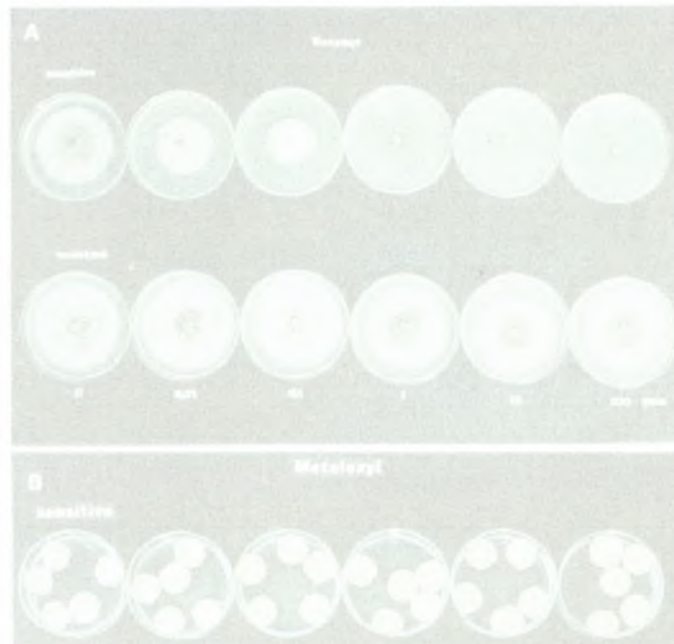


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Τεχνολογικών Επιστημών  
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής και Ζωικής Παραγωγής  
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

**Δ. Γ. Αντωνιάδης**



**Ταξινόμηση ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα  
στελεχών του *Botrytis cinerea*,  
με τη χρησιμοποίηση μοριακών και  
βιοχημικών δεικτών**



**Βόλος - Οκτώβριος 2000**

**Ταξινόμηση ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα στελεχών του  
*Botrytis cinerea*, με τη χρησιμοποίηση μοριακών και  
βιοχημικών δεικτών**

**Εξεταστική Επιτροπή**

**Εισηγητής :** Α.Χ. Παππάς, Καθηγητής Φυτοπαθολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Μέλη :** Ι.Α Τσιτσιπής, Καθηγητής Εντομολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Ε.Ι. Παπλωματάς, Ερευνητής Β΄, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο.



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 2245/1

Ημερ. Εισ.: 01-07-2003

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

632.3

ANT

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |    |
|---|----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ<br>ΠΡΟΛΟΓΟΣ   | 1  |
| <b>Μέρος Α΄ : Βιβλιογραφική ανασκόπηση</b>  |    |
| <i>Botrytis cinerea</i> , το παθογόνο αίτιο της τεφράς σήψης .....  | 3  |
| <b>Χημική καταπολέμηση της τεφράς σήψης και<br/>προβλήματα ανθεκτικότητας στον αγρό .....</b>   | 7  |
| Βενζιμιδαζολικά .....   | 7  |
| Δικαρβοξυμιδικά .....   | 9  |
| Φαινυλοκαρβαμιδικά .....  | 9  |
| Φθαλμίδια .....   | 10 |
| Ανυλινοπυριμιδίνες .....  | 11 |
| Παρεμποδιστές Βιοσύνθεσης Εργοστερόλης .....  | 11 |
| <b>Μέθοδοι ανίχνευσης και καταγραφής της ευαισθησίας των μυκήτων στα<br/>μυκητοκτόνα .....</b>  | 13 |
| <b>Α΄. ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ</b>   | 14 |
| Βιοδοκιμές για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των πληθυσμών των<br>μυκήτων στα μυκητοκτόνα .....  | 14 |
| Βιοδοκικές ανίχνευσης ανθεκτικότητας σε τεχνητά μέσα .....  | 17 |
| Δοκιμές βλάστησης σπορίων .....   | 18 |
| Δοκιμές ανάπτυξης μυκηλίου .....  | 19 |
| Δοκιμές ανθεκτικότητας στα φυτά .....   | 20 |
| Τρόποι μέτρησης της ευαισθησίας του μύκητα στα μυκητοκτόνα ..   | 21 |
| Παρακολούθηση για ανθεκτικότητα .....   | 22 |
| Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μεθόδων .....   | 22 |
| <b>Β΄. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ</b>   | 24 |
| 1. Διαγνωστικές δοκιμές που βασίζονται σε τεχνικές ανοσολογικής<br>ανίχνευσης .....   | 25 |
| Εντοπισμός στελεχών του <i>B. cinerea</i> ανθεκτικών στα<br>βενζιμιδαζολικά με μεθόδους ανοσολογίας .....   | 26 |
| Εντοπισμός της παρουσίας στελεχών του <i>B. cinerea</i><br>ανθεκτικών και ευαίσθητων στα βενζιμιδαζολικά με τρεις<br>διαφορετικές δοκιμές ανοσοεντοπισμού ..... | 27 |
| 2. Διαγνωστικές δοκιμές που βασίζονται σε Μοριακές τεχνικές ...   | 28 |
| Τεχνική RFLP .....  | 28 |

|   |    |
|---|----|
| Τεχνική Southern blotting .....                                     | 28 |
| Τεχνική FISH .....  | 29 |
| Χρήση τελομερών για την αναγνώριση των μικροοργανισμών              | 30 |
| Μέθοδος ελέγχου αποτυπώματος DNA .....                              | 30 |
| Υβριδοποίηση Νουκλεϊνικών οξέων .....                               | 31 |
| Τεχνική PCR .....   | 31 |
| Τεχνική RAPD .....  | 32 |
| 3. Διαγνωστικές δοκιμές που βασίζονται σε τεχνικές κυτταρογενετικής | 33 |
| Τεχνική PFGE .....  | 33 |
| 4. Διαγνωστικές δοκιμές που βασίζονται σε βιοχημικές τεχνικές ...   | 34 |
| Πρότυπα Πρωτεϊνών .....   | 34 |
| Ισοένζυμα .....   | 34 |

## Μέρος Β': Πειραματικό μέρος

|   |    |
|---|----|
| 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....   | 37 |
|   | 38 |
| 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....   | 41 |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....  | 41 |
| Υπόστρωμα ανάπτυξης του μύκητα .....                                | 41 |
| Απομονώσεις του <i>Botrytis cinerea</i> .....                       | 41 |
| Μυκητοκτόνα .....   | 42 |
| Ανίχνευση ανθεκτικότητας .....                                      | 43 |
| Μέτρηση ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα .....                           | 43 |
| Έλεγχος βλάστησης σπορίων.....                                      | 43 |
| Δοκιμές στο μυκήλιο .....   | 43 |
| Ανάπτυξη σε υγρό θρεπτικό .....                                     | 45 |
| Λυοφυλίωση .....  | 45 |
| Απομόνωση και χειρισμός του DNA .....                               | 45 |
| Ανάλυση RAPD .....  | 45 |
| Ηλεκτροφόρηση DNA .....   | 46 |
| Γενετικός χαρακτηρισμός απομονώσεων του <i>B. cinerea</i> .....     | 46 |
| Στατιστική επεξεργασία .....  | 47 |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....   | 49 |
| Ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών του <i>B. cinerea</i> στα μυκητοκτόνα | 49 |
| Μέτρηση της ευαισθησίας ανάλογα με τον τρόπο βλάστησης              |    |
| των σπορίων .....   | 49 |
| Στελέχη αγρίου τύπου .....  | 49 |
| Ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα .....                 | 49 |
| Ανθεκτικότητα στα δικαρβοξυμιδικά .....                             | 50 |
| Ανθεκτικότητα στο μίγμα carbendazim + diethofencarb .....           | 50 |
| Μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid .....                         | 51 |
| Υπολογισμός τιμών MIC για τη βλάστηση των σπορίων.....              | 51 |
| Μέτρηση της ευαισθησίας ανάλογα με την παρεμπόδιση στην             |    |
| ανάπτυξη του μυκηλίου .....   | 52 |
| Ανθεκτικότητα στο carbendazim .....                                 | 52 |

|  |           |
|--|-----------|
| Ανθεκτικότητα στο diethofencarb .....  | 53        |
| Ανθεκτικότητα στο μίγμα carbendazim +diethofencarb .....   | 53        |
| Ανθεκτικότητα στο iprodione .....  | 53        |
| Ανθεκτικότητα στο dichlofluanid .....  | 54        |
| Ανάπτυξη μυκηλίου παρουσία μυκητοκτόνου στους φαινοτύπους<br>ανθεκτικότητας .....  | 54        |
| <b>Ανάλυση RAPD σε απομονώσεις του <i>B. cinerea</i><br/>γνωστού φαινοτύπου ανθεκτικότητας</b>   |           |
| Πολυμορφισμοί DNA μεταξύ απομονώσεων του <i>B.cinerea</i> .....  | 54        |
| Γενετικός χαρακτηρισμός των απομονώσεων του <i>B. cinerea</i> ....   | 55        |
| Φυλογενετική ανάλυση .....   | 55        |
| <br>   |           |
| <b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>   |           |
| <br>   |           |
| <b>Ταξινόμηση απομονώσεων του <i>B. cinerea</i> σε<br/>φαινοτύπους ανθεκτικότητας .....</b>  | <b>57</b> |
| Ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά .....  | 57        |
| Ανθεκτικότητα στα δικαρβοξυμιδικά.....   | 59        |
| Ανθεκτικότητα στο dichlofluanid .....  | 60        |
| Πολλαπλή ανθεκτικότητα .....   | 62        |
| <b>Δοκιμές <i>in vitro</i> ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα<br/>απομονώσεων του <i>B.cinerea</i> .....</b>  |           |
| Βλάστηση σπορίων .....   | 63        |
| Δόκιμες ευαισθησίας στο μυκήλιο .....  | 64        |
| Διαφορές στην ταξινόμηση φαινοτύπων ανθεκτικότητας στα<br>μυκητοκτόνα μεταξύ των δύο τεχνικών .....  | 64        |
| <b>Ανάλυση RAPD .....</b>  | <b>66</b> |
| <br>   |           |
| <b>Μέρος Γ΄: Παράρτημα παρουσίασης Δεδομένων</b>   | <b>69</b> |
| <br>   |           |
| 1. Ανίχνευση ανθεκτικότητας του <i>Botrytis cinerea</i> στα μυκητοκτόνα .....  | 70        |
| 2. Μέτρηση της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα ανάλογα με τον τόπο<br>βλάστησης των σπορίων. Κατάταξη των απομονώσεων στους<br>αντίστοιχους φαινοτύπους ανθεκτικότητας με βάση τις τιμές MIC | 72        |
| 3. Μέτρηση της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα ανάλογα με την<br>παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μυκηλίου .....  | 73        |
| Κατάταξη των απομονώσεων στους αντίστοιχους φαινοτύπους<br>ανθεκτικότητας με βάση τις τιμές ED <sub>50</sub> .....   | 82        |
| 4. Ανάλυση RAPD σε απομονώσεις του <i>B.cinerea</i> γνωστού φαινοτύπου<br>ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα. ....   | 86        |
| <br>   |           |
| <b>Μέρος Δ΄: Βιβλιογραφία .....</b>  | <b>91</b> |

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Γεωπονίας - Φυτικής και Ζωικής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Για τις υποδείξεις στην αναζήτηση της βιβλιογραφίας, τη συμμετοχή στην εκτέλεση της πειραματικής εργασίας, την παραχώρηση φωτογραφικού υλικού και την καθοδήγηση στην παρουσίαση της διατριβής, ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Παππά.

Ευχαριστώ επίσης τον Ερευνητή Β' του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου Δρ. Ε. Παπλωματά για τη συμβολή του στην ολοκλήρωση μέρους της πειραματικής εργασίας και την παραχώρηση φωτογραφικού υλικού.

Για τις γλωσσικές διορθώσεις του κειμένου και την επιμέλεια της παρουσίασης ευχαριστώ τις κυρίες Ε. Βενετά και Κ.Σπύρου- Βλαχούτσου, Φιλόλογους.



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* προκαλεί την ασθένεια της Τεφράς σήψης (Gray mould), και προκαλεί μεγάλες οικονομικές απώλειες στους καλλιεργητές λόγω των ποιοτικών και ποσοτικών ζημιών που προκαλεί στις καλλιέργειες σε ένα μεγάλο εύρος ξενιστών. Ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης της ασθένειας σήμερα είναι η χημική καταπολέμηση. Η εμφάνιση στελεχών του μύκητα ανθεκτικών στις φυτοπροστατευτικές ουσίες (μυκητοκτόνα) που διαθέτουμε σήμερα για την κατά πολέμηση της Τεφράς σήψης, αποτελεί γεγονός με άμεσες συνέπειες στην αποτελεσματικότητα της καταπολέμησης. Η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου στις ουσίες αυτές είναι γεγονός που έχει καταγραφεί από πολύ νωρίς στον αγρό και συμπίπτει κυρίως με την εμφάνιση των διασυστηματικών ουσιών εξειδικευμένης δράσης μετά τη δεκαετία του '60.

Η καταγραφή της ευαισθησίας των πληθυσμών του παθογόνου τόσο σε τοπικό όσο και εθνικό επίπεδο είναι απαραίτητη για την ανάληψη στρατηγικών αντιμετώπισης της ανθεκτικότητας και στρατηγικών που θα επιτρέψουν την βελτίωση της αποτελεσματικότητας των μεθόδων της χημικής καταπολέμησης. Στην προσπάθεια ανίχνευσης και καταγραφής της ευαισθησίας των πληθυσμών των φυτοπαθογόνων μυκήτων στα διάφορα μυκητοκτόνα, χρησιμοποιούνται οι συμβατικές μέθοδοι της Φυτοπαθολογίας ενώ πρόσφατα έχουν εισαχθεί, εξελίσσονται και βρίσκουν εφαρμογή διαγνωστικές τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας όπως η ανοσολογία και η τεχνολογία του DNA. Μερικοί από τους τρόπους ταυτοποίησης των ανθεκτικών στελεχών είναι οι βιοδοκιμές *in vitro* σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων, στις οποίες καταγράφεται ο τρόπος βλάστησης των σποριών, ο ρυθμός αύξησης της διαμέτρου της αποικίας, ο ρυθμός αύξησης του ξηρού βάρους σε υγρό θρεπτικό και οι δοκιμές *in vivo* σε φυτά ή φυτικά μέρη π.χ. αποκομμένα φύλλα. Από τις τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας έχουν χρησιμοποιηθεί τεχνικές της Ανοσολογίας και μοριακές τεχνικές όπως η RAPD-PCR, η τεχνική RFLP, η κυτοενετική κ.α.

Η μελέτη αποτελείται από δύο μέρη: την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, και το πειραματικό μέρος.

Το πρώτο μέρος περιλαμβάνει μια γενική αναφορά στο παθογόνο καθώς και στους τρόπους καταπολέμησης της ασθένειας που προκαλεί στα φυτά, ενώ γίνεται μια ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, πάνω στην χημική καταπολέμηση της Τεφράς σήψης και τα προβλήματα ανθεκτικότητας που εμφανίζονται στον αγρό. Στη συνέχεια γίνεται αναφορά στην καταγραφή της ευαισθησίας των μυκήτων στα διάφορα μυκητοκτόνα και αναφέρονται οι τρόποι ανίχνευσης και καταγραφής της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα στελεχών του *Botrytis cinerea*, με τις συμβατικές μεθόδους της Φυτοπαθολογίας ενώ ένα μεγάλο κομμάτι της βιβλιογραφικής

ανασκόπησης περιλαμβάνει την έρευνα και τις εφαρμογές που έχουν γίνει μέχρι σήμερα στην ανάπτυξη και εφαρμογή διαγνωστικών τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας, στην ανίχνευση ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα.

Στο πειραματικό μέρος έγινε ανίχνευση ανθεκτικότητας σε περισσότερες από 100 απομονώσεις στελεχών του *B.cinerea* που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων. Συγκεκριμένα, έγινε αρχικός έλεγχος ανάπτυξης στελεχών σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με carbendazim ή diethofencarb ή του μίγματος carbendazim + diethofencarb σε συγκεντρώσεις 0, 1 και 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με iprodione σε συγκεντρώσεις 0, 3 και 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  και σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με dichlofluanid σε συγκεντρώσεις 0, 1, 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Επιλέχθηκαν 20 απομονώσεις του *Botrytis cinerea*, στις οποίες έγινε δοκιμή βλάστησης σπορίων παρουσία μυκητοκτόνου, υπολογίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση που παρεμποδίζει τη φυσιολογική βλάστηση των σπορίων (MIC), και οι απομονώσεις κατατάχθηκαν σε φαινοτύπους ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα, με βάση τις τιμές MIC. Στις απομονώσεις αυτές έγινε στη συνέχεια δοκιμή ανάπτυξης μυκηλίου παρουσία μυκητοκτόνου, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του μυκητοκτόνου που παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μυκηλίου κατά 50% σε σχέση με το μάρτυρα (τιμή  $\text{ED}_{50}$ ) και οι απομονώσεις κατατάχθηκαν σε φαινοτύπους ανθεκτικότητας με βάση τις τιμές  $\text{ED}_{50}$ .

Υπήρξε ταύτιση των μεθόδων ταξινόμησης των στελεχών σε φαινοτύπους ανθεκτικότητας στο carbendazim, το diethofencarb και το carbendazim + diethofencarb, παρόμοια αποτελέσματα σε όλες τις απομονώσεις εκτός από μία για το iprodione, ενώ η δοκιμή ανάπτυξης μυκηλίου στο dichlofluanid έδωσε διαφορετικά αποτελέσματα από την ταξινόμηση που έγινε με βάση τη βλάστηση των σπορίων. Τα αποτελέσματα συζητούνται ως προς τον τρόπο δράσης των μυκητοκτόνων.

Τέλος σε απομονώσεις γνωστού φαινοτύπου ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα που είχαν χαρακτηριστεί με τις παραπάνω μεθόδους, έγινε εφαρμογή της τεχνικής RAPD-PCR για να διαπιστωθεί αν η τεχνική μπορεί να διακρίνει τα στελέχη ως προς την ευαισθησία τους στα μυκητοκτόνα. Διαπιστώθηκε αξιοσημείωτη γενετική ποικιλότητα μεταξύ των απομονώσεων και φάνηκε ότι η τεχνική μπορεί να ξεχωρίζει τα στελέχη στους φαινοτύπους ανθεκτικότητας που δοκιμάστηκαν.



## Μέρος Α΄: Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

### ***Botrytis cinerea*, ΤΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ ΤΗΣ ΤΕΦΡΑΣ ΣΗΨΗΣ**

Η ασθένεια που είναι κυρίως γνωστή και σαν βοτρυτής, τεφρά ή σταχτιά σήψη (gray mold, grey mould), προκαλείται από το μύκητα *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., έχει παγκόσμια εξάπλωση και προσβάλλει τα περισσότερα από τα καλλιεργούμενα φυτά. Σοβαρές ζημιές προκαλεί σε πολλά κηπευτικά και καλλωπιστικά φυτά. Είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη στις καλλιέργειες υπό κάλυψη λόγω των έντονων προσβολών και των δυσχερειών στην αντιμετώπισή της. Η ασθένεια προκαλεί επίσης και μετασυλλεκτικές σήψεις στα συγκομιζόμενα προϊόντα (διακίνηση και αποθήκευση) (Παναγόπουλος, 1995). Στη χώρα μας η Τεφρά σήψη αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα στις καλλιέργειες θερμοκηπίου κηπευτικών και ανθέων. Γενικά είναι μια από τις πλέον διαδεδομένες και μεγάλης οικονομικής σημασίας ασθένειες των φυτών στις περιοχές που επικρατούν οι κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξή της.

#### **Συμπτώματα – ξενιστές**

Ο μύκητας αναπτύσσεται πάνω σε υγιείς ή εξασθενημένους ή νεκρούς φυτικούς ιστούς στους οποίους μπορεί να ζει τόσο σαπροφυτικά όσο και παρασιτικά. Αν και είναι παράσιτο αδυναμίας, μπορεί να προξενήσει τεράστιες ζημιές κάτω από ευνοϊκές συνθήκες. Εξειδίκευση του είδους *Botrytis cinerea* σε ορισμένο ξενιστή δεν θεωρείται ότι υπάρχει. Πάντως έχουν αναφερθεί διαφορές στην παθογένεια μεταξύ απομονώσεων από διάφορους ξενιστές. Προσβάλλει φυτά όλων των ηλικιών και όλα σχεδόν τα μέρη τους (φύλλα, άνθη, καρπούς, στελέχη, ρίζες) και προκαλεί συμπτώματα διαφόρων τύπων. Ανάλογα με το είδος και την ηλικία των ιστών που προσβάλλει και των συνθηκών του περιβάλλοντος που επικρατούν προκαλεί κηλιδώσεις φύλλων, ανθέων και καρπών, έλκη βλαστών, σήψεις καρπών, ανθέων, κονδύλων, και μικρών φυτών. Ο μύκητας προσβάλλει σημαντικές οικονομικά καλλιέργειες όπως τομάτα, αγγούρι, πιπεριά, μελιτζάνα, μαρούλι, σέλινο, φράουλα, τεύτλο, λάχανο, κρεμμύδι κ.α., διάφορα ανθοκομικά και καλλωπιστικά φυτά όπως γαρύφαλλο τριαντάφυλλο, αζαλέα, χρυσάνθεμο κ.α. Επίσης προσβάλλει το αμπέλι και τα καρποφόρα δέντρα. Οι ζημιές που προκαλεί το παθογόνο διακρίνονται σε ποιοτικές και ποσοτικές ανάλογα με τον ξενιστή και τις συνθήκες που επικρατούν μετά τη μόλυνση (Μπέσα, 1995).

#### **Παθογόνο Αίτιο**

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. (Deuteromycotina, Hyphomycetes), σχηματίζει όρθιους κονιδιοφόρους που αποτελούνται από ένα ποδίσκο καστανού χρώματος, αρχικά απλούς που στη συνέχεια διακλαδίζονται ακανόνιστα ή με

διχοτόμηση και φέρουν στην κορυφή τους πάνω σε μικρές διακλαδώσεις κονίδια κατά κεφαλές, σε μορφή βότρυος (Διάγραμμα 1.1). Τα κονίδια (σπόρια) του μύκητα είναι υαλώδη, μονοκύτταρα, ωοειδή, με διαστάσεις 8-14 x 6-9 μm (Παναγόπουλος, 1995). Το μυκήλιο του μύκητα είναι γενικά κυλινδρικό και μεγάλης διαμέτρου με πολυάριθμα διαφράγματα (septa), τα οποία φέρουν έναν απλό πόρο. Το μυκήλιο μπορεί να είναι μεσοκυττάριο, ενδοκυτταρικό ή επιφανειακό, ενώ συχνά σημειώνονται αναστομώσεις μεταξύ των υφών. Τα κύτταρα των υφών, με ελάχιστες εξαιρέσεις είναι πολυπύρρηνα. Τα βλαστάνοντα κύτταρα και τα σπόρια του *Botrytis cinerea* μπορεί να είναι ετεροκαρυωτικά. Η ετεροκαρύωση αποτελεί μια πηγή ποικιλομορφίας στο μύκητα (Μπέσα, 1995).



**Διάγραμμα 1.1 :** Κονιδιοφόροι και κονίδια του μύκητα *Botrytis cinerea*

### Συνθήκες ανάπτυξης

Απαραίτητες συνθήκες για την ανάπτυξη της ασθένειας είναι η υψηλή σχετική υγρασία του περιβάλλοντος (συνεχείς βροχοπτώσεις, ομίχλες, υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία λόγω έλλειψης αερισμού κ.α. ) και ο σχετικά ψυχρός καιρός. Ο μύκητας δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας γιατί μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 1° και 30 °C. Εντούτοις, η άριστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του μύκητα κυμαίνεται μεταξύ 18- 23 °C. Σε θερμοκρασίες 32 °C και άνω η ανάπτυξη του παθογόνου παρεμποδίζεται (Παναγόπουλος, 1995). Με ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας αναπτύσσεται πολύ γρήγορα το μυκήλιο του παρασίτου και σχηματίζονται άφθονοι κονιδιοφόροι με τεράστιο αριθμό σπορίων (Παναγόπουλος 1997) που εμφανίζονται σαν σταχτιά μούχλα πάνω στους προσβεβλημένους ιστούς, σύμπτωμα χαρακτηριστικό της προσβολής του *Botrytis cinerea*. Τα σπόρια βλαστάνουν ταχύτατα στις σταγόνες του νερού και προκαλούν με απ' ευθείας διάτρηση της εφυμενίδας νέες μολύνσεις. Οι μολύνσεις όμως γίνονται συνήθεστερα με μυκήλιο το οποίο αναπτυσσόμενο σε νεκρούς ή εξασθενημένους ιστούς εξαπλώνεται εύκολα στους επαπτόμενους υγιείς ιστούς. Η παρουσία πληγών διευκολύνει την είσοδο του παθογόνου (Παναγόπουλος 1995).

## Επιδημιολογία

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* ζει σαν σαπρόφυτο υπό μορφή μυκηλίου ή σκληρωτίων πάνω σε εξασθενημένους φυτικούς ιστούς και υπολείμματα καλλιέργειας. Κύρια πηγή μόλυνσης είναι οι προσβεβλημένοι ιστοί πάνω στους οποίους παράγονται άφθονα σπόρια τα οποία μεταφέρονται με τα ρεύματα του αέρα ή τη βροχή. Διασπορά σπορίων και μεταφορά τους στα υγιή φυτά γίνεται επίσης με τα χέρια, τα ρούχα και τα εργαλεία των εργατών κατά την εκτέλεση των καλλιεργητικών φροντίδων ιδιαίτερα μέσα στα θερμοκήπια (Παναγόπουλος, 1997). Τα σπόρια μπορούν να επιβιώσουν για 1-3 μήνες, αν ο καιρός παραμείνει υγρός και ψυχρός. Αν η μόλυνση εγκατασταθεί, το επίπεδο υγρασίας και θερμοκρασίας είναι λιγότερο σημαντικό για την επιβίωση του μύκητα. Φυτικά υπολείμματα που φιλοξενούν τον μύκητα σαν σαπρόφυτο αναφέρεται επίσης ότι μεταφέρονται με τον αέρα και προσκολλώνται πάνω σε υγιείς ιστούς τους οποίους μολύνουν εξ επαφής (π.χ. ράγες σταφυλιών). Τα ασκοσπόρια του μύκητα παράγονται πολύ σπάνια και δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση της ασθένειας (Μπέσα, 1995).

## Καταπολέμηση

Η καταπολέμηση του *Botrytis cinerea* είναι δύσκολη και προϋποθέτει τη χρησιμοποίηση σε συνδυασμό καλλιεργητικών, βιολογικών και χημικών μεθόδων. Κι αυτό γιατί το παθογόνο δημιουργεί εύκολα ανθεκτικά στελέχη σε πολλά μυκητοκτόνα περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των χημικών επεμβάσεων.

Η καταπολέμηση της Τεφράς σήψης, γίνεται με την εφαρμογή των παρακάτω μέτρων:

**1. Καλλιεργητικές πρακτικές.** Συνιστάται η λήψη τους για τη διατήρηση του μολύσματος σε χαμηλά επίπεδα και η δημιουργία δυσμενών συνθηκών για την ανάπτυξη της ασθένειας

α. **Μείωση της υγρασίας,** είτε με αραιή φύτευση είτε στα θερμοκήπια με αποφυγή των μεγάλων διακυμάνσεων της θερμοκρασίας που συντελούν στη συμπύκνωση των υδρατμών και με καλό αερισμό (Παναγόπουλος, 1995) καθώς επίσης και κανονικό κλάδεμα και ξεφύλλισμα, καλό αερισμό και κανονικά ποτίσματα (Βακαουνάκης, 1998).

β. **Τήρηση καλής υγιεινής** στις φυτείες, με αφαίρεση και καταστροφή των προσβεβλημένων φυτών ή φυτικών ιστών (Παναγόπουλος 1995) και λήψη μέτρων για αποφυγή πληγών με προσεκτικούς χειρισμούς κατά την εκτέλεση καλλιεργητικών εργασιών και κατά τη συγκομιδή (Παναγόπουλος, 1997).

Για καλύτερα αποτελέσματα οι καλλιεργητικές πρακτικές πρέπει να εφαρμόζονται σε συνδυασμό με προληπτικές επεμβάσεις κατάλληλων μυκητοκτόνων

**2. Χημική καταπολέμηση.** Για την προστασία των εναέριων φυτικών μερών των φυτών, γίνονται προληπτικοί ψεκασμοί, ανά 7 μέρες, με ένα οργανικό μυκητοκτόνο όπως captan, thiram, dichlofluanid, chlorothalonil, dicloran (Παναγόπουλος 1995). Αργότερα όταν η ασθένεια προχωρήσει συστήνονται ψεκασμοί με μίγματα ενός από τα πιο πάνω προστατευτικά μυκητοκτόνα μαζί με ένα δικαρβοξυμιδικό (vinclozolin, procymidone, iprodione) ή βενζιμιδαζολικό (benomyl, carbendazim, thiophanate methyl, κ.α.) μυκητοκτόνο. Παρόλα αυτά, είναι πιθανόν η χημική καταπολέμηση να μην είναι αποτελεσματική, λόγω της εμφάνισης και επικράτησης ανθεκτικών στελεχών του μύκητα. Μίγματα βενζιμιδαζολικών και φαινυλοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων, των οποίων η αποτελεσματικότητα οφείλεται

στην αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα των συστατικών τους δίνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση ανθεκτικών στελεχών (Βακαλουνάκης, 1998).

**3.Βιολογική καταπολέμηση.** Τα τελευταία χρόνια διεξάγεται εντατική έρευνα για την ανάπτυξη μεθόδων βιολογικής καταπολέμησης της ασθένειας, ιδίως με τη χρησιμοποίηση διαφόρων ανταγωνιστικών μικροοργανισμών. Πρόσφατα πήρε έγκριση στη χώρα μας το πρώτο βιολογικό μυκητοκτόνο που συνιστάται για τη βιολογική καταπολέμηση του Βοτρύτη. Είναι το Trichodex 20 WP που περιέχει το μύκητα *Trichoderma harzianum* (φυλή no 39), ο οποίος φαίνεται ότι δρα ως τροφικός ανταγωνιστής εναντίον του παθογόνου (Παναγόπουλος, 1997).

Οι ανταγωνιστές *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Coniothyrium minitans* και η αμοιβάδα *Arachnula impatiens* σε δοκιμές *in vitro* και *in vivo* έλεγξαν ικανοποιητικά το παθογόνο (Μπέσα, 1995).

**4.Συνδυασμένη καταπολέμηση.** Η αντιμετώπιση της ασθένειας στην τομάτα μπορεί να γίνει και με την εκτέλεση 2-3 ψεκασμών με το βιολογικό προϊόν Trichodex 20 WP με την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων, οι οποίοι επαναλαμβάνονται ανά 7ήμερο, σε εναλλαγή με δικαρβοξυμιδικά μυκητοκτόνα. Εφόσον η πίεση της προσβολής είναι μεγάλη ή δεν επιτυγχάνονται ικανοποιητικά αποτελέσματα, συνιστάται η αποκλειστική εφαρμογή χημικής καταπολέμησης.

Σε πειράματα διαπιστώθηκε ικανοποιητική καταπολέμηση της ασθένειας με τη χρησιμοποίηση ειδικής κατηγορίας πλαστικού που απορροφά μέρος της υπεριώδους ακτινοβολίας και έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της παραγωγής σπορίων από το παθογόνο (Παναγόπουλος, 1995).

**Βιβλιογραφία:** Βακαλουνάκης (1998), Μπέσα (1995), Παναγόπουλος (1995), Παναγόπουλος (1997).



## ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΦΡΑΣ ΣΗΨΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΑΓΡΟ

Η καταπολέμηση της Τεφράς σήψης είναι δύσκολη, ιδιαίτερα όταν δεν ακολουθείται μια στρατηγική αντιμετώπισης ολοκληρωμένη και ορθολογική. Μια τέτοια στρατηγική προϋποθέτει τη χρησιμοποίηση σε συνδυασμό καλλιεργητικών, βιολογικών και χημικών μεθόδων. Κι αυτό γιατί το παθογόνο δημιουργεί εύκολα ανθεκτικά στελέχη σε πολλά μυκητοκτόνα περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των χημικών επεμβάσεων. Με την εμφάνιση των διασυστηματικών μυκητοκτόνων είχαμε μεγάλη αύξηση της σημασίας της ανθεκτικότητας για τη Φυτοπαθολογία. Με τα μυκητοκτόνα αυτά η δημιουργία ανθεκτικότητας είναι ο κανόνας μάλλον παρά η εξαίρεση και την είσοδό τους στη γεωργική πράξη ακολούθησε σύντομα η εμφάνιση του προβλήματος της ανθεκτικότητας σε πολλές καλλιέργειες (Πίνακες 1.1 και 1.2). Έτσι είχαμε πολλές αποτυχίες κυρίως με τα βενζιμιδαζολικά και με τα φαινυλαμίδια. Ανθεκτικότητα έχει επίσης παρουσιασθεί στην περίπτωση των δικαρβοξυμιδικών, των ανυλινουριμιδινών και τελευταία των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης (Γεωργόπουλος 1992).

Τα μυκητοκτόνα που συνιστώνται για την καταπολέμηση της ασθένειας ανήκουν στις ακόλουθες τρεις κατηγορίες: Α. Οργανικά μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος δράσης όπως dichlofluanid, chlorothalonil, captan, thiram, Β. Διασυστηματικά της ομάδας των βενζιμιδαζολικών, όπως benomyl, carbendazim, thiophanate methyl και Γ. Ειδικής δράσεως της ομάδας των δικαρβοξυμιδικών: procymidone, vinclozolin, iprodione, chlozolinatate (Παναγόπουλος 1997). Επίσης στη χημική καταπολέμηση του βοτρυτή χρησιμοποιούνται νέες οικογένειες βοτρυδιοκτόνων όπως οι ανυλινουριμιδίνες και οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης καθώς και μίγματα βενζιμιδαζολικών και φαινυλοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων.

### Βενζιμιδαζολικά

Το φθινόπωρο του 1970, καταγράφηκε για πρώτη φορά στην Ολλανδία ανθεκτικότητα στελεχών του *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά, μέσα σε θερμοκήπια κυκλάμινων. Από το 1972 και μετά το ίδιο φαινόμενο αναφέρεται και στο αμπέλι. Σε αμπελώνες στη Νέα Ζηλανδία το 1985 βρέθηκαν στελέχη του *B. cinerea*, με μέση συχνότητα ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, 8- 40% (Beever *et al.*, 1989). Τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα ανήκουν στην ομάδα υψηλού κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Στα μυκητοκτόνα αυτά έχουμε υψηλή ανθεκτικότητα με μεταλλαγές επικρατών γονιδίων, που δεν φαίνεται να επηρεάζουν συγχρόνως την προσαρμοστικότητα των μεταλλαγμένων στελεχών. Σύμφωνα με τους Faretra and Pollastro (1991,1993), η ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά καθορίζεται από αλληλόμορφα του ίδιου γονιδίου που το ονόμασαν Mbc1. Η καλή προσαρμοστι-

κότητα των ανθεκτικών στελεχών δεν επιτρέπει επιλογή προς την κατεύθυνση του ευαίσθητου πληθυσμού στις περιόδους μεταξύ των εφαρμογών του μυκητοκτόνου. Έτσι έχουμε γρήγορη αύξηση της συχνότητας των ανθεκτικών στελεχών και απότομη απώλεια της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου. Επιπλέον η συχνότητα των ανθεκτικών στελεχών στον πληθυσμό παραμένει υψηλή για πολλά χρόνια μετά τη διακοπή εφαρμογής του μυκητοκτόνου σε μια περιοχή, γεγονός που κάνει αδύνατη τη χρησιμοποίηση του μυκητοκτόνου αυτού ή άλλου παρόμοιας δράσης για πολλά χρόνια (Γεωργόπουλος, 1992).

