.7 PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Στόχος αποτελούσε ο εντοπισμός των μεταθετών στοιχείων Boty, Flipper σε δείγματα που λήφθηκαν από προσβεβλημένα φύλλα τομάτας από *B. cinerea* στην περιοχή της Κρήτης, με μία απλή και παράλληλα αποτελεσματική PCR. Η εξαγωγή του DNA των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως, ενώ για τη διαξαγωγή της PCR σχεδιάστηκαν οι primers Bc-Boty1 5'- CTT TAC CGG AAC ACA AGC CAT and Bc-Boty2 5'- GGT CTT CCA TTC TTC GCC TTC, οι οποίοι δίνουν προϊόν 484 bp και αφορούν τον εντοπισμό του στοιχείου Boty και οι BcFlp1 5'- GCA CAA AAC CTA CAG AAG A and BcFlp2 5'- CCA AAG GTA AAA GTG CTC T, οι οποίοι δίνουν προϊόν 383 bp και αφορούν τον εντοπισμό του στοιχείου Flipper στο *B. cinerea*. Όλα τα δείγματα επεξεργάστηκαν με KAPA2G Fast HotStart ReadyMix Kit (Kapa Biosystems) και βελτιστοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 25 μl. Το κάθε δείγμα περιείχε 5 μl of fungal DNA, 12.5 μl of 2X KAPA2G Fast HotStart ReadyMix, 5 μl

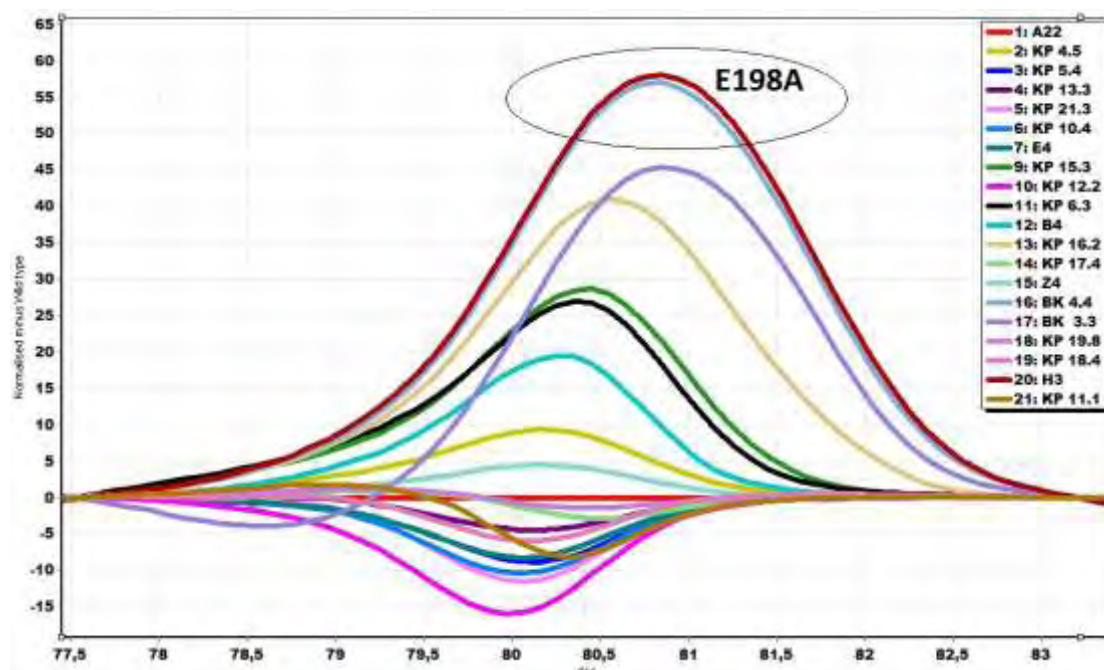
of injection water and 1.25 µl of each primer. Η διαδικασία της PCR πραγματοποιήθηκε σε Mastercycler Gradient Thermocycler (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH) και το πρωτόκολο περιλάμβανε αρχικό denaturation στους 95°C για 3 minutes και εν συνεχεία 35 κύκλοι οι οποίοι περιλάμβαναν:

1. αποδιάταξη στους 95 °C για 15 sec
2. υβριδοποίηση εκκινητών στους 61 °C για 15 sec
3. επιμήκυνση στους 72 °C για 10 sec και τερματισμός με τελική επώαση στους 72 °C για 10 λεπτά.