Ο μηχανισμός μυκητοτοξικής δράσης των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων είναι γνωστός σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό και βασίζεται στην επίδραση τους στην πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων τουμπουλίνη, η οποία είναι ένα ετεροδιμερές μόριο, αποτελείται δηλαδή από δυο υπομονάδες, οι οποίες συμβολίζονται ως α- και β-τουμπουλίνη. Σήμερα είναι γνωστό ότι στους ευαίσθητους μύκητες το carbendazim, είναι τοξικό, γιατί παρεμποδίζει το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου (spindle), αποκλείοντας έτσι τον κανονικό αποχωρισμό των θυγατρικών χρωμοσωμάτων (Γεωργόπουλος, 1992). Σημαντικό ρόλο για τη μυκητοτοξικότητα αυτών των μορίων παίζει και η παρεμπόδιση του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων του κυτταροπλάσματος από τους οποίους εξαρτάται ο προσανατολισμός των υφών. Τεχνικές μοριακής βιολογίας έχουν επιβεβαιώσει ότι η β-τουμπουλίνη είναι ο στόχος δράσης των βενζιμιδαζολικών (Fujumura *et al.*, 1990).

**Πίνακας 1.1.** Εμφάνιση προβλημάτων ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα διεθνώς

| Έτος | Κατηγορία                      | Έτη Εφαρμογής | Ασθένεια   |
|------|--------------------------------|---------------|--|
| 1964 | Όργανο-υδραργυρούχα            | 40            | Ελμινθοσπορίωση βρώμης                           |
| 1970 | Βενζιμιδαζολικά                | 2             | Φουζικλάδιο, Βοτρύτης, Ωίδιο, Κερκοσπορίωση κ.ά. |
| 1971 | Αμινο-πυριμιδινικά             | 2             | Ωίδιο κολοκυνθοειδών και κριθαριού               |
| 1973 | Καρβοξαμιδικά                  | 3             | Σκωρίωση χρυσάνθεμου                             |
| 1980 | Φαινυλαμίδια                   | 2             | Περωνόσπορος πατάτας, αμπέλου και μαρουλιού      |
| 1982 | Δικαρβοξιμιδικά                | 5             | Βοτρύτης αμπέλου και άλλων καλλιεργειών          |
| 1982 | DMIs                           | 4             | Ωίδιο σιτηρών και κολοκυνθοειδών                 |
| 1986 | Καρβοξαμιδικά                  | 14            | Γυμνός άνθρακας του κριθαριού                    |
| 1987 | Μορφολινικά<br>(fenpropimorph) | 7             | Ωίδιο σιτηρών                                    |

Πηγή: Β.Ν. Ζιώγας, Ν. Παναγιωταρου- Πέτσικου και Α. Καλαμαράκη, 1998

**Πίνακας 1.2.** Εμφάνιση ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα στην Ελλάδα

| Έτος | Μυκητοκτόνο     | Ασθένεια                           |
|------|-----------------|------------------------------------|
| 1972 | benomyl         | Κερκοσπορίωση τεύτλων              |
| 1976 | benomyl         | Ωίδιο κολοκυνθοειδών               |
| 1977 | fentin acetate  | Κερκοσπορίωση τεύτλων              |
| 1979 | metalaxyl       | Περωνόσπορος αγγουριού             |
| 1980 | Δικαρβοξιμιδικά | Βοτρύτης κυκλάμινου και κηπευτικών |
| 1982 | Βενζιμιδαζολικά | Μαύρη σήψη ή Κομμίωση αγγουριού    |
| 1995 | DMIs            | Ωίδιο αμπέλου                      |



## Δικαρβοξιμιδικά

Μετά την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά στη δεκαετία του '70, χρησιμοποιήθηκαν κυρίως τα δικαρβοξιμιδικά, μυκητοκτόνα εναντίον της ασθένειας του βοτρώτη. Παρόλα αυτά, μέχρι το 1981, στελέχη του *Botrytis cinerea* που εμφάνιζαν μερική ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά iprodione, vinclozolin, procymidone και / ή υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά (benomyl, carbendazim, thiophanate methyl ) ανακαλύφθηκαν σε διάφορες καλλιέργειες υπό κάλυψη και περιοχές της Ελλάδας (Pappas, 1982). Εξαιτίας της ανθεκτικότητας αυτής, μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος, όπως το dichlofluanid, εφαρμόζονταν σε μίγματα ή σε εναλλακτικούς ψεκασμούς με τα δικαρβοξιμιδικά. Τέτοιες εφαρμογές ήταν αποτελεσματικές εναντίον της Τεφράς σήψης όταν δοκιμάστηκαν σε περιοχές όπου υπήρχαν στελέχη που εμφάνιζαν υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και επιπλέον μέτρια ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid (Pappas and Elena, 1992).

Τα δικαρβοξιμιδικά (iprodione) παρεμποδίζουν την βλάστηση των σπορίων και τη διαμόρφωση του ράμφους μόλυνσης και προκαλούν διακλαδώσεις, διόγκωση και λύση στις υφές του μύκητα. Βιοχημικές μελέτες δείχνουν ότι αυτά τα μυκητοκτόνα επηρεάζουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και επάγουν τη συσσώρευση γλυκερόλης στα μυκηλιακά κύτταρα (Leroux, 1996) ενώ μια τελευταία θεωρία υποστηρίζει ότι προκαλούν υπεροξείδωση των λιπιδίων κύρια στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, στην πυρηνική μεμβράνη και το ενδοπλασματικό δίκτυο των ευαίσθητων μυκήτων (Γεωργόπουλος, 1992).

Τα δικαρβοξιμιδικά ανήκουν στα μυκητοκτόνα μέσου κινδύνου. Εδώ υπάγονται μυκητοκτόνα στα οποία είτε έχουμε μεταλλαγές επικρατών γονιδίων που όμως επηρεάζουν σοβαρά την προσαρμοστικότητα των μεταλλαγμένων. Γενετικές μελέτες που έγιναν από τους Faretra and Pollastro (1991, 1993) σε απομονώσεις αγρού και εργαστηριακά μεταλλαγμένα στελέχη, έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά κωδικοποιείται από ένα μόνο πολυμορφικό επικρατές γονίδιο που το ονόμασαν *Daf1* με πολλές κατηγορίες αλληλομόρφων που είναι υπεύθυνα για ανάλογες φαινοτυπικές αποκρίσεις στα μυκητοκτόνα. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται μια αντίθετη σχέση μεταξύ βαθμού ανθεκτικότητας και προσαρμοστικότητας. Έτσι στην πράξη επικρατούν στελέχη με μέτρια μάλλον ανθεκτικότητα. Με μια αύξηση στη δόση ή τη συχνότητα των επεμβάσεων μπορούμε να έχουμε και πάλι ικανοποιητικά αποτελέσματα στη χημική καταπολέμηση (Hewitt, 1998).

## Φαινυλοκαρβαμιδικά

Το κύριο πρόβλημα των βενζιμιδαζολικών είναι η συχνή εμφάνιση και επικράτηση στον αγρό ανθεκτικών στελεχών. Οι Leroux και Gredt (1979) παρατήρησαν πρώτοι ότι στελέχη του *Botrytis cinerea*, ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά, παρουσίαζαν μεγάλη ευαισθησία στα καρβαμιδικά ζιζανιοκτόνα. Από τις παρατηρήσεις αυτές ξεκίνησε μια προσπάθεια για την ανακάλυψη φαινυλοκαρβαμιδικών ενώσεων, που να μην είναι τοξικές και να είναι κατάλληλες για την καταπολέμηση των ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών του *Botrytis cinerea*. Τέτοιες ενώσεις που ανακαλύφθηκαν, είναι το MDPC και το diethofencarb.

Η κύρια δράση των φαινυλοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων είναι η παρεμπόδιση της δημιουργίας της μιτωτικής ατράκτου, παρόμοια με τα βενζιμιδαζολικά. Μελέτες προτείνουν την παρουσία μιας κοινής περιοχής πρόσδεσης

στην περιοχή της β-τουμπουλίνης (Fujimura *et al.*, 1990). Αλλαγές στη θέση προσκόλλησης, που μειώνουν τη συγγένεια (affinity) για τα βενζιμιδαζολικά μπορεί να αυξήσουν τη συγγένεια για τα φαινυλοκαρβαμιδικά γεγονός που μπορεί να είναι η βάση για την αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ των ανθεκτικών στο carbendazim και των φαινυλοκαρβαμιδικών (Butters *et al.*, 1995). Γενικά αυτό το φαινόμενο αφορά απομονώσεις υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, ενώ στελέχη μέτριας και μικρής ανθεκτικότητας παραμένουν ανεπηρέαστα από τα φαινυλοκαρβαμιδικά.

Το χειμώνα του 1989, ένα μείγμα από carbendazim 25% δ.ο και diethofencarb 25% δ.ο., με το εμπορικό όνομα Sumico εισήχθηκε στην αγορά αγροχημικών προϊόντων στην Ελλάδα αντικαθιστώντας τα περισσότερα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνταν πριν εναντίον του Βοτρύτη. Παρόλα αυτά, η αποτελεσματικότητα αυτού του μυκητοκτόνου μίγματος δεν θεωρήθηκε ποτέ αποτελεσματική από τους παραγωγούς στην Ελλάδα (Pappas, 1997). Στην Ισπανία το 1992, εντοπίστηκαν στελέχη *B. cinerea* με πολλαπλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμιδικά και στο μίγμα carbendazim+ diethofencarb σε θερμοκήπια όπου είχαν γίνει ψεκασμοί με το μίγμα (Raposo *et al.*, 1994). Στελέχη πολλαπλής ανθεκτικότητας εντοπίστηκαν και στο Ισραήλ το 1988 δύο χρόνια μετά τη χρήση του μίγματος σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες αγγουριού (Katan *et al.*, 1989). Μετά από τέσσερα χρόνια εφαρμογής του carbendazim + diethofencarb σε αμπελώνες στη Γαλλία, η μέση συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών ήταν 43%. Σε πολλές χώρες, αμέσως μετά την εισαγωγή του μίγματος carbendazim – diethofencarb, διαπιστώθηκε η παρουσία στελεχών του παθογόνου με διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, δηλαδή στελέχη ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά που διατηρούσαν την ανθεκτικότητα άγριου τύπου στο diethofencarb (Katan *et al.*, 1989; Raposo *et al.*, 1994). Η πλειοψηφία αυτών των στελεχών ήταν μερικώς ανθεκτικά στα δικαρβοξιμιδικά και τα βενζιμιδαζολικά και υψηλά ανθεκτικά στο diethofencarb. Στην Ελλάδα, τέτοια στελέχη εμφανίζονταν περιστασιακά αρχίζοντας από το 1994 σε καλλιέργειες θερμοκηπίου, στις περιοχές Τριφυλίας Μεσσηνίας στη Δυτική Πελοπόννησο και Μαραθώνα Αττικής (Λάσκαρης και συν., 1994).

### Φθαλιμίδια

Το dichlofluanid, εισήχθηκε το 1965 από την εταιρεία Bayer AG με τα εμπορικά ονόματα Euraren και Elvaron σαν προστατευτικό μυκητοκτόνο ευρέως φάσματος με δράση εναντίον παθογόνων συμπεριλαμβανομένου και του *Botrytis cinerea*. Μετά την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των στελεχών του *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά και δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα προτεινόταν για την αντιμετώπιση της Τεφράς σήψης η εφαρμογή σε εναλλαγές ή σε μίγματα χημικών ουσιών ευρέως φάσματος όπως το dichlofluanid (Pollastro *et al.*, 1996).

Το dichlofluanid ανήκει στα μυκητοκτόνα χαμηλού κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει τα περισσότερα από τα γνωστά μυκητοκτόνα μη εξειδικευμένης δράσης. Παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες στο εργαστήριο δεν έχει επιτευχθεί η απόκτηση στελεχών με κληρονομήσιμη σημαντικού επιπέδου ανθεκτικότητα (Γεωργόπουλος, 1992). Επί πλέον παρόλη τη συνεχή και συχνή εφαρμογή των μυκητοκτόνων αυτών για δεκαετίες σε ελάχιστες περιπτώσεις έχει αναφερθεί μειωμένη αποτελεσματικότητα στον αγρό. Υπάρχουν διάφορες αναφορές που υποστηρίζουν ότι στελέχη του *Botrytis cinerea* εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο dichlofluanid (Pollastro *et al.*, 1996), αλλά το αν υφίσταται στην

πραγματικότητα ανθεκτικότητα στο dichlofluanid έχει αμφισβητηθεί, εξαιτίας της μεγάλης ποικιλίας στην ευαισθησία που παρατηρείται στο μυκητοκτόνο μεταξύ των απομονώσεων αγρίου τύπου του παθογόνου ( Pappas and Elena, 1992). Γι' αυτόν τον τύπο συμπεριφοράς, ο όρος μειωμένη ευαισθησία χρησιμοποιείται σε πρακτικές περιπτώσεις όπου υπάρχει μειωμένη ευαισθησία σε ένα μυκητοκτόνο χωρίς επίδραση όμως στη συμπεριφορά στον αγρό, ενώ ο όρος ανθεκτικότητα αγρού χρησιμοποιείται όταν τόσο το επίπεδο ανθεκτικότητας όσο και η συχνότητα των ανθεκτικών στελεχών είναι υψηλή με αποτέλεσμα την αξιοσημείωτη μείωση της αποτελεσματικότητας του μυκητοκτόνου στον αγρό (Hewitt, 1998).

Πρόσφατα, στην Ιταλία, στελέχη του *B. cinerea* ανθεκτικά στο dichlofluanid ανιχνεύτηκαν σε χαμηλή συχνότητα σε πειραματικά τεμάχια σε θερμοκήπια ζέρμπερας ως αποτέλεσμα 7-8 ψεκασμών με dichlofluanid ή μίγματα μυκητοκτόνων που περιείχαν το χημικό ανάλογο tolyfluanid (Sansiviero *et al.*, 1995). Επιπλέον, σύμφωνα με τον Pollastro *et al.* (1996), οι Hunter (1987) και Washington (1992), βρήκαν ενδείξεις διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ του dichlofluanid και των δικαρβοξυμιδικών μυκητοκτόνων.

Ο Pollastro *et al.*, (1996), σε έρευνες για την γενετική βάση των ανθεκτικών φαινοτύπων, προτείνει την παρουσία δύο γονιδίων που ελέγχουν την ανθεκτικότητα στο dichlofluanid που μπορεί να εμπλέκονται σε μηχανισμούς αποτοξικοποίησης και πιθανόν στη ρύθμιση παραγωγής θειόλης.

### Ανυλινοπυριμιδίνες

Οι ανυλινοπυριμιδίνες (π.χ. cyrodinil, meranipyridin, pyrimethanil) αντιπροσωπεύουν μια νέα οικογένεια βοτρυδιοκτόνων. Η δραστηριότητα τους *in vivo* στους μύκητες μπορεί να είναι αποτέλεσμα της αναστολής έκκρισης υδρολυτικών ενζύμων που εμπλέκονται στην διαδικασία παθογένεσης και/ ή από την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της μεθειονίνης στα κύτταρα των μυκήτων ( Leroux, 1996).

Στελέχη του *B. cinerea* υψηλά ανθεκτικά στις ανυλινοπυριμιδίνες έχουν ανιχνευθεί σε πολλούς Ευρωπαϊκούς αμπελώνες. (Hilber and Hilber – Bodmer, 1998). Σε μια μακρόχρονη δοκιμή τους που έγινε στην Σουηδία, η καταπολέμηση της ασθένειας οδηγήθηκε σε αποτυχία ( Foster and Staub, 1996).

### Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης

Σε πειράματα σε θερμοκήπιο με νεαρά φυτά αγγουριάς οι Μάρκογλου και Ζιώγας βρήκαν ότι τα μυκητοκτόνα pyrifenox, flusilazol, fenpropimorph και triflumizole (παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης) επιτυγχάνουν πλήρη προστασία των φυτών από το παθογόνο (στελέχη ευαίσθητα και ανθεκτικά στα μυκητοκτόνα της ομάδας των βενζιμιδαζολικών, δικαρβοξυμιδίων και μιγμάτων βενζιμιδαζολικών – φανυλοκαρβαμιδικών) (Παναγόπουλος, 1995). Απομονώσεις του *B. cinerea* που εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία στους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης έχουν βρεθεί σε διάφορες καλλιέργειες σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες και στο Ισραήλ (Elad, 1992; Stenmann and De Waard, 1995).

Η εργοστερόλη είναι η κύρια στερόλη των μεμβρανών των μυκήτων (τόσο της κυτταροπλασματικής όσο και εκείνων του ενδοπλασματικού δικτύου, των μιτοχονδρίων κ.τ.λ.), με εξαίρεση τους Ωομύκητες. Τόσο τα ανώτερα φυτά όσο και τα θηλαστικά δεν έχουν εργοστερόλη. Συνεπώς η βιοσύνθεση της εργοστερόλης φαίνεται να είναι ένας κατάλληλος στόχος για την επίτευξη εκλεκτικής τοξικότητας για τους μύκητες. Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης (SBIs ή EBIs

διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες ανάλογα με το στόχο δράσης τους. Είναι α) οι παρεμποδιστές της υπεροξειδάσης του σκουαλενίου, (π.χ. naftifine, terbinafine, tolnaftate), β) οι DMIs ή παρεμποδιστές της 14<sup>α</sup> διμεθυλάσης (π.χ. imazalil, prochloraz, pyrifenoxy, triadimenol, tebuconazole) και γ) οι παρεμποδιστές της  $\Delta^{14}$  - ρεδουκτάσης της στερόλης ή της  $\Delta^8 - \Delta^7$  ισομεράσης (π.χ. fenpropidine, fenpropimorph, spiroxamine, tridemorph). Μυκητοκτόνα υπάρχουν μόνο στις τελευταίες δύο ομάδες και λίγα από αυτά ελέγχουν το Βοτρύτη σε συνθήκες αγρού. Τα περισσότερα αποτελεσματικά SBIs περιλαμβάνουν τα prochloraz, tebuconazole που και τα δύο ανήκουν στα DMIs (Leroux *et al.*, 1999).

**Βιβλιογραφία:** Beever *et al.* (1989), Butters *et al.* (1995), Γεωργόπουλος (1992), Elad, (1992), Faretra and Pollastro (1991, 1993), Foster and Staub, (1996), Fujumura *et al.* (1990), Hewitt (1998), Hilber and Hilber – Bodmer, (1998), Katan *et al.* (1989). Λασκαρης και συν. (1994), Leroux (1979), Leroux, (1996), Leroux *et al.* 1999), Παναγόπουλος (1995,1997), Pappas (1982,1997), Pappas and Elena (1992), Pollastro *et al.* (1996), Raposo *et al.*(1994), Sansiviero *et al.*(1995), Stenmann and De Waard (1995), Ζιώγας (1998).



## ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

Η παρακολούθηση της ευαισθησίας των πληθυσμών των παθογόνων μυκήτων σε ένα ή περισσότερα μυκητοκτόνα (monitoring for fungicide resistance) σε παγκόσμια κλίμακα στη διάρκεια πολλών ετών δείχνει ότι η ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα είναι σήμερα ένα πρακτικό πρόβλημα στη Φυτοπροστασία με σοβαρές διαστάσεις. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα των παθογόνων μυκήτων των φυτών μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη αποτελεσματικότητα στην καταπολέμηση των ασθενειών που αυτοί προκαλούν, με συνέπειες που επηρεάζουν άμεσα τον παραγωγό ως απώλειες στην παραγωγή ή έμμεσα την τοπική ή παγκόσμια αγορά προϊόντων καθώς και συνέπειες οικονομικές για τις εταιρείες παραγωγής μυκητοκτόνων. Γι' αυτό είναι σημαντικό να υπάρχει δυνατότητα να ανιχνεύσουμε και να μετρήσουμε την ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα έγκαιρα ώστε να ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα (Hewitt, 1998). Η καταγραφή και παρακολούθηση της ευαισθησίας των πληθυσμών των μυκήτων στα μυκητοκτόνα είναι προς το παρόν το μόνο μέσο για να αποκτήσουμε σχετική πληροφορία ως προς την ευαισθησία των πληθυσμών του μύκητα-στόχου, πληροφορία απαραίτητη τόσο στη λήψη στρατηγικών για την κατάλληλη και αποτελεσματική εφαρμογή των μυκητοκτόνων στην αντιμετώπιση των ασθενειών όσο και στη λήψη στρατηγικών που να παρατείνουν την αποτελεσματικότητα στη χρήση των μυκητοκτόνων (Brent, 1991).

Τα προγράμματα παρακολούθησης της ευαισθησίας των πληθυσμών των μυκήτων στα μυκητοκτόνα ποικίλουν τόσο σε διάρκεια όσο και στο εύρος των περιοχών που καλύπτουν. Το πιο σημαντικό κριτήριο στις μεθόδους παρακολούθησης και καταγραφής είναι η απλότητα και η ευκολία στο χειρισμό τους και χρειάζεται μία γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος ειδικά όταν εφαρμόζεται σε μεγάλη κλίμακα. Μοριακές τεχνικές που βασίζονται είτε στην τεχνολογία του DNA είτε στην ανοσολογία, επιστρατεύονται από άλλες επιστήμες κυρίως την Ιατρική, για να βοηθήσουν στην εισαγωγή μιας φθηνής και γρήγορης διαγνωστικής δοκιμής για την ανίχνευση ανθεκτικών βιοτύπων μέσα στον πληθυσμό των μυκήτων. Η ανάπτυξη και εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών τεχνικών στη Φυτοπαθολογία στην παρακολούθηση της ευαισθησίας των πληθυσμών στα μυκητοκτόνα, θα βοηθήσει τόσο τις μελέτες επιδημιολογίας του παθογόνου όσο και την επιλογή και εφαρμογή των κατάλληλων μυκητοκτόνων για κάθε δεδομένη περίπτωση (Hollomon, 1991).

## A. ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

### Βιοδοκιμές για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των πληθυσμών των μυκήτων στα μυκητοκτόνα.

Γενικές αναφορές στις τεχνικές ελέγχου της ευαισθησίας των μυκήτων στα μυκητοκτόνα υπάρχουν διαθέσιμες στη βιβλιογραφία ( Georgopoulos 1982 και Ogawa *et al.*, 1979). Παρότι η χρήση διαφορετικών μεθόδων δεν φαίνεται να επηρεάζει τα συμπεράσματα των μεθόδων παρακολούθησης είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται τυποποιημένες μέθοδοι ώστε να είναι δυνατή η απευθείας σύγκριση των αποτελεσμάτων. Διεθνείς τυποποιημένες μέθοδοι σε ένα αριθμό παθογόνων έχουν δημοσιευθεί από διεθνείς οργανισμούς ( FAO 1982; FRAC 1991).

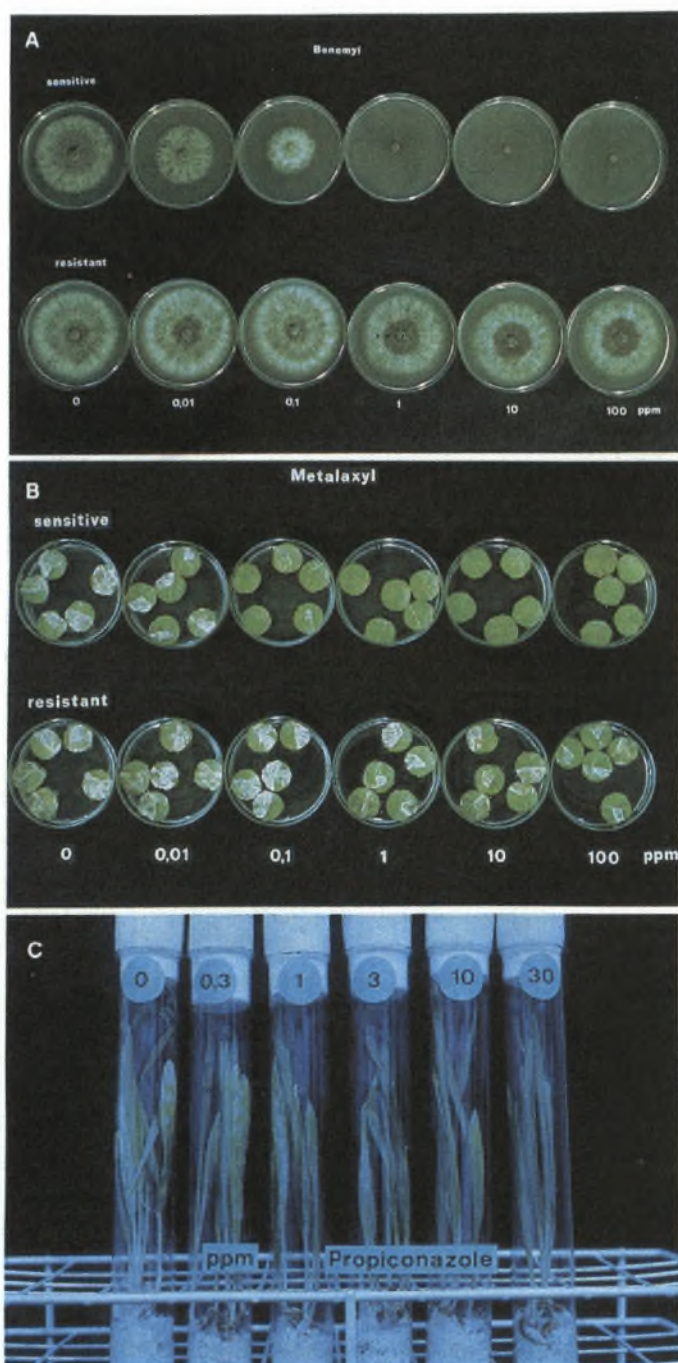
Η τεχνική που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ευαισθησίας εξαρτάται από τον σκοπό της καταγραφής και το συνδυασμό μύκητα / μυκητοκτόνου (Εικόνα 1.1). Τα υποχρεωτικά παθογόνα δοκιμάζονται για την ευαισθησία τους στα μυκητοκτόνα συνήθως *in vivo* είτε πάνω σε επιμολυσμένα μικρά φυτά στα οποία ψεκάζεται ή εφαρμόζεται από το έδαφος το μυκητοκτόνο ή σε δίσκους κομμένους από φύλλα (leaf disks) που επιπλέουν σε διαλύματα του μυκητοκτόνου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα προαιρετικά παθογόνα δοκιμάζονται κυρίως *in vitro*, γενικά μετρώντας την ανάπτυξη τους σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου. Σαν μολύσματα έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο τα σπόρια όσο και το μυκήλιο και γενικά δίνουν παρόμοια αποτελέσματα (Staub & Sozzi, 1984).

Τα περισσότερα παθογόνα ποικίλουν στην απόκρισή τους σε ένα μυκητοκτόνο μεταξύ και μέσα στους πληθυσμούς. Αυτή η φυσική παραλλακτικότητα πρέπει να ληφθεί υπόψη πριν γίνουν δοκιμές για αλλαγές στην απόκριση στα μυκητοκτόνα. Είναι επίσης χρήσιμο να καταγραφούν πληθυσμοί αμέσως μετά από μια πετυχημένη χρήση για να προσδιορισθεί η αλλαγή στην ευαισθησία στους πληθυσμούς του μύκητα. Αν παρατηρούνται ασυνήθιστα ποσά ασθένειας σε φυτά που έχουν μεταχειριστεί με μυκητοκτόνο, πριν γίνει παρακολούθηση για ανθεκτικότητα πρέπει πρώτα να γίνει σκέψη για κακή εφαρμογή, χρήση λάθους ή ληγμένου προϊόντος, κακός προσδιορισμός του παθογόνου, ασυνήθιστες κλιματικές συνθήκες ή συνθήκες εδάφους. Αν ως αιτία απώλειας της αποτελεσματικότητας της χημικής καταπολέμησης προτείνεται η ανθεκτικότητα που ανέπτυξε το παθογόνο στην εφαρμοζόμενη χημική ουσία, τότε θα πρέπει να γίνει καταγραφή σε περιοχές με φτωχό έλεγχο, καλό έλεγχο και όπου το μυκητοκτόνο δεν έχει χρησιμοποιηθεί (Brent, 1991).

Επιλογή της μεθόδου ελέγχου ευαισθησίας. Καθώς η ανίχνευση ανθεκτικότητας βασίζεται στην αναγνώριση της διαφοράς στην ευαισθησία στα μυκητοκτόνα, είναι σημαντικό σε κάθε περίπτωση να επιλέγεται η πιο κατάλληλη μέθοδος για τον ακριβή προσδιορισμό της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα εξαρτάται από το παθογόνο, τον ξενιστή, το βαθμό της εκτιμώμενης απώλειας αποτελεσματικότητας, τη διαθεσιμότητα εργαστηρίου και άλλους παράγοντες. Παρότι μέθοδοι για την ανίχνευση και τη μέτρηση της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα μπορούν να ποικίλουν ανάλογα με το συνδυασμό οργανισμού και χημικής ουσίας εν τούτοις οι βασικές αρχές είναι οι ίδιες η αναγνώριση των ανθεκτικών στελεχών πρέπει να γίνει σε σύγκριση με τα ευαίσθητα. Έτσι είναι στοιχειώδες να έχει καταγραφεί η ευαισθησία των πληθυσμών αγρίου τύπου για το συνδυασμό μύκητα - μυκητοκτόνο που μας ενδιαφέρει. Η τοξικότητα ποικίλει με τον τύπο και την δοκιμές *in vivo*, τη θερμοκρασία το pH κ.α. Γι αυτό το λόγο τα στελέχη που υποπτευόμαστε



ότι είναι ανθεκτικά πρέπει να μελετώνται με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για να αποκτηθούν τα δεδομένα της ευαισθησίας του άγριου πληθυσμού και αυστηρά κάτω από τις ίδιες συνθήκες ( FAO, Method No24, 1982).



Εικόνα 1. Μέθοδοι ελέγχου ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα. Α. Ακτινική ανάπτυξη ενός ευαίσθητου και ενός ανθεκτικού στελέχους του *Botrytis cinerea* σε τρυβλία που περιέχουν υπόστρωμα εμπλουτισμένο με benomyl. Β. Δίσκοι φύλλων αμπέλου που επιπλέουν σε υδατικό διάλυμα metalaxyl και έχουν επωασθεί με ένα ευαίσθητο και ένα ανθεκτικό στέλεχος *Plasmopora viticola*. C. Δοκιμές σε σωλήνα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο του μύκητα *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei* σε φυτά βρώμης (ποικιλία Golden Promise) στο propiconazole που έχει προστεθεί στο μέσο ανάπτυξης 7 μέρες μετά τη σπορά. Ένα ευαίσθητο στέλεχος χρησιμοποιείται σα μάρτυρας. Πηγή: Staub and Sozzi, 1984.

Μεγάλο πλεονέκτημα θεωρείται η ύπαρξη δεδομένων ευαισθησίας του άγριου πληθυσμού καθώς και μια συλλογή από απομονώσεις αναφοράς. Επίσης είναι σημαντική τόσο η καταγραφή της συμπεριφοράς των απομονώσεων στο εργαστήριο όσο και η καταγραφή της πραγματικής συμπεριφοράς τους στον αγρό. Μια δοκιμή ανθεκτικότητας, για να υιοθετηθεί θα πρέπει να μπορεί να επαναληφθεί σε διαφορετικά εργαστήρια χωρίς να χρειάζεται υψηλά εξειδικευμένο προσωπικό ή πολύ εξεζητημένα υλικά. Θα πρέπει να είναι απλή και να φέρεται εύκολα σε πέρας (Brent, 1991). Οποιαδήποτε μέθοδος και αν επιλεγεί, θα πρέπει να διατηρηθεί χωρίς αλλαγές στη διάρκεια των ερευνών. Κατά τη διάρκεια των δοκιμών, είναι σημαντικό να παρατηρούνται διαφορές στην παθογένεια, ρυθμό ανάπτυξης, σπορίωσης (sporulation) και άλλες ιδιότητες που συνεισφέρουν στην προσαρμοστικότητα του παθογόνου. Αυτή η γνώση θα βοηθήσει στην εξήγηση και πρόβλεψη της δυναμικής των ανθεκτικών πληθυσμών (Staub & Sozzi, 1984).

#### Δεδομένα ευαισθησίας άγριου πληθυσμού (baseline sensitivity data).

Ανθεκτικότητα των μυκήτων σε μια εφαρμοζόμενη τοξική ουσία προκύπτει γιατί επιλέγονται γρήγορα στελέχη από τον άγριο πληθυσμό τα οποία προϋπάρχουν σε χαμηλή συχνότητα πριν η ουσία μπει σε εφαρμογή. Η παρουσία αυτών των πληθυσμών δηλώνεται με τον όρο ευαισθησία άγριου πληθυσμού (baseline sensitivity). Καταγραφή τέτοιων δεδομένων ευαισθησίας του άγριου πληθυσμού (baseline sensitivity data), στον οποίο δεν έχει εφαρμοσθεί το μυκητοκτόνο χρειάζονται για να ανιχνευθούν αλλαγές στην ευαισθησία των πληθυσμών στους οποίους εφαρμόζεται το μυκητοκτόνο. Αυτά τα δεδομένα συνήθως αποκτώνται σε πειράματα με ένα εύρος συγκεντρώσεων και εκφράζονται σε τιμές ED<sub>50</sub>. Οι τιμές ED<sub>50</sub> μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με τη μέθοδο δοκιμής και το μόλυσμα που χρησιμοποιείται και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Έτσι προτείνεται να συμπεριλαμβάνονται απομονώσεις γνωστής ευαισθησίας και αν είναι διαθέσιμες ανθεκτικές απομονώσεις αναφοράς σε όλα τα πειράματα παρακολούθησης ανθεκτικότητας (FAO Method No25, 1982).

Είναι σημαντικό να αποκτηθεί πληροφορία για τους τύπους και το χρονοδιάγραμμα των μεταχειρίσεων με μυκητοκτόνα, τον έλεγχο της ασθένειας και την παρουσία της ασθένειας στο χρόνο της δειγματοληψίας. Επίσης πρέπει να ερευνηθούν συσχετίσεις μεταξύ πρακτικού ελέγχου της ασθένειας και ανθεκτικότητας γιατί τα ανθεκτικά στελέχη μπορεί να ανιχνευθούν εύκολα σε περιπτώσεις που η αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου διατηρείται πλήρως. Αν υπάρχει σημαντική απώλεια της ευαισθησίας σε σχέση με αυτή του άγριου πληθυσμού τότε θα πρέπει να γίνει περαιτέρω παρακολούθηση για να μελετηθεί η διασπορά των ανθεκτικών στελεχών και η πιθανή συσχέτιση με μειωμένο έλεγχο της ασθένειας (Brent, 1991).