Αρνητικός μας μάρτυρας στην προκειμένη περίπτωση ήταν δείγμα που δεν περιείχε DNA. Τα αποτελέσματα της PCR έγιναν ορατά σε τζελ αγαρόζης 1.2%. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση και βαφή του τζελ με 5 µl βρωμιούχο αιθίδιο για μία ώρα. Εν συνεχεία ακολουθήθηκε φωτογράφιση των αποτελεσμάτων κάτω από UV ακτινοβολία.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

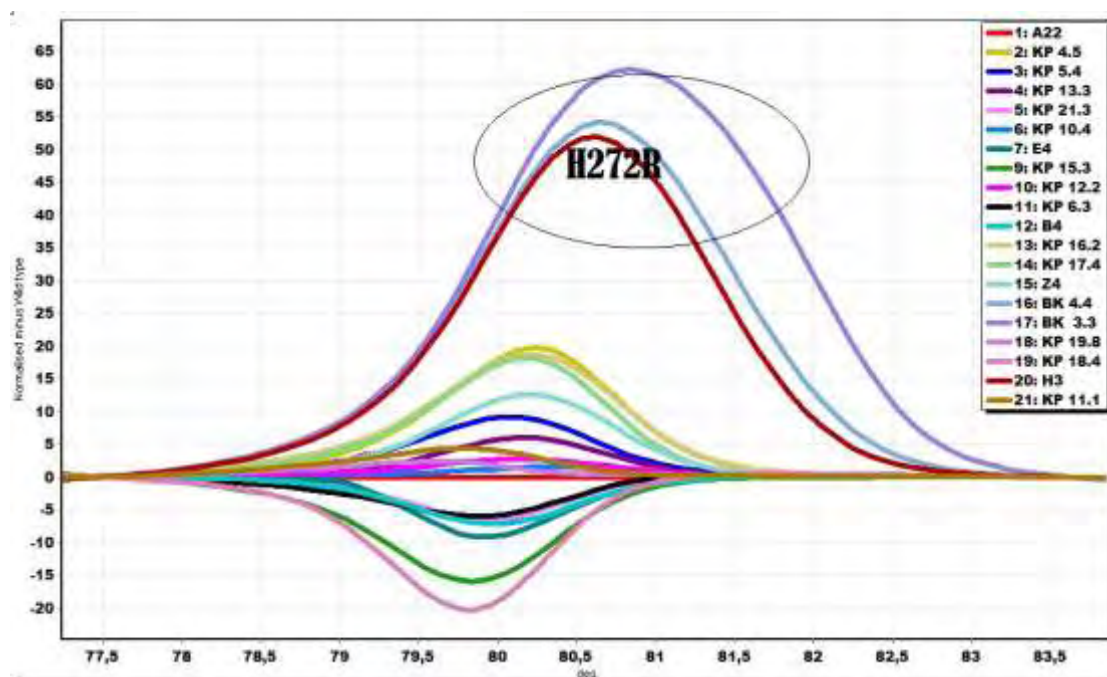
3.1.1 Αποτελέσματα HRM αναφορικά με την ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά.



Εικόνα 11. Αποτελέσματα της HRM για την μετάλλαξη E198 (το δείγμα A22 είναι άγριου τύπου και αποτελεί σημείο αναφοράς)

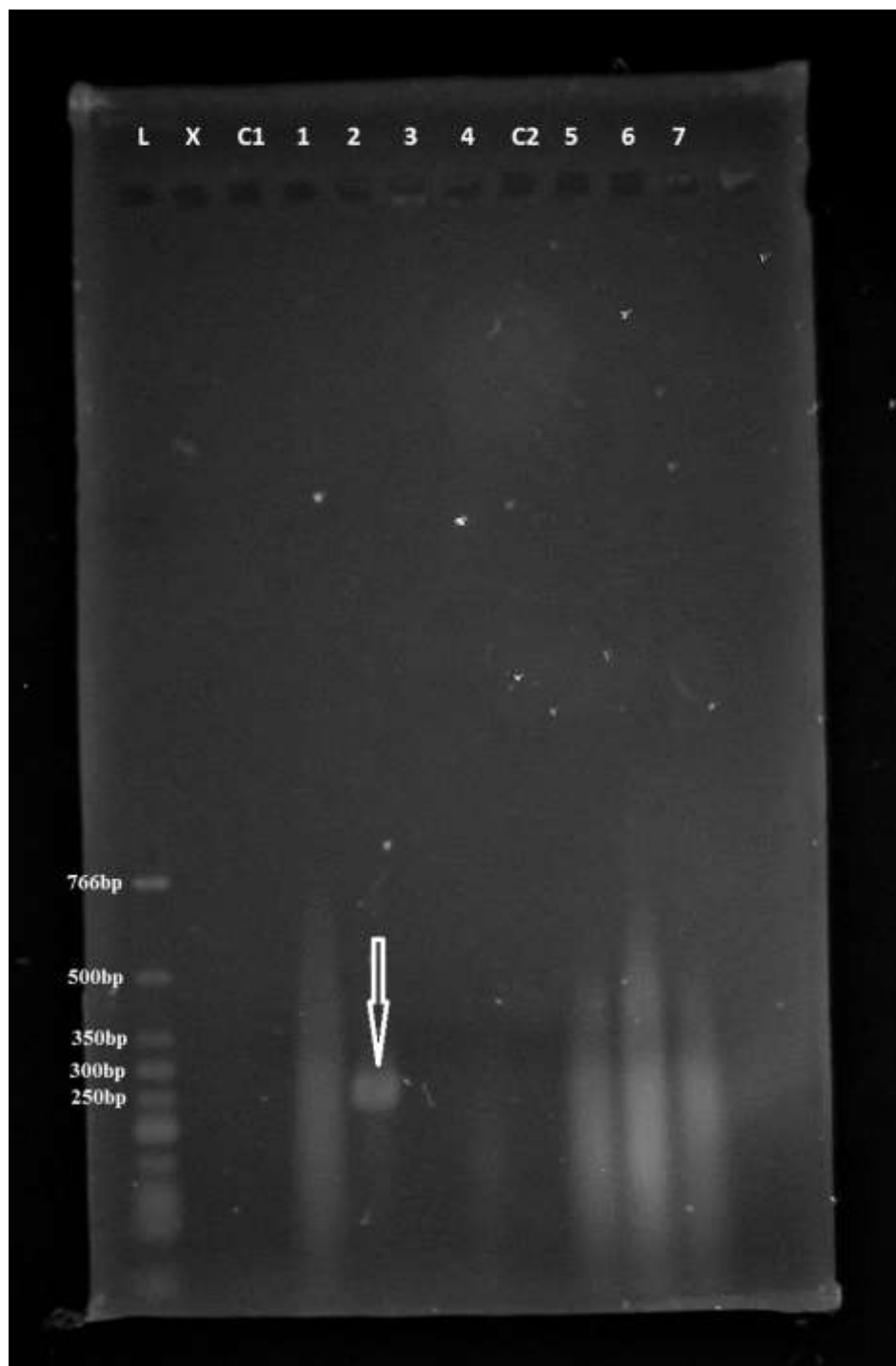
Στην Εικόνα 11 φαίνονται τα αποτελέσματα της HRM αναφορικά με πιθανή ύπαρξη στελεχών ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά. Παρατηρείται ότι οι απομονώσεις που έφεραν ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά ήταν δύο στον αριθμό και πιο συγκεκριμένα ήταν οι απομονώσεις H3 και B.K.4.4. Τα δείγματα που έφεραν τη μετάλλαξη E198A, είναι και αυτά που παρουσίασαν τις υψηλότερες καμπύλες στην HRM, σε σύγκριση με το δείγμα άγριου τύπου, A22, που παρουσιάζεται ως οριζόντια γραμμή στο γράφημα και αποτελεί σημείο αναφοράς. Τα δείγματα με χαμηλότερες καμπύλες αντιστοιχούν σε δείγματα που δεν φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Στο συγκεκριμένο γράφημα 5 δείγματα είναι αυτά που παρουσιάζουν ιδιόζουσε καμπύλες εκ των οποίων επιλέχθηκαν τα 3 (BK 3.3, B4, KP 15.3) και τα οποία εξετάστηκαν περαιτέρω.

3.1.2 Αποτελέσματα HRM αναφορικά με την ανθεκτικότητα στο boscalid

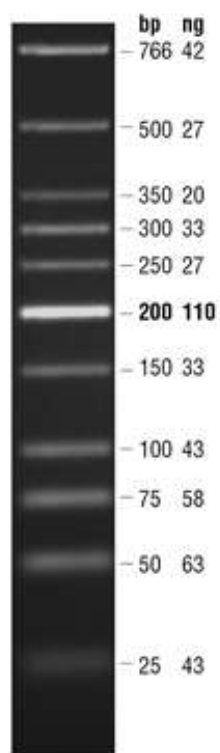


Εικόνα 12. Αποτελέσματα της HRM για την H272 μετάλλαξη (το δείγμα A22 είναι άγριου τύπου και αποτελεί σημείο αναφοράς)

Στην Εικόνα 12 φαίνονται τα αποτελέσματα της HRM αναφορικά με πιθανή ύπαρξη στελεχών ανθεκτικών στο boscalid. Παρατηρείται ότι οι απομονώσεις που έφεραν ανθεκτικότητα στο boscalid, είναι τρεις στον αριθμό και παρουσίασαν τις υψηλότερες καμπύλες σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Οι τρεις απομονώσεις με την μετάλλαξη H272R ήταν οι B.K3.3, B.K4.4 και H3. Το δείγμα A22 είναι άγριου τύπου και αποτελεί σημείο αναφοράς για τα υπόλοιπα δείγματα, έχοντας μορφή οριζόντια γραμμής στο γράφημα. Οι υπόλοιπες καμπύλες αντιστοιχούν σε δείγματα που δε φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Τα δείγματα που παρουσιάζουν ιδιάζουσες καμπύλες ήταν τα : KP 17.4, Z4, KP. 16.2 και KP 18.4. Τα συγκεκριμένα δείγματα εξετάστηκαν περαιτέρω.