Δειγματοληψία. Για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων είναι σημαντικό να δοθεί προσοχή στη σωστή μέθοδο δειγματοληψίας, το μέγεθος, τον αριθμό και την κατανομή των δειγμάτων. Η δειγματοληψία μπορεί να είναι εκτεταμένη ή επιλεκτική. Ο αριθμός των δειγμάτων που συλλέγονται μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το σκοπό της εργασίας. Συχνά για εκτεταμένη έρευνα είναι καλό να γίνεται αρχικά μια γενικευμένη δειγματοληψία και να ακολουθείται από εντατικές μελέτες αν είναι απαραίτητο. Αν φανούν τα πρώτα συμπτώματα ανθεκτικότητας τότε χρειάζεται ένα μεγαλύτερο δείγμα για να αποκαλυφθούν σπάνιες ανθεκτικές μορφές. Για να προσδιορισθεί το ποσοστό των ανθεκτικών οργανισμών σε ένα πληθυσμό ή διαφορές στην ευαισθησία, τότε μικρότερα δείγματα είναι καλύτερα (Brent, 1991). Για να δείχθεί ότι ο μη αποτελεσματικός έλεγχος στην καταπολέμηση της ασθένειας οφείλεται σε ανθεκτικότητα, συλλέγονται ένα ή δύο σύνθετα δείγματα από διάφορα



όργανα του φυτού από τις περισσότερο προσβεβλημένες περιοχές του αγρού που έχουν ψεκαστεί. Για να προσδιορισθεί η προηγούμενα άγνωστη ευαισθησία του παθογόνου σε ένα μυκητοκτόνο ή για τη μελέτη της δυναμικής του πλυθυσμού, το μέγεθος των δειγμάτων θα πρέπει να αυξηθεί σε 10 –100 και να προέρχεται από ένα ευρύ φάσμα της περιοχής που ελέγχεται (FAO, Method No25, 1982).

Τα δείγματα μπορεί να είναι φύλλα καρποί ή βλαστοί που δείχνουν τα συμπτώματα της ασθένειας. Δείγματα με φρέσκα παραγόμενα σπόρια είναι καλύτερα για απομονώσεις χωρίς επιμολύνσεις. Το υλικό που συλλέγεται, τοποθετείται σε πλαστικές σακούλες πολυαιθυλενίου, μεταφέρεται στο εργαστήριο και διατηρείται στο ψυγείο στους 1-5 ° C, καθώς παρατεταμένες περιόδους υψηλών θερμοκρασιών μπορεί να μειώσουν τη βιωσιμότητα των σπορίων. Αν το φρέσκο υλικό δεν χρησιμοποιηθεί μέσα σε μια δύο μέρες, πρέπει να διατηρηθεί στους 1° C για να μην αλλοιωθούν (FAO, Method No25, 1982). Προτείνεται να πλένονται τα φύλλα σχολαστικά με νερό βρύσης ώστε να απομακρύνονται υπολείμματα μυκητοκτόνων ή γηρασμένα σπόρια (FAO, Method No29, 1982). Τα δείγματα πρέπει να ελέγχονται όσο πιο φρέσκα γίνεται και να κρατούνται υποκαλλιέργειες. Απ' την άλλη θα πρέπει να γίνεται επανέλεγχος των δειγμάτων μετά από υποκαλλιέργεια για να ελέγχεται η σταθερότητα της απομόνωσης στην απόκριση στο μυκητοκτόνο (Brent, 1991).

### **Βιοδοκιμές ανίχνευσης ανθεκτικότητας σε τεχνητά μέσα**

**Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.** Για τον έλεγχο της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα είναι κατάλληλα τόσο φτωχά όσο και πλούσια σε θρεπτικά τεχνητά μέσα. Το κλασικό potato dextrose agar (PDA) που ετοιμάζεται από έτοιμα σκευάσματα ή φρέσκιες πατάτες είναι ένα ικανοποιητικό μέσο ανάπτυξης. Το agar 2%σε νερό, μπορεί να υποκαταστήσει τα άλλα μέσα σε δοκιμές ελέγχου σπορίων γιατί επιτρέπει πιο ξεκάθαρες δοκιμές, καθώς υπάρχουν λιγότερα τροφικά ερεθίσματα στα σπόρια και λιγότερη αλληλεπίδραση από οργανισμούς που τυχόν έχουν επιμολύνει το μέσο (FAO, Method No 25,1982).

**Μυκητοκτόνα.** Οι εμπορικές συσκευασίες των μυκητοκτόνων χρησιμοποιούνται σε παρακολουθήσεις ρουτίνας, αλλά σε λεπτομερείς μελέτες προτιμάται το τεχνικό προϊόν. Οι εμπορικές συσκευασίες των μυκητοκτόνων χρησιμοποιούνται στις μελέτες ελέγχου στα φυτά ξενιστές ενώ το τεχνικό προϊόν είναι προτιμότερο σε δοκιμές *in vitro*. Μια σειρά δόσεων δίνει πιο ακριβή δεδομένα παρά μια μόνο συγκέντρωση ενώ θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στις δοκιμές ένας μάρτυρας με διαλύτη (FAO, Method No25, 1982). Προτείνεται η προετοιμασία πυκνών διαλυμάτων σε κατάλληλο για κάθε μυκητοκτόνο διαλύτη. Με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας από πυκνό διάλυμα σε λυωμένο μέσο άγαρ αποκτάται το επιθυμητό εύρος συγκεντρώσεων (FAO, Method No28, 1982). Ιδανικά, τα μυκητοκτόνα προστίθενται σε λυωμένο άγαρ (60 °C) πριν να πήξει αλλά οι εμπορικές συσκευασίες των μυκητοκτόνων μπορεί να είναι επιμολυσμένες με βακτήρια. Έτσι σε δοκιμές ρουτίνας, είναι πιο βολικό να προστίθεται το μυκητοκτόνο πριν την αποστείρωση του μέσου της καλλιέργειας. Η δραστηριότητα των περισσότερων μυκητοκτόνων όπως το benomyl, οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης, ή το dodine δεν επηρεάζεται από τη θερμοκρασία. Η επιμόλυνση με βακτήρια από το φυτικό υλικό μπορεί να μειωθεί με οξίνιση του μέσου στο pH 3.7 προσθέτοντας 1 ml γαλακτικού οξέος 1% ανά λίτρο ψυχρού μέσου. Μια εναλλακτική μέθοδος είναι να προστεθούν 40000 μονάδες από πενικιλίνη G και 50 mg διυδροστρεπτομυκίνη ανά λίτρο ψυχρού μέσου (FAO, Method No25, 1982).

**Απομόνωση του παθογόνου.** Μερικά παθογόνα είναι δύσκολο να διατηρηθούν σε μέσα με άγαρ καθώς αναπτύσσονται αργά και χρειάζονται ειδικές τεχνικές που να επάγουν τη sporίωση. Αν χρειάζονται καθαρές καλλιέργειες όπως με τις απομονώσεις που έχουν διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, τα θρεπτικά μέσα PDA ή MEA (malt extract agar) είναι ικανοποιητικά. Τα σπόρια μπορεί να διατηρηθούν για αρκετούς μήνες σε μολυσμένες κηλίδες του ξενιστή σε υγρές συνθήκες στους 1° C ή σε αιωρήματα σε παγωμένο νερό. Για τις περισσότερες περιπτώσεις η διατήρηση του παθογόνου στον ξενιστή είναι ικανοποιητική μέθοδος (FAO, Method No25, 1982).

### Δοκιμές βλάστησης σπορίων

Στους μύκητες που παράγουν ικανοποιητικό αριθμό σπορίων (π.χ. *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* ή *Monilinia* spp.), μεγάλος αριθμός σπορίων μπορεί να αναλυθεί μέσα σε λίγες μέρες, επιτρέποντας την ανίχνευση χαμηλών επιπέδων ευαισθησίας σε πληθυσμούς κυρίως ευαίσθητους. Για να εφαρμοστεί αυτή η μέθοδος είναι απαραίτητο ότι τα μυκητοκτόνα που εφαρμόζονται παρεμποδίζουν τη βλάστηση ή παρεμποδίζουν μια α κανονική ή μια β κανονική διαδικασία βλάστησης κάτω από την επίδραση του μυκητοκτόνου και ότι αυτή η αλλαγή μπορεί εύκολα να διακριθεί. Για παράδειγμα η διάκριση μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών βασίζεται στην παρατήρηση στο φωτονικό μικροσκόπιο του τρόπου βλάστησης των σπορίων σε μέσο εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο και μπορεί εύκολα να γίνει σε θρεπτικό MEA ή PDA ή σε άγαρ με νερό που περιέχει 1  $\mu\text{gml}^{-1}$  και 0.1  $\mu\text{gml}^{-1}$  benomyl αντίστοιχα. Τα ευαίσθητα σπόρια μπορεί να βλαστάνουν αλλά οι βλαστικοί σωλήνες βλαστάνουν μόνο μερικά κύτταρα σε μήκος, παραμορφώνονται, διογκώνονται και συχνά διαρρηγνύονται. Αντίθετα οι βλαστικοί σωλήνες των ανθεκτικών σπορίων δεν παρεμποδίζονται στην ανάπτυξη τους και δε διακρίνονται από αυτούς που παράγονται στο ίδιο μέσο χωρίς μυκητοκτόνο. Αν τα σπόρια έχουν τοποθετηθεί σε προσημειωμένες θέσεις στα τρυβλία άγαρ ώστε να μπορούν να ελεγχθούν κάτω από το φωτονικό μικροσκόπιο, τότε η δυνατότητα διάκρισης ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών είναι αρκετά εύκολη μέσα σε 24 ώρες. Αν δεν χρειάζεται να γίνει γρήγορος προσδιορισμός, τα τρυβλία επωάζονται για λίγες μέρες και εξετάζονται μικροσκοπικά. Η διάκριση είναι προφανής καθώς ακόμη και μετά από παρατεταμένη επώαση τα ευαίσθητα στελέχη δε δίνουν ενδείξεις ανάπτυξης ενώ τα ανθεκτικά στελέχη σχηματίζουν κανονικές αποικίες (FAO, Method No28, 1982).

Για την εκτίμηση της ανθεκτικότητας έχουν δημιουργηθεί ειδικοί πίνακες στους οποίους καταγράφεται η βλάστηση ή μη των σπορίων, η κανονική διαμόρφωση του βλαστικού σωλήνα και οι παραμορφώσεις, οι ανωμαλίες και οι ιδιαιτερότητες στη διαμόρφωση του σε δεδομένες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων. Από τους πίνακες αυτούς γίνεται προσδιορισμός και καταγραφή του ανάλογου φαινοτύπου που αντιστοιχεί στην απομόνωση που δοκιμάζεται (Πίνακας 2.1). Με τις δοκιμές βλάστησης σπορίων σε άγαρ εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο προσομοιάζεται η παρεμπόδιση που προκαλεί το μυκητοκτόνο στην εγκατάσταση των πρωταρχικών μολυσμάτων του μύκητα, σε θέσεις όπου υπάρχει το μυκητοκτόνο.

Ξεκινώντας από ασθενές φυτικό υλικό που σποροποιεί (sporulate), ετοιμάζεται ένα αιώρημα σπορίων σταθερής συγκέντρωσης. Τα σπόρια μπορεί να απομακρυνθούν από τους προσβεβλημένους ιστούς ψεκάγοντας με αποστειρωμένο υγρό και συλλέγοντας το υγρό σε γυάλινα τρυβλία ή σε ειδικές αντικειμενοφόρους. Τα σπόρια μπορεί επίσης να αποκτηθούν τοποθετώντας μερικές σταγόνες νερού με μία πιπέτα στο μολυσμένο ιστό, στη συνέχεια σύροντας μαλακά με την άκρη της

πιπέτας και αναρροφώντας το νερό για να τοποθετηθεί σε άγαρ ή στο φυτό ξενιστή. Αν οι ιστοί έχουν μεταχειρισθεί με άλλα παρασιτοκτόνα θα πρέπει πρώτα να πλυθούν καλά και στη συνέχεια να αφεθούν να σποροποιήσουν. Εναλλακτικά, τα σπόρια μπορεί να ξεπλυθούν μια δύο φορές με φυγοκέντρηση σε νερό ώστε να γίνει δυνατή η βλάστηση των σπορίων. Περίπου 50000 σπόρια / ml νερού χρησιμοποιούνται για μολύνσεις ξενιστών και 1000 σπόρια / ml για μελέτες σε μέσο με άγαρ. Τα αιωρήματα σπορίων σε νερό πρέπει να αναδεύονται συνεχώς για να αποφευχθεί η καθίζησή τους πριν μεταφερθούν στο μέσο δοκιμής. Επίσης θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν όσο πιο σύντομα γίνεται μετά την παρασκευή τους για να αποφευχθεί η προβλάστηση. (FAO, Method No25, 1982).

Σταγόνες από αιώρημα σπορίων που τοποθετήθηκαν στο άγαρ απλώνονται με μια αποστειρωμένη βελόνα σε τεθλασμένες γραμμές στην επιφάνεια του άγαρ. Τα σπόρια μπορεί επίσης να τοποθετηθούν στο μέσο προς δοκιμή σύροντας ένα ιστό με καρποφορίες πρώτα σε μέσο χωρίς μυκητοκτόνο και στη συνέχεια σε αυξανόμενες δόσεις μυκητοκτόνου. Η τελευταία μέθοδος έχει αποδειχθεί πολύ χρήσιμη για τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. (FAO, Method No 25, 1982). Οι καλλιέργειες μπορούν να εκτιμηθούν μετά από 16-18 ώρες επώασης. Επίσης δοκιμές για τη βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα γίνονται σε υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης και δίνουν ιδιαίτερα γρήγορα αποτελέσματα. Όλες οι δοκιμές γίνονται σε θερμοκρασία 18- 22° C.

Άλλη μέθοδος που επιτρέπει την γρήγορη ποιοτική ανάλυση είναι η ονομαζόμενη δοκιμή διαποτισμού σε άγαρ (agar diffusion test). Προϋπόθεση αυτής της τεχνικής είναι η απομόνωση που δοκιμάζεται να έχει δημιουργήσει ικανοποιητική ποσότητα σπορίων. Αυτό μπορεί φυσιολογικά να επιτευχθεί καλλιεργώντας την απομόνωση κάτω από υπεριώδες φως (black light). Τα σπόρια σκονίζονται στην επιφάνεια άγαρ που έχει στερεοποιηθεί σε τρυβλίο Petri. Δίσκοι από διηθητικό χαρτί που έχουν εμποτισθεί σε διάλυμα μυκητοκτόνου, τοποθετούνται πάνω σε επιφάνεια άγαρ. Η εκτίμηση της καλλιέργειας γίνεται μετά από τρεις μέρες καταγράφοντας τη ζώνη παρεμπόδισης γύρω από τους δίσκους του διηθητικού χαρτιού. Η μέθοδος προσομοιάζει την παρεμπόδιση που προκαλεί το μυκητοκτόνο στην ανάπτυξη του μύκητα μετά την εγκατάσταση των αρχικών μολυσμάτων. Ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μπορεί να δοκιμασθεί ένας μεγάλος αριθμός συγκεντρώσεων των μυκητοκτόνων, ενώ ο έλεγχος μπορεί να γίνει σε ένα μόνο τρυβλίο Petri.

### **Δοκιμές ανάπτυξης μυκηλίου**

Όταν τα στελέχη έχουν ταξινομηθεί ως ευαίσθητα ή ανθεκτικά με την παραπάνω μέθοδο, ο βαθμός ανθεκτικότητας για κάθε στέλεχος μπορεί να αποκτηθεί μεταφέροντας τα σε μέσο που περιέχει μια σειρά από συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου. Η ευαισθησία μπορεί να προσδιορισθεί μετρώντας το ποσοστό σχηματισμού αποικίας ή τη διάμετρο των αποικιών σε μέσο με άγαρ ή την αύξηση του ξηρού βάρους σε υγρό θρεπτικό μέσο (FAO, Method No28, 1982). Τρεις ή περισσότερες απομονώσεις τοποθετούνται σε τρυβλία Petri σε καθένα από τα οποία έχει κατάλληλα προσδιορισθεί η δόση μεταχείρισης. Εναλλακτικά, ένα τρυβλίο Petri με διαφορετικές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου, μπορεί να φιλοξενήσει μία απομόνωση. Η ανάπτυξη καλλιέργειας σε μέσο που περιέχει μυκητοκτόνα μπορεί να είναι το κριτήριο για τον προσδιορισμό ανθεκτικότητας. Όταν σπόρια απομακρυνθούν από ιστό που σποροποιεί και απλωθούν με αποστειρωμένη βελόνα σε μέσο που περιέχει μυκητοκτόνα, τα ευαίσθητα στελέχη δεν παράγουν μυκηλιακές αποικίες ενώ ο ανθεκτικός απομονώσεις εμφανίζουν μυκηλιακή ανάπτυξη μέσα σε 24 ώρες αλλά



χρειάζεται μια περίοδος τριών τεσσάρων ημερών επώασης σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 24° C) ώστε να παραχθούν αποικίες.

Ορισμένα μυκητοκτόνα δεν παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων ενώ πολλοί μύκητες δεν παράγουν ικανοποιητικό αριθμό σπορίων. Γι αυτούς τους λόγους ο προσδιορισμός του επιπέδου ευαισθησίας μπορεί να γίνει με τον προσδιορισμό της ακτινωτής ανάπτυξης μυκηλιακής μάζας που μεταφέρθηκε σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο. Η μέθοδος προσομοιάζει την παρεμπόδιση που προκαλεί το μυκητοκτόνο στη δευτερεύουσα διάδοση της ασθένειας με το μυκήλιο όπως για παράδειγμα από σάπιο καρπό σε γειτονικό υγρή.

Καθαρές καλλιέργειες μπορεί να εκτιμηθούν μετρώντας την παρεμπόδιση της ακτινωτής ανάπτυξης μυκηλίου που προκύπτει όταν δίσκοι μυκηλίου από καθαρές καλλιέργειες τοποθετηθούν σε μέσο εμπλουτισμένο με άγαρ. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιηθούν δίσκοι μυκηλίου από καθαρές καλλιέργειες, η ανάπτυξη πρέπει να δοκιμασθεί σε πέντε μέρες καθώς μεγαλύτερο διάστημα επώασης θα έχει ως αποτέλεσμα να έχουμε μυκηλιακή ανάπτυξη σε αυτές τις καλλιέργειες στις οποίες δεν είχε παρατηρηθεί προηγούμενα καμία ανάπτυξη. Γνωστές ευαίσθητες ή ανθεκτικές απομονώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν πρότυπα σε αυτές τις δοκιμές. Αυτή η μέθοδος δεν είναι εφαρμόσιμη για δοκιμές ρουτίνας μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε απομονώσεις αγρού (FAO, Method No25, 1982).

#### Δοκιμές ανθεκτικότητας σε φυτά

Μερικά μυκητοκτόνα όπως οι ακυλαλανίνες δεν παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων καθόλου. Επιπρόσθετα η παρεμπόδιση *in vitro* της μυκηλιακής ανάπτυξης δείχνει μικρή συσχέτιση σε σχέση με την *in vivo* δραστηριότητα (Staub *et al.*, 1979). Σε αυτές τις περιπτώσεις, μέθοδοι *in vivo* σε δίσκους φύλλων ή ολόκληρων φυτών πρέπει να χρησιμοποιηθούν για το έλεγχο ευαισθησίας.

Τα νεαρότερα φύλλα ξενιστή που εμφανίζει καλή ανάπτυξη σημειώνονται με μικρές ταμπέλες. Τρία ως πέντε φυτά για κάθε μεταχείριση ψεκάζονται μέχρι απορροής με το μυκητοκτόνο και αφού στεγνώσει το ψεκαστικό υγρό, τα φυτά μολύνονται με αιώρημα σπορίων και επωάζονται στους 16- 24 °C για 24- 48 ώρες με διαρκή ύγρανση των φύλλων ακολουθούμενη από επώαση στο θερμοκήπιο μέχρι την εμφάνιση κηλίδων τουλάχιστον στον μάρτυρα (FAO, Method No 25, 1982).

Στις περιπτώσεις των υποχρεωτικών παρασίτων όπως τα οΐδια ή τους περονόσπορους (*Plasmopora* sp. ή *Phytophthora* spp.) η παρουσία ανθεκτικών στελεχών μπορεί να ανιχνευθεί σε δοκιμές με φυτά ή φυτικά μέρη. Αυτό μπορεί γίνει σε δοκιμές με ψεκασμούς, ριζοποτίσματα ή δίσκους φύλλων που επιπλέουν σε διάλυμα μυκητοκτόνου (Εικόνα 1). Στα πρώτα πειράματα φυτά σε γλάστρες με ένα δύο πραγματικά φύλλα ψεκάζονται μέχρι απορροής με ένα διάλυμα μυκητοκτόνου το οποίο κανονικά παρεμποδίζει την ανάπτυξη των συμπτωμάτων της ασθένειας και στη συνέχεια αφού στεγνώσουν τα φύλλα, μεταφέρεται μόλυσμα από τα δείγματα που πρόκειται να δοκιμαστούν είτε σκονίζοντας σπόρια είτε ψεκάζοντας την επιφάνεια των φύλλων με αιώρημα σπορίων που περιέχει 50000 σπόρια / ml νερού. Τα φυτά διατηρούνται σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης στο θερμοκήπιο και το ποσοστό των περιοχών που έχουν προσβληθεί μετράται μετά από 7 – 10 μέρες. Στις δοκιμές εφαρμογών από τη ρίζα, τα φυτά τοποθετούνται με τις ρίζες τους σε ένα διάλυμα μυκητοκτόνου σε ένα τρυβλίο Petri και μολύνονται τινάζοντας σπόρια στην επιφάνεια τους. Στις δοκιμές δίσκων φύλλων, δίσκοι φύλλων διαμέτρου 12mm κόβονται με ένα φελοτρυπητή, από νεαρά φύλλα φυτών απαλλαγμένων από ασθένεια και ομάδες από πέντε δίσκους επιπλέουν σε διάλυμα μυκητοκτόνου σε μικρά



τρυβλία Petri. Η μόλυνση γίνεται σκονίζοντας σπόρια από τα δείγματα που ελέγχονται στην πάνω επιφάνεια των δίσκων που επιπλέουν ή μεταφέροντας μια σταγόνα από αιώρημα σποριαγγείων για τους περονόσπορους. Τα τρυβλία κλείνονται και διατηρούνται σε κανονικές συνθήκες στο θερμοκήπιο ή στο εργαστήριο μακριά από απευθείας φωτισμό για την αποφυγή εξάτμισης ή σε υγρούς θαλάμους στους 18-21° C με 12 -16 ώρες μήκος ημέρας. Μετά από 48 ώρες ο υγρός θάλαμος απομακρύνεται για να στεγνώσουν οι σταγόνες του μολύσματος (FAO, Method No29, 1982). Η προσβολή καταγράφεται μετά από 7 – 10 μέρες μετά την επώαση. Με αυτόν τον τρόπο χρησιμοποιώντας λίγο χώρο, φυτικό υλικό και μυκητοκτόνο, μπορεί να δοκιμαστούν ένα εύρος από συγκεντρώσεις και να υπολογιστούν οι τιμές ED<sub>50</sub> και MIC από τις καμπύλες δόσεις απόκρισης. Σε όλες τις δοκιμές το ποσό της ασθένειας συγκρίνεται με αυτό των μεταχειρισμένων φυτών ή φυτικών μερών που μολύνονται με ευαίσθητα παθογόνα αγρίου τύπου. Καθώς οι τελευταίες δύο δοκιμές εξαρτώνται από την προσρόφηση των χημικών ουσιών από το φυτικό ιστό, μπορεί να χρησιμοποιηθούν μόνο για τον έλεγχο διασυστηματικών μυκητοκτόνων (FAO, Method No27, 1982).

### Τρόποι μέτρησης της ευαισθησίας του μύκητα στα μυκητοκτόνα

Στην πράξη τα παθογόνα ανέχονται ένα εύρος από συγκεντρώσεις και για αυτό το λόγο, όπως και για μεγαλύτερη ακρίβεια είναι καλύτερο να χρησιμοποιείται ένα εύρος από συγκεντρώσεις στις βιοδοκιμές, παρά μια προκαθορισμένη δόση που να διακρίνει τους βιοτύπους για την ευαισθησία τους στο εφαρμοζόμενο μυκητοκτόνο. Παρόλα αυτά για πρωταρχικές, μεγάλης κλίμακας έρευνες ανθεκτικότητας η χρήση μιας μόνο δόσης μπορεί να δώσει κάποιες αρχικές ενδείξεις.

Όταν χρησιμοποιείται στις δοκιμές ένα εύρος από συγκεντρώσεις, οι διάφοροι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει σαν τιμή για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας του μύκητα στο εφαρμοζόμενο μυκητοκτόνο, α) την υψηλότερη συγκέντρωση που επιτρέπει κάποιο βαθμό ανάπτυξης του μύκητα, β) την ελάχιστη συγκέντρωση που να δίνει πλήρη έλεγχο (minimum inhibitory concentration, MIC), γ) τον υπολογισμό της ED<sub>50</sub>, τη συγκέντρωση δηλαδή του μυκητοκτόνου που προκαλεί 50 % παρεμπόδιση στην μυκηλιακή ανάπτυξη ή τη βλάστηση σπορίων του μύκητα σε σχέση με το μάρτυρα δ) το άθροισμα των βαθμών ελέγχου που δίνεται σε κάθε συγκέντρωση που ελέγχεται. Επίσης η ευαισθησία μπορεί να προσδιοριστεί μετρώντας το ποσοστό ανάπτυξης της αποικίας ή τη διάμετρο της αποικίας σε άγαρ ή την αύξηση του ξηρού βάρους σε υγρό μέσο. Η τιμή ED<sub>50</sub> είναι ο πιο κοινός τύπος καταγραφής της ευαισθησίας του μύκητα στο μυκητοκτόνο και προτείνεται ως ο καταλληλότερος να εφαρμόζεται όπου αυτό είναι δυνατό. Η διαφορά στην ευαισθησία μεταξύ ανθεκτικών και αγρίου τύπου απομονώσεων παρουσιάζεται με καμπύλες δόσης απόκρισης χρησιμοποιώντας λογαριθμική probit analysis. Σχεδιάζεται η συγκέντρωση σε mgml<sup>-1</sup> στη λογαριθμική κλίμακα προς το ποσοστό παρεμπόδισης στην κλίμακα των probits και προσδιορίζονται οι τιμές ED<sub>50</sub> ή και ED<sub>95</sub>. Συχνά αναφέρεται ότι η τιμή ED<sub>95</sub> είναι πιο κοντά στον πρακτικό βαθμό καταπολέμησης της ασθένειας που επιθυμούμε, αλλά αυτή είναι γενικά πιο δύσκολο να μετρηθεί με ακρίβεια (Brent, 1991).

Σε πειράματα με φυτά, οι μεταχειρίσεις προσδιορίζονται περίπου δυο εβδομάδες μετά την μόλυνση. Ένας απλός τρόπος καταγραφής που χρησιμοποιείται είναι ο προσδιορισμός των ασθενών φυλλικών δίσκων με σπορίωση ανά συγκέντρωση. Για μεγαλύτερη ακρίβεια ένα κατάλογος έντασης της ασθένειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί π.χ. 0= όχι ορατά συμπτώματα, 1, 2, 3, = μικρή ενδιάμεση

και εκτεταμένη sporίωση (FAO, Method No29, 1982). Ο αριθμός των μολυσματικών μονάδων στα σημειωμένα φύλλα και στα επόμενα δυο παλαιότερα φύλλα μετριοούνται και υπολογίζεται το ποσοστό ελέγχου για κάθε μεταχείριση για κάθε απομόνωση σε σχέση με τον αριθμό των μολυσματικών μονάδων στα φυτά που δεν έχουν ψεκάσει. Οι διαφορές στον έλεγχο της ασθένειας μπορεί να εκφραστούν σαν το ποσοστό ελέγχου ανά δόση ή προσδιορίζοντας τις τιμές ED<sub>50</sub> ή ED<sub>95</sub>. Το ποσό της sporίωσης μπορεί να διαβαθμιστεί οπτικά ή τα σπόρια μπορεί να αποκολληθούν από τα φύλλα ψεκάζοντας νερό σε αυτά και μετρώντας τον αριθμό των sporίων στο μικροσκόπιο. Η sporίωση είναι πολύ σημαντική στον προσδιορισμό της ευαισθησίας στους παρεμποδιστές βοσύνθεσης εργοστερόλης (FAO, Method No 25, 1982).

### Παρακολούθηση για ανθεκτικότητα

Για παρακολούθηση ρουτίνας για την ανίχνευση της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών σε ένα φυσικό πληθυσμό του παθογόνου, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί μια διαγνωστική συγκέντρωση του μυκητοκτόνου. Αυτή μπορεί να είναι η MIC, όπως υπολογίστηκε από τα δεδομένα ευαισθησίας του άγριου πληθυσμού. Δεν υπάρχει απόλυτο κριτήριο ως προς τον αριθμό των δειγμάτων που θα χρειαστούν (FAO, Method No25, 1982). Ο αριθμός δεν θα πρέπει να είναι πολύ μικρός και τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται από ένα αριθμό φυτών από όλο τον αγρό ή την περιοχή. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των δειγμάτων τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα ανίχνευσης ανάπτυξης ενός ανθεκτικού πληθυσμού του παθογόνου σε αρχικά στάδια. Για την ανίχνευση ανθεκτικότητας ένα ελάχιστο από δύο διακριτές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων πρέπει να χρησιμοποιείται, μία ακριβώς πάνω απ' το επίπεδο της ED<sub>50</sub> των ευαίσθητων στελεχών και μία ξεκάθαρα θανατηφόρα, μαζί με ένα μάρτυρα. Για έγκαιρη ανίχνευση ανθεκτικότητας, χρειάζεται ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων που προέρχονται από διαφορετικά φυτά, αγρούς και άλλες περιοχές. Το επίπεδο ανθεκτικότητας (resistance factor, RL) καταγράφεται ως ο λόγος της τιμής ED<sub>50</sub> της απομόνωσης που ελέγχεται προς την τιμή ED<sub>50</sub> του ευαίσθητου πληθυσμού. Τα επίπεδα ανθεκτικότητας μπορεί να διαφέρουν από πολύ χαμηλά για το dodine και μέλη της ομάδας των αρωματικών υδρογονανθράκων (RL=2-4) ως πολύ υψηλά για τα βενζιμιδαζολικά ή τις ακυλαντανίνες (RL=100-1000x) επιτρέποντας την εύκολη ανίχνευση της ανθεκτικότητας ή την ανάγκη πιο προσεκτικών δοκιμών (FAO, Method No 24, 1982).

### Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μεθόδων

Το πλεονέκτημα της βλάστησης των sporίων είναι ότι είναι γρήγορη τεχνική και υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου μεγάλου αριθμού απομονώσεων. Τα μειονεκτήματα είναι η σχετικά μικρή περίοδος κατά την οποία ο μύκητας αναπτύσσεται αλλά περισσότερο σημαντική είναι η απουσία υλικού για περαιτέρω δοκιμές. Σε αντίθεση, στις δοκιμές ακτινωτής ανάπτυξης του μυκηλίου υπάρχει διαθέσιμο υλικό για παραπέρα δοκιμές είτε σαν μέσο σύγκρισης ανθεκτικότητας ή για περισσότερο λεπτομερείς μελέτες (έλεγχος παθογένειας, προσδιορισμός βαθμού ανθεκτικότητας κ.τ.λ.). Μειονέκτημα των τελευταίων μεθόδων σε σύγκριση με τις δοκιμές ανάπτυξης sporίων είναι ο μικρός αριθμός απομονώσεων που μπορούν να ελεγχθούν και ότι τα δείγματα μπορεί να αντιδρούν ως ευαίσθητα ή ανθεκτικά ενώ στην πραγματικότητα είναι μίγματα σε διάφορες αναλογίες και των δύο. Με τις *in vivo* μεθόδους δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι ότι θα ανιχνεύσουμε επίπεδα ανθεκτικότητας κάτω από 1% σε ένα δεδομένο πληθυσμό (Staub & Sozzi, 1984).

Γενικά, όταν χρησιμοποιούνται *in vitro* μέθοδοι είναι καλό να γίνεται κάποια *in vivo* σύγκριση των αποτελεσμάτων ώστε να ελεγχθεί ότι οι διαφορές που ανιχνεύονται στην απόκριση των μυκήτων στα μυκητοκτόνα εκφράζονται επίσης και σε συνθήκες ασθένειας πάνω στα ψεκασμένα φυτά (Brent, 1991).

Μεγάλη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών στο εργαστήριο ή το θερμοκήπιο κατευθείαν σε όρους πρόβλεψης ανθεκτικότητας στον αγρό. Συχνά, μυκητοκτόνα που δίνουν πλήρη έλεγχο όταν ψεκάζονται προσεκτικά σε μικρά φυτά στο θερμοκήπιο σε δόσεις 1- 10  $\mu\text{gml}^{-1}$ , χρειάζονται να ψεκαστούν με 50 –500  $\mu\text{gml}^{-1}$  για να δώσουν αποτελεσματικό έλεγχο της ίδια ασθένειας στον αγρό (Staub & Sozzi, 1984).

Ένα σχετικό πρόβλημα προκύπτει όταν αναφορές ανθεκτικότητας δημοσιεύονται χωρίς αρκετά δεδομένα ευαισθησίας του άγριου πληθυσμού ή χωρίς κριτική εκτίμηση της μεθόδου της δοκιμής. Για παράδειγμα *in vitro* δεδομένα δεν είναι επαρκή για τις ακυλαανίνες και την *Phytophthora*, εξαιτίας της μικρής συσχέτισης μεταξύ δοκιμών *in vitro* και *in vivo*. Παρόμοια, δεδομένα βλάστησης σπορίων δεν έχουν μεγάλη σημασία ως ένδειξη ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα που παρεμποδίζουν πρωταρχικά τη μυκηλιακή ανάπτυξη και είναι λιγότερο δραστικά στην βλάστηση των σπορίων π.χ. μερικά προϊόντα DMI (Staub and Sozzi, 1984). Επίσης ενδείξεις ανθεκτικότητας από δεδομένα παρεμπόδισης μυκηλιακής ανάπτυξης δεν έχουν ιδιαίτερη βαρύτητα για μυκητοκτόνα που κυρίως παρεμποδίζουν τη βλάστηση σπορίων και είναι λιγότερο δραστικά στη μυκηλιακή ανάπτυξη όπως π.χ. το dichlofluanid.