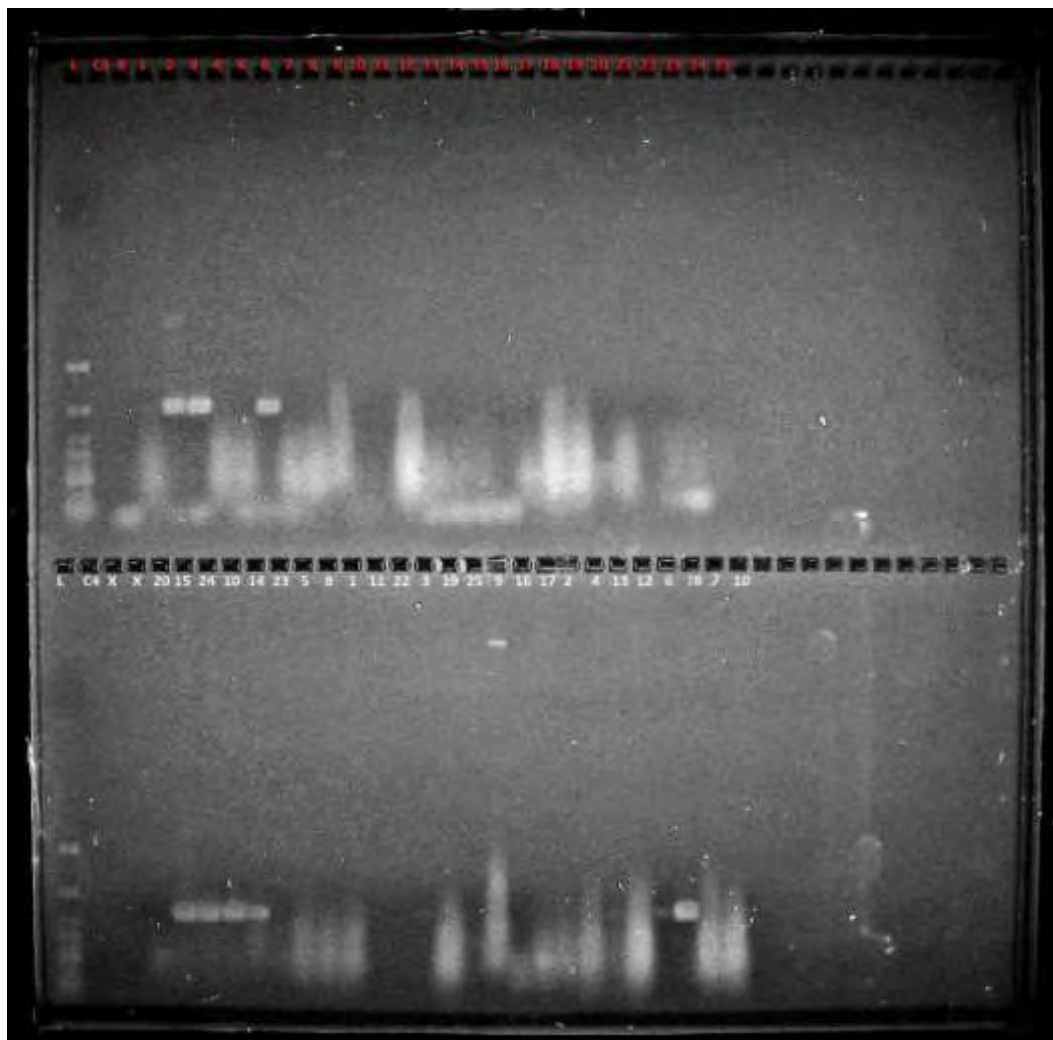
Εικόνα 13α. Προϊόντα PCR των καμπυλών των διαζουσών καμπυλών (L= LMW ladder, X= κενό, C1- Control 1 (BoS-F/R), 1= KP 18.4 BoS, 2= Z4 BoS, 3= KP 16.2 BoS, 4=KP 17.4 BoS,C2= Control 2 (TUB1- F/R), 5= B4-TUB, 6= KP 6.3-TUB, 7=KP 15.3-TUB)



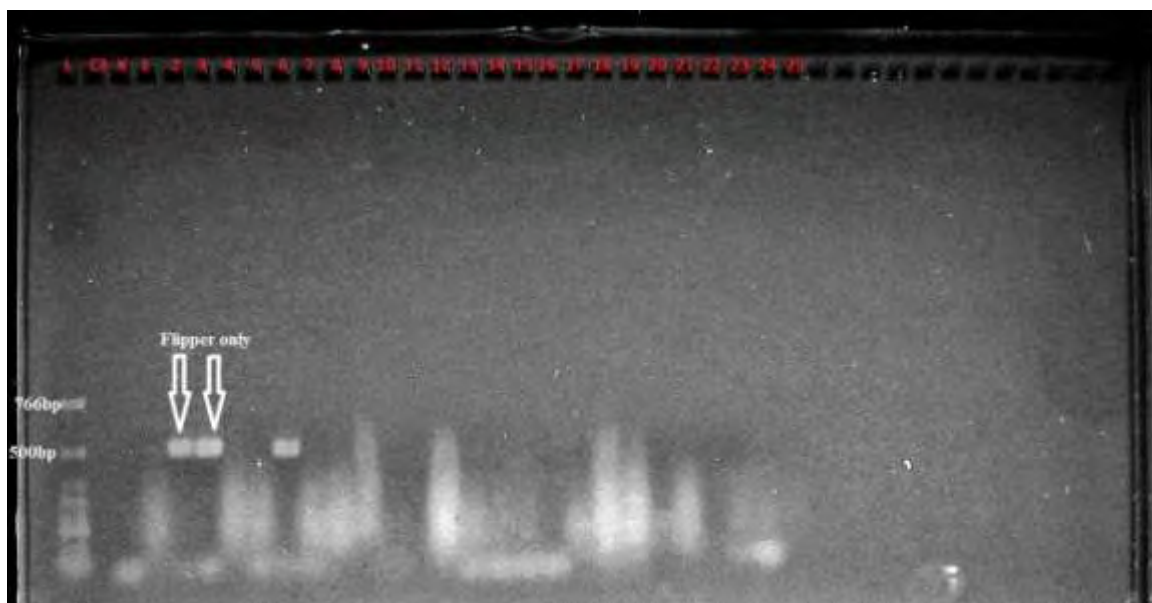
Εικόνα 13β. LMW ladder (Low molecular Weight ladder) της New England Biolabs- NEB

Στην Εικόνα 13α παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR των διαζουσών καμπυλών. Στην PCR ο ladder που χρησιμοποιήσαμε ήταν ο LMW της NEB (Low Molecular Weight), ο οποίος παρατείνεται στην Εικόνα 13β. Μετά το Ladder και πριν το πρώτο δείγμα έχουμε αφήσει μία θέση κενή, ενώ ακολουθεί ο αρνητικός μας μάρτυρας C1, για ανθεκτικότητα στο boscalid, που στην περίπτωση μας είναι δείγμα χωρίς DNA . Μετά τον αρνητικό μάρτυρα έπονται 4 δείγματα DNA που εξετάζονται για ανθεκτικότητα στο boscalid, εκ των οποίων μόνο ένα έδωσε θετικό αποτέλεσμα. Στο ίδιο τζελ ηλεκτροφόρησης , υπάρχει ο αρνητικός μάρτυρας για την ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, C2, ο οποίος είναι δείγμα χωρίς DNA. Μετά τον αρνητικό μάρτυρα ακολουθούν 3 δείγματα DNA, που εξετάζονται για ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, τα οποία στο σύνολό τους δεν έδωσαν κανένα θετικό αποτέλεσμα.

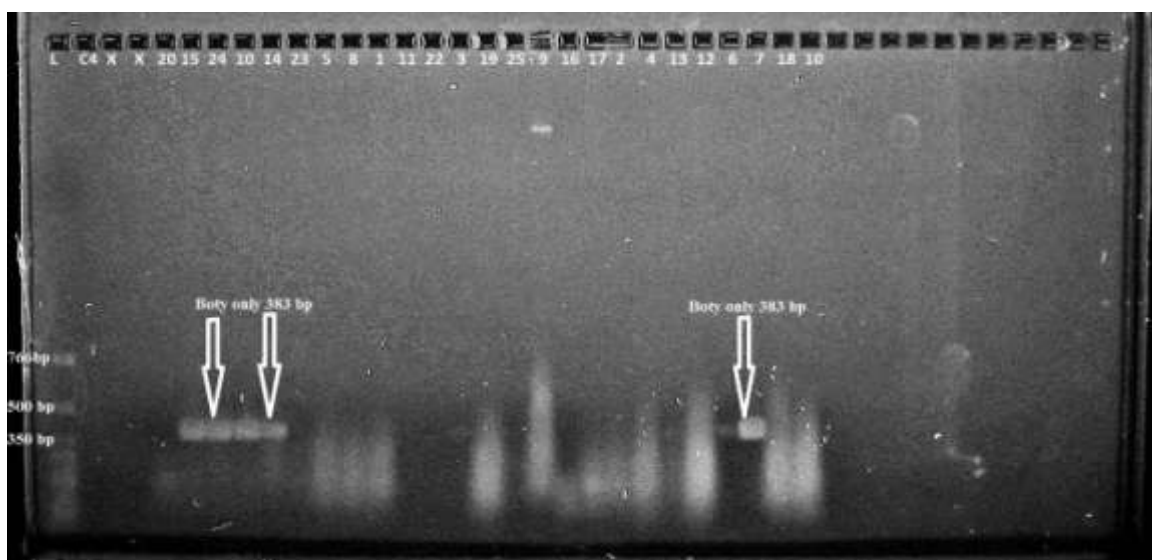
3.1.3 Αποτελέσματα PCR αναφορικά με την ύπαρξη των μεταθετών στοιχείων BOTY-FLIPPER



Εικόνα 14. Αποτέλεσμα PCR για την μελέτη των Boty- Flipper (L= LMW ladder, X= κενό, C3= Control 3 (BcFlp1/2), C4=Control 4(Bc-Boty1/2) 1= KP 19.2, 2= KP 12.2, 3=KP 13.3, 4= B4, 5= KP 4.5, 6= KP 13.5, 7= KP 19.8, 8= KP15.3. 9=14.3, 10=E2, 11= BK3.3, 12= KP21.3, 13=KP10.4, 14= Z4 15= Leh23, 16= KP16.2, 17=KP5.4, 18=KP18.4, 19=KP6.3, 20=BFluoz, 21=KP14.3, 22=Z1, 23= H3, 24= E4, 25= CR18)



Εικόνα 15. Προϊόντα PCR για την ύπαρξη Flipper. (L= LMW ladder, X= κενό, C3= Control 3 (BcFlp1/2), 1= KP 19.2, 2= KP 12.2, 3=KP 13.3, 4= B4, 5= KP4.5, 6= KP13.5, 7= KP19.8, 8= KP15.3, 9=14.3, 10=E2, 11= BK3.3, 12= KP21.3, 13=KP10.4, 14= Z4 15= Leh23, 16= KP16.2, 17=KP5.4, 18=KP18.4, 19=KP6.3, 20=BFluoz, 21=KP14.3, 22=Z1, 23= H3, 24= E4, 25= CR18)