Όταν δημοσιεύονται ή συζητούνται τα αποτελέσματα της παρακολούθησης της ευαισθησίας των πληθυσμών των μυκήτων στα μυκητοκτόνα, η σχετική χρήση των όρων ανθεκτικότητα ή ευαισθησία (π.χ το δείγμα Α ήταν περισσότερο ανθεκτικό από το δείγμα Β) παρουσιάζει λίγα προβλήματα. Παρόλα αυτά η απόλυτη χρήση τους πολύ συχνά είναι παραπλανητική (π.χ το δείγμα Α είναι ανθεκτικό ενώ το δείγμα Β είναι ευαίσθητο) και πρέπει πάντα να γίνεται μια ακριβής δήλωση στο πως προσδιορίστηκαν και μετρήθηκαν οι κατηγορίες των ανθεκτικών ή ευαίσθητων. Μπορούμε να προσδιορίσουμε εύκολα μεταξύ 'ανθεκτικότητας στο εργαστήριο', όπου τα μεταλλαγμένα στελέχη έχουν παραχθεί τεχνητά, και 'πρακτικής ανθεκτικότητας', όπου ποικίλοι οργανισμοί στους πληθυσμούς αγρού έχουν αποκτήσει επαρκή επίπεδα ανθεκτικότητας, συχνότητα και παθογένεια για να προκαλέσουν μείωση ή απώλεια στην αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου στην πράξη. Παρόλα αυτά υπάρχουν ενδιάμεσες καταστάσεις όπου ανθεκτικές μορφές εμφανίζονται στους πληθυσμούς αγρού αλλά προς το παρόν δεν προκαλούν ανιχνεύσιμα πρακτικά προβλήματα. Γι' αυτόν τον τύπο συμπεριφοράς δεν έχει γίνει αποδεκτός ο όρος ανθεκτικότητα (Brent, 1994). Έτσι, ο όρος μειωμένη ευαισθησία χρησιμοποιείται σε πρακτικές περιπτώσεις όπου υπάρχει μειωμένη ευαισθησία σε ένα μυκητοκτόνο χωρίς επίδραση όμως στη συμπεριφορά στον αγρό, ενώ ο όρος ανθεκτικότητα αγρού χρησιμοποιείται όταν τόσο το επίπεδο ανθεκτικότητας όσο και η συχνότητα των ανθεκτικών στελεχών είναι υψηλή με αποτέλεσμα την αξιοσημείωτη μείωση της αποτελεσματικότητας του μυκητοκτόνου στον αγρό (Hewitt, 1998). Τέλος επειδή η ανίχνευση είναι συχνά δυνατή μόνο σε τελευταία στάδια της συνολικής εξελικτικής διαδικασίας και πολύ κοντά ή μετά την αποτυχία του προϊόντος στην καταπολέμηση μιας ασθένειας, οι κυριότερες προσπάθειες πρέπει να κατευθυνθούν σε στρατηγικές που προλαμβάνουν ή καθυστερούν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας και στην εφαρμογή αυτών των στρατηγικών όσο το δυνατό νωρίτερα (Brent, 1991).



## **Β. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ - ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ**

Η βιοτεχνολογία έχει αναπτύξει μια μεγάλη ποικιλία από διαγνωστικές τεχνικές που βασίζονται στην ανοσολογία και την τεχνολογία του DNA στην Ιατρική και την Γεωργία. Η πρόοδος στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των μυκητολογικών ασθενειών, είναι πολύ πιο αργή για πολλούς λόγους, αλλά ένας αριθμός πρόσφατων δημοσιεύσεων δείχνουν ότι γίνεται αξιόλογη πρόοδος. Ακριβής ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση της ασθένειας μπορεί σύντομα να είναι διαθέσιμη για να βελτιώσει τα μέτρα ελέγχου για ένα αριθμό σημαντικών φυτοπαθογόνων.

Βιοχημικές, ανοσολογικές και μέθοδοι της Μοριακής Βιολογίας, έχουν αναπτυχθεί για την καταγραφή της ευαισθησίας των εντόμων στα εντομοκτόνα (Brown & Brogdon, 1987; Devonshire, 1990). Αυτές οι μέθοδοι, είναι πολύ βολικές και μερικές από αυτές μπορούν να προσδιορίσουν επίπεδα ανθεκτικότητας χωρίς να χρειάζεται να γίνουν δοκιμές σε ένα εύρος συγκεντρώσεων. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις μπορούν να ανιχνεύσουν ανθεκτικότητα σε χαμηλότερες συχνότητες από ότι οι βιοδοκιμές. Οι συνήθεις μέθοδοι ανίχνευσης και παρακολούθησης της ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα βασίζονται μόνο σε τεχνικές βιοδοκιμών, οι οποίες προσδιορίζουν ποικίλα φαινοτυπικά επίπεδα ανθεκτικότητας. Οι βιοδοκιμές παίρνουν συχνά αρκετό χρόνο, μπορεί να είναι ανακριβείς και επιτρέπουν την ανίχνευση ενός μόνο μέρους του πληθυσμού του παθογόνου. Έτσι η ανθεκτικότητα συχνά ανιχνεύεται μόνο όταν είναι πολύ αργά να υιοθετηθούν στρατηγικές που ίσως θα μπορούσαν να αποτρέψουν την απώλεια της αποτελεσματικότητας του μυκητοκτόνου. Οι μέθοδοι που βασίζονται σε βιοχημικές τεχνικές θα επιτρέπουν περισσότερα δείγματα να ελέγχονται και να ανιχνεύουν την ανθεκτικότητα νωρίτερα. Επιπρόσθετα, θα παρέχουν άμεση ένδειξη του μηχανισμού της ανθεκτικότητας που είναι παρών στους πληθυσμούς του παθογόνου καθώς και καλύτερη γνώση για τους μηχανισμούς ανάπτυξης της ανθεκτικότητας (Hollomon, 1991).

Βέβαια η απόλυτη εμπιστοσύνη στα αποτελέσματα αυτών των μεθόδων εμπεριέχει και κινδύνους. Βιοχημικές δοκιμές, ανοσολογικές δοκιμές ή δοκιμές ανίχνευσης DNA, πιθανόν να ανιχνεύσουν μόνο ένα μηχανισμό ανθεκτικότητας ενώ παράλληλα μπορεί να συνυπάρχουν και άλλοι. Παρόλα αυτά, κάποια προβλήματα ανθεκτικότητας μπορεί να αποδειχθεί στην πράξη ότι εξαρτώνται από την παρουσία ή την απουσία ενός ξεκάθਾਰου μηχανισμού ανθεκτικότητας και σε αυτήν την περίπτωση αυτή η προσέγγιση μπορεί να έχει χρήσιμη πρακτική αξία. Η ικανότητα εντοπισμού συγκεκριμένων γονιδίων ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς στον αγρό είναι βέβαια ένα σημαντικό εργαλείο για επιδημιολογικές έρευνες (Brent, 1991).

Προσπάθειες έχουν γίνει για να βρεθούν βιοχημικές ή ανοσολογικές μέθοδοι που θα ανιχνεύουν άμεσα την ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα π.χ. ανίχνευση ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα (Groves & Fox, 1988) χωρίς αυτό να είναι πάντα εφικτό. Έχουν παραχθεί ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές, ειδικοί για την ανίχνευση συγκεκριμένης συμπληρωματικής αλληλουχίας στο μόριο του DNA του μύκητα που εξετάζεται, που επιτρέπουν την ανίχνευση της ανθεκτικότητας μέσα σε τρεις μέρες σε απομονώσεις αγρού. Παρόλα αυτά, έχουν προσδιοριστεί πολλές διαφορετικές σημειακές μεταλλαγές που προκαλούν ανθεκτικότητα και μένει να δειχθεί αν ένας ή λίγοι ανιχνευτές (probes) θα είναι ικανοί να δώσουν αξιόπιστα αποτελέσματα για την πρακτική καταγραφή της ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα σε συγκεκριμένες απομονώσεις που έχουν προηγούμενα καταγραφεί ως ανθεκτικές με άλλες τεχνικές (Brent, 1991).

Οι ανοσοδοκιμές ταιριάζουν ιδανικά για την ανίχνευση παθογόνων, είτε ως ευαίσθητες και ποσοτικές ανοσοενζυμικές δοκιμές ELISA (Enzyme linked Immunoabsorbent Assays), είτε ως πιο γρήγορες ποιοτικές διαγνωστικές εφαρμογές (Martin & Fox, 1992).

Όπου τα μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα δεν επιτυγχάνουν την απαραίτητη αντιγονική ειδικότητα που χρειάζεται για την παραγωγή χρήσιμων διαγνωστικών τεχνικών, η τεχνολογία ιχνηθετών DNA, συνδεδεμένη με τεχνικές που βασίζονται στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) προσφέρουν εναλλακτικές προσεγγίσεις (Groves & Fox, 1988), ενώ συστήματα βασισμένα σε μεθόδους κυτταρογενετικής μπορεί να φανούν χρήσιμα (Van kan *et al.*, 1993).

## 1. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Οι τεχνικές Ανοσολογικής ανίχνευσης είναι αυξημένης σημασίας στην καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών (Fox, 1993). Προσαρμοσμένες σε μεθόδους που χρησιμοποιούνται από άλλες επιστήμες όπως στην Ιατρική, είναι γρήγορες και βασίζονται στην ανίχνευση ενός αντιγόνου από το μύκητα που εξετάζεται. Η ανίχνευση της παρουσίας του αντιγόνου γίνεται ορατή με την αλλαγή χρώματος κατά τη δοκιμή. Αντιγόνο είναι κάθε ξένο σώμα που μπορεί να προκαλέσει ανοσολογική απόκριση σε ένα θηλαστικό, με αποτέλεσμα την παραγωγή αντισωμάτων. Οι ανοσολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούν την ιδιότητα του αντιγόνου να δεσμεύεται ειδικά με τα αντισώματα που έχουν παραχθεί γι αυτό. Οι μύκητες παράγουν χαρακτηριστικά μόρια, συχνά στα κυτταρικά τους τοιχώματα ή προσιτά με μεθόδους απευθείας εξαγωγής τους από το μυκήλιο (κυτταρόπλασμα). Τα προβλήματα που σχετίζονται με την χρήση των αντισωμάτων περιλαμβάνουν την μειωμένη αντιγονικότητα των παραπάνω μορίων και την έλλειψη εξειδίκευσης των αντισωμάτων που παράγονται.

Πολλές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αντιορού - το υγρό κλάσμα του αίματος του θηλαστικού που ανοσοποιείται, στο οποίο υπάρχουν τα αντισώματα - σε παθογόνα μύκητων των φυτών και δεν είναι γενικά γνωστό ποιο από τα δομικά συστατικά των μυκήτων (κυτταρικό τοίχωμα, σπόρια, διαλυτές πρωτεΐνες, εξωκυτταρικό υλικό) είναι πιο χρήσιμο και πιο αξιόπιστο για την παραγωγή εξειδικευμένων αντισωμάτων και συγκεκριμένα ποιες από τις πρωτεΐνες που περιέχουν αυτά τα συστατικά έχουν αντιγονική δράση.

Οι ανοσοδοκιμές μπορεί να βασίζονται σε μόνο- ή πολυκλωνικά αντισώματα. Οι δοκιμές που βασίζονται σε πολυκλωνικά αντισώματα περιέχουν ένα μίγμα από αντισώματα που έχουν παραχθεί σε πειραματόζωα που ανοσοποιήθηκαν με χορήγηση του αντιγόνου σε μορφή ένεσης με ανεπεξέργαστο εκχύλισμα από τον μύκητα που δοκιμάζεται. Οι δοκιμές με πολυκλωνικά αντισώματα είναι μη εξειδικευμένες και αναγνωρίζουν όλους τους μύκητες που περιέχουν αντισώματα στο συγκεκριμένο αντιγόνο. Παρόλα αυτά πολλοί μύκητες, συμπεριλαμβάνοντας και πολλούς μη παθογόνους, παράγουν μη ειδικά αντιγόνα και έτσι μειώνουν τη διαγνωστική αξία των δοκιμών που βασίζονται στα πολυκλωνικά αντισώματα.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα κερδίζουν γενικότερης αποδοχής ως διαγνωστικό εργαλείο στο επίπεδο του είδους και του υποείδους. Τα μονοκλωνικά αντισώματα μπορεί να είναι ειδικά για το γένος, το είδος ή το στέλεχος. Έτσι οι δοκιμές που βασίζονται σε μονοκλωνικά αντισώματα είναι πολύ εξειδικευμένες. Αποτελέσματα των μεθόδων αυτών μπορεί να ληφθούν σε ένα διάστημα λίγων ωρών (Miller *et al.*, 1992; Fox, 1993).

Βέβαια οι εφαρμογές και οι περιορισμοί των διαγνωστικών μεθόδων για τη γεωργική τους χρήση ερευνώνται ακόμη. Ερωτήματα παραμένουν στο κατά πόσο αποτελεσματικά είναι αυτά τα διαγνωστικά ενώ σημαντική παράμετρος είναι το κόστος της χρήσης των διαγνωστικών αυτών σε σχέση με το κόστος των τυπικών τεχνικών απομόνωσης.

#### Εντοπισμός στελεχών του *Botrytis cinerea* ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά με μεθόδους ανοσολογίας

Το carbendazim και τα συγγενή μυκητοκτόνα παρεμποδίζουν τον πολυμερισμό της α- και β- τουμπουλίνης για το σχηματισμό μικροσωληνίσκων. Αυτά τα μυκητοκτόνα δεσμεύουν τη β- τουμπουλίνη αλλά στα ανθεκτικά στελέχη μια τροποποιημένη τουμπουλίνη δε δεσμεύεται πλέον με αυτά τα μυκητοκτόνα. Προσπάθειες να χρησιμοποιηθεί η ανοσολογία για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας στο carbendazim στον *Botrytis cinerea* ήταν ανεπιτυχής και φαίνεται ότι οι αμινοξικές αλλαγές που εμπλέκονται δεν δημιουργούν μοναδικούς επιτοπους (Hollomon, 1991).

Ο *Botrytis cinerea* επιλέχθηκε για την αρχική ανάπτυξη μιας διαγνωστικής δοκιμής που θα εφαρμόζεται στον αγρό και η οποία θα ανιχνεύει στους πληθυσμούς του μύκητα για ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. Ο *Botrytis cinerea* είναι ένα οικονομικά σημαντικό παθογόνο που αναπτύσσεται σχετικά εύκολα και γρήγορα *in vitro*, έχει μια υφιστάμενη ιστορία ανθεκτικότητας στο carbendazim (MBC) σε όλο τον κόσμο, ενώ πληθυσμοί απ' όλον τον κόσμο έχουν δείξει να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται καλά μετά την παύση της εφαρμογής του μυκητοκτόνου.

Η βιοχημική βάση της επίδρασης του carbendazim στο μύκητα είναι σχετικά καλά περιγεγραμμένη. Η συγγένεια πρόσδεσης της πρωτεΐνης των μικροσωληνίσκων τουμπουλίνης για το [<sup>14</sup>C] MBC έδειξε να σχετίζεται στενά με την ευαισθησία του στελέχους για το μυκητοκτόνο. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο MBC σε στελέχη κανονικά ευαίσθητων ειδών όπως ο *Botrytis cinerea* αποδίδεται σε μια μη εύκολα αναγνωρίσιμη τροποποίηση στη δομή της τουμπουλίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη συγγένεια (affinity) για το carbendazim αλλά χωρίς σημαντική επίπτωση στη λειτουργία των μικροσωληνίσκων. Αυτή είναι η δομική διαφορά που μπορεί να προσφέρει τη βάση για ανοσοχημική διαφοροποίηση των βióτυπων που είναι ανθεκτικοί στο carbendazim και αυτών που είναι ευαίσθητοι (Groves and Fox, 1988). Έγινε προσπάθεια χρήσης ενός εκχυλίσματος τουμπουλίνης από ευαίσθητο στέλεχος για την ανοσοποίηση και την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικών για την β- υπομονάδα της πρωτεΐνης τουμπουλίνης. Το ίδιο έγινε και για την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικών για την β- υπομονάδα της τουμπουλίνης των ανθεκτικών στελεχών. Η ιδέα ήταν ότι η τροποποιημένη τουμπουλίνη των ανθεκτικών στελεχών, θα είχε τέτοια διαφοροποίηση στη στερεοδιάταξή της που θα προκαλούσε την παραγωγή διαφορετικού μονοκλωνικού αντισώματος ειδικού γι' αυτήν. Η δοκιμή αυτή θα μπορούσε να εφαρμόζεται στον αγρό σε εκχύλισμα μυκήτων και ο προσδιορισμός της ανθεκτικότητας θα γινόταν εύκολα με την αλλαγή χρώματος που θα δήλωνε την παρουσία ή την απουσία της τροποποιημένης τουμπουλίνης και επομένως την παρουσία ή όχι ανθεκτικών στελεχών στον αγρό. Με τη δοκιμή αυτή θα ήταν δυνατή η ανάπτυξη μιας ανοσολογικής μεθόδου για ταχεία ανίχνευση σπορίων από στελέχη ανθεκτικά στο carbendazim που θα βρίσκονταν σε χαμηλή συχνότητα σε πληθυσμούς του *Botrytis cinerea* (Groves and Fox, 1988).



Οι Groves and Fox (1988) κατάφεραν να προσδιορίσουν με ανοσοχημικό εντοπισμό τις υπομονάδες της τουμπουλίνης του *Botrytis cinerea*. Ο αποτελεσματικός καθαρισμός όμως της πρωτεΐνης τουμπουλίνης από το εκχύλισμα του μύκητα (γεγονός απαραίτητο για την χρήση της τουμπουλίνης ως αντιγόνο και την παραγωγή αντισωμάτων) είναι πολύ δύσκολος. Επίσης η αντιγονικότητα της τουμπουλίνης του *B. cinerea* καθώς και η διαθεσιμότητα του επιτόπου της περιοχής πρόσδεσης του carbendazim είναι αβέβαιες κι έτσι θα πρέπει να γίνουν εναλλακτικές προσεγγίσεις για την ανάπτυξη ενός ανοσοδιαγνωστικού.

### **Εντοπισμός της παρουσίας στελεχών του *Botrytis cinerea* ανθεκτικών και ευαίσθητων στα βενζιμιδαζολικά με τρεις διαφορετικές δοκιμές ανοσοεντοπισμού**

Οι δοκιμές ανοσοεντοπισμού βασίζονται στην ίδια αρχή της ανοσολογίας. Την αντίδραση του αντισώματος με το αντιγόνο εναντίον του οποίου έχει παραχθεί. Για να γίνει όμως αντιληπτή η αντίδραση του αντιγόνου με το αντίσωμα, θα πρέπει το σύμπλοκο που προκύπτει κατά την αντίδραση να παράγει ένα αποτέλεσμα - οπτικό συνήθως - η ύπαρξη του οποίου να πιστοποιεί την αντίδραση του αντιγόνου με το αντίσωμα, άρα την παρουσία του αντιγόνου στο δείγμα που ελέγχεται και επομένως την παρουσία του οργανισμού ή ότι άλλο ελέγχεται. Οι διαφορές στις μεθόδους ανοσοεντοπισμού υπάρχουν και στον τρόπο με τον οποίο παράγεται το οπτικό αποτέλεσμα το οποίο πιστοποιεί την δημιουργία συμπλόκου με το αντιγόνο. Έτσι μπορεί σαν ένδειξη να χρησιμοποιηθεί η ραδιενέργεια που εκπέμπεται από ραδιενεργά ισότοπα που έχουν συζευχθεί με το αντίσωμα και καταγράφεται με μία αυτοραδιογραφία όπως συμβαίνει στην Ανοσοραδιομετρική δοκιμή (Immuno-radiometric assay, IRMA). Επίσης οπτικό αποτέλεσμα παράγεται με την αντίδραση ενός ενζύμου το οποίο έχει συνδεθεί στο αντίσωμα με το υπόστρωμα του ενζύμου, σαν ένδειξη της δημιουργίας συμπλόκου με το αντιγόνο, όπως στους διάφορους τύπους ELISA ενώ η μέτρηση του οπτικού αποτελέσματος σε φασματοφωτόμετρο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοστικό προσδιορισμό του παράγοντα που ελέγχεται. Όσο περισσότερο έντονο χρώμα καταγράφεται, τόσο μεγαλύτερος αριθμός αντιγόνων υπάρχει άρα και τόσο μεγαλύτερο πλήθος του παράγοντα που ελέγχεται. Επίσης για την παραγωγή οπτικού αποτελέσματος μπορεί να χρησιμοποιείται φθορισμός μορίων που συνδέονται με το αντίσωμα σαν ένδειξη δημιουργίας συμπλόκου άρα και παρουσίας του αντιγόνου, όπως στη δοκιμή ανοσοφθορισμού (immunofluorescent assay, IF).

Οι τεχνικές IRMA, ELISA και IF δοκιμάστηκαν για να εξακριβωθεί αν η ανοσοδιαγνωστική είναι ικανοποιητική μέθοδος για τον προσδιορισμό του *Botrytis cinerea*, χρησιμοποιώντας στελέχη ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά και ευαίσθητα στα βενζιμιδαζολικά που απομονώθηκαν από επιτραπέζια σταφύλια (Auger *et al.*, 1995). Διαλυτές πρωτεΐνες αποκτήθηκαν από μυκήλιο και σκληρώτια από κάθε στέλεχος και προσδιορίστηκαν ποσοτικά με τη μέθοδο Bradford. Σε πήκτωμα ακρυλαμίδης έγινε ηλεκτροφόρηση για να αποκτηθούν πρότυπα πρωτεϊνών. Οι διαλυτές πρωτεΐνες και από τα δύο στελέχη ενέθηκαν σε θηλυκό κουνέλι Νέας Ζηλανδίας και αποκτήθηκαν αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά υποβλήθηκαν στη δοκιμή IRMA για να προσδιοριστούν υπερευαίσθητοι πολυμορφικοί δείκτες, αντισώματα δηλαδή που να συνδέονται με συγκεκριμένα μόνο αντιγόνα διαφορετικά για κάθε στέλεχος και έτσι η ανοσοδιαγνωστική μέθοδος να μπορεί να διαχωρίζει τα δύο στελέχη. Τέτοια αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σαν stock αντισώματα στην ELISA και IF. Η ηλεκτροφόρηση έδειξε την ομοιότητα των προτύπων και για τα δύο

στελέχη. Η ανοσοαντίδραση στις 4 διαχύσεις κατά τη δοκιμή IRMA δεν διέφεραν πολύ. Η δοκιμή ELISA ήταν υψηλά ευαίσθητη για το παθογόνο αποκτώντας υψηλές τιμές οπτικής απορρόφησης αλλά δεν διέκρινε μεταξύ των στελεχών ως προς την ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά. Η IF *in vitro* ήταν υψηλά ευαίσθητη και ειδική για το *Botrytis cinerea* χωρίς να διαφοροποιεί τα στελέχη ως προς την ανθεκτικότητα. Η ίδια τεχνική διέκρινε το παθογόνο σε ιστούς σταφυλιού παρότι είχε 50 % λιγότερο φθορισμό (Auger *et al.*, 1995).

## 2. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Η ταυτότητα κάθε οργανισμού βρίσκεται βασικά στην αλληλουχία των βάσεων του νουκλεϊνικού οξέος (DNA) που αποτελεί το γενετικό υλικό του οργανισμού. Μέθοδοι που αποκαλύπτουν διαφορές στο DNA πιθανόν να είναι περισσότερο ευαίσθητες από αυτές που βασίζονται στις αλληλεπιδράσεις αντιγόνου – αντισώματος. Οι πρακτικές δοκιμές που χρησιμοποιούν τεχνικές που βασίζονται στα νουκλεϊνικά οξέα είναι σύνθετες και σχετικά αργές με τυπικό χρόνο διεξαγωγής 24-48 ώρες αλλά η ακρίβεια τέτοιων τεχνικών κάνει πιθανό το σχεδιασμό δοκιμών που θεωρητικά μπορούν να διακρίνουν όχι μόνο μεταξύ ειδών αλλά και μεταξύ παθοτύπων. Τέτοιες διαγνωστικές τεχνικές βασίζονται στις μικρές αλλά σταθερές γενετικές διαφορές που εμφανίζονται μεταξύ των οργανισμών.

### Τεχνική RFLP (restriction fragment length polymorphism Analysis)

Τα πρωτόκολλα για την απομόνωση και τον καθαρισμό του γενωμικού ή του οργανιδιακού DNA (μιτοχονδριακό) είναι αρκετά καλά τεκμηριωμένα (Maniatis *et al* 1982; Taylor & Natvig, 1987 ) και η ανάλυση RFLP έχει χρησιμοποιηθεί στην εξέταση των ταξινομικών σχέσεων μεταξύ των μυκήτων (Bruns *et al*, 1992) όσο και στη διάκριση στελεχών μέσα στο είδος όπως στο *Botrytis cinerea* (Levis *et al*, 1997). Η ανάλυση RFLP περιλαμβάνει αρκετά στάδια όπως: 1) Απομόνωση και καθαρισμός του συνολικού γενωμικού ή οργανιδιακού DNA 2) Χρήση ενζύμων (περιοριστικές ενδονουκλεάσες, restriction endonucleases) που προκαλούν πέψη, ‘κόβουν’ δηλαδή το DNA σε ειδικές θέσεις κι έτσι παράγεται ένας αριθμός τμημάτων DNA που έχουν διαφορετικό μήκος 3) ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των τμημάτων του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης και 4) οπτικοποίηση των τμημάτων DNA με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο ( ethidium bromide) ή 5) μεταφορά των τμημάτων DNA σε νιτροκυτταρίνη ή σε μεμβράνες από πολυμερές πλαστικό (nylon) όπως π.χ. στην τεχνική Southern blotting και ανίχνευση (probing) με ένα ραδιενεργό ή μη ραδιενεργό ανιχνευτή (probe). Διαφορές στο μέγεθος των τμημάτων DNA, και έτσι στην κινητικότητά τους μπορεί να προκύψουν από μικρές αλλαγές στις βάσεις ή προσθήκης ή αφαίρεσης αλληλουχιών (Correll, 1993). Με ανάλυση RFLP διαπιστώθηκε σημαντική γενετική ποικιλότητα στον *Botrytis cinerea*, που οδηγεί στην υπόθεση της παρουσίας δύο διαφορετικών ειδών (Giraud *et al.*, 1997).

### Τεχνική Southern Blotting

Στην τεχνική Southern blotting αφού γίνει ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των τμημάτων του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης μεταφέρονται τα τμήματα του DNA σε νιτροκυτταρίνη ή σε μεμβράνες από πολυμερές πλαστικό (nylon). Η πρόσδεση του DNA στη νιτροκυτταρίνη γίνεται μόνιμη όταν η νιτροκυτταρίνη θερμανθεί και

στεγνώσει. Έτσι έχει κατασκευασθεί στη νιτροκυτταρίνη ένα αντίγραφο των ζωνών του DNA στο πήκτωμα. Στο φύλλο αυτό της νιτροκυτταρίνης μπορεί να γίνει ανίχνευση (probing) μιας δεδομένης αλληλουχίας DNA με ένα ραδιενεργό ή μη ραδιενεργό ανιχνευτή (probe), ο οποίος ύστερα από ειδική επεξεργασία θα υβριδιστεί, θα ενωθεί δηλαδή λόγω συμπληρωματικότητας με την περιοχή αυτή του DNA αν υπάρχει στο δείγμα που ελέγχεται. Στη συνέχεια η μεμβράνη εκτίθεται σε φωτογραφικό ή χημικά ευαίσθητο χαρτί (αυτοραδιογραφία), στο οποίο καταγράφεται η εκπομπή ραδιενέργειας του ανιχνευτή κι έτσι ανιχνεύεται, αν και που, ο ανιχνευτής έχει υβριδιστεί με τα τμήματα DNA. Οι ανιχνευτές μπορεί να είναι αποδιατεταγμένο κλωνοποιημένο DNA, cDNA, RNA, καθαρό γενωμικό ή οργανιδιακό DNA, τυχαία κομμάτια DNA ή ειδικά γονίδια που έχουν κλωνοποιηθεί σε βακτηριακά πλασμίδια (Λεκανίδου, 1992). Ομόλογοι ανιχνευτές (homologous probes) προέρχονται από τον οργανισμό που μελετάται, ενώ ετερόλογοι ανιχνευτές (heterologous probes) προέρχονται από DNA διαφορετικού οργανισμού που μας ενδιαφέρει. Με την τεχνική αυτή δίνεται η δυνατότητα να αναγνωρίσουμε τη συγκεκριμένη περιοχή του DNA που αναζητούμε π.χ. θέση στην οποία έχει συμβεί μία μεταλλαγή που οδηγεί σε ανθεκτικότητα σε ένα μυκητοκτόνο, αν γνωρίζουμε την αλληλουχία των βάσεων στη συγκεκριμένη θέση και κατασκευάσουμε τον ειδικό ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή.

Στην ανθεκτικότητα στο carbendazim μια σημειακή μεταλλαγή είναι υπεύθυνη για την τροποποιημένη στερεοδομή της β- υπομονάδας της τουμπουλίνης η οποία οδηγεί σε μειωμένη συγγένεια με το carbendazim. Οι Martin & Fox (1992), χρησιμοποίησαν ένα 18μερή ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή, η αλληλουχία του οποίου ανταποκρίνονταν στην αλληλουχία DNA του γονιδίου της β- τουμπουλίνης που είχε υποστεί μεταλλαγή και προκαλούσε ανθεκτικότητα στο MBC, με τη μεταλλαγή τοποθετημένη στο κέντρο του ανιχνευτή ώστε να διευκολυνθεί η υβριδοποίηση. Ο ανιχνευτής ιχνηθετήθηκε με [ $^{32}$ P] ATP και οι αυτοραδιογραφίες έδειχναν ότι ο ανιχνευτής συνδέονταν ειδικά στις αντίστοιχες αλληλουχίες που ήταν υπεύθυνες για την ανθεκτικότητα.

### Τεχνική FISH (fluorescence in situ hybridization).

Μια από τις σημαντικές τεχνικές που αναπτύχθηκαν τα τελευταία χρόνια είναι η τεχνική FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Σ' αυτήν χρησιμοποιούνται ανιχνευτές DNA, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι ή μπορούν να συνδεθούν με φθορίζουσες χρωστικές. Προσθήκη των ανιχνευτών σε ένα χρωμοσωμικό παρασκεύασμα έχει ως αποτέλεσμα την ένωση του ανιχνευτή σε συγκεκριμένη περιοχή του DNA. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα να αναγνωρίσουμε την συγκεκριμένη περιοχή παρατηρώντας τα χρωμοσώματα στο μικροσκόπιο, λόγω του φθορισμού που παράγει η φθορίζουσα ουσία που είναι συνδεδεμένη με τον ανιχνευτή. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει χρωμοσωμικές περιοχές και σε μεσοφασικούς πυρήνες, γεγονός ιδιαίτερα χρήσιμο για τη μελέτη κυττάρων που δε διαιρούνται. Σημαντική είναι επίσης η συνεισφορά της και στη χαρτογράφηση των γονιδίων.

Στην περίπτωση που είναι γνωστή η ακολουθία βάσεων ενός γονιδίου μπορεί να συντεθεί ένας ανιχνευτής DNA, ο οποίος όταν προστεθεί σε ένα παρασκεύασμα χρωμοσωμάτων θα ενωθεί, λόγω συμπληρωματικότητας, στην περιοχή του χρωμοσώματος που εντοπίζεται το γονίδιο, υποδεικνύοντας μας την ακριβή θέση του στο χρωμόσωμα. Μια εφαρμογή της μεθόδου θα ήταν και η ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας στα χρωμοσώματα των μυκήτων.



Η πρώτη αναφορά επιτυχημένης εφαρμογής της FISH στα χρωμοσώματα φυτοπαθογόνου μύκητα έγινε στους μύκητες *Botrytis cinerea* και *Alternaria alternata* (Taga & Murata, 1994). Στα χρωμοσώματα έγινε χρώση με τη φθορίζουσα χρωστική DAPI, η οποία έδινε πολύ καλή διακριτότητα στην παρατήρηση των χρωμοσωμάτων στο μικροσκόπιο.

### Χρήση τελομερών για την αναγνώριση μικροοργανισμών

Το DNA έχει χρησιμοποιηθεί σαν μοριακός ανιχνευτής (probe) για την ταυτοποίηση των μυκήτων. Μικρά, τυχαία κομμάτια γενωμικού DNA έχουν κλωνοποιηθεί και χρησιμοποιούνται με επιτυχία σε επίπεδο είδους στον προσδιορισμό της *Phytophthora parasitica* (Goodwin *et al.*, 1990), ενώ μικρά κομμάτια DNA χρησιμοποιούνται σαν ανιχνευτές για την αναγνώριση σε επίπεδο είδους και στελέχους στο μύκητα *F. oxysporum* (Kistler *et al.*, 1991).

Ο Levis *et al.* (1997) απομόνωσαν μια τελομερή αλληλουχία από τον *Botrytis cinerea* για να εξετάσουν τη δυναμική της χρήση στη μελέτη της ποικιλότητας των πληθυσμών αυτού του μύκητα. Παρότι δεν έχουν προσδιοριστεί τα επίπεδα ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα είναι πιθανό η μέθοδος αυτή να χρησιμοποιηθεί στη διάκριση στελεχών ανάλογα με τα επίπεδα ανθεκτικότητάς τους στα μυκητοκτόνα.

Τα τελομερή, τα τελικά συμπλέγματα DNA – πρωτεϊνών των χρωμοσωμάτων, χρειάζονται για να σταθεροποιηθούν τα χρωμοσώματα και για την πλήρη αντιγραφή του DNA. Τα τελομερή από απομακρυσμένους οργανισμούς, όλα περιέχουν μία ποικιλία σε αριθμό από ταυτόχρονα επαναλαμβανόμενες, απλές, πλούσιες σε (G+C) αλληλουχίες, συχνά του τύπου 5' (T/A<sub>1-4</sub> G<sub>1-8</sub>)<sub>3</sub>'.

Ένας ανιχνευτής ειδικός για την επανάληψη των τελομερών μπορεί να χρησιμοποιηθεί με RFLP ανάλυση για να αναγνωρίσει ομάδες μέσα στο *Cladosporium fulvum* που συσχετίζεται με τη φυλή, και η τελομερική αλληλουχία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αναγνώριση στελεχών σε ζύμες του γένους *Candida*.

Τελομερικό DNA απόμονώθηκε από το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea*, χρησιμοποιώντας μόνο τον ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή (CCCTAA)<sub>4</sub>. Οπως και με άλλους φυτοπαθογόνους μύκητες, ο *Botrytis cinerea* έχει μια μικρή TTAGGG τελομερική επανάληψη. Ανάλυση RFLP έγινε σε στελέχη του *Botrytis cinerea* που απομονώθηκαν από διαφορετικά φυτά ξενιστές και συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές, σε διαφορετικές περιόδους. Σχεδόν κάθε στέλεχος είχε ένα συγκεκριμένο πρότυπο RFLP, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που συλλέχθηκαν από το ίδιο φυτό σε διάστημα ενός μηνός. Έτσι αυτός ο δείκτης φαίνεται να είναι ένα σημαντικό εργαλείο για να δείξει το μεγάλο πολυμορφισμό των στελεχών του *Botrytis cinerea*.

Τα Southern blots μερικών στελεχών *Botrytis cinerea* έδειξαν μια ζώνη που ήταν πολύ έντονη, δεικνύοντας ότι η πλειοψηφία των αλληλουχιών που συνδέονται με το τελομερές έχουν την ίδια αλληλουχία.

### Μέθοδος ελέγχου αποτυπώματος DNA (DNA Fingerprinting)

Άλλη εφαρμογή των νουκλεϊνικών οξέων σαν ανιχνευτών είναι η πρόσφατη χρήση των 'μινι-δορυφορικών' DNA ανιχνευτών ('minisatellite' DNA probes) που χρησιμοποιούνται στην χαρτογράφηση των γονιδίων (fingerprinting). Απλές επαναλαμβανόμενες περιοχές του DNA ή μινιδορυφόροι (minisatellites), βρίσκονται διασπαρμένες στο γονιδίωμα. Αυτές οι ξεχωριστές σειρές γενετικών πληροφοριών παρουσιάζουν εξαιρετική ποικιλομορφία στα διαφορετικά άτομα και βρίσκονται σε πολλαπλή επανάληψη κατά μήκος του μορίου του DNA. Το μέγεθος καθορίζεται από τις

επαναλαμβανόμενες σειρές, ο αριθμός των επαναλήψεων και η ακριβής θέση τους στο μόριο είναι απολύτως χαρακτηριστικές για το συγκεκριμένο άτομο. Ειδικόι ανιχνευτές (probes), μπορούν να ανιχνεύουν αυτούς τους μικροδορυφόρους, δημιουργώντας σταθερά “αποτυπώματα” DNA επάνω σε φωτογραφική πλάκα, απεικονίζοντας έτσι μοναδικά πρότυπα, τα οποία είναι εντελώς ειδικά για κάθε άτομο. Αυτοί οι ανιχνευτές όπως και τεχνικά συντιθέμενοι, ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές μπορεί να αποδειχθούν πολύ χρήσιμοι για την αναγνώριση των μυκήτων σε επίπεδο είδους υποείδους ή ακόμη και αναγνώρισης στελεχών μέσα στους πληθυσμούς (DeScenzo and Harrington, 1991).