Εικόνα 16. Προϊόντα PCR για την ύπαρξη Boty. (L= LMW ladder, X= κενό, C4=Control 4(Bc-Boty1/2) 1= KP 19.2, 2= KP 12.2, 3=KP 13.3, 4= B4, 5= KP 4.5 6= KP 13.5, 7= KP 19.8, 8= KP15.3. 9=14.3, 10=E2, 11= BK3.3, 12= KP21.3, 13=KP10.4, 14= Z4 15= Leh23, 16= KP16.2, 17=KP5.4, 18=KP18.4, 19=KP6.3, 20=BFluoz, 21=KP14.3, 22=Z1, 23= H3, 24= E4, 25= CR18)

Στην εικόνα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR για την ύπαρξη μεταθετών στοιχείων Boty και Flipper. Στο πρώτο μισό του τζελ ηλεκτροφόρησης τα δείγματα εξετάζονται για την παρουσία του μεταθετού στοιχείου Flipper. Στην προκειμένη περίπτωση για ladder χρησιμοποιείται ο LMW της NEB (Εικόνα 14.) και αρνητικός μάρτυρας είναι ο C3 που αντιστοιχεί σε δείγμα χωρίς DNA. Μετά τον αρνητικό μάρτυρα έχουμε αφήσει μία θέση κενή.

Στο δεύτερο μισό του τζελ ηλεκτροφόρησης τα δείγματα εξετάζονται για την παρουσία του μεταθετού στοιχείου Boty. Στην προκειμένη περίπτωση για ladder χρησιμοποιείται ο LMW της NEB (Εικόνα 14.) και αρνητικός μάρτυρας είναι ο C4 που αντιστοιχεί σε δείγμα χωρίς DNA.

Στην Εικόνα 15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR στο πρώτο μισό του τζελ ηλεκτροφόρησης αναφορικά με την ύπαρξη του μεταθετού στοιχείου Flipper. Όπως προαναφέρθηκε ladder είναι ο LMW της NEB (Εικόνα 14β) ενώ ο αρνητικό μάρτυρας C3 είναι δείγμα που δεν περιέχει DNA. Μετά τη χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, τα δείγματα που φέρουν το μεταθετό στοιχείο Flipper, είναι 2 στον αριθμό και παρουσιάζουν αποτέλεσμα στις 484bp. Τα δείγματα 3 και 6 , KP 13.3 και KP 13.6 αντίστοιχα, είναι δείγματα που λήφθηκαν από το ίδιο φυτό.

Στην Εικόνα 16 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR στο δεύτερο μισό του τζελ ηλεκτροφόρησης αναφορικά με την ύπαρξη του μεταθετού στοιχείου Boty . Όπως προαναφέρθηκε ladder είναι ο LMW της NEB (Εικόνα 14) ενώ ο αρνητικό μάρτυρας C4 είναι δείγμα που δεν περιέχει DNA, ενώ θετικό μάρτυρας αποτελούσε το δείγμα 15. Μετά τη χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, τα δείγματα που φέρουν το μεταθετό στοιχείο Boty, είναι 3 στον αριθμό και παρουσιάζουν αποτέλεσμα στις 383bp. Τα δείγματα 24 και 10, E4 και E2 αντίστοιχα, είναι δείγματα που λήφθηκαν από το ίδιο φυτό.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της HRM έδειξαν ότι από τα συνολικά 20 δείγματα που εξετάστηκαν 2 από αυτά έφεραν την μετάλλαξη E198A που είναι υπεύθυνη για την ύπαρξη ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, ενώ οι υπόλοιπες απομονώσεις ήταν ευαίσθητες (Εικόνα 11). Οι καμπύλες που λαμβάνονται για κάθε ενισχυόμενο προϊόν είναι χαρακτηριστικές και εξαρτώνται από το μήκος του ενισχυόμενου προϊόντος, το περιεχόμενο σε GC, καθώς και την αλληλουχία του. Οι καμπύλες που έφεραν αποκλίσεις από τα δείγματα άγριου τύπου εξετάστηκαν με PCR για να ταυτοποιηθεί αν έφεραν τη μετάλλαξη. Κανένα από αυτά δεν παρουσίασε μετάλλαξη και συνεπώς χαρακτηρίστηκαν ως άγριου τύπου. Ο λόγος που είχαμε καμπύλες υψηλότερες από τις προσδοκώμενες οφείλεται στη μεγάλη συγκέντρωση μυκητιακού DNA ($> 20\text{ pmol}$) κάτι που επηρέασε άμεσα τα αποτελέσματα της HRM.