### Υβριδοποίηση γονιδιακών Νουκλεϊνικών οξέων

Ο υβριδισμός του DNA έχει χρησιμοποιηθεί σε περιορισμένη κλίμακα στην ταξινόμηση των μυκήτων. Η διαδικασία περιλαμβάνει την απομόνωση του συνολικού DNA μιας απομόνωσης, την ανάμιξη του DNA από άλλο στέλεχος ή είδος, τη θέρμανση και την ψύξη του μίγματος για να αποδιαταχθεί το μόριο του DNA και να μπορέσει να επανασυγκολληθεί (Kurtzman, 1985). Ο βαθμός επανασυγκόλλησης εξαρτάται από την ομολογία ή την ομοιότητα μεταξύ των διαφορετικών μορίων DNA. Αυτή η τεχνική δεν έχει εφαρμοστεί πολύ εξαιτίας του κόστους του εξοπλισμού και την ποικιλία στην ομολογία του DNA ακόμη και μέσα στο είδος.

### Τεχνική PCR (polymerase chain reaction)

Η Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης, ή PCR, είναι μια τεχνική για την αναπαραγωγή κομματιών DNA με δεδομένη αλληλουχία βάσεων. Αυτή η μέθοδος έχει εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών και είναι ένα χρήσιμο εργαλείο στην Πληθυσμιακή Βιολογία (Arnheim *et al.*, 1990) και τον προσδιορισμό των μυκήτων (Gardes *et al.*, 1991). Η PCR περιλαμβάνει την ενζυμική αντιγραφή μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Μια μικρή ποσότητα DNA ενός οργανισμού προστίθεται σε ένα μίγμα που περιέχει ένα ζεύγος εκκινητών (primers) ειδικών για τη συγκεκριμένη αλληλουχία DNA που κάποιος ενδιαφέρεται να αντιγράψει (Correll, 1993). Μια περιοχή που χρησιμοποιείται συχνά στις μελέτες των μυκήτων είναι η περιοχή ITS (internally transcribed spacer region, ITS region), η οποία χωρίζει τα γονίδια του ριβοσωμικού RNA. Η αλληλουχία των βάσεων αυτής της περιοχής ενώ είναι αρκετά συντηρημένη για κάθε είδος οργανισμών, ποικίλει στους διάφορους μύκητες και έτσι αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο στις μελέτες για τη σχέση μεταξύ των ειδών (Bruns *et al.*, 1992). Η αλληλουχία των βάσεων του αντιγραφόμενου DNA μπορεί να συγκριθεί μεταξύ των ειδών και των στελεχών. Αυτή η τεχνική είναι πολύτιμη εξαιτίας του εξαιρετικά υψηλού επιπέδου διάκρισης (resolution) με το οποίο στελέχη ή είδη μπορεί να συγκριθούν. Ένας περιορισμός της μεθόδου είναι η έλλειψη ποικιλότητας σε μερικές ταξινομικές ομάδες.

Η PCR έχει κάποια αξία για εξειδικευμένη αναγνώριση ειδών ή στελεχών. Είναι πιθανό ότι το αντιγραφόμενο DNA μπορεί να υβριδιστεί με ειδική αλληλουχία που ανταποκρίνεται σε ένα συγκεκριμένο είδος ή στέλεχος.

Η ανακάλυψη ότι η ανθεκτικότητα στο MBC σε πολλά στελέχη μυκήτων οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο της β- υπομονάδας της τουμπουλίνης το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα σε απλές αλλαγές σε αμινοξέα και η οποία επηρεάζει τις ηλεκτροφορητικές ιδιότητες της υπομονάδας της πρωτεΐνης οδήγησε τους Martin και Fox (1992), να εξετάσουν τη δυνατότητα διάγνωσης της σημειακής μεταλλάξης με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας



ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές ειδικούς για τη γονιδιακή θέση (allele specific oligonucleotides, ASO).

Η πλειονότητα αυτών των αλλαγών στο γονίδιο της β- τουμπουλίνης βρίσκονται μεταξύ των αμινοξέων 100 και 300. Χρησιμοποιώντας ανάστροφους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (conversed oligon primers ) που καλύπτουν ή συμπεριλαμβάνουν αυτήν την περιοχή, κατάφεραν να κλωνοποιήσουν , να πολλαπλασιάσουν και να προσδιορίσουν την αλληλουχία μέρους του γονιδίου της β- τουμπουλίνης από δύο απομονώσεις του *Botrytis cinerea* με φαινότυπους με ανθεκτικότητα και ευαισθησία στο MBC (Martin and Fox, 1992).

Μια σημειακή μεταλλαγή στο αμινοξύ 198, που προκαλούσε αλλαγή από γλουταμινικό οξύ σε αλλανίνη, αποδόθηκε στην ανθεκτικότητα στο MBC. Συντέθηκαν δύο ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που συμπεριλάμβαναν τη σημειακή μεταλλαγή για ανθεκτικότητα και ευαισθησία. Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια, ειδικά για τη συγκεκριμένη γονιδιακή θέση (allele specific ) χρησιμοποιήθηκαν σε μια Μέθοδο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) με εγκατεστημένους εκκινητές (nested primers ), για τον προσδιορισμό του φαινοτύπου πολλών στελεχών του μύκητα γνωστής ευαισθησίας ή ανθεκτικότητας στο MBC. Τα ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη διαγνώστηκαν με επιτυχία από την PCR και με υβριδισμό Southern blotting.

Βρέθηκε ότι ήταν δυνατό να δοκιμαστεί ευαισθησία ή ανθεκτικότητα MBC σε 48 – 72 ώρες. Η δοκιμή είναι πολύ πιο γρήγορη από τις κλασικές δοκιμές των εμπλουτισμένων με μυκητοκτόνα τρυβλίων, οι οποίες μπορεί να διαρκέσουν μέχρι τρεις βδομάδες και βασίζονται σε καθαρές καλλιέργειες. Η ASO PCR είναι σημαντικά ευαίσθητη με τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζει τόσο λίγο όσο 1 ng του DNA στόχου. Πιστεύεται ότι λιγότερο μυκηλιακό υλικό θα χρειάζεται για αυτή τη μέθοδο από ότι για αυτές βασιζόμενες σε μονοκλωνικά αντισώματα. Η PCR ανιχνεύει γενοτυπική παρά φαινοτυπική ανθεκτικότητα, η οποία είναι δυνητικά πιο χρήσιμη στη διάγνωση ανθεκτικότητας σε ένα ετεροκαρυωτικό μύκητα όπως ο *Botrytis cinerea*.

Οι Martin και Fox (1992), προσπάθησαν να πολλαπλασιάσουν ειδικά αλληλουχίες β- τουμπουλίνης από γενωμικό DNA ανθεκτικών (R) και ευαίσθητων (S) στελεχών του *Botrytis cinerea*, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές, για την περιοχή του γονιδίου όπου εντοπίζονταν η μεταλλαγή, αλλά οι προσπάθειες αποδείχθηκαν ανεπιτυχείς, ενώ ήταν επιτυχείς χρησιμοποιώντας ένα σύστημα εγκατεστημένου εκκινητή (nested primer system). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν για άλλες δοκιμές με χρήση PCR. Πολλαπλασιασμός των περιοχών στόχων επηρεάζεται από την καθαρότητα του γενωμικού DNA. Η εξειδίκευση της δοκιμής μπορεί να βασίζεται στην συνεχιζόμενη χρήση ενός συστήματος εγκατεστημένου εκκινητή. Αυτό έχει τη δυνατότητα για ανάπτυξη σε ευαίσθητη διαγνωστική δοκιμή ώστε να αυξήσει την ευκολία και αποτελεσματικότητα της δοκιμής.

### Τεχνική RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)

Πρόσφατα μια τεχνική γνωστή ως RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) έχει αναπτυχθεί (Williams *et al* 1990). Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την αντιγραφή τυχαίων κομματιών DNA ενός οργανισμού με ένα αριθμό τυχαία κατασκευασμένων δεκαμερών εκκινητών (10- base primers). Τυπικά, τμήματα 10 – 200 βάσεων αντιγράφονται, και περιστασιακά μέχρι και 1kb τμήματα. Απομονώσεις μυκήτων μπορεί να συγκριθούν ελέγχοντας την παρουσία ή απουσία των DNA

τμημάτων, ή πιθανόν τις διαφορές στο μέγεθος των κομματιών. Για αυτή και άλλες PCR τεχνικές πρέπει να λαμβάνονται μέτρα για τυχόν επιμόλυνση με ξένο προς το δοκιμαζόμενο DNA (Correll, 1993).

Με την τεχνική RAPD μελετήθηκε η γενετική ποικιλότητα μεταξύ των διαφόρων απομονώσεων του *Botrytis cinerea* που συλλέχθηκαν στη διάρκεια ενός χρόνου από τον εξωτερικό και τον εσωτερικό χώρο ενός θερμοκηπίου στην Ολλανδία στο οποίο καλλιεργούνταν τριαντάφυλλα, ώστε να ερευνηθεί σε περιορισμένη κλίμακα, η δομή του πληθυσμού του μύκητα (Van der Vlugt *et al.*, 1993). Καθώς εκτιμήθηκε ότι το μόλυσμα προέρχονταν από διάφορες πηγές έξω από το θερμοκήπιο έγινε η υπόθεση ότι ο πληθυσμός μέσα στο θερμοκήπιο θα εμφάνιζε γενετική ποικιλομορφία.

Επίσης, με ανάλυση RAPD ερευνήθηκε η δυνατότητα διάκρισης, μεταξύ απομονώσεων του *Botrytis cinerea* που εμφάνιζαν ποικιλότητα στην παθογένεια στα φυτά. Σε 30 επιλεγμένες απομονώσεις με διαφορετική σχετική παθογένεια, που συλλέχθηκαν τόσο από τον εσωτερικό όσο και από τον εξωτερικό χώρο θερμοκηπίου τριανταφυλλιάς στην Ολλανδία έγινε ανάλυση RAPD ώστε να ερευνηθεί αν παρόμοια επίπεδα παθογένειας αντανακλούν γενετική ομοιότητα. Σχεδόν όλες οι απομονώσεις που ελέγχθηκαν ήταν γενετικά διαφορετικές αλλά δεν βρέθηκε καμιά συσχέτιση μεταξύ παθογένειας και προτύπων RAPD (Kersies *et al.*, 1997).

Από την άλλη, η τεχνική RAPD θα μπορούσε να αποκαλύψει αν συγκεκριμένοι γενότυποι κυριαρχούν στον πληθυσμό του μύκητα κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, ως ένδειξη για την εμφάνιση επιδημιών από γενετικά ομογενείς και σταθερές απομονώσεις

### 3. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

#### Τεχνική PFGE

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης πηκτώματος σε μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), είναι μια σχετικά νέα τεχνική που πρόσφατα εφαρμόστηκε για να ελέγξει την ποικιλότητα στους μύκητες (Mills and McCluskey, 1990). Η τεχνική περιλαμβάνει την απομόνωση ολόκληρων των χρωμοσωμάτων σε αгарόζη, η οποία βοηθάει να αποφεύγονται φυσικά σπασίματα στα μεγάλα μόρια DNA (με μήκος μεγαλύτερο από 10 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων) και στη συνέχεια ο διαχωρισμός τους σε ένα μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (pulsed electric field). Τα μόρια DNA, γίνονται ορατά με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide) (Correll, 1993). Τα πρότυπα του ηλεκτροφορητικού καρυότυπου που παίρνονται έτσι (καρυότυπος είναι η φωτογραφική απεικόνιση των χρωμοσωμάτων ενός οργανισμού κατά σειρά ελαττούμενου μεγέθους, τα οποία μετά από χρώση εμφανίζουν χαρακτηριστικές ζωνώσεις), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να γίνει σύγκριση της ποικιλότητας τόσο μέσα στο είδος όσο και μεταξύ των ειδών (Miao, 1990).

Οι Vallejo *et al.*, (1996) προσδιόρισαν τον ηλεκτροφορητικό καρυότυπο πέντε στελεχών του *Botrytis cinerea* από διαφορετικές περιοχές και διαπίστωσαν ότι για κάθε στέλεχος προκύπτει ένας μοναδικός καρυότυπος, δηλώνοντας ότι μέσα στο είδος υπάρχει αξιόλογος πολυμορφισμός στο μήκος τους DNA.

Παραλλαγή της τεχνικής PFGE είναι η τεχνική CHEF (contour-clamped homogeneous electric field). Η τεχνική αυτή έχει δείξει ότι πολλά είδη μυκήτων συμπεριλαμβανομένων στελεχών ή απομονώσεων εμφανίζουν πολύ διαφορετικούς

ηλεκτροφορητικούς καρυότυπους. Οι Van Kan *et al.*, (1993), ανέλυσαν τους καρυότυπους πέντε στελεχών του *Botrytis cinerea* με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος σε παροδικά μεταβαλλόμενο πεδίο (CHEF). Με ανάλυση υβριδοποίησης, τέσσερις ιχνηθέτες DNA χρησιμοποιήθηκαν για συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ζώνες. Δύο από τους ιχνηθέτες υβριδίζουν σε όλα τα στελέχη ενώ δύο άλλοι διαφοροποιούνται μεταξύ των στελεχών. Κανένα από τα πέντε πρότυπα χρωμοσωμάτων δεν ήταν ταυτόσημα και όλα τα πέντε στελέχη περιείχαν ένα ή περισσότερα μινιχρωμοσώματα ποικίλου μήκους. Με τη χρήση της CHEF ηλεκτροφόρησης πηκτώματος δείχθηκε ότι υπάρχει πολυμορφισμός στον καρυότυπο μεταξύ των πέντε στελεχών του *Botrytis cinerea* και όλα τα στελέχη είχαν διακριτά πρότυπα ζωνών χρωμοσωμάτων, ακόμη και στελέχη που απομονώθηκαν από το ίδιο φυτό ξενιστή.

#### 4. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

##### Πρότυπα Πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση του συνόλου των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών έχει χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση ειδών και υποειδών. Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει: α) εξαγωγή του συνόλου των πρωτεϊνών από το μυκήλιο ή τα σπόρια του μυκήτων και β) διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, με ηλεκτροφόρηση, ακολουθούμενο από γ) χρώση, για να γίνουν ορατές οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες (Correll, 1993). Η τεχνική αυτή είναι αρκετά χρήσιμη για τον διαχωρισμό ειδών μέσα στο γένος.

Στις διαλυτές πρωτεΐνες που αποκτήθηκαν από μυκήλιο και σκληρώτια στελεχών του *Botrytis cinerea*, ενός στέλεχους ευαίσθητου και ενός στελέχους ανθεκτικού στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο MBC σε ευαίσθητα στελέχη ειδών όπως ο *Botrytis cinerea* αποδίδεται σε μια μη εύκολα αναγνωρίσιμη τροποποίηση στη δομή της τουμπουλίνης. Η τροποποίηση αυτή στην αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης πιθανόν να επηρέαζε το φορτίο, τη διαμόρφωση του μορίου στο χώρο και πιθανόν την ηλεκτροφορητική κινητικότητα της πρωτεΐνης. Έτσι με ηλεκτροφόρηση διαλυτών πρωτεϊνών από το εκχύλισμα του μύκητα θα ήταν δυνατή η διαφοροποίηση των στελεχών ως προς την ανθεκτικότητα στο MBC. Η ηλεκτροφόρηση των διαλυτών πρωτεϊνών έδειξε ομοιότητα των προτύπων των πρωτεϊνών και για τα δύο στελέχη (Auger *et al.*, 1995). Η τροποποίηση της δομής στο μόριο της πρωτεΐνης είτε δεν προκαλεί αλλαγή στη στερεοδομή στο μόριο ή δεν προκαλεί αλλαγή στο φορτίο και επομένως αλλαγή στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα του μορίου ή η διαφορά αυτή δεν αποκαλύπτεται γιατί η καθαρότητα του εκχυλίσματος τουμπουλίνης δεν είναι ικανή να διακρίνει τόσο μικρές διαφορές.

##### Ισοένζυμα

Η ανάλυση ισοενζύμων είναι πολύ χρήσιμη τεχνική στο διαχωρισμό μορφολογικά όμοιων ή ποικιλόμορφων ταξινομικών ομάδων. Στους μύκητες υπάρχουν πάνω από 90 ένζυμα τα οποία μπορούν δυναμικά να εξετασθούν και να συγκριθούν. Παρόλα αυτά πολλά από τα ένζυμα μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμα σε ένα δεδομένο είδος. Τα ένζυμα που ανιχνεύονται μπορεί να είναι μονομορφικά, έχοντας πολύ μικρή παραλλακτικότητα ανάμεσα στα είδη ή υποείδη, ή μπορεί να είναι πολύ πολυμορφικά.



Εγχειρίδια για να δουλεύει κανείς με ισοένζυμα είναι διαθέσιμα και περιλαμβάνουν πολλές διαδικασίες χρώσης για πολλά ενζυμικά συστήματα. (Conkle *et al*, 1982; Micales *et al*, 1986). Μετά την ηλεκτροφόρηση των διαλυτών ενζύμων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ή σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης, προστίθεται ένα υπόστρωμα του ενζύμου συχνά με μία χρωμογόνο χρωστική (chromogenic dye). Το ένζυμο αντιδρά με το υπόστρωμα και τη χρωστική για να φτιάξει ένα χρωματικό σύμπλεγμα στη θέση όπου το ένζυμο έχει μετακινηθεί. Μικρές διαφορές στη αμινοξική σύνθεση μπορεί να αλλάξουν το φορτίο ή τη δομή της πρωτεΐνης, κάτι που αλλάζει την κινητικότητά της (Correll, 1993).

Γενετικές διαφορές ανάμεσα σε διάφορες ταξινομικές μονάδες μπορεί να υπολογιστούν με τον αριθμό των φαινοτυπικών διαφορών ανάμεσα στις θέσεις των αλληλομόρφων των ενζύμων. Δυστυχώς επειδή πολλοί μύκητες αναπαράγονται αγενώς, η γενετική βάση της ποικιλότητας των ισοενζύμων δεν αποδεικνύεται πάντα.

Η ανάλυση ισοενζύμων χρησιμοποιείται για να διαφοροποιήσει μορφολογικά όμοια ή παρόμοια είδη, ποικιλίες και ειδικές φόρμες πολλών μυκήτων. Παρ' όλα αυτά ο πολυμορφισμός των ισοενζύμων έχει παρατηρηθεί και μεταξύ απομονώσεων μέσα στα είδη, όπου υπήρχαν διακριτές ηλεκτροφορητικές υποομάδες.

Τα μειονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι ότι χρειάζεται πολύς χρόνος και προσπάθεια για την εγκατάσταση ενός συστήματος το οποίο επιτυγχάνει συνεχή αποτελέσματα. Επίσης η ανίχνευση και η κινητικότητα αυτών των ενζύμων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των συνθηκών κάτω από τις οποίες γίνεται η ανάπτυξη του οργανισμού, το pH, το ηλεκτρικό ρεύμα, τα συστήματα των ρυθμιστικών διαλυμάτων, η ηλικία και η δύναμη των διαλυμάτων χρώσης, και η προετοιμασία των δειγμάτων.

Πολλές απομονώσεις θα πρέπει να ελέγχονται σε πιλοτικά πειράματα για να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες. Μερικοί προτείνουν ότι ένα ελάχιστο 20 αλληλομόρφων χρειάζονται για μια ακριβή ερμηνεία της γενετικής σχέσης με τη χρησιμοποίηση ισοενζύμων. Το σχετικό κόστος της εγκατάστασης ενός συστήματος ανίχνευσης ισοενζύμων είναι μικρότερο από αυτό πολλών μοριακών τεχνικών και μπορεί να παρέχει χρήσιμα αριθμητικά δεδομένα. Τα ισοένζυμα μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν ως χρήσιμοι δείκτες σε Μενδελικές γενετικές μελέτες και μελέτες του παρασεξουαλικού κύκλου στους παθογόνους μυκήτων φυτών (Correll, 1993).

Τελευταία, πηκτώματα οξικής κυτταρίνης έχουν κατασκευαστεί για την ανάλυση ισοενζύμων. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα οξικής κυτταρίνης μπορεί να μειωθεί σημαντικά ο χρόνος προετοιμασίας σε σύγκριση με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Το κύριο στοιχείο αυτής της τεχνικής είναι ότι τα δείγματα εφαρμόζονται σε προκατασκευασμένες μεμβράνες οξικής κυτταρίνης, μειώνοντας το χρόνο προετοιμασίας που χρειάζεται για να φτιαχτεί ένα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ο χρόνος εφαρμογής της μεθόδου επίσης μειώνεται σημαντικά με τις μεμβράνες οξικής κυτταρίνης. Τα πηκτώματα της οξικής κυτταρίνης δεν έχουν εφαρμοστεί αρκετά για την ανάλυση ισοενζύμων αλλά μπορεί να αποδειχθούν πολύ χρήσιμα για μερικές εφαρμογές.

Το ένζυμο μεθυλεστεράση της πηκτίνης (PME), απομονώθηκε σε καθαρή μορφή από στελέχη του *Botrytis cinerea*. Παρά το γεγονός ότι άλλες πηκτινάσες του *B. cinerea* είναι πολυμορφικές, στο συγκεκριμένο ένζυμο δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα πρότυπα PME εικοσι πέντε στελεχών του μύκητα από διαφορετικές προελεύσεις (Reignault *et al.*, 1994).



**Βιβλιογραφία:** Arnheim *et al.* (1990), Auger *et al.* (1995), Brent (1991), Brown *et al.* (1987), Bruns *et al.* (1992), Correll (1993), Dekker & Georgopoulos (1982), DeScenzo & Harrington (1991), Devonshire (1990), FAO (1982,) Fox (1993), FRAC (1991), Gardes *et al.* (1991) Georgopoulos (1982), Goodwin *et al.* (1990), Goodwin (1990), Groves & Fox (1988), Hollomon (1991), Hewitt (1998), Kersies *et al.* (1997), Kistler (1991), Kurtzman (1985), Λεκανίδου(1992), Levis *et al.* (1997), Maniatis *et al.* (1982), Martin & Fox (1992), Miao (1990), Micales *et al.* (1986), Mills & Mc Cluskey (1990), ΟΕΔΒ (1999), Ogawa *et al.* (1979), Reader & Broda (1985), Reignault *et al.* (1994), Staub *et al.* (1979), Staub & Sozzi (1984), Taga & Murata (1994), Taylor & Natvig (1987), Thompson & Latorre (1999), Vallejo *et al.* (1996), Van Kan *et al.* (1993), Van der Vlugt- Bergmans *et al.* (1993), Williams *et al.* (1990).

# Μέρος Β' : Πειραματικό Μέρος

## 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Περισσότερες από 100 επιλεγμένες μονόσπορες απομονώσεις του *Botrytis cinerea* Pers., από διάφορες θερμοκηπιακές καλλιέργειες ελέγχθηκαν ως προς την ευαισθησία τους στα δικαρβοξιμιδικά, βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα καθώς και στο μίγμα cabendazim + diethofencarb και το dichlofluanid. Με βάση τον τρόπο βλάστησης των σπορίων και την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου σε υποστρώματα εμπλουτισμένα με διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων προέκυψαν οι ακόλουθες 7 αντιπροσωπευτικές κατηγορίες ανθεκτικών φαινοτύπων: Pcm HR: υψηλής ανθεκτικότητας στα φαινυλοκαρβαμιδικά, (βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη μυκηλίου σε 100  $\mu\text{gml}^{-1}$  diethofencarb), DicMRPcmHR: μετρίας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά και υψηλής στα φαινυλοκαρβαμιδικά (βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη μυκηλίου σε 3  $\mu\text{gml}^{-1}$  iprodione και 100  $\mu\text{gml}^{-1}$  diethofencarb, BenHR: υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά (βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη μυκηλίου σε 100  $\mu\text{gml}^{-1}$  carbendazim), BenHR PcmHR Ben+PcmHR: υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, στα φαινυλοκαρβαμιδικά και στο μίγμα τους (βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη μυκηλίου σε 100  $\mu\text{gml}^{-1}$  carbendazim, 100  $\mu\text{gml}^{-1}$  diethofencarb και 100  $\mu\text{gml}^{-1}$  carbendazim+diethofencarb), DicMR BenMR PcmHR Ben+PcmMR: μετρίας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά, στα βενζιμιδαζολικά και στο μίγμα και υψηλής ανθεκτικότητας στα φαινυλοκαρβαμιδικά (βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη μυκηλίου σε 3  $\mu\text{gml}^{-1}$  iprodione, 1  $\mu\text{gml}^{-1}$  carbendazim, 1  $\mu\text{gml}^{-1}$  carbendazim + diethofencarb και 100  $\mu\text{gml}^{-1}$  diethofencarb) και Dich MS DicMR BenMR PcmHR Ben+PcmMR: μειωμένης ευαισθησίας στο dichlofluanid, μετρίας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά, τα βενζιμιδαζολικά και το μίγμα και υψηλής ανθεκτικότητας στο diethofencarb (βλάστηση σπορίων σε 1  $\mu\text{gml}^{-1}$  dichlofluanid, βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη μυκηλίου σε 3  $\mu\text{gml}^{-1}$  iprodione, 1  $\mu\text{gml}^{-1}$  carbendazim 1  $\mu\text{gml}^{-1}$  carbendazim + diethofencarb και 100  $\mu\text{gml}^{-1}$  diethofencarb). Από την ανάλυση RAPDs τριών φαινοτύπων κάθε κατηγορίας και τη δημιουργία δένδρογραμμάτων με τη βοήθεια του λογισμικού Phylip 3.5, διαπιστώθηκε διαφοροποίηση των φαινοτύπων σε σαφώς καθορισμένες ομάδες. Μια ομάδα περιελάμβανε στελέχη υψηλής ανθεκτικότητας στο diethofencarb και το carbendazim και σχημάτιζε διχοτομικούς κλάδους με τους φαινότυπους Dic MR Ben MR PcmHR. Αυτές οι δύο ομάδες σχημάτιζαν διχοτομικούς κλάδους με τις απομονώσεις DichMS. Όλα τα παραπάνω στελέχη διαχωρίζονταν από την ομάδα με υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά που σχημάτιζε διχοτομικό κλάδο με την ομάδα DicMRBenHR. Τέλος το άγριο στέλεχος κατελάμβανε ξεχωριστό κλάδο με μεγάλη γενετική απόσταση από τις ομάδες των ανθεκτικών στελεχών.

Από τα δεδομένα της εργασίας αυτής προκύπτει αναμφίβολα η δυνατότητα ταυτοποίησης των διαφόρων ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα φαινοτύπων του *Botrytis cinerea* με τη χρήση εύχρηστων και ευαίσθητων βιοχημικών μεθόδων. Διαπιστώθηκε

ότι είναι δυνατό να διαχωριστούν αντίστοιχες ομάδες ανθεκτικότητας με ανάλυση RAPDs παρέχοντας τη δυνατότητα ταξινόμησης στελεχών του *Botrytis cinerea* στα μυκητοκτόνα με μοριακούς δείκτες ενώ ενισχύεται η άποψη της ύπαρξης γενετικής φύσεως ανθεκτικότητας και παρέχεται η δυνατότητα προσδιορισμού τυχόν γενετικής φύσεως συγγένεια μεταξύ των διαφόρων ανθεκτικών φαινοτύπων.

## 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο βοτρώτης αποτελεί μια από τις πιο κοινές ασθένειες των καλλιεργειών θερμοκηπίου που είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν με χημικά μέσα. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ιδιαίτερη ικανότητα του παθογόνου αιτίου της ασθένειας του μύκητα *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. να αναπτύσσει γρήγορα ανθεκτικά στελέχη στα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμησή του (Παπλωματάς και συν., 2000).

Πολλές έρευνες έγιναν για να καθορίσουν την παρουσία ανθεκτικότητας σε πληθυσμούς του *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα και στο μίγμα τους (carbendazim + diethofencarb), καθώς και στα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα και το dichlofluanid σε διάφορες καλλιέργειες. Το φθινόπωρο του 1970, καταγράφηκε για πρώτη φορά στην Ολλανδία ανθεκτικότητα στελεχών του *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά, μέσα σε θερμοκήπια κυκλάμιων πολύ σύντομα από την πρώτη εφαρμογή τους (Martin & Fox, 1992). Από το 1972 και μετά το ίδιο φαινόμενο αναφέρεται και στο αμπέλι. Σε αμπελώνες στη Νέα Ζηλανδία το 1985 βρέθηκαν στελέχη του *B. cinerea*, με μέση συχνότητα ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, 8- 40% (Beever *et al.*, 1989). Μετά την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά στη δεκαετία του '70, τα δικαρβοξιμιδικά, μυκητοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν κυρίως εναντίον της ασθένειας. Παρόλα αυτά, μέχρι το 1981, ανακαλύφθηκαν στελέχη του *Botrytis cinerea* που εμφάνιζαν μερική ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά iprodione, vinclozolin, procymidone και / ή υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά (benomyl, carbendazim, thiophanate methyl) σε διάφορες καλλιέργειες υπό κάλυψη και περιοχές της Ελλάδας (Pappas, 1982). Εξαιτίας της ανθεκτικότητας αυτής, μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος, όπως το dichlofluanid, εφαρμόζονταν σε μίγματα ή σε εναλλακτικούς ψεκασμούς με δικαρβοξιμιδικά την περίοδο 1983- 1989, πρακτική αποτελεσματική εναντίον της τεφράς σήψης (Pappas and Elena, 1992). Το dichlofluanid, εισήχθη το 1965, σαν προστατευτικό μυκητοκτόνο ευρέως φάσματος με δράση εναντίον παθογόνων συμπεριλαμβανομένου και του *Botrytis cinerea*. Υπάρχουν διάφορες αναφορές που υποστηρίζουν ότι στελέχη του *Botrytis cinerea* εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο dichlofluanid, αλλά το αν υφίσταται στην πραγματικότητα ανθεκτικότητα στο dichlofluanid έχει αμφισβητηθεί, εξαιτίας της μεγάλης ποικιλίας στην ευαισθησία που παρατηρείται στο μυκητοκτόνο μεταξύ των απομονώσεων αγρίου τύπου του παθογόνου (Pollastro *et al.*, 1996). Επιπλέον, οι Hunter *et al.* (1987) και Washington *et al.* (1992), βρήκαν ενδείξεις διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ του dichlofluanid και των δικαρβοξιμιδικών μυκητοκτόνων. Πρόσφατα, στην Ιταλία, στελέχη του *Botrytis cinerea* ανθεκτικά στο dichlofluanid ανιχνεύθηκαν σε χαμηλή συχνότητα σε πειραματικά τεμάχια σε θερμοκήπια ζέρμπερας ως αποτέλεσμα 7-8 ψεκασμών με dichlofluanid ή μίγματα μυκητοκτόνων που περιείχαν το χημικό ανάλογο tolyfluanid (Sansiviero *et al.*, 1995). Το χειμώνα του 1989, ένα μίγμα από carbendazim 25% δ.ο και diethofencarb 25%

δ.ο., με το εμπορικό όνομα Sumico εισήχθη στην αγορά αγροχημικών προϊόντων στην Ελλάδα αντικαθιστώντας τα περισσότερα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνταν πριν εναντίον του Βοτρύτη. Παρόλα αυτά, η αποτελεσματικότητα αυτού του μυκητοκτόνου μίγματος δεν θεωρήθηκε ποτέ ικανοποιητική από τους παραγωγούς στην Ελλάδα (Pappas, 1997). Στελέχη *B. cinerea* με πολλαπλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμιδικά και στο μίγμα carbendazim+diethofencarb εντοπίστηκαν σε θερμοκήπια όπου είχαν γίνει ψεκασμοί με το μίγμα. Στην Ισπανία το 1992 (Raposo *et al.*, 1994), το Ισραήλ το 1988 δύο χρόνια μετά τη χρήση του μίγματος σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες αγγουριού (Katan *et al.*, 1989) ενώ μετά από τέσσερα χρόνια εφαρμογής του carbendazim + diethofencarb σε αμπελώνες στη Γαλλία, η μέση συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών ήταν 43%. Η πλειοψηφία αυτών των στελεχών ήταν μερικώς ανθεκτικά στα δικαρβοξιμιδικά και τα βενζιμιδαζολικά και υψηλά ανθεκτικά στο diethofencarb. Στην Ελλάδα, τέτοια στελέχη εμφανίζονταν περιστασιακά αρχίζοντας από το 1994 σε καλλιέργειες θερμοκηπίου, στις περιοχές Τριφυλίας Μεσσηνίας στη Δυτική Πελοπόννησο και Μαραθώνα Αττικής (Λασκαρης και συν., 1994). Στελέχη του *Botrytis cinerea* υψηλά ανθεκτικά στις ανυλινοπυριμιδίνες έχουν ανιχνευθεί σε πολλούς Ευρωπαϊκούς αμπελώνες (Hilber and Hilber – Bodmer, 1998, ενώ απομονώσεις του *B. cinerea* που εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία στους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης έχουν βρεθεί σε διάφορες καλλιέργειες σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες και στο Ισραήλ (Elad, 1992; Stenmann and De Waard, 1995).

Η ανάπτυξη μεθόδων έγκαιρης επισήμανσης των ανθεκτικών στελεχών και μελέτης της γενετικής τους συγγένειας αναμφίβολα συμβάλλουν στον καλύτερο προγραμματισμό των χημικών επεμβάσεων για την αντιμετώπιση της ασθένειας στην πράξη (Παπλωματάς και συν., 2000). Γενικές αναφορές στις τεχνικές ελέγχου της ευαισθησίας των μυκήτων στα μυκητοκτόνα υπάρχουν διαθέσιμες στη βιβλιογραφία (Georgopoulos 1982 και Ogawa *et al.*, 1979) ενώ διεθνείς τυποποιημένες μέθοδοι σε ένα αριθμό παθογόνων έχουν δημοσιευθεί από διεθνείς οργανισμούς (FAO, 1982; FRAC, 1991). Η τεχνική που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ευαισθησίας εξαρτάται από τον σκοπό της καταγραφής και το συνδυασμό μύκητα / μυκητοκτόνου. Τα υποχρεωτικά παθογόνα δοκιμάζονται για την ευαισθησία τους στα μυκητοκτόνα συνήθως *in vivo* είτε πάνω σε επιμολυσμένα μικρά φυτά στα οποία το μυκητοκτόνο ψεκάζεται ή εφαρμόζεται από το έδαφος ή σε δίσκους από φύλλα ή σε αποκομμένα τμήματα του φυτού που επιπλέουν σε διαλύματα του μυκητοκτόνου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα προαιρετικά παθογόνα δοκιμάζονται κυρίως *in vitro*, γενικά μετρώντας την ανάπτυξή τους σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου (Brent, 1991). Σαν μολύσματα έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο τα σπόρια όσο και το μυκήλιο. Γενικά δίνουν παρόμοια αποτελέσματα. Απλές, γρήγορες τεχνικές, όπως οι δοκιμές βλάστησης σπορίων σε άγαρ είναι ιδανικές σε πολλές περιπτώσεις μυκήτων που παράγουν ικανοποιητικό αριθμό σπορίων (π.χ. *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* ή *Monilinia* spp.), όπου μεγάλος αριθμός σπορίων μπορεί να αναλυθεί μέσα σε λίγες μέρες (Staub & Sozzi, 1984). Με ορισμένα εκλεκτικά μυκητοκτόνα, όπως τα βενζιμιδαζολικά, τα καρβοξαμιδικά και τις ακιλαλανίνες υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην ευαισθησία μεταξύ στελεχών αγρίου τύπου και ανθεκτικών και η ανίχνευση της ανθεκτικότητας είναι εύκολη, ωστόσο με ορισμένα άλλα μυκητοκτόνα π.χ. dodine και μέλη της ομάδας των αρωματικών υδρογονανθράκων, οι διαφορές μπορεί να είναι μικρές και δύσκολο να προσδιορισθούν και ακόμη και η ανίχνευση της ανθεκτικότητας χρειάζεται προσεκτικές δοκιμές (FAO, Method No 25, 1982). Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας του μύκητα στο εφαρμοζόμενο μυκητοκτόνο χρησιμοποιούνται κυρίως η ελάχιστη



παρεμποδιστική συγκέντρωση στη βλάστηση των σπορίων ή την ανάπτυξη του μύκητα (τιμές MIC) και η τιμή ED<sub>50</sub>, η συγκέντρωση δηλαδή του μυκητοκτόνου που προκαλεί 50 % παρεμπόδιση στην μυκηλιακή ανάπτυξη ή τη βλάστηση σπορίων του μύκητα σε σχέση με το μάρτυρα. Η τιμή ED<sub>50</sub> είναι ο πιο κοινός τύπος καταγραφής της ευαισθησίας του μύκητα στο μυκητοκτόνο και προτείνεται ως ο καταλληλότερος να εφαρμόζεται όπου αυτό είναι δυνατό (Brent, 1991).

Εκτός από τις συμβατικές τεχνικές της Φυτοπαθολογίας για την ανίχνευση της ευαισθησίας των μυκήτων στα μυκητοκτόνα, τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια ανάπτυξης και εφαρμογής σύγχρονων τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας όπως οι διαγνωστικές τεχνικές που βασίζονται στην ανοσολογία και την τεχνολογία του DNA που θα ανιχνεύουν άμεσα την ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα. Οι Groves & Fox (1988), χρησιμοποιώντας τις διαγνωστικές τεχνικές της ανοσολογίας προσπάθησαν να αναπτύξουν μια ανοσολογική μέθοδο για τη γρήγορη ανίχνευση σπορίων του *Botrytis cinerea* ανθεκτικών στο MBC που βρίσκονται σε χαμηλή συχνότητα μέσα στον πληθυσμό του παθογόνου, χρησιμοποιώντας αντισώματα που θα ανιχνεύουν την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη β-τουμπουλίνη που προκαλεί ανθεκτικότητα στο MBC. Οι Martin και Fox (1992), εξέτασαν τη δυνατότητα διάγνωσης της σημειακής μεταλλαγής στο γονίδιο της β- υπομονάδας της τουμπουλίνης που προκαλεί ανθεκτικότητα στο MBC με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές ειδικούς για τη γονιδιακή θέση που έχει συμβεί η μεταλλαγή.

Διάφορες μοριακές τεχνικές έχουν δείξει γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των στελεχών του *Botrytis cinerea*. Οι Levis *et al.*, (1997) απομόνωσαν μια τελομερική αλληλουχία από τον *Botrytis cinerea* η οποία φαίνεται να είναι ένα σημαντικό εργαλείο στη μελέτη του πολυμορφισμού των πληθυσμών αυτού του μύκητα. Οι Van Kan *et al.*, (1993) και οι Vallejo *et al.*, (1996) διαπίστωσαν έντο- νο χρωμοσωμικό πολυμορφισμό σε στελέχη του *Botrytis cinerea*. Επίσης η ανάλυση RAPD έχει δώσει πληροφορίες για την ποικιλότητα στην παθογένεια (Kersies *et al.*, 1997) και την μεταβίβαση γενετικών χαρακτήρων (Van der Vlugt *et al.*, 1993) μεταξύ στελεχών του *Botrytis cinerea*, ενώ χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων δεικτών οι οποίοι θα διακρίνουν τον *Botrytis cinerea* από άλλους επιφυτικούς μύκητες (Thompson & Lattore, 1999). Ανάλυση RFLP έχει επίσης αναδείξει σημαντική γενετική ποικιλότητα στον *Botrytis cinerea* (Diolez *et al.*, 1995; Giraud *et al.*, 1997).

Στην παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια προσδιορισμού της ανθεκτικότητας και γενετικής συγγένειας επιλεγμένων στελεχών του *Botrytis cinerea* που παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία στα βενζιμιδαζολικά, φαινυλοκαρβαμιδικά, δικαρβοξυμιδικά μυκητοκτόνα και το dichlofluanid με την εφαρμογή εύχρηστων και ευαίσθητων βιοχημικών τεχνικών καθώς και με ανάλυση RAPD για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων δεικτών που θα μπορούσαν να διαφοροποιήσουν στελέχη του *Botrytis cinerea* ως προς την ευαισθησία τους στα μυκητοκτόνα.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### Υπόστρωμα ανάπτυξης του μύκητα

Στα πειράματα που έγιναν, όλες οι απομονώσεις διατηρήθηκαν και αναλύθηκαν σε υπόστρωμα ανάπτυξης, malt extract agar (MEA, Oxoid, UK). Για την παρασκευή του, διαλύθηκαν 40 gr σκόνης MEA σε 1 lt δις - απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα θερμάνθηκε για να γίνει πλήρης διάλυση της σκόνης, τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες (περίπου 10 ml ανά σωλήνα) και κάθε σωλήνας τοποθετήθηκε σε κεκλιμένο επίπεδο για να δημιουργηθεί κλίση agar. Μέρος του υλικού τοποθετήθηκε σε ειδικές φιάλες των 100 ml με πεπλατυσμένα τοιχώματα (medicine bottles). Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν από 10 ml δις-απεσταγμένο νερό που χρειάστηκαν στη διάρκεια του πειράματος. Όλα τα υλικά αποστειρώθηκαν σε κλίβανο στους 121° C για 15 min.

#### Απομονώσεις του *Botrytis cinerea*

Από 100 επιλεγμένες απομονώσεις αγρού του *Botrytis cinerea*, δημιουργήθηκαν 20 μονόσπορες καλλιέργειες.

Από τις μητρικές καλλιέργειες από τις οποίες αποκτήθηκαν οι μονόσπορες καλλιέργειες, οι A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, E<sub>6</sub>, F<sub>2</sub>, αποκτήθηκαν από καρπό τομάτας, η D<sub>1</sub> από καρπό αγγουριού, οι E<sub>1</sub>, E<sub>5</sub>, από καρπό μελιτζάνας, οι F<sub>3</sub> και F<sub>5</sub> από φύλλα Καλανγχόας, η G<sub>1</sub> από σταφύλι, η G<sub>2</sub> απομονώθηκε από δοκιμή *in vitro* σε πέταλα τριανταφυλλιάς σε τρυβλίο που περιείχε μυκητοκτόνο Sumico (carbendazim + diethofencarb) 10 ppm, η B<sub>2</sub> αποκτήθηκε από σπόρια που συλλέχθηκαν από τον αέρα σε τρυβλίο που περιείχε iprodione σε συγκέντρωση 10 ppm και εκλεκτικό υλικό Kerssies, και οι D<sub>2</sub> και D<sub>3</sub> απομονώθηκαν από σπόρια που συλλέχθηκαν από τον αέρα σε τρυβλίο που περιείχε το μυκητοκτόνο Sumico σε συγκέντρωση 1ppm. (Πίνακας 2.2). Οι απομονώσεις διατηρήθηκαν σε σωλήνες με MEA στους 4 °C. Υποκαλλιέργειες γίνονταν με τη μεταφορά μυκηλιακών δίσκων σε τρυβλία με MEA για να αποκτηθούν μολύσματα για τη μέτρηση της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα.

Για τη δημιουργία μονόσπορων καλλιεργειών, ετοιμάσθηκαν αρχικά τρυβλία Petri στα οποία είχε χυθεί λυωμένο άγαρ (περίπου 10 ml) και αφέθηκε να στερεοποιηθεί. Σε καλλιέργειες 7 ημερών που επωάσθηκαν στους 20°C, σε σκοτάδι, μεταφέρθηκαν 10 ml αποστειρωμένο νερό. Ο σωλήνας αναταράχθηκε σε αναδευτήρα, για να αποκολληθούν τα σπόρια από το μυκήλιο. Σε δοκιμαστικό σωλήνα πάρθηκε καθαρό αιώρημα σπορίων. 1ml από το καθαρό αιώρημα των σπορίων μεταφέρθηκε σε τρυβλίο Petri που περιείχε άγαρ. Τα τρυβλία επωάσθηκαν για 18 ώρες στους 15 °C. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η βλάστηση των σπορίων σε μικροσκόπιο διερχόμενου φωτισμού σε μεγέθυνση 10x. Σημειώθηκαν οι θέσεις στις

οποίες υπήρχε ένα βλαστημένο σπόριο σε κάθε οπτικό πεδίο. Στις θέσεις αυτές κόπηκαν δίσκοι άγαρ με φελोटρυπητή (cork borer) και κάθε δισκίο άγαρ που περιείχε το βλαστημένο σπόριο μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα με MEA. Οι καλλιέργειες επώασθηκαν στους 20°C.

### Μυκητοκτόνα

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω μυκητοκτόνα: dichlofluanid (Euparen 50% WP, Bayer, Germany), iprodione (Rovral 50% WP, Rhone – Poulenc, France), carbendazim (Derozal 50% WP, Hoechst, Germany), diethofencarb (Diethofencarb 25% WP, Sumitomo Chemical Co., Japan), carbendazim + diethofencarb (Sumico 25% + 25% WP, Hoechst, Germany).

Για την απόκτηση των επιθυμητών συγκεντρώσεων μυκητοκτόνου στο μέσο ανάπτυξης του μύκητα (μg δραστικής ουσίας ανά ml μέσου ανάπτυξης), κατάλληλες ποσότητες από πυκνά διαλύματα (1000 μg ml<sup>-1</sup>) carbendazim, diethofencarb, carbendazim + diethofencarb σε διαλύτη dimethyl sulfoxide (DMSO) και dichlofluanid και iprodione σε διαλύτη ακετόνη, προστέθηκαν σε αποστειρωμένο μέσο ανάπτυξης MEA σε ειδικά φιαλίδια με πεπλατυσμένα πλευρά (medicine bottles) σε θερμοκρασία περίπου 45 °C. Η τελική συγκέντρωση του dimethyl sulfoxide (DMSO) ή της ακετόνης στο υλικό δεν ξεπερνούσε το 1%.

Τα πυκνά διαλύματα των μυκητοκτόνων παρασκευάστηκαν ως εξής:  
 carbendazim 1000 μg ml<sup>-1</sup>: Διάλυση 200 mg carbendazim σε 100 ml DMSO.  
 diethofencarb 1000 μg ml<sup>-1</sup>: Διάλυση 400 mg diethofencarb σε 100 ml DMSO.  
 carbendazim + diethofencarb 1000 μg ml<sup>-1</sup>: Διάλυση 400 mg σε 100 ml DMSO  
 dichlofluanid 1000 μg ml<sup>-1</sup>: Διάλυση 200 mg dichlofluanid σε 100 ml ακετόνη  
 iprodione 1000 μg ml<sup>-1</sup>: Διάλυση 200 mg iprodione σε 100 ml ακετόνη.  
 carbendazim 100 μg ml<sup>-1</sup>: Διάλυση 1 ml carbendazim 1000 μg ml<sup>-1</sup> σε 9 ml DMSO.  
 diethofencarb 1000 μg ml<sup>-1</sup>: Διάλυση 1 ml diethofencarb 1000 μg ml<sup>-1</sup> σε 9 ml DMSO.  
 carbendazim + diethofencarb 100 μg ml<sup>-1</sup>: Διάλυση 1 ml διαλύματος 1000 μg ml<sup>-1</sup> σε 9 ml DMSO  
 dichlofluanid 100 μg ml<sup>-1</sup>: Διάλυση 1 ml dichlofluanid 1000 μg ml<sup>-1</sup> σε 9 ml ακετόνη  
 iprodione 100 μg ml<sup>-1</sup>: Διάλυση 1 ml iprodione 1000 μg ml<sup>-1</sup> σε 9 ml ακετόνη.  
 Τα εμπλουτισμένα με μυκητοκτόνα σε διάφορες συγκεντρώσεις θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση ανθεκτικότητας και για τον υπολογισμό των τιμών MIC, παρασκευάστηκαν προσθέτοντας στις ειδικές φιάλες των 100 ml με πεπλατυσμένα τοιχώματα (medicine bottles) ρευστοποιημένου (μετά από θέρμανση) υποστρώματος MEA, τις ακόλουθες ποσότητες από τις αρχικές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων:

| Μυκητοκτονα                        | Τελική συγκέντρωση      | Από το πυκνό διάλυμα     | ποσότητα | Σε ποσότητα υποστρώματος (ml) |
|------------------------------------|-------------------------|--------------------------|----------|-------------------------------|
| <b>Dichlofluanid</b>               | 1 μg ml <sup>-1</sup>   | 100 μg ml <sup>-1</sup>  | 1 ml     | 100                           |
|                                    | 3 μg ml <sup>-1</sup>   | 100 μg ml <sup>-1</sup>  | 3 ml     | 100                           |
| <b>Iprodione</b>                   | 3 μg ml <sup>-1</sup>   | 100 μg ml <sup>-1</sup>  | 3 ml     | 100                           |
|                                    | 10 μg ml <sup>-1</sup>  | 1000 μg ml <sup>-1</sup> | 1 ml     | 100                           |
| <b>Carbendazim</b>                 | 1 μg ml <sup>-1</sup>   | 100 μg ml <sup>-1</sup>  | 1 ml     | 100                           |
|                                    | 100 μg ml <sup>-1</sup> |                          | 20 mg    | 100                           |
| <b>Diethofencarb</b>               | 1 μg ml <sup>-1</sup>   | 100 μg ml <sup>-1</sup>  | 1 ml     | 100                           |
|                                    | 100 μg ml <sup>-1</sup> |                          | 40 mg    | 100                           |
| <b>Carbendazim + diethofencarb</b> | 1 μg ml <sup>-1</sup>   | 100 μg ml <sup>-1</sup>  | 1 ml     | 100                           |
|                                    | 100 μg ml <sup>-1</sup> |                          | 40 mg    | 100 ml                        |

Στη συνέχεια το υλικό χύθηκε σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm (10 ml σε κάθε τρυβλίο) και τρυβλία Petri διαμέτρου 5.5 cm και αφέθηκε να στερεοποιηθεί.

## ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

Για την ανίχνευση ανθεκτικότητας των στελεχών του *Botrytis cinerea* στα μυκητοκτόνα έγιναν προκαταρκτικές δοκιμές ανάπτυξης του μύκητα, σε υλικό ανάπτυξης εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνα. Για κάθε μυκητοκτόνο χρησιμοποιήθηκαν δύο διακριτές συγκεντρώσεις, μια λίγο πάνω από το επίπεδο της ED<sub>50</sub> των ευαίσθητων στελεχών και μία συγκέντρωση παρεμποδιστική της βλάστησης των σπορίων ή της ανάπτυξης του μυκηλίου. Έτσι οι απομονώσεις δοκιμάστηκαν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με iprodione σε συγκεντρώσεις 3 και 10 mg l<sup>-1</sup>, carbendazim 1 και 100 μg ml<sup>-1</sup>, diethofencarb 1 και 100 μg ml<sup>-1</sup>, dichlofluanid 1 και 3 μg ml<sup>-1</sup> και carbendazim + diethofencarb 1 και 100 μg ml<sup>-1</sup>. Τρυβλία χωρίς μυκητοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες.

## ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

### Έλεγχος βλάστησης σπορίων

Η παρεμπόδιση της βλάστησης των σπορίων ή της επιμήκυνσης και διαμόρφωσης του βλαστικού σωλήνα που προκαλούν τα μυκητοκτόνα εκτιμήθηκε με τη μέτρηση της ελάχιστης συγκέντρωσης που προκαλεί παρεμπόδιση στη βλάστηση των σπορίων ή την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα σε ΜΕΑ σε τρυβλία που περιέχουν ένα εύρος από συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων σε τρεις επαναλήψεις.

Οι συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 3 και 10 μg ml<sup>-1</sup> iprodione, 1 και 100 μg ml<sup>-1</sup> carbendazim, 1 και 100 μg ml<sup>-1</sup> diethofencarb, 1 και 3 μg ml<sup>-1</sup> dichlofluanid και 1 και 100 μg ml<sup>-1</sup> carbendazim + diethofencarb. Τρυβλία χωρίς μυκητοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες.

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας των απομονώσεων του *B. cinerea* στα μυκητοκτόνα, ανάλογα με τον τρόπο βλάστησης των σπορίων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της σημειακής μόλυνσης (Point inoculation method, κατά Λάσκαρη και συνεργάτες 1994). Στα τρυβλία σημειώθηκαν στην κάτω επιφάνεια και περιφερειακά 15 ισαπέχοντα σημεία, τα οποία και αριθμήθηκαν. Πάνω από κάθε αριθμημένο σημείο, τοποθετήθηκε μόλυσμα σπορίων τόσων, όσων μπορεί να μεταφέρει η άκρη της βελόνας, με μια απλή επαφή στις καρποφορίες του μύκητα. Τα τρυβλία επώασθησαν στο σκοτάδι στους 22°C. Μετά από 20 –24 ώρες επώασσης, τα τρυβλία ελέγχθηκαν σε μικροσκόπιο διερχόμενου φωτισμού σε μεγέθυνση x10 για να προσδιοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση που παρεμποδίζει τη βλάστηση των σπορίων ή την τυπική διαμόρφωση του βλαστικού σωλήνα και να προσδιοριστούν έτσι οι τιμές MIC (Minimum inhibitory concentration).

### Δοκιμές στο μυκήλιο

Η παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης που προκαλούσε το μυκητοκτόνο στις απομονώσεις του *B. cinerea*, υπολογίστηκε μετρώντας την ακτινωτή ανάπτυξη του μύκητα, σε τρυβλία με ΜΕΑ που περιείχαν ένα εύρος από συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων σε 3 επαναλήψεις.



Οι συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων στο υλικό ανάπτυξης του μύκητα ήταν: Dichlofluanid: 1, 2.5, 5 και 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Iprodione: 0.05, 0.5, 1, και 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Carbendazim: 0.05, 0.1, 1, 5, 10 και 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Diethofencarb: 0.05, 0.1, 1, 5, 10 και 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Carbendazim + diethofencarb: 0.05, 0.1, 1, 5, 10, και 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Τρυβλία χωρίς μυκητοκτόνο χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες.

Για την παρασκευή των εμπλουτισμένων με μυκητοκτόνα θρεπτικών υποστρώματων προστέθηκαν στις ειδικές φιάλες των 100 ml με πεπλατυσμένα τοιχώματα (medicine bottles) ρευστοποιημένου (μετά από θέρμανση) υποστρώματος ΜΕΑ, οι ακόλουθες ποσότητες από τις αρχικές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων:

| Μυκητοκτονα                        | Τελική Συγκέντρωση ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Από το πυκνό διάλυμα ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | ποσότητα | Σε ποσότητα υποστρώματος (ml) |
|------------------------------------|--|--|----------|-------------------------------|
| <b>Dichlofluanid</b>               | 1  | 100  | 1 ml     | 100                           |
|                                    | 2.5  | 100  | 2.5 ml   | 100                           |
|                                    | 5  | 1000   | 0.5 ml   | 100                           |
|                                    | 10   | 1000   | 1 ml     | 100                           |
| <b>Iprodione</b>                   | 0.05   | 10   | 0.5 ml   | 100                           |
|                                    | 0.5  | 100  | 0.5 ml   | 100                           |
|                                    | 1  | 100  | 1 ml     | 100                           |
|                                    | 10   | 1000   | 1 ml     | 100                           |
| <b>Carbendazim</b>                 | 0.05   | 10   | 0.5 ml   | 100                           |
|                                    | 0.1  | 10   | 1 ml     | 100                           |
|                                    | 1  | 100  | 1 ml     | 100                           |
|                                    | 5  | 1000   | 0.5 ml   | 100                           |
|                                    | 10   | 1000   | 1 ml     | 100                           |
|                                    | 100  |  | 20 mg    | 100                           |
| <b>Diethofencarb</b>               | 0.05   | 10   | 0.5 ml   | 100                           |
|                                    | 0.1  | 10   | 0.1 ml   | 100                           |
|                                    | 1  | 100  | 1 ml     | 100                           |
|                                    | 5  | 1000   | 0.5 ml   | 100                           |
|                                    | 10   | 1000   | 1 ml     | 100                           |
|                                    | 100  |  | 40 mg    | 100                           |
| <b>Carbendazim + diethofencarb</b> | 0.05   | 10   | 0.5 ml   | 100                           |
|                                    | 0.1  | 10   | 1 ml     | 100                           |
|                                    | 1  | 100  | 1 ml     | 100                           |
|                                    | 5  | 1000   | 0.5      | 100                           |
|                                    | 10   | 1000   | 1 ml     | 100                           |
|                                    | 100 $\text{mg l}^{-1}$                       |  | 40 mg    | 100                           |

Στη συνέχεια το υλικό χύθηκε σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm (10 ml σε κάθε τρυβλίο) και τρυβλία Petri διαμέτρου 5.5 cm και αφέθηκε να στερεοποιηθεί.

Σαν μολύσματα χρησιμοποιήθηκαν μυκηλιακοί δίσκοι (διαμέτρου 5mm) που πάρθηκαν από την περιφέρεια καλλιεργειών ηλικίας 3 ημερών, για τον εμβολιασμό τρυβλίων με ΜΕΑ με τις ανάλογες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου. Τα τρυβλία επώασθησαν για 3 μέρες στους 22 °C και συγκρίθηκαν με τους μάρτυρες.

Οι τιμές ED<sub>50</sub> υπολογίστηκαν από το διάγραμμα του μέσου ποσοστού παρεμπόδισης της μυκηλιακής ανάπτυξης σε σχέση με το μάρτυρα σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου προς το λογάριθμο των συγκεντρώσεων.

### Ανάπτυξη σε υγρό θρεπτικό υλικό

Για την απόκτηση ικανής ποσότητας μυκηλίου, από την οποία θα λαμβάνονταν το DNA για τη γενετική ανάλυση RAPD, οι απομονώσεις αναπτύχθηκαν σε 50 ml θρεπτικό μέσο Potato-dextrose (100 gr πατάτας και 10 gr δεξτροζης σε 1 l νερό) σε φιάλες Erlenmeyer στους 22° C για 7 μέρες υπό ανάδευση στις 170 περιστροφές το λεπτό.

### Λυοφυλίωση

Για τη συλλογή του μυκηλίου, το κάθε δείγμα ξεπλύθηκε 2 φορές με αποσταγμένο νερό με φυγοκέντρηση στις 3200 στροφές για 3min σε σωλήνες των 10 ml σε φυγόκεντρο Hermle-Z320.

Το μυκήλιο που συλλέχθηκε καταψύχθηκε αμέσως στους -20 °C όπου και παρέμεινε για όλη τη νύχτα και στη συνέχεια έγινε λυοφυλίωση στους -51 °C υπό κενό για 24ώρες σε συσκευή λυοφυλίωσης Virtis, Sentry,CA.

## ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA

Για κάθε απομόνωση, 100 mg λυοφυλιωμένου μυκηλίου τοποθετήθηκαν σε ιγδίο πορσελάνης μαζί με μικρή ποσότητα χαλαζιακής άμμου και λυοτριβήθηκαν μέχρι πλήρους κονιορτοποίησης. Προστέθηκαν 2 ml lysis buffer (0.5M NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM EDTA, 1% SDS). Αναμίχθηκαν καλά και προστέθηκαν 1.5 ml φαινόλης. Αναμίχθηκαν καλά και προστέθηκαν 1.5 ml chloroform : iso amyl alcohol (24:1) Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε γυάλινο σωλήνα Corex των 15 ml. Φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 rpm, στους 4 °C για 60 min. Μεταφέρθηκε προσεκτικά η επάνω φάση σε καινούργιο σωλήνα Corex. Επαναλάβουμε με ίσο όγκο φαινόλη – χλωροφόρμιο, ανάδευση, φυγοκέντρηση 10 min, και πάρθηκε η επάνω φάση σε καθαρό σωλήνα Corex.. Προστέθηκε 25 μl RNAase A (10mg/ml) και το διάλυμα αφέθηκε στους 37 °C για 15- 30 min. Προστέθηκε ίσος όγκος – περίπου 3 ml – chloroform: amyl alcohol (24:1), ανακατεύθηκε καλά και φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 rpm, στους 4 °C για 10 min. Μεταφέρθηκε η επάνω φάση σε καινούργιο σωλήνα Corex.

Καθίζηση του DNA έγινε με 0.54 όγκους ισοπροπανόλης (θερμοκρασία δωματίου) με ελαφρά ανάδευση. Το δείγμα αφέθηκε όλη τη νύχτα στο ψυγείο.

Την επόμενη μέρα φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 rpm στους 4 °C, για 10 min. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, τα χείλη του σωλήνα ακούμπησαν σε καθαρό χαρτί και προστέθηκαν 2 ml 70% αιθυλικής αλκοόλης. Έγινε φυγοκέντρηση στις 10000 rpm, στους 4 °C, για 5 min, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό και οι σωλήνες στέγνωσαν στους 37 °C για 15-20 min. Το δείγμα αναδιαλύθηκε σε ανάλογη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος TE (συνήθως 100 μl). Οι σωλήνες διατηρήθηκαν σε πάγο κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των δειγμάτων.

## ΑΝΑΛΥΣΗ RAPD

Οι εκκινητές (δεκαμερή oligονουκλεοτίδια) που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR μας χορηγήθηκαν από το Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Κηφισιά,

Αθήνα) ενώ είχαν αγοραστεί από το University of British Columbia του Καναδά, σειρά 1- 100.

Οι αντιδράσεις πολλαπλασιασμού του DNA, έγιναν σε μίγμα αντίδρασης τελικού όγκου 25 μl που περιείχαν 50 – 150 ng γονιδιακού DNA, 2.5 μl από 10x ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (500 mM KCl, 100 mM Tris- HCl [pH 9.0] και 1% Triton, (Promega Corp., Madison, WI), 1.25 μl dNTPs (καθένα από 2 mM), 0.4 μl *Taq* DNA πολυμεράση (5U/μl, Promega Corp), 2.0 μl MgCl (25mM), 1.0 μl (30 μM) εκκινητή και 17.85 μl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού. Τα δείγματα υπερκαλύφθηκαν με αποστειρωμένο παραφινέλαιο.

Οι αντιδράσεις στους μάρτυρες περιείχαν αποστειρωμένο νερό αντί για DNA.

Οι αντιδράσεις αντιγραφής έγιναν σε προγραμματιζόμενη συσκευή PCR (Eppendorf, Mastercycler gradient) για 45 κύκλους με 1 min στους 94° C (αποδιάταξη), 30s στους 35° C (πρόσδεση εκκινητών), και 1.5 min στους 72° C (επιμήκυνση), με τελική επιμήκυνση στους 72° C για 4 min.

### Ηλεκτροφόρηση DNA

Ο διαχωρισμός των προϊόντων αντιγραφής του DNA ανάλογα με το μέγεθος τους, έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.7 % (β/ο) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTBE.

Μία κλίμακα DNA με βήμα 1000 ζεύγη βάσεων (1 kb) (Life Technologies, Gaithersburg, MD) χρησιμοποιήθηκε σαν πρότυπο μεγέθους.

Για να γίνει ορατό το DNA, στα πηκτώματα έγινε χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (0.1mg/l) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκαν με Polaroid Ds-34 με φιλμ 667 (Polaroid Corp., Cambridge, MA).

Όλες οι αναλύσεις RAPD επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές. Τα κομμάτια του DNA ονομάστηκαν από τον εκκινητή με τον οποίο αντιγράφηκαν και το μέγεθός τους. Για παράδειγμα, ο δείκτης #82<sub>0.8</sub>, είναι ένας δείκτης RAPD 0.8 kb που αντιγράφηκε με τον εκκινητή #82.

### Γενετικός χαρακτηρισμός απομονώσεων του *B. cinerea*

Η γενετική ποικιλότητα μεταξύ απομονώσεων του *Botrytis cinerea* μελετήθηκε με ανάλυση RAPD, χρησιμοποιώντας 7 διαφορετικούς δεκαμερείς εκκινητές (# 70, # 71, # 73, # 74, # 77, # 82 και # 84) που προέρχονταν από το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Αναλύθηκαν 7 απομονώσεις, οι οποίες είχαν προηγουμένως ταξινομηθεί ως προς την ευαισθησία τους στα μυκητοκτόνα. Οι απομονώσεις που ελέγχθηκαν ήταν: τρεις απομονώσεις από τομάτα (Βόλος '97, Βόλος '94 και Τυμπάκι '93), οι οποίες ταξινομήθηκαν στους φαινότυπος αγρίου τύπου (1a), υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και ευαισθησία στα φαινυλοκαρβαμιδικά (6a) και ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά και υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά (8a). Μία απομόνωση (7a) αποκτήθηκε από Αγγούρι (Ισραήλ '89) ενώ μια άλλη (7b), αποκτήθηκε από αεροπαγίδα σε τρυβλίο που περιείχε Sumico 1ppm (Τυμπάκι '96) (Πίνακας 2.6). Και οι δύο απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν υψηλά ανθεκτικές στα βενζιμιδαζολικά, υψηλά ανθεκτικές στα φαινυλοκαρβαμιδικά και υψηλά ανθεκτικές στο μίγμα carbendazim +diethofencarb. Μία απομόνωση (9a) ήταν ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά και τα βενζιμιδαζολικά και υψηλής στα φαινυλοκαρβαμιδικά, ενώ μια τελευταία (10a) που αποκτήθηκε από τριαντάφυλλα, ήταν μειωμένης ευαισθησίας στο dichlofluanid. Οι φαινότυποι αυτοί,



καλύπτουν ένα φάσμα φαινοτύπων που καταγράφονται στους πληθυσμούς του *B.cinerea*, στα προγράμματα παρακολούθησης της ευαισθησίας του μύκητα στα μυκητοκτόνα. Με την ανάλυση RAPD, αναζητήθηκαν μοριακοί δείκτες ικανοί να διακρίνουν τα στελέχη ως προς την ανθεκτικότητά τους στα μυκητοκτόνα.

### Στατιστική επεξεργασία

Για τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των στελεχών που βασίζονται στο βαθμό πολυμορφισμού των προϊόντων αντιγραφής του DNA, τα δεδομένα αναλύθηκαν και σημειώθηκαν με τις τιμές 0 και 1 για απουσία ή παρουσία αντίστοιχα των τμημάτων DNA τα οποία εμφανίζονταν διαρκώς σε κανονικές συνθήκες.

Οι υπολογισμοί των γενετικών αποστάσεων έγιναν με δύο τρόπους α) με βάση το συντελεστή ομοιότητας του Dice με τη χρήση του υπολογιστικού πακέτου ομαδοποίησης RAPDISTANCE και κατασκευάστηκε ένα φαινόγραμμα με βάση τους συντελεστές ομοιότητας με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Phylip και β) με το υπολογιστικό πρόγραμμα Mega με χρήση τιμών bootstrap.



## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ *B. cinerea* ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

Μετά από επώαση 24 h σε σκοτάδι και σε θερμοκρασία 20 °C τα τρυβλία παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση x10 για την αναζήτηση σπορίων που τυχόν έχουν βλαστήσει και του τρόπου με τον οποίο έχουν βλαστήσει.

Για τον προσδιορισμό του τρόπου ανάπτυξης και διαμόρφωσης του βλαστικού σωλήνα του σπορίου χρησιμοποιήθηκε ο Πίνακας 2.1. Τα αποτελέσματα της ανίχνευσης ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα φαίνονται στον Πίνακα 2.2 .

### ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ, ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟΝ ΤΡΟΠΟ ΒΛΑΣΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΟΡΙΩΝ

Ανάλογα με τον τρόπο βλάστησης των σπορίων σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις σε δικαρβοξυμιδικά (Dic), βενζιμιδαζολικά (Ben), φαινυλοκαρβαμιδικά (Pcm), dichlofluanid (Dich) και στο μίγμα carbendazim + diethofencarb (Ben + Pcm), οι απομονώσεις ταξινομήθηκαν στους φαινοτύπους αγρίου τύπου (W), μετρίως ανθεκτικές (MR) και υψηλά ανθεκτικές (HR), σύμφωνα με τη μέθοδο ελέγχου ευαισθησίας στελεχών του *B.cinerea* στα μυκητοκτόνα ανάλογα με τον τρόπο βλάστησης των σπορίων (Πίνακας 2.1).

#### Στελέχη αγρίου τύπου

Τα στελέχη αγρίου τύπου (W), εμφάνιζαν ταυτόχρονα, ανθεκτικότητα στο diethofencarb (καμία επίδραση στη βλάστηση σπορίων σε μέσο που περιείχε 100 µg ml<sup>-1</sup> diethofencarb) και ευαισθησία στο carbendazim και το μίγμα carbendazim + diethofencarb (παραμορφώσεις βλαστικού σωλήνα). Επίσης εμφάνιζαν ευαισθησία στο iprodione το οποίο μπορούσε να παρεμποδίσει τη βλάστηση των σπορίων.

#### Ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα

Ανάλογα με την *in vitro* ευαισθησία τους στο carbendazim, οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες (Ben S), υψηλά ανθεκτικές (Ben HR) και μετρίως ανθεκτικές (Ben MR).

Οι βλαστικοί σωλήνες που δημιουργούνταν από στελέχη Ben S τα οποία είχαν μεταχειριστεί με carbendazim και από τα στελέχη BenHR που είχαν μεταχειριστεί με diethofencarb, ήταν κοντοί, παραμορφωμένοι και συστρεμμένοι. (Εικόνα 2.1Γ,



Πίνακας 2.2 και 2.3). Παρόλα αυτά, οι ουσίες αυτές δεν παρεμπόδισαν τη βλάστηση των σπορίων ούτε στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (Πίνακας 2.2).

Τα στελέχη μέτριας ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά (Ben MR), εμφάνιζαν κανονική ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα σε συγκέντρωση  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  carbendazim και  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  στο μίγμα carbendazim + diethofencarb, ενώ εμφάνιζαν παρόμοιες με τα ευαίσθητα παραμορφώσεις του βλαστικού σωλήνα σε συγκέντρωση  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  carbendazim και του μίγματος carbendazim + diethofencarb. Τέλος εμφάνιζαν ανθεκτικότητα αγρίου τύπου στο diethofencarb.