Επιπλέον από τις συνολικά 20 απομονώσεις που εξετάστηκαν οι 3 έδειξαν ότι φέρουν την H272R μετάλλαξη (Εικόνα 12). Όλες οι υπόλοιπες καμπύλες που παρουσίασαν σημαντικές αποκλίσεις από τις καμπύλες των ευαίσθητων απομονώσεων εξετάστηκαν περαιτέρω με PCR για ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων. Η ιδιομορφία αυτή στις συγκεκριμένες καμπύλες οφείλεται πιθανόν στη μεγάλη συγκέντρωση μυκητιακού DNA ($> 20\text{ pmol}$).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR, ώστε να εξεταστούν περαιτέρω τα δείγματα που εμφάνισαν ιδιόζουσες καμπύλες. Πιο συγκεκριμένα για ανθεκτικότητα στο boscalid ελέγχθηκαν 4 δείγματα και για ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά ελέγχθηκαν 3 δείγματα. Από όλα τα ενισχυμένα PCR προϊόντα μόνο ένα έφερε μετάλλαξη στο boscalid (Εικόνα 13α). Η καμπύλη που παρουσίασε το συγκεκριμένο δείγμα στην HRM ήταν χαμηλότερη από αυτών που έφεραν τη μετάλλαξη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση μυκητιακού DNA (12 pmol). Το συγκεκριμένο δείγμα στάλθηκε για sequencing με σκοπό την επιβεβαίωση της μετάλλαξης. Σε βιοδοκιμές που πραγματοποιήθηκαν το συγκεκριμένο δείγμα παρουσίασε ανθεκτικότητα στο boscalid.

Συνοψίζοντας, 2 από τα 20 δείγματα που εξετάστηκαν έφεραν την μετάλλαξη E198A, που αντιστοιχεί σε ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά. Από την PCR που ακολούθησε δε φάνηκε κανένα άλλο από τα τρία δείγματα, που παρουσίασαν ιδιομορφία στις καμπύλες τήξης, δεν έφερε τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Στην προκειμένη περίπτωση ήταν εφικτός ο εντοπισμός της μετάλλαξης E198A, παρά την ανομοιογένεια των δειγμάτων. Σε βιοδοκιμές

που ακολούθησαν, τα δύο δείγματα που έφεραν την μετάλλαξη E198A παρουσίασαν υψηλή ανθεκτικότητα στο carpendazim.

Για την μετάλλαξη H272R, 4 δείγματα φαίνεται να είναι ανθεκτικά στο boscalid. Στην Εικόνα 12, ξεχωρίζουν χαρακτηριστικά οι καμπύλες που αντιστοιχούν στα 3 δείγματα που έχουν την μετάλλαξη. Από τα δείγματα, που παρουσίασαν ιδιόμορφες καμπύλες, εξετάστηκαν περαιτέρω 4 με PCR, εκ των οποίων μόνο το 1 έφερε τη μετάλλαξη H272Y. Όπως προαναφέρθηκε η καμπύλη που παρουσίασε το συγκεκριμένο δείγμα ήταν χαμηλότερη από το αναμενόμενο εξαιτίας της χαμηλότερης συγκέντρωσης μυκητιακού DNA. Είναι ξεκάθαρο, ότι τα αποτελέσματα της HRM επηρεάστηκαν άμεσα από την πυκνότητα του γενετικού υλικού των δειγμάτων. Παρόλη την ανομοιογένεια στα εξεταζόμενα δείγματα, με τη συγκεκριμένη μέθοδο καταφέραμε να εντοπίσουμε γενετικές μεταλλάξεις επιτυχώς. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα της HRM και στις δύο περιπτώσεις, παρατηρεί ότι 2 δείγματα, συγκεκριμένα το H3 και BK4.4 παρουσιάζουν ανθεκτικότητα τόσο στο boscalid όσο και στα βενζιμιδαζολικά.

Σε πρόσφατες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί η πιο διαδεδομένη μετάλλαξη είναι η H272R και έχει συνδεθεί με μέση ανθεκτικότητα στο boscalid, στη φράουλα. (Veloukas,2013). Στην προκειμένη περίπτωση, τα αποτελέσματα συμφωνούν καθώς παρατηρείται ότι τα στελέχη H272R να παρουσιάζουν μία μέση ανθεκτικότητα στο boscalid στην τομάτα.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας διαφοροποιούνται με αυτά που προκύπτουν από παρόμοια εργασία που έχει πραγματοποιηθεί για την ύπαρξη και τη συχνότητα των μεταθετών στοιχείων σε διάφορους ξενιστές στον Ελλαδικό χώρο. Στην προκειμένη περίπτωση οι τύποι που είχαν εντοπιστεί ήταν τέσσερις : transposa που έφεραν και τα δύο μεταθετά στοιχεία, vacuma, transposa που είχαν μόνο το μεταθετό στοιχείο Boty και αυτά που έφεραν μόνο το στοιχείο Flipper (Samuel et al, 2012). Στη συγκεκριμένη εργασία παρουσιάστηκαν μόνο οι τρεις τύποι κάτι που υποδεικνύει ότι ίσως πρόκειται για διαφορετικό πληθυσμό. Ο λόγος για το οποίο παρατηρείται αυτή η διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων ίσως να οφείλεται στο ότι ο συγκεκριμένος πληθυσμός βρίσκεται σε ένα σχετικά απομονωμένο περιβάλλον και διαμορφώνεται με βάση τις καλλιεργητικές τεχνικές, το περιβάλλον αλλά και τη χρήση των φαρμάκων που διαφέρουν σε σύγκριση με την υπόλοιπη ηπειρωτική Ελλάδα. Η ενεργοποίηση των μεταθετών στοιχείων γίνεται όταν ο μύκητας βρεθεί κάτω από συνθήκες πίεσης.