Στα στελέχη υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά (Ben HR), η βλάστηση των σπορίων και η κανονική ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα δεν επηρεαζόταν ούτε σε μέσο που περιείχε  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  carbendazim. Ένας φαινότυπος των στελεχών που ήταν υψηλά ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά, εμφάνιζαν ταυτόχρονη ευαισθησία στο diethofencarb και στο μίγμα carbendazim + diethofencarb σε συγκεντρώσεις  $0.05 \mu\text{g ml}^{-1}$ , ενώ υπήρχαν στελέχη BenHR, που διατηρούσαν την ανθεκτικότητα αγρίου τύπου στο diethofencarb (βλάστηση σπορίων σε  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  diethofencarb) (Πίνακας 2.2 και 2.3).

Σε όλα τα παραπάνω στελέχη, το carbendazim δεν παρεμπόδιζε τη βλάστηση των σπορίων (καμία επίδραση σε μέσο που περιείχε  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  carbendazim).

### Ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά

Ανάλογα με την *in vitro* ευαισθησία τους στα δικαρβοξιμιδικά, οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες (W) και μετρίως ανθεκτικές (DicMR).

Οι δοκιμές που έγιναν σε σπόρια από στελέχη αγρίου τύπου (W), έδειξαν ότι το iprodione, μπορούσε να παρεμποδίσει τόσο τη βλάστηση των σπορίων όσο και την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα (Πίνακας 2.2 και 2.3).

Το μυκητοκτόνο αυτό προκαλεί μορφολογικές τροποποιήσεις του βλαστικού σωλήνα. Στα στελέχη μέτριας ανθεκτικότητας (DicMR) δεν παρεμποδίζονταν η βλάστηση των σπορίων (Πίνακας 2.2 και 2.3), αλλά σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  iprodione, το μυκητοκτόνο παρεμπόδιζε την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα, επάγοντας μορφολογικές τροποποιήσεις (π.χ. διόγκωση βλαστικού σωλήνα, διακλαδώσεις, διάρρηξη του βλαστικού σωλήνα) (Εικόνα 2.1B).

Στελέχη που εμφάνιζαν υψηλή ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά (Dic HR), δεν διαπιστώθηκαν στην εργασία αυτή (η βλάστηση των σπορίων παρεμποδίζονταν σε μέσο που περιείχε  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  iprodione).

### Ανθεκτικότητα στο μίγμα carbendazim + diethofencarb

Ανάλογα με την *in vitro* ευαισθησία τους στο μίγμα carbendazim + diethofencarb οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες (S), μετρίως ανθεκτικές (MR) και ανθεκτικές (HR)

Ευαίσθητα στελέχη (S) στο μίγμα είναι τα στελέχη αγρίου τύπου και τα στελέχη με υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, τα σπόρια των οποίων βλαστάνουν μεν αλλά ο βλαστικός σωλήνας που αναπτύσσεται είναι πιο κοντός και παραμορφωμένος, σε συγκεντρώσεις του μίγματος  $0.05 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Μέτρια ανθεκτικότητα εμφανίζουν τα στελέχη που είναι μετρίως ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά και είναι αυτά που δεν ελέγχονται αποτελεσματικά από το μίγμα. Τα σπόρια αυτών των απομονώσεων βλαστάνουν κανονικά ενώ η ανάπτυξη

του βλαστικού σωλήνα είναι κανονική σε συγκεντρώσεις  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  ενώ σε συγκέντρωση  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ , ο βλαστικός σωλήνας είναι παραμορφωμένος με διακλαδώσεις (Πίνακας 2.2 και 2.3, Εικόνα 2.1).

Τέλος έχουν επιλεγεί στελέχη που εμφανίζουν ταυτόχρονα υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, υψηλή ανθεκτικότητα στα φαινυλοκαρβαμιδικά και υψηλή ανθεκτικότητα στο μίγμα carbendazim + diethofencarb. Τα σπόρια από τα στελέχη αυτά αναπτύσσονται κανονικά σε συγκεντρώσεις του μίγματος  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

### Μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid

Στα στελέχη αγρίου τύπου, η βλάστηση των σπορίων *in vitro* παρεμποδίζονταν σε μέσο που περιείχε συγκέντρωση dichlofluanid  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$

Στα στελέχη που εμφάνιζαν μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid (απομονώσεις G1 και G2), η βλάστηση των σπορίων παρεμποδίζονταν σε συγκέντρωση  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ , ενώ σε συγκέντρωση  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  τα σπόρια βλάσταναν αλλά με κοντό βλαστικό σωλήνα (Εικόνα 2.1B-Δ, Πίνακες 2.2 και 2.3).

### Υπολογισμός τιμών MIC για τη βλάστηση των σπορίων ή την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα

Τα αποτελέσματα από την καταγραφή της βλάστησης και του τρόπου βλάστησης των σπορίων σε μέσο εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων φαίνονται στον Πίνακα 2.3.

Από τα αποτελέσματα αυτά υπολογίστηκε η τιμή MIC (minimum inhibitory concentration) για τη βλάστηση των σπορίων ή την κανονική ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα. Με βάση την τιμή MIC, κάθε απομόνωση ταξινομήθηκε στον φαινότυπο που αντιστοιχεί στην ευαισθησία της στα μυκητοκτόνα (Πίνακας 2.4).

Ανάλογα με την *in vitro* ευαισθησία τους στο carbendazim, τρεις φαινότυποι του *Botrytis cinerea* ανιχνεύθηκαν. Χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητοι (Ben S), υψηλά ανθεκτικοί (Ben HR) και μετρίως ανθεκτικοί (Ben MR). Οι αντιπροσωπευτικές τιμές MIC για την επιμήκυνση και διαμόρφωση του βλαστικού σωλήνα ήταν κάτω από  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  πάνω από  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  και μεγαλύτερη από  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  αντίστοιχα.

Το *N*-φαινυλοκαρβαμιδικό μυκητοκτόνο diethofencarb δεν είχε καμία επίδραση στα στελέχη Ben S και Ben MR, τα οποία χαρακτηρίστηκαν υψηλά ανθεκτικά στο diethofencarb (PcmHR) με τιμές MIC μεγαλύτερες από  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ , ενώ ήταν πολύ τοξικό στα στελέχη Ben HR (φαινότυπος PcmS) με τιμές MIC μικρότερες από  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ , εκτός από τις απομονώσεις D1, D2, D3, οι οποίες εμφάνιζαν τριπλή ανθεκτικότητα (υψηλά ανθεκτικές στο carbendazim, το diethofencarb και το μίγμα carbendazim + diethofencarb) με τιμές MIC μεγαλύτερες από  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  και για τα τρία μυκητοκτόνα.

Ανάλογα με την *in vitro* ευαισθησία τους στο iprodione, δύο φαινότυποι του *Botrytis cinerea* ανιχνεύθηκαν. Χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητοι (W) και μετρίως ανθεκτικοί (Dic MR). Οι τιμές MIC ήταν μικρότερες από  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  και  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  αντίστοιχα.

Στο dichlofluanid, οι περισσότερες απομονώσεις ήταν ευαίσθητες ( $\text{MIC} < 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), εκτός από τις απομονώσεις G1 και G2, που εμφάνιζαν μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid ( $\text{MIC} 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

Στο μίγμα carbendazim + diethofencarb, ανάλογα με την *in vitro* ευαισθησία των απομονώσεων χαρακτηρίστηκαν τρεις φαινότυποι. Τα στελέχη BenHR PcmS και BenS PcmHR ήταν όλα ευαίσθητα στο μίγμα (αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα)

και χαρακτηρίστηκαν ως ( Ben+ Pcm S) με τιμές MIC <1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Τα στελέχη BenMR PcmHR και Ben MR PcmS ήταν μετρίως ανθεκτικά στο μίγμα (MIC 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), ενώ τα στελέχη D1, D2, D3, που εμφάνιζαν τριπλή ανθεκτικότητα (υψηλά ανθεκτικά στο carbendazim, το diethofencarb και το μίγμα carbendazim + diethofencarb) χαρακτηρίστηκαν Ben + Pcm HR με τιμές MIC >100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Ο υπολογισμός της τιμής MIC για την βλάστηση των σπορίων ή την κανονική ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα των απομονώσεων του *Botrytis cinerea*, καθώς και οι φαινότυποι που αντιστοιχούν, φαίνονται στον Πίνακα 2.4.

## ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ, ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΛΙΟΥ

Η παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης προσδιορίστηκε μετρώντας την ακτινωτή ανάπτυξη του μυκηλίου των απομονώσεων σε ΜΕΑ, σε τρυβλία που περιείχαν ένα εύρος από συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων.

Οι τιμές ED<sub>50</sub> υπολογίστηκαν από το διάγραμμα του μέσου ποσοστού παρεμπόδισης της μυκηλιακής ανάπτυξης σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου προς το λογάριθμο των συγκεντρώσεων.

Ανάλογα με την επίδραση που είχαν τα βενζιμιδαζολικά (Ben), τα δικαρβοξιμιδικά, (Dic), το μίγμα carbendazim + diethofencarb (Ben + Pcm) και το dichlofluanid (Dich), στη μυκηλιακή ανάπτυξη, οι απομονώσεις ταξινομήθηκαν στους φαινότυπους αγρίου τύπου (W), ευαίσθητες (S), μετρίως ανθεκτικές (MR) ή υψηλά ανθεκτικές (HR) με βάση τις τιμές ED<sub>50</sub> (Πίνακας 2.5).

### Ανθεκτικότητα στο carbendazim

Ανάλογα με την *in vitro* ευαισθησία τους στο carbendazim, τρεις φαινότυποι του *Botrytis cinerea* ανιχνεύθηκαν (διάγραμμα 2.1). Χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητοι (Ben S), υψηλά ανθεκτικοί (Ben HR) και μετρίως ανθεκτικοί (Ben MR). Οι αντιπροσωπευτικές τιμές ED<sub>50</sub> για τη μυκηλιακή ανάπτυξη ήταν 0.05  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , μεγαλύτερη από 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  και μεταξύ 7 και 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  για τους αντίστοιχους φαινοτύπους (Πίνακας 2.5).

Οι τιμές RL (Resistance Level, επίπεδο ανθεκτικότητας) για τις ανθεκτικές απομονώσεις, δηλαδή ο λόγος της τιμής ED<sub>50</sub> της ανθεκτικής απομόνωσης προς την τιμή ED<sub>50</sub> της απομόνωσης αγρίου τύπου, ήταν για τις υψηλά ανθεκτικές απομονώσεις (Ben HR) μεγαλύτερος από 2000, ενώ για τις μετρίως ανθεκτικές απομονώσεις (Ben MR), ήταν μεταξύ 140 και 180.

Οι απομονώσεις Ben S σταματούσαν την ανάπτυξή τους σχεδόν αμέσως από την παρουσία του μυκητοκτόνου και κάθε περαιτέρω ανάπτυξη του μυκηλίου διακόπτονταν.

Όλες οι υψηλά ανθεκτικές απομονώσεις διακρίνονταν εύκολα γιατί η μυκηλιακή ανάπτυξη δεν επηρεάζονταν ούτε σε μέσο 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  carbendazim (BenHR), ενώ οι απομονώσεις BenMR αναπτύσσονταν σε συγκέντρωση 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  αλλά όχι σε συγκέντρωση 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  carbendazim (Εικόνα 2.2).



### Ανθεκτικότητα στο diethofencarb

Ανάλογα με την *in vitro* ευαισθησία στο diethofencarb προσδιορίστηκαν δύο φαινότυποι ανθεκτικότητας (διάγραμμα 2.2). Χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητοι (PcmS) και υψηλά ανθεκτικοί (PcmHR) με τιμές ED<sub>50</sub> 0.05 μg ml<sup>-1</sup> και μεταξύ 70 και 100 μg ml<sup>-1</sup> αντίστοιχα.

Το diethofencarb δεν είχε καμία επίδραση στα στελέχη Ben S και Ben MR τα οποία χαρακτηρίστηκαν υψηλά ανθεκτικά στο diethofencarb (PcmHR), ενώ ήταν πολύ τοξικό στα στελέχη Ben HR (φαινότυπος PcmS) (Πίνακας 2.5). Οι τιμές RL για τα στελέχη Pcm HR ήταν 700 ως 1000.

Όλες οι BenHR απομονώσεις, εμφάνιζαν αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα φαινυλοκαρβαμιδικά, δηλαδή ήταν ευαίσθητες στο diethofencarb (PcmS) με εξαίρεση τις απομονώσεις D1, D2, D3, που εμφάνιζαν τριπλή ανθεκτικότητα δηλαδή αναπτύσσονταν σε συγκεντρώσεις carbendazim 100 μg ml<sup>-1</sup>, diethofencarb 100 μg ml<sup>-1</sup> και στο μίγμα carbendazim + diethofencarb σε συγκέντρωση 100 μg ml<sup>-1</sup>.

Σε αντίθεση όλες οι απομονώσεις Ben MR ήταν ανθεκτικές στο diethofencarb όσο και αυτές του άγριου τύπου, δηλαδή ήταν επίσης και PcmHR (Εικόνα 2.2).

### Ανθεκτικότητα στο μίγμα carbendazim +diethofencarb

Ανάλογα με την *in vitro* ευαισθησία τους στο carbendazim + diethofencarb, τρεις φαινότυποι του *Botrytis cinerea* ανιχνεύθηκαν (διάγραμμα 2.3). Χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητοι (Ben+Pcm S), υψηλά ανθεκτικοί (Ben+Pcm HR) και μετρίως ανθεκτικοί (Ben+Pcm MR). Οι αντιπροσωπευτικές τιμές ED<sub>50</sub> για τη μυκηλιακή ανάπτυξη ήταν 0.05 μg ml<sup>-1</sup>, 70 μg ml<sup>-1</sup> και μεταξύ 8 και 10 μg ml<sup>-1</sup> για τους αντίστοιχους φαινοτύπους (Πίνακας 2.5).

Σε όλα τα στελέχη Ben MR που δοκιμάστηκαν το μίγμα carbendazim + diethofencarb δεν ήταν αποτελεσματικό (απομονώσεις E1, E5 και E6, καθώς και οι G1 και G2). Οι απομονώσεις Ben HR συνέχιζαν να αναπτύσσονται αργά παρουσία του μίγματος, παράγοντας διακλαδιζόμενο μυκήλιο και τελικά αποικίες με μικρή παραγωγή σπορίων (Εικόνα 2.2).

### Ανθεκτικότητα στο iprodione

Ανάλογα με την *in vitro* ευαισθησία τους στο iprodione, δύο φαινότυποι του *Botrytis cinerea* ανιχνεύθηκαν (διάγραμμα 2.4). Χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητοι – άγριου τύπου (W) και μετρίως ανθεκτικοί (Dic MR).

Ως προς την επίδραση του iprodione στη μυκηλιακή ανάπτυξη των στελεχών άγριου τύπου η παρεμπόδιση κυμαίνονταν μεταξύ 0.1 και 0.2 μg ml<sup>-1</sup> (Πίνακας 2.5).

Στα στελέχη που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στα δικαρβοξυμιδικά μυκητοκτόνα (Dic MR), το 50% της μυκηλιακής ανάπτυξης παρεμποδίζονταν σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 2 και 4 μg ml<sup>-1</sup> iprodione (Πίνακας 2.5). Οι τιμές RL για τα στελέχη Dic MR, ήταν μεταξύ 20 και 40. Κανένα στέλεχος δεν αναπτύχθηκε σε συγκέντρωση 10 μg ml<sup>-1</sup> του μυκητοκτόνου. Φαινότυπος υψηλά ανθεκτικός στα δικαρβοξυμιδικά δεν βρέθηκε (Εικόνα 2.3).

### Ανθεκτικότητα στο dichlofluanid

Στις απομονώσεις του *B. cinerea* που δοκιμάστηκαν για την ευαισθησία τους *in vitro* στο dichlofluanid, φάνηκε ότι το μυκητοκτόνο δεν προκαλεί σημαντική παρεμπόδιση στη μυκηλιακή ανάπτυξη (Εικόνα 2.4).

Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές ανάπτυξης μυκηλίου για αντιπροσωπευτικές απομονώσεις κάθε φαινοτύπου φαίνονται στο διάγραμμα 2.5. Δεν διακρίνονται διακριτές ομάδες φαινοτύπων με διαφορετική αντίδραση στο dichlofluanid. Η ευαισθησία του πληθυσμού ακολουθεί περίπου κανονική κατανομή όπως φαίνεται στο διάγραμμα. Στη συγκέντρωση 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , η παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μυκηλίου για 3 απομονώσεις ήταν μεταξύ 0-25% για 3 απομονώσεις ήταν από 25 –50% για 7 από 50 – 75% και για 5 από 75- 100% (διάγραμμα 2.6). Τη μεγαλύτερη σχετικά, ευαισθησία στο dichlofluanid στη συγκέντρωση 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  παρουσίαζαν οι απομονώσεις D1, D2 και D3, που εμφάνιζαν τριπλή ανθεκτικότητα στο carbendazim, το diethofencarb και το μίγμα τους, στις οποίες η παρεμπόδιση έφθανε και το 95% ενώ προκαλούσε μικρότερη παρεμπόδιση στις απομονώσεις αγρίου τύπου. Οι απομονώσεις με μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid εμφάνιζαν επίσης μέτρια ανθεκτικότητα στα δικαρβοξυμιδικά και υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά.

Πάντως δεν βρέθηκε η δοκιμή ευαισθησίας στο μυκήλιο να ξεχωρίζει σαφώς τις απομονώσεις ως προς την ευαισθησία τους στο dichlofluanid και έτσι οι απομονώσεις δεν κατατάχθηκαν σε φαινοτύπους με βάση τις τιμές ED<sub>50</sub> για το dichlofluanid.

### Ανάπτυξη μυκηλίου παρουσία μυκητοκτόνου στους φαινοτύπους ανθεκτικότητας

Στα διαγράμματα 2.7α,β,γ απεικονίζεται η σχετική μυκηλιακή ανάπτυξη (ποσοστό ανάπτυξης μυκηλίου απομόνωσης σε σχέση με τη μυκηλιακή ανάπτυξη του μάρτυρα) των αντίστοιχων φαινοτύπων ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα απομονώσεων του *B. cinerea*, σε ΜΕΑ εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων σε  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

## ΑΝΑΛΥΣΗ RAPD ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ *B. cinerea* ΓΝΩΣΤΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ.

### Πολυμορφισμοί DNA μεταξύ απομονώσεων του *B.cinerea*

Η γενετική ποικιλότητα των 7 στελεχών που παρουσίαζαν διαφορετικούς φαινότυπους ως προς την ευαισθησία τους στα μυκητοκτόνα (Πίνακας 2.6), μελετήθηκε με ανάλυση RAPD χρησιμοποιώντας 7 διαφορετικούς δεκαμερής εκκινητές. Όλοι οι εκκινητές παρήγαγαν από 1 ως 9 προϊόντα αντιγραφής ανά εκκινητή, με μέγεθος που κυμαίνονταν από 3 ως 0.4 kb, η πλειονότητα των οποίων είχαν μέγεθος μικρότερο από 1.6 kb (Εικόνα 2.5 και 2.6). Καθώς η ένταση των ζωνών στο πρότυπο RAPD, διέφερε ελαφρώς σημειώθηκαν σαν δείκτες RAPD και καταγράφηκε η απουσία ή παρουσία μόνο των ζωνών στο πήκτωμα που ήταν εύκολα διακριτές.

Έντονα μη πολυμορφικά τμήματα DNA αντιγράφονταν με την PCR από τις απομονώσεις με τους εκκινητές #84 (84<sub>1.3</sub>, 84<sub>1.1</sub> και 84<sub>0.7</sub>), #71 (71<sub>0.7</sub>), #77 (77<sub>1</sub>, 77<sub>1.2</sub>, 77<sub>1.4</sub>) και #74 (#74<sub>0.7</sub>). Μερικοί εκκινητές εμφάνιζαν στα πρότυπα RAPD

πολλές έντονες ζώνες (π.χ. ο εκκινητής #82) ενώ άλλοι παρήγαγαν μικρό αριθμό ζωνών (όπως ο #73). Άλλοι εκκινητές όπως οι #82, #73, #71 και #74 επέτρεπαν την αντιγραφή πολλών τμημάτων του γενόματος του *B. cinerea* και αποκάλυπταν πολυμορφισμό μεταξύ των 7 απομονώσεων που δοκιμάστηκαν, ενώ άλλοι όπως ο #84, #77 και #70 παρήγαγαν έντονες ζώνες ίδιου μεγέθους.

Μεταξύ των 7 απομονώσεων, ο αριθμός των διαφορετικών προτύπων RAPD ανά εκκινητή, κυμαίνονταν από 2 ως 6. Κανένας από τους εκκινητές από μόνος του δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να διαχωρίσει όλα τα στελέχη του *B. cinerea* που δοκιμάστηκαν. Παρόλα αυτά συνδυάζοντας τα πρότυπα RAPD από διάφορους εκκινητές, ήταν προφανές ότι και οι 7 απομονώσεις έδειχναν πολυμορφισμούς στα κομμάτια DNA που αντιγράφονταν. Ο #82 παρήγαγε πρότυπα ζωνών διαφορετικά για τις 6 από τις 7 απομονώσεις, που τις διέκριναν εύκολα από τις άλλες όπως και ο #71.

### Γενετικός χαρακτηρισμός των απομονώσεων του *B. cinerea*

Για τον υπολογισμό της γενετικής ομοιότητας μεταξύ των στελεχών, σημειώθηκαν όλοι οι δείκτες RAPD που αντιγράφονταν κατ' επανάληψη από τους 7 εκκινητές και αποκτούσαν έντονη χρώση. Ένα σύνολο από 48 μοριακούς δείκτες σημειώθηκαν, από τους οποίους οι 26 ήταν παρόντες σε όλα τα στελέχη, ενώ 22 μοριακοί δείκτες έδειχναν πολυμορφισμό. Στον Πίνακα 2.7 φαίνονται οι συντελεστές ομοιότητας για κάθε ζεύγος απομονώσεων, οι οποίοι κυμαίνονται από 0.078 ως 0.333.

Οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των 7 απομονώσεων του *Botrytis cinerea*, έδειξαν σημαντική γενετική ποικιλότητα μεταξύ των απομονώσεων.

### Φυλογενετική Ανάλυση

Με την ανάλυση ομαδοποίησης που έγινε με βάση τους συντελεστές ομοιότητας που προκύπτουν από την ανάλυση RAPD, προσδιορίστηκαν τρεις κύριες διακριτές ομάδες απομονώσεων που εμφάνιζαν γενετική συγγένεια, οι RAPD ομάδες I, II και III (διάγραμμα 2.8). Το ενδιαφέρον είναι ότι κάθε ομάδα αποτελούνταν από απομονώσεις διακριτών φαινοτύπων.

Η Ομάδα I αποτελείται από την απομόνωση 1a (Τομάτα, Βόλος 97) που είχε χαρακτηριστεί ως φαινότυπος αγρίου τύπου (Wild, PcmHR). Η ομάδα αυτή διακρίνονταν σαφώς από τις άλλες δύο ομάδες που περιελάμβαναν απομονώσεις που είχαν χαρακτηριστεί με φαινοτύπους ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, φαινυλοκαρβαμιδικά και το dichlofluanid.

Η ομάδα II περιλαμβάνει δυο υποομάδες, την IIa στην οποία κατατάσσονται στελέχη που έχουν χαρακτηριστεί ως φαινότυποι μόνο BenHR (Τομάτα, Βόλος 94) ενώ στην υποομάδα IIb κατατάσσονται στελέχη που έχουν χαρακτηριστεί ως φαινότυποι Dic MR BenHR (Καλαγχόρα Τυμπάκι, 95)

Στην ομάδα III διακρίνονται στην υποομάδα IIIa1, τα στελέχη που έχουν χαρακτηριστεί ως Ben HR Pcm HR (7a, Αγγούρι, Ισραήλ, 89), (7b, Αεροπαγίδα Τυμπάκι 96), στην υποομάδα IIIa2 οι απομονώσεις που έχουν χαρακτηριστεί με το φαινότυπο Dic MR Ben MR Pcm HR (9a, Τομάτα Τυμπάκι 93) και τέλος στην υποομάδα IIIb, στελέχη με φαινότυπο Dich MS (10a, Τριαντάφυλλα). Οι φαινότυποι Ben HR ξεχωρίζουν σε διαφορετική ομάδα όταν βρίσκονται σε φαινοτυπικό συνδυασμό με PcmS ή Dic MR και σε διαφορετική φαινοτυπική ομάδα όταν βρίσκονται σε φαινοτυπικό συνδυασμό με Pcm HR.







## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ *B. cinerea* ΣΕ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

Απομονώσεις του *Botrytis cinerea* από διάφορες καλλιέργειες και τοποθεσίες της Ελλάδας ταξινομήθηκαν σε διάφορους φαινότυπους με βάση την ευαισθησία τους στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξυμιδικά, φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, στο μίγμα carbendazim + diethofencarb και στο dichlofluanid. Οι απομονώσεις του *Botrytis cinerea* μπορούν να ταξινομηθούν με βάση το επίπεδο ευαισθησίας / ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, τα φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα και στο μίγμα τους ως ευαίσθητες (S) ή αγρίου τύπου, μετρίως ανθεκτικές (MR) ή υψηλά ανθεκτικές (HR), στα δικαρβοξυμιδικά μυκητοκτόνα ως αγρίου τύπου και μετρίως ανθεκτικές (MR) και στο dichlofluanid ως αγρίου τύπου και μειωμένης ευαισθησίας (DichMR).

Στο πειραματικό μέρος της μελέτης, έγινε ανίχνευση ανθεκτικότητας στελεχών *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά, φαινυλοκαρβαμιδικά, δικαρβοξυμιδικά στο dichlofluanid και στο μίγμα carbendazim + diethofencarb, εφαρμόζοντας μια κριτική συγκέντρωση του μυκητοκτόνου που να επιτρέπει την ξεκάθαρη διάκριση μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών. Στη συνέχεια οι απομονώσεις κατατάχθηκαν σε φαινότυπους ανθεκτικότητας α) με βάση την ελάχιστη συγκέντρωση που προκαλεί παρεμπόδιση στη βλάστηση των σποριών ή την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα (MIC) και β) τη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου που προκαλεί παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μυκηλίου κατά 50% σε σχέση με το μάρτυρα (τιμή ED<sub>50</sub>). Τα αποτελέσματα συζητούνται παρακάτω.

#### Ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά

Στις απομονώσεις του *B. cinerea* που δοκιμάστηκαν, ανιχνεύθηκαν τρεις φαινότυποι που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα

Α) Ο πρώτος (Ben HR) εμφάνιζε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο carbendazim με τιμές RL (λόγος ED<sub>50</sub> ανθεκτικών απομονώσεων προς ED<sub>50</sub> ευαίσθητων απομονώσεων) μεγαλύτερες από 2000 και ταυτόχρονα ήταν περισσότερο ευαίσθητος στο diethofencarb από ότι ο ευαίσθητος τύπος στα βενζιμιδαζολικά (Ben S). Αυτό το φαινόμενο αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας των υψηλά ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών, επεκτείνεται και σε άλλα N-φαινυλοκαρβαμίδια (barban, chlorpropham, MDPC) και σε διάφορα ζιζανιοκτόνα των οποίων ο πρωταρχικός στόχος δράσης δεν είναι οι μικροσωληνίσκοι (Leroux and Gredt, 1989). Ο φαινότυπος αυτός χαρακτηρίστηκε ως Ben HR Pcm S Ben + Pcm S και σε αυτόν τον φαινότυπο ταξινομήθηκαν οι απομονώσεις C1 (Τομάτα, Βόλος 94), C2 (Τομάτα, Τυμπάκι 96) και C3 (Τομάτα, Τυμπάκι 96) και οι απομονώσεις F2

(Τομάτα, Τυμπάκι 95), F3 (Καλαγχόα, Κρόκιο 99) και F5 (Καλαγχόα, Κρόκιο 99) οι οποίες εμφάνιζαν ταυτόχρονα ευαισθησία και στα δικαρβοξυμιδικά

B) Ο δεύτερος φαινότυπος (Ben HR), με τιμές RL μεγαλύτερες από 2000 εμφάνιζε διασταυρωτή ανθεκτικότητα στο carbendazim, το diethofencarb καθώς και στο μίγμα τους. Το χειμώνα του 1989, εισήχθηκε στην αγορά αγροχημικών της Ελλάδας ένα μίγμα από carbendazim 25% δ.ο. + diethofencarb 25% δ.ο., με το εμπορικό όνομα Sumico, ως μια στρατηγική αντιμετώπισης του προβλήματος της ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά. Γρήγορα όμως επιλέχθηκαν στελέχη του μύκητα που εμφάνιζαν ταυτόχρονα ανθεκτικότητα και στα δύο συστατικά, γεγονός που οδήγησε πρακτικά σε ανθεκτικότητα των στελεχών στο μίγμα. Στην Ελλάδα, τέτοια στελέχη διασταυρωτής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά ανιχνεύονταν περιστασιακά ξεκινώντας από το 1994 σε καλλιέργειες θερμοκηπίου στη Δυτική Πελοπόννησο (Λάσκαρης και συνεργάτες, 1994). Ο φαινότυπος αυτός χαρακτηρίστηκε ως Ben HR Pcm HR Ben + Pcm HR και σε αυτόν ταξινομήθηκαν οι απομονώσεις D1 (Αγγούρι, Ισραήλ 89), D2 (Αεροπαγίδα, Τυμπάκι 96) και D3 (Αεροπαγίδα, Τυμπάκι, 96). Καθώς η συχνότητα των στελεχών Ben HR Pcm HR Ben + Pcm HR μειώνονταν μετά την παύση της πίεσης επιλογής από τη χρήση του μίγματος, προτάθηκε η χρήση του μίγματος carbendazim + diethofencarb να είναι ασυνεχής και να γίνεται εναλλαγή ψεκασμών με μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος όπως το dichlofluanid ή δικαρβοξυμιδικά (Leroux and Descotes, 1996).

Σύμφωνα με τους Faretra and Pollastro (1991), η ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και στους δύο φαινότυπους καθορίζεται από αλληλόμορφα του ίδιου γονιδίου που το ονόμασαν *Mbc1*. Η γονιδιακή θέση που έχει μεταλλαχθεί αναφέρεται στο δομικό γονίδιο της β- τουμπουλίνης στο οποίο αναγνωρίστηκαν απλές μεταλλαγές σε ζεύγη βάσεων στα κωδικόνια 198 και 200. Σε σχέση με τα στελέχη αγρίου τύπου έγιναν οι ακόλουθες αλλαγές: στα στελέχη Ben HR Pcm S Ben + Pcm S, στη θέση 198, το αμινοξύ αλανίνη αντικαταστάθηκε από το αμινοξύ γλουταμινικό οξύ, ενώ στα στελέχη Ben HR Pcm HR Ben + Pcm HR, στη θέση 200, το αμινοξύ τυροσίνη αντικαταστάθηκε από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη (Yarden and Katan, 1993). Σε πολλούς μύκητες συμπεριλαμβανομένου και του *B. cinerea*, έχει δειχθεί ότι η πρόσδεση του carbendazim στην τουμπουλίνη των στελεχών που είναι ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά, ήταν ασθενέστερη σε σύγκριση με τα στελέχη αγρίου τύπου. Αυτό το φαινόμενο που σχετίζεται πιθανόν με την ποικιλία στην αλληλουχία των αμινοξέων της β- τουμπουλίνης ίσως προκαλεί τροποποίηση στη θέση πρόσδεσης των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων στην τουμπουλίνη. Μεταλλαγές στο κωδικόνιο 198 θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αυξημένη πρόσδεση στην τουμπουλίνη συστατικών που εμφανίζουν αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά (π.χ. diethofencarb) (Leroux *et al.*, 1999).

Η ύπαρξη στελεχών στον άγριο πληθυσμό του *B. cinerea* με αλληλόμορφα *Mbc1R* που καθορίζουν ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά αλλά δεν καταλήγουν σε ευαισθησία στα φαινυλοκαρβαμιδικά, δείχνει ότι στρατηγικές προστασίας των καλλιεργειών που περιλαμβάνουν το μίγμα carbendazim + diethofencarb, μπορεί να χάσουν την αποτελεσματικότητά τους μακροπρόθεσμα, μετά από υψηλή πίεση επιλογής που ευνοεί την επικράτηση στελεχών που δεν είναι ευαίσθητα σε κανένα από τα δύο μυκητοκτόνα (Faretra and Pollastro, 1993). Από τα ανωτέρω φαίνεται ότι η συνεχής χρήση του μίγματος carbendazim + diethofencarb στον αγρό, αν και δίνει επί του παρόντος ικανοποιητικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση του Βοτρύτη εκεί που επικρατούν ανθεκτικά στελέχη στα βενζιμιδαζολικά, εντούτοις επιλέγει στελέχη διπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά.

Πάντως από παρατηρήσεις καλλιεργειών που αναπτύσσονται σε θερμοκήπια αναφέρεται μειωμένη αποτελεσματικότητα του μίγματος carbendazim + diethofencarb στη χημική καταπολέμηση του Βοτρώτη, που αποδίδεται στην αδυναμία του μίγματος να αποτρέψει τη μυκηλιακή ανάπτυξη και τη σπορίωση (sporulation) των απομονώσεων BenHR PcmS των οποίων τα σπόρια έχουν βλαστήσει απουσία του μυκητοκτόνου (Pappas, 1997).

Γ) Άλλος φαινότυπος ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά είναι αυτός στελεχών με διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και τα φαινυλοκαρβαμιδικά τα οποία εμφανίζουν μέτρια ανθεκτικότητα στο carbendazim, ανθεκτικότητα αγρίου τύπου στο diethofencarb και μέτρια ανθεκτικότητα στο μίγμα carbendazim, + diethofencarb. Τα στελέχη αυτά χαρακτηρίστηκαν ως Ben MR Pcm HR Ben + Pcm MR. Σε αυτόν το φαινότυπο ταξινομήθηκαν οι απομονώσεις E1 (μελιτζάνα, Κυπαρισία 93), E5 (μελιτζάνα Κυπαρισία 93) και E6 (Τομάτα, Τυμπάκι 93) οι οποίες εμφάνιζαν ταυτόχρονα και ενδιάμεση ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά και οι απομονώσεις G1 (Σταφύλια, Γαλλία 93) και G2 (Τριαντάφυλλα) οι οποίες εμφάνιζαν ταυτόχρονα, μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid. Το μίγμα carbendazim, + diethofencarb σε ίσες αναλογίες δεν ήταν ικανοποιητικά αποτελεσματικό σε όλα τα στελέχη Ben MR που ελέγχθηκαν.

Στελέχη ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά που διατηρούσαν την ανθεκτικότητα αγρίου τύπου στο diethofencarb ανιχνεύθηκαν σε πολλές χώρες αμέσως μετά την εισαγωγή του μίγματος carbendazim + diethofencarb (Pappas, 1997). Η πλειοψηφία αυτών των στελεχών ήταν μερικώς ανθεκτικά στα δικαρβοξιμιδικά και βενζιμιδαζολικά και υψηλά ανθεκτικά στο diethofencarb, ενώ ήταν ενδιάμεσα ανθεκτικά στο μίγμα. Εμφάνιση στελεχών διπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα αναφέρθηκε στο Ισραήλ, από την Katan *et al.*, το 1989.

### Ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά

Κατά τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του *B. cinerea* δεν διαπιστώθηκε η παρουσία στελεχών του μύκητα με υψηλή ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά. Αυτοί οι φαινότυποι γενικά δείχνουν υπερευαισθησία στην υψηλή οσμωτική πίεση η οποία σε συνδυασμό με την μειωμένη παθογένεια αυτών των στελεχών ίσως εξηγούν την σπανιότητά τους στον αγρό (Leroux *et al.*, 1999).