Επιπλέον, στα 25 δείγματα που μελετήθηκαν για την ύπαρξη των μεταθετών στοιχείων παρουσιάστηκαν τρεις τύποι *B.cinerea*. Αυτοί που ήταν *vacuma*, δηλαδή δεν έφεραν κανένα μεταθετό στοιχείο, και τέλος *transposa* αλλά έφεραν μόνο το *Boty* στοιχείο ή μόνο το *Flipper* στοιχείο. Πιο συγκεκριμένα 2 δείγματα έφεραν το στοιχείο *Flipper* ενώ 3 έφεραν μόνο το στοιχείο *Boty*. Ο τύπος *vacuma* υπήρχε σε μεγαλύτερη αναλογία σε σχέση με τους άλλους τύπους, κάτι που υποδεικνύει προδιάθεση για ευαισθησία στο *carpendazim*. Αν και η ύπαρξη ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά έχει αναφερθεί να είναι διαδομένη στον Ελλαδικό χώρο (Samuel et al, 2012), δεν υποδεικνύεται κάτι τέτοιο. Επιπρόσθετα, στον Ελλαδικό χώρο έχει αναφερθεί ότι η συχνότητα των *transposa* που φέρουν και τα δύο μεταθετά στοιχεία, στην τομάτα μπορεί να φτάσει το 77%. Αντίθετα τα *transposa* που φέρουν μόνο ένα από τα μεταθετά στοιχεία κυμαίνονται σε χαμηλότερες συχνότητες, 2% για το γενότυπο *Boty* και 7% για το γενότυπο *Flipper* (Samuel et al, 2012). Στην προκειμένη περίπτωση η συχνότητα των *vacuma* σαφώς μεγαλύτερη από των *transposa*, ενώ υπήρχαν μόνο *transposa* που έφεραν ένα από τα δύο μεταθετά στοιχεία. Η αναντιστοιχία αυτή των αποτελεσμάτων στα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας με τα αποτελέσματα παρόμοιας διατριβής για την ηπειρωτική Ελλάδα, μπορεί να οφείλεται στην περιορισμένη χρήση βενζιμιδαζολικών σκευασμάτων στη νήσο Κρήτη αλλά και στο στάδιο ανάπτυξης κατά το οποίο συλλέχθηκαν τα δείγματα, αφού η συλλογή πραγματοποιήθηκε πολύ αργότερα από το ανθικό στάδιο του φυτού.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Avenot, H.F., Sellam, A., Karaoglanidis, G. and Michailides T.J. 2008. Characterization of mutations in the iron–sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. *Phytopathology* 98: 736–742.
- Bardas, G. A., Veloukas, T., Koutita, O. and Karaoglanidis, G. S. 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, Qois and fungicides of other chemical groups. *Pest Managing. Science.* 66: 967-973.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen, N., *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, 2007
- Kapabiosystems, n.d. Introduction to High Resolution Melt Analysis [pdf] Available at [http://www.kapabiosystems.com/public/pdfs/kapa-hrm-fast-pcr-kits/Introduction to High Resolution Melt Analysis Guide.pdf](http://www.kapabiosystems.com/public/pdfs/kapa-hrm-fast-pcr-kits/Introduction%20to%20High%20Resolution%20Melt%20Analysis%20Guide.pdf) [Accessed 25 February 2014]
- Ma, Z. and Michailides, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 24: 853-863.
- Michailides, T.J. and Elmer, P.A.G. 2000. Botrytis Gray Mold of kiwifruit caused by *Botrytis cinerea* in the United States and New Zealand. *Plant Disease.* 84: 208-223.
- Myresiotis, C.K., Karaoglanidis, G.S. and Tzavella-Klonari, K. 2007. Monitoring for resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxylanilide, benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease.* 91: 407-413.
- Samuel, S., Veloukas, T., Papayiannis, L.C. and Karaoglanidis, G.S. 2012. Differences in frequency of transposable elements presence in *Botrytis cinerea* populations from several hosts in Greece. *Plant Disease.* 96: 1286-1290.

Veloukas, T., Markoglou, A. N., and Karaoglanidis, G. S. 2013. Differential effect of SdhB gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. Plant Disease. 97:118-122

Vossen R.H., Aten E., Roos A., and Dunnen J.T., 2009, High resolution melting analysis (HRMA)—more than just sequence variant screening, Human Mutation, 30(6): 860-866

Ελληνική βιβλιογραφία

Βελούκας Θ. (2011) , Βιολογική δράση του καρβοξαμιδικού μυκητοκτόνου fluopyram και χαρακτηρισμός του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea*, Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (2011)

Κομνάκου Ι., Η καλλιέργεια της τομάτας στο θερμοκήπιο, εκδ. Σταμούλης, Αθήνα 2000

Παναγόπουλος, Χ., Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Σταμούλης, Αθήνα, Πειραιάς 1995.

Σαμουήλ Σ. (2011) Γενετυπική παραλλακτικότητα πληθυσμών του μύκητα *Botrytis cinerea* και η σχέση της με την αμθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αριστοτέλειο πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (2011)