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε η παρουσία στελεχών που εμφανίζουν μέτρια ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά με τιμές RL που κυμαίνονταν 10 ως 20 για τη μυκηλιακή ανάπτυξη. Οι απομονώσεις αυτές χαρακτηρίστηκαν ως Dic MR. Στο φαινότυπο αυτό ταξινομήθηκαν α) οι απομονώσεις B1( Τυμπάκι 94), B2 (Αεροπαγίδα, Τυμπάκι 94) και B3 (Τομάτα, Τυμπάκι 95) οι οποίες εμφάνιζαν ταυτόχρονα ανθεκτικότητα αγρίου τύπου στο diethofencarb, β) οι απομονώσεις E1 (μελιτζάνα, Κυπαρισία 93), E5 (μελιτζάνα Κυπαρισία 93) και E6 (Τομάτα, Τυμπάκι 93), οι οποίες εμφάνιζαν τριπλή ανθεκτικότητα, στα δικαρβοξιμιδικά βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά, με μέτρια ανθεκτικότητα στο iprodione, το carbendazim και το μίγμα carbendazim + diethofencarb γ) οι απομονώσεις F2 (Τομάτα, Τυμπάκι 95), F3 (Καλαγχόα, Κρόκιο 99) και F5 (Καλαγχόα, Κρόκιο 99) οι οποίες εμφάνιζαν ταυτόχρονα υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και δ) οι απομονώσεις G1 (Σταφύλια, Γαλλία 93) και G2 (Τριαντάφυλλα) που εμφάνιζαν ταυτόχρονα μέτρια ανθεκτικότητα στο carbendazim και το μίγμα carbendazim + diethofencarb, ανθεκτικότητα αγρίου τύπου στο diethofencarb και μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid.



Από τις αρχές της δεκαετίας του '80, πρακτική ανθεκτικότητα των μυκήτων στα δικαρβοξυμιδικά σχετίστηκε με την επιλογή στελεχών μετρίως ανθεκτικών στο μυκητοκτόνο (Leroux and Clerjeau, 1985). Στα περισσότερα από αυτά τα στελέχη (Dic MR), τα επίπεδα ανθεκτικότητας στα δικαρβοξυμιδικά (τιμές RL), κυμαίνονταν από 8 ως 20 (για τη μυκηλιακή ανάπτυξη) ενώ εμφάνιζαν και θετική διασταυρωτή ανθεκτικότητα με τα AHFs (Leroux *et al.*, 1999). Γενετικές μελέτες που έγιναν από τους Faretra and Pollastro (1991, 1993) σε απομονώσεις αγρού και εργαστηριακά μεταλλαγμένα στελέχη, έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα στα δικαρβοξυμιδικά κωδικοποιείται από ένα μόνο πολυμορφικό επικρατές γονίδιο που το ονόμασαν *Daf1*. Πολλές κατηγορίες αλληλομόρφων έχουν αναγνωρισθεί σε στελέχη του μύκητα, υπεύθυνα για ανάλογες φαινοτυπικές αποκρίσεις στα μυκητοκτόνα. Στα περισσότερα στελέχη που ανιχνεύονται από απομονώσεις αγρού τα αλληλόμορφα *Daf1 LR* προσδίδουν χαμηλή ανθεκτικότητα στα δικαρβοξυμιδικά. Κατ'αναλογία με συγκρίσιμα γονίδια που πρόσφατα χαρακτηρίστηκαν στους μύκητες *N.crassa* και *U.maydis* (Orth *et al.*, 1995; Schumacher *et al.*, 1997), τα γονίδια *Daf1*, ίσως κωδικοποιούν για πρωτεϊνικές κινάσες που μπορεί να εμπλέκονται στη διαμόρφωση του κυτταρικού τοιχώματος όπως και στην απόκριση του κυττάρου στις εξωτερικές αλλαγές στην οσμωτικότητα. Άλλοι προτείνουν ότι η τοξικότητα αυτών των μυκητοκτόνων είναι αποτέλεσμα της παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου (Edlich and Lyr, 1992). Αυξημένα επίπεδα καταλάσης που βρέθηκαν σε στελέχη του *B. cinerea* ανθεκτικών στα δικαρβοξυμιδικά, θα μπορούσε να είναι ένας μηχανισμός ανθεκτικότητας που δε σχετίζεται με τη θέση δράσης αυτών των μυκητοκτόνων (Steel and Nair, 1993).

Πάντως η υψηλή ευαισθησία στην οσμωτική πίεση που πιθανώς επηρεάζει την παθογένεια και την προσαρμοστικότητα των στελεχών Dic HR δεν φαίνεται να ισχύει για τα στελέχη Dic MR ή τα ετεροκάρυα που περιέχουν μεγάλη αναλογία πυρήνων από στελέχη DicS (Faretra and Pollastro, 1993). Σε επιδημιολογικές μελέτες που έγιναν στην Ελλάδα (Pappas, 1997), μολύνσεις που προκλήθηκαν από απομονώσεις Dic MR ή Dic MR Ben HR, ήταν ασυνήθιστες στην αρχή της καλλιεργητικής περιόδου. Παρόλα αυτά, τόσο η εμφάνιση όσο και η συχνότητα των μολύνσεων από τέτοιες απομονώσεις αυξάνονταν σταθερά με την πρόοδο της καλλιεργητικής περιόδου και στη συνέχεια μειώνονταν μετά τη λήξη των ψεκασμών με μυκητοκτόνου. Σε αντίθεση, προσβολές που προκαλούνταν από απομονώσεις που έδειχναν υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά αλλά ευαισθησία στα δικαρβοξυμιδικά, ήταν συχνές σε όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (Pappas, 1997).

Ο Elad *et al* (1992), περιγράφουν ένα νέο φαινότυπο με τριπλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξυμιδικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα. Ο νέος αυτός φαινότυπος παρατηρήθηκε ότι μπορούσε να επιβιώσει κατά τη ζεστή περίοδο του καλοκαιριού στο Ισραήλ και να προκαλέσει μολύνσεις τον επόμενο χειμώνα. Η γρήγορη εμφάνιση τέτοιων στελεχών, σχετίζεται με τη χρήση του μίγματος carbendazim + diethofencarb. Επίσης χρήση του μίγματος σε πληθυσμό που ήδη είναι ανθεκτικός στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση στελεχών τριπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξυμιδικά και φαινυλοκαρβαμιδικά (Elad *et al.*, 1992).

### **Ανθεκτικότητα στο dichlofluanid**

Κατά τον έλεγχο της ευαισθησίας των στελεχών στο dichlofluanid, διαπιστώθηκαν φαινότυποι με μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid που εμφάνιζαν

ταυτόχρονα μέτρια ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και το μίγμα carbendazim + diethofencarb και υψηλή ανθεκτικότητα στα φαινυλοκαρβαμιδικά στις απομονώσεις G1 (Σταφύλια, Γαλλία 93) και G2 (Τριαντάφυλλα). Η βλάστηση των σπορίων των απομονώσεων αγρίου τύπου παρεμποδίζονταν σε συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου μικρότερες από  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ , ενώ η MIC για τα στελέχη με μειωμένη ευαισθησία ήταν  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  dichlofluanid.

Σε πειράματα δοκιμής *in vitro* της ευαισθησίας στο dichlofluanid που έγινε από τους Ελενα και Παππά, (1989), σε MEA εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις dichlofluanid, είχε καταγραφεί ότι το 50% των απομονώσεων που δοκιμάστηκαν εμφάνιζαν μειωμένη ευαισθησία (βλάστηση σπορίων σε  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), ενώ τα προηγούμενα χρόνια το ποσοστό αυτό δεν ξεπερνούσε το 1%. Σε ένα αριθμό επιλεγμένων απομονώσεων από την Ελλάδα με μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid προσδιόρισαν τιμές ED<sub>50</sub> για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου που κυμαίνονταν από 4- 7  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Ο Pollastro *et al.*, (1996) έδειξε ότι απομονώσεις αγρού του *B. cinerea*, κάτω από αυστηρά καθορισμένες πειραματικές συνθήκες, μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις φαινοτύπους ανάλογα με την ευαισθησία τους *in vitro* στο dichlofluanid. Οι τιμές ED<sub>50</sub> για τη μυκηλιακή ανάπτυξη ήταν αντίστοιχα: ευαίσθητες, 1-3  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , μέτριας ανθεκτικότητας, 3- 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  και υψηλής ανθεκτικότητας, 10-30  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , ενώ οι τιμές MIC για αυτές τις φαινοτυπικές κλάσεις σε δοκιμές βλάστησης σπορίων ήταν αντίστοιχα 0.2, 0.5 και 0.9-1.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Σε επιδημιολογικές μελέτες που έγιναν σε πληθυσμούς του *B. cinerea* στο Τυμπάκι Κρήτης, διαπιστώθηκε ότι προσβολές που προκαλούνταν από απομονώσεις με μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid ήταν πολυάριθμες σε περιοχές όπου το μυκητοκτόνο αυτό είχε χρησιμοποιηθεί (Pappas, 1997).

Η βλάστηση των σπορίων των απομονώσεων Dich MS παρεμποδίζονταν σε μέσο που περιείχε περισσότερο από 3  $\mu\text{g dichlofluanid ml}^{-1}$  (MIC). Αυτή η μικρή διαφοροποίηση στην παρεμποδιστική συγκέντρωση *in vitro* των φαινοτύπων DichMS δεν φαίνεται να έχει σημαντική πρακτική σημασία για τον έλεγχο της ασθένειας στον αγρό, πιθανόν γιατί οι συνήθως εφαρμοζόμενες δόσεις του μυκητοκτόνου στον αγρό (0.1% δ.ο. ή και μεγαλύτερες ) είναι πολύ μεγαλύτερες από τις απαιτούμενες παρεμποδιστικές συγκεντρώσεις για τη βλάστηση σπορίων των στελεχών Dich MS που καταγράφονται *in vitro* (Pappas, 1997). Ανάλογα ο Polastro *et al.* (1996) διαπιστώνει ότι οι δόσεις του μυκητοκτόνου, πρέπει να είναι ακόμη αποτελεσματικές στην πρόληψη προσβολών από σπόρια, καθώς η βλάστησή τους παρεμποδίζεται με συγκεντρώσεις μικρότερες από  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  ακόμη και για υψηλά ανθεκτικά στελέχη.

Αυτό ίσως εξηγεί γιατί στην πράξη, σε αντίθεση με τα βενζιμιδαζολικά και τα δικαρβοξυμιδικά, η παρουσία ανθεκτικών στο dichlofluanid απομονώσεων έχει χρεωθεί για αποτυχίες στην καταπολέμηση μόνο σε λίγες περιπτώσεις (Malathrakis, 1989), ενώ δεν υπάρχουν αναφορές απώλειας της καταπολέμησης του dichlofluanid εναντίον του Βοτρύτη σε πολλές χώρες στις οποίες εφαρμόζεται το μυκητοκτόνο στην καταπολέμηση του Βοτρύτη για πολλά χρόνια (Leroux *et al.*, 1999). Ο Rewal *et al.* (1991) διαπιστώνει από μελέτες σε πληθυσμούς του *B. cinerea* στην Αγγλία ότι δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι η ανθεκτικότητα στο dichlofluanid μπορεί να προκαλέσει απώλεια στην χημική καταπολέμηση του Βοτρύτη καθώς η ανθεκτικότητα στο dichlofluanid δεν είναι διαδεδομένη σε θερμοκήπια του Humberside. Σε προηγούμενη αναφορά καταγραφής στελεχών *in vitro* με μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid, βρέθηκε ότι κατά τη διάρκεια τριετούς δοκιμής στην τομάτα με ψεκασμούς με dichlofluanid η αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου στην πράξη δε μειώθηκε (Pappas & Elena, 1992). Πάντως υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (π.χ. παρατεταμένη εφαρμογή του ίδιου μυκητοκτόνου,

εφαρμογές στα θερμοκήπια) σε μύκητες με πολλούς βιολογικούς κύκλους στη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, όπως ο *Botrytis cinerea*, μπορεί να αναπτύξουν ανθεκτικότητα ακόμη και σε ένα μυκητοκτόνο ευρέως φάσματος (Malathrakis, 1989). Στην Ιταλία, στελέχη του *B. cinerea* ανθεκτικά στο dichlofluanid ανιχνεύθηκαν σε χαμηλές συχνότητες σε πειραματικά τεμάχια σε θερμοκήπιο στο οποίο καλλιεργούνταν ζέρμπερες, σαν αποτέλεσμα 7- 8 ψεκασμών με dichlofluanid ή μίγματα που περιέχουν την χημικά ανάλογη ουσία tolyfluanid (Sansiviero *et al.*, 1995). Στελέχη που ποικίλουν σε ανθεκτικότητα στο dichlofluanid έχουν κατά καιρούς δημοσιευθεί (Gjaerum & Munthe, 1985, 1987; Hunter *et al.*, 1987; Malathrakis, 1989).

Ο Pollastro *et al.*, (1996), προτείνει ότι η ανθεκτικότητα στο dichlofluanid ελέγχεται από τουλάχιστον 2 επικρατή γονίδια που ονομάστηκαν *Dic1* και *Dic2* με αλληλόμορφα που κωδικοποιούν για ευαισθησία, μέτρια ανθεκτικότητα και υψηλή ανθεκτικότητα. Τα γονίδια αυτά κληρονομούνται με Μενδελικό τρόπο κληρονομικότητας σε απογόνους φυλετικών διασταυρώσεων. Το πώς τα γονίδια ανθεκτικότητας λειτουργούν παραμένει άγνωστο. Η ανθεκτικότητα σε ένα ευρέως φάσματος μυκητοκτόνο σαν το dichlofluanid δεν μπορεί να προκαλείται από τροποποίηση την θέσεων δράσης αλλά είναι πιθανόν να οφείλεται σε τροποποιημένη απορρόφηση της ουσίας από το κύτταρο ή αποτοξικοποίηση της. Ο Pollastro *et al.*, (1996) προτείνει ότι τα γονίδια ανθεκτικότητας μπορεί να εμπλέκονται σε μηχανισμούς αποτοξικοποίησης και πιθανόν στη ρύθμιση παραγωγής θειόλης.

Σε μελέτη των ιδιοτήτων των ανθεκτικών στο dichlofluanid στελεχών ο Rewal *et al.* (1991) διαπιστώνει έλλειψη προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών στο dichlofluanid στελεχών, σε σύγκριση με τα ευαίσθητα στελέχη ενώ υποστηρίζει ότι η ανθεκτικότητα στο dichlofluanid σε απομονώσεις αγρού εξαφανίστηκε μετά από 12 βδομάδες απουσίας του μυκητοκτόνου. Επίσης διαπιστώνει μειωμένη ικανότητα των σπορίων από ανθεκτικές απομονώσεις να μολύνουν φυτά παρουσία των ευαίσθητων στελεχών. Παρότι το μόλυσμα του μυκηλίου μπορούσε με επιτυχία να μολύνει φυτά εντούτοις σημαντικά για την επιδημιολογία της ασθένειας είναι τα σπόρια και όχι το μυκήλιο.

Το dichlofluanid είναι ένας ισχυρός παρεμποδιστής της βλάστησης των σπορίων αλλά δείχνει περιορισμένη δραστηριότητα στη μυκηλιακή ανάπτυξη (Pollastro *et al.*, 1996). Στην έρευνά του ο Pollastro, προτείνει ότι η μειωμένη ευαισθησία των ανθεκτικών απομονώσεων ίσως να μειώνει την αποτελεσματικότητα των μεταχειρίσεων με το dichlofluanid επειδή δεν παρεμποδίζει προσβολές από μυκήλιο (Pollastro *et al.*, 1996). Η διασπορά ανθεκτικών απομονώσεων στον αγρό ίσως σχετίζεται με τη μείωση της αποτελεσματικότητας του dichlofluanid κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Πιθανόν, μικρή αποτελεσματικότητα αναμένεται όπου, πέρα από τα σπόρια, σημαντικό ρόλο σαν μόλυσμα σε νέες προσβολές έχει το μυκήλιο το οποίο ζει σε υπολείμματα φυτών (Pollastro *et al.*, 1996). Γι αυτό στα προγράμματα ολοκληρωμένης καταπολέμησης θα πρέπει να λαμβάνονται οι απαραίτητες καλλιεργητικές πρακτικές ώστε να διατηρούνται τα φυτά ελεύθερα από πεσμένα φύλλα και φυτικά υπολείμματα, ειδικά όπου είναι παρόντα ανθεκτικά στελέχη στο dichlofluanid (Pollastro *et al.*, 1996).

### Πολλαπλή ανθεκτικότητα

Οι περισσότερες ανθεκτικές απομονώσεις παρουσιάζουν ταυτόχρονα ανθεκτικότητα στα δικαρβοξυμιδικά και τα βενζιμιδαζολικά. Γενετική ανάλυση από τους Pollastro *et al.*, (1996) έδειξε ξεκάθαρα την απουσία κάθε σχέσης μεταξύ



ανθεκτικότητας στα διαφορετικά μυκητοκτόνα καθώς προκαλούνται από διαφορετικά γονίδια. Είναι έτσι προφανές ότι η παρουσία γενοτύπων ανθεκτικών στα διαφορετικά μυκητοκτόνα στον πληθυσμό ενός παθογόνου είναι το αποτέλεσμα ανεξάρτητων γεγονότων μεταλλάξεων και διακριτές δυνάμεις επιλογής προκαλούνται από τις μεταχειρίσεις με τα μυκητοκτόνα (Pollastro *et al.*, 1996).

## ΔΟΚΙΜΕΣ *in vitro* ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ *B.cinerea*

### Βλάστηση σπορίων

Στις δοκιμές στα βενζιμιδαζολικά, υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ δοκιμών *in vitro* και συμπεριφοράς του μυκητοκτόνου στον αγρό. Από την άλλη διαφορές στην ευαισθησία *in vitro* για το dichlofluanid δεν συσχετίζονται με μειωμένη αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου στην καταπολέμηση της ασθένειας.

Η ανθεκτικότητα στο carbendazim, ανιχνεύεται πολύ εύκολα σε δοκιμές βλάστησης σπορίων. Σε δοκιμές που γίνονται σε τεχνητά μέσα που περιέχουν carbendazim, οι απομονώσεις ταξινομούνται ανάλογα με την ελάχιστη δόση που παρεμποδίζει την κανονική βλάστηση και τη διαμόρφωση του βλαστικού σωλήνα (MIC). Η βλάστηση των σπορίων πραγματοποιείται μετά από 20-24 ώρες. Παρουσία του carbendazim σε συγκεντρώσεις  $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ , τα ευαίσθητα σπόρια βλαστάνουν αλλά παράγουν κοντούς βλαστικούς σωλήνες που αναπτύσσονται σε μήκος ένα, δύο ή λίγα κύτταρα, αλλά στη συνέχεια παραμορφώνονται, διογκώνονται και συχνά διαρρηγνύονται. Σε αντίθεση οι βλαστικοί σωλήνες των ανθεκτικών στελεχών αναπτύσσονται κανονικά σε συγκέντρωση  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  και δεν διακρίνονται από αυτά που βλαστάνουν σε μέσο χωρίς μυκητοκτόνο. Τα στελέχη με μέτρια ανθεκτικότητα αναπτύσσονται σε συγκέντρωση  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  αλλά δεν αναπτύσσονται σε συγκέντρωση  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Γενικά, υπάρχει καλή συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ των *in vitro* δοκιμών και της συμπεριφοράς του carbendazim στον αγρό (Staub & Sozzi, 1984).

Με αντίστοιχη ευκολία διαπιστώνεται η ανθεκτικότητα στελεχών στο diethofencarb και στο μίγμα carbendazim + diethofencarb με τις δοκιμές βλάστησης σπορίων.

Με το iprodione, η ανίχνευση της ανθεκτικότητας μπορεί να γίνει τόσο στη βλάστηση των σπορίων όσο και στην ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα. Τα σπόρια από ευαίσθητες απομονώσεις δεν βλαστάνουν σε συγκέντρωση  $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ , ενώ σπόρια από στελέχη μέτριας ανθεκτικότητας βλαστάνουν σε συγκέντρωση  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  αλλά με κοντό βλαστικό σωλήνα ενώ δε βλαστάνουν σε συγκέντρωση  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Με το dichlofluanid, τα ευαίσθητα σπόρια δεν βλαστάνουν σε συγκέντρωση του μυκητοκτόνου  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ , ενώ τα σπόρια των στελεχών που παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία βλαστάνουν σε συγκέντρωση  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  αλλά παρεμποδίζονται να βλαστήσουν σε συγκέντρωση  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  dichlofluanid. Αύξηση των δόσεων έχει σαν αποτέλεσμα στην αύξηση στο ποσοστό των σπορίων που παρεμποδίζονται να βλαστήσουν.

Ετσι με τις δοκιμές βλάστησης των σπορίων παρουσία μυκητοκτόνου, δίνεται η δυνατότητα γρήγορης ανίχνευσης μεγάλου αριθμού απομονώσεων μυκήτων όπως ο *B.cinerea* που αναπτύσσονται εύκολα *in vitro* και παράγουν μεγάλο αριθμό σπορίων (Lorenz, 1994). Είναι όμως πολύ λιγότερο ευαίσθητη στο να διαγνώσει χαμηλά επίπεδα ανθεκτικών βιότυπων και είναι επίσης αργή (Groves and Fox, 1988). Το



μειονέκτημα είναι ο μικρός χρόνος ανάπτυξης και η απουσία υλικού για περαιτέρω μελέτες ελέγχου άλλων ιδιοτήτων. Ο χρόνος εφαρμογής είναι περίπου από μία ως τρεις βδομάδες ενώ χρονοβόρα είναι και η διαδικασία απόκτησης μονόσπορων καλλιεργειών, προετοιμασίας των υλικών ανάπτυξης ενώ απαιτείται εργαστηριακός εξοπλισμός και εμπειρία. Επίσης πρόβλημα μπορεί να προκύψει στις δοκιμές ανίχνευσης ευαισθησίας με τη βλάστηση των σπορίων σε περιπτώσεις απομονώσεων, ιδιαίτερα ανθεκτικών, που παρουσιάζουν αργή ανάπτυξη ή παράγουν μικρό αριθμό σπορίων. Πάντως η μέθοδος ελέγχου της βλάστησης των σπορίων παρουσία μυκητοκτόνου, θεωρείται αξιόπιστη για την καταγραφή προσβολών στον αγρό που προκαλούνται από απομονώσεις του *Botrytis cinerea* ανθεκτικές στα μυκητοκτόνα (Pappas, 1997).

### Δοκιμές ευαισθησίας στο μυκήλιο

Με τις δοκιμές ευαισθησίας στο μυκήλιο, οι υψηλά ανθεκτικές απομονώσεις διακρίνονταν εύκολα γιατί η μυκηλιακή ανάπτυξη δεν επηρεάζεται ούτε σε μέσο 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  carbendazim (BenHR), diethofencarb 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Pcm HR) ή carbendazim + diethofencarb (Ben + Pcm HR). Οι μετρίως ανθεκτικές απομονώσεις αναπτύσσονται κανονικά σε συγκεντρώσεις που παρεμπόδιζαν την ανάπτυξη των ευαίσθητων απομονώσεων (1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  για το carbendazim το diethofencarb και το μίγμα τους και 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  για το iprodione) αλλά δεν αναπτύσσονταν σε συγκεντρώσεις στις οποίες αναπτύσσονταν οι υψηλά ανθεκτικές απομονώσεις (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  για το carbendazim το diethofencarb και το μίγμα τους και 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  για το iprodione).

Με τις δοκιμές ευαισθησίας στο μυκήλιο, υπάρχει διαθέσιμο υλικό για παραπέρα δοκιμές είτε σαν μέσο σύγκρισης ανθεκτικότητας ή για περισσότερο λεπτομερείς μελέτες (έλεγχος παθογένειας, προσδιορισμός βαθμού ανθεκτικότητας κ.τ.λ.). Πάντως αυτή η μέθοδος δεν είναι εφαρμόσιμη για τη διαδικασία ρουτίνας μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι χρειάζεται περισσότερη εργαστηριακή δουλειά για την απόκτηση των απομονώσεων (απομόνωση καθαρών καλλιεργειών δοκιμής), είναι αργή στην εγκατάσταση και διεξαγωγή της και μπορεί να ελεγχθεί σχετικά μικρός αριθμός απομονώσεων (Groves and Fox, 1988).

### Διαφορές στην ταξινόμηση φαινοτύπων ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα μεταξύ των δύο τεχνικών

Η ταξινόμηση σε φαινοτύπους ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα που βασίζεται στις δοκιμές ανάπτυξης του μυκηλίου ήταν σχεδόν πάντα σε συμφωνία με τις δοκιμές βλάστησης των σπορίων σε υπόστρωμα που περιείχε μυκητοκτόνο. Εξαιρέση υπήρχε στην απομόνωση A1 (Τομάτα – Τυμπάκι 97), η οποία χαρακτηρίστηκε ως αγρίου τύπου από τον τρόπο βλάστησης των σπορίων ενώ στη δοκιμή ανάπτυξης του μυκηλίου χαρακτηρίστηκε ως μετρίως ανθεκτική στα δικαρβοξυμιδικά. Είναι πιθανόν μερικές μονόσπορες καλλιέργειες να είναι ασταθείς εξαιτίας της ετεροκαρύωσης (Kerssies *et al.*, 1997) εμφανίζοντας διαφορές στην αντίδραση στα μυκητοκτόνα που θα μπορούσαν να οφείλονται στη συνύπαρξη διαφορετικών γενετικά πυρήνων σε ένα ετεροκαρυωτικό μυκήλιο. Καθώς η ετεροκαρύωση είναι κοινή σε μύκητες όπως ο *B.cinerea* (Grindle, 1979), δίνεται η δυνατότητα σε πυρήνες με γονίδια ανθεκτικότητας να επιβιώσουν σε χαμηλή συχνότητα στο μυκήλιο και έτσι η πιθανότητα αναγέννησης ενός ανθεκτικού

φαινοτύπου στη πίεση επιλογής ενός δικαρβοξυμιδικού μυκητοκτόνου αυξάνεται. Η ετεροκαρύωση δίνει τη δυνατότητα στο μύκητα να προσαρμόζεται σε αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών. Ετεροκαρυωτικοί μύκητες που έχουν αλληλόμορφα για ανθεκτικότητα ή ευαισθησία σε μυκητοκτόνα σε διάφορους πυρήνες, μπορούν να προσαρμοστούν σε διαφορετικά περιβάλλοντα, αναδιαμορφώνοντας την αναλογία των δύο ειδών πυρήνων. Πιθανώς η μονόσπορη καλλιέργεια A1 να είναι ασταθής εξαιτίας της ετεροκαρύωσης.

Εκδοχές για την διαφοροποίηση των φαινοτύπων έχουν αποδοθεί στην παρουσία μεταθετών στοιχείων (transposons) στο γένωμα του *B. cinerea* (Kerssies *et al.*, 1997), που ίσως προκαλούν αλλαγή της έκφρασης συγκεκριμένων αλληλομόρφων ίσως και των αλληλομόρφων που είναι υπεύθυνα για την έκφραση της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα. Το μεταθετό στοιχείο Flipper, που απομονώθηκε από τον *B. cinerea*, προσδιορίστηκε σαν αλληλουχία εσωνίου μέσα στη περιοχή κωδικοποίησης του γονιδίου της ρεδουκτάσης του νιτρικού (Levis *et al.*, 1997). Επίσης σε απομονώσεις του μύκητα διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός άλλου μεταθετού στοιχείου που ονομάστηκε Boty (Diolez *et al.*, 1995) το οποίο ίσως συμμετέχει στην ενδογενή γενετική αστάθεια που εμφανίζει η απομόνωση.

Ενδεχομένως και διαφορές στην πλοειδία μεταξύ των απομονώσεων του *Botrytis cinerea* θα μπορούσαν να συσχετιστούν με τη διαφοροποίηση των φαινοτύπων στις δύο μεθόδους (Buttner, 1994).

Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές ευαισθησίας στο μυκήλιο των απομονώσεων στο dichlofluanid δεν συσχετίζονταν με τα αποτελέσματα από τη δοκιμή της βλάστησης των σπορίων. Οι απομονώσεις G1 και G2 που με τις δοκιμές βλάστησης των σπορίων είχαν χαρακτηριστεί ως μειωμένης ευαισθησίας στο dichlofluanid με τη δοκιμή ανάπτυξης του μυκηλίου δεν διακρίνονταν από τις άλλες απομονώσεις που είχαν χαρακτηριστεί ευαίσθητες στο dichlofluanid. Αντίθετα όλες οι απομονώσεις εμφανίζονταν από μέτριας ως υψηλής ανθεκτικότητας στο dichlofluanid με τη δοκιμή ανάπτυξης μυκηλίου. Από τις 20 απομονώσεις που δοκιμάστηκαν, οι 6 εμφάνιζαν τιμές ED<sub>50</sub> μεγαλύτερες από 10 μg ml<sup>-1</sup> ενώ οι υπόλοιπες απομονώσεις είχαν τιμές ED<sub>50</sub>, μικρότερες από 10 μg ml<sup>-1</sup>. Στη διάρκεια της συνεχούς χρήσης του μυκητοκτόνου φαίνεται να υπάρχει μετατόπιση της αντίδρασης στο dichlofluanid του πληθυσμού του *B. cinerea* προς την κατεύθυνση της μειωμένης ευαισθησίας.

Τόσο ο Hunter *et al.*, (1988) όσο και ο Pollastro *et al.*, (1996) συμφωνούν ότι για την ταξινόμηση των απομονώσεων ως προς την ευαισθησία τους στο dichlofluanid τόσο με τη δοκιμή βλάστησης των σπορίων όσο και με τη δοκιμή παρεμπόδισης του μυκηλίου είναι καθοριστικές η προσεκτική τυποποίηση των πειραματικών συνθηκών και ο τύπος του μολύσματος. Στη δοκιμή ανάπτυξης του μυκηλίου χρειάζεται μόλυσμα νεαρής ηλικίας που συλλέγεται από τη περιφέρεια ενεργά αναπτυσσομένων αποικιών. Μυκηλιακοί δίσκοι από ηλικιωμένες αποικίες ευαίσθητων απομονώσεων συχνά παρήγαγαν τομείς ακόμη και σε MEA που περιείχε 100 μg ml<sup>-1</sup> dichlofluanid και το μυκήλιο των τομέων δεν έδειχνε μειωμένη ευαισθησία όταν δοκιμάζονταν σε περαιτέρω μελέτες (Pollastro *et al.*, 1996). Η συγκέντρωση των σπορίων ήταν καθοριστική στις δοκιμές βλάστησης των σπορίων. Όταν η πυκνότητα των σπορίων που χρησιμοποιούνταν ήταν μεγαλύτερη, τα σπόρια βλάσταναν και ανέπτυσσαν κανονικούς βλαστικούς σωλήνες ακόμη και σε συγκέντρωση 1μg ml<sup>-1</sup> σε DA (dextrose agar), ανεξάρτητα από το φαινότυπο ανθεκτικότητας (Pollastro *et al.*, 1996).

## ΑΝΑΛΥΣΗ RAPD

Από την εισαγωγή της ανάλυσης RAPD από τους Williams *et al.*, (1990), έχει αποδειχθεί ότι αυτή η τεχνική είναι ένα σημαντικό εργαλείο στη γενετική ανάλυση. Οι δείκτες RAPD, τμήματα δηλαδή DNA τα οποία αντιγράφονται από το γενωμικό DNA του μύκητα σε μια δοκιμή PCR, με τη χρήση τυχαίων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, βασίζονται στο φυσικό πολυμορφισμό που παρουσιάζει το DNA των οργανισμών (Van der Vlugt- Bergmans *et al.*, 1993). Η τεχνική αυτή φάνηκε ότι ήταν ένα χρήσιμο εργαλείο για το χαρακτηρισμό της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ απομονώσεων του *B.cinerea* γνωστού φαινότυπου ως προς την ευαισθησία τους στα μυκητοκτόνα. Σ αυτή τη γενετική ποικιλότητα αναζητήσαμε με την ανάλυση RAPD-PCR, μοριακούς δείκτες ικανούς να διακρίνουν τα στελέχη του μύκητα με διαφορετική ευαισθησία στα μυκητοκτόνα.

Οι 7 απομονώσεις που δοκιμάστηκαν στην ανάλυση RAPD επιλέχθηκαν με κριτήριο το φαινότυπο ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται στη χημική καταπολέμηση του Βοτρύτη. Ο μύκητας έχει επιλέξει στελέχη ανθεκτικά στα μυκητοκτόνα και γι' αυτό επιλέχθηκαν απομονώσεις που αντιπροσωπεύουν ένα φάσμα των φαινοτύπων που καταγράφονται στους πληθυσμούς του μύκητα. Η εύρεση μοριακών δεικτών ικανών να διακρίνουν στελέχη του μύκητα ως προς την ανθεκτικότητά τους στα μυκητοκτόνα, θα μπορούσε να αποτελέσει ένα γρήγορο και αξιόπιστο διαγνωστικό μέσο, ιδιαίτερα χρήσιμο στην παρακολούθηση της ευαισθησίας των πληθυσμών του μύκητα στα μυκητοκτόνα.

Σημαντική γενετική ποικιλότητα παρατηρήθηκε μεταξύ των 7 διαφορετικών απομονώσεων του *B.cinerea*, χρησιμοποιώντας 7 ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές με συντελεστές ομοιότητας SC που κυμαίνονταν από 0.078 ως 0.333. Όλοι οι εκκινητές παρήγαγαν από 1 ως 9 προϊόντα αντιγραφής ανά εκκινητή, με μέγεθος που κυμαίνονταν από 3 ως 0.4 kb, η πλειονότητα των οποίων είχαν μέγεθος μικρότερο από 1.6 kb. Παρόμοια γενετική ποικιλότητα στους πληθυσμούς του *B.cinerea* έχει καταγραφεί σε προηγούμενες εργασίες στις οποίες έγινε ανάλυση RAPD στον *Botrytis cinerea*, δηλώνοντας ότι υπάρχει μεγάλη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ απομονώσεων του *B.cinerea* (Thompson & Latorre, 1999; Kerssies *et al.*, 1997; Munoz *et al.*, 1999; Van der Vlugt- Bergmans *et al.*, 1993). Τα πρότυπα RAPD που αποκτήθηκαν με τους 7 εκκινητές δείχνουν ότι όλες οι απομονώσεις ήταν γενετικά διαφορετικές. Από την ανάλυση RAPDs τριών φαινοτύπων κάθε κατηγορίας και τη δημιουργία δένδρογραμμάτων με τη βοήθεια του λογισμικού Phylip 3.5, διαπιστώθηκε διαφοροποίηση των φαινοτύπων σε σαφώς καθορισμένες ομάδες. Μια ομάδα περιελάμβανε στελέχη υψηλής ανθεκτικότητας στο diethofencarb και το carbendazim και σχημάτιζε διχοτομικούς κλάδους με τους φαινότυπους Dic MR Ben MR PcmHR. Αυτές οι δύο ομάδες σχημάτιζαν διχοτομικούς κλάδους με τις απομονώσεις DichMS. Όλα τα παραπάνω στελέχη διαχωρίζονταν από την ομάδα με υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά που σχημάτιζε διχοτομικό κλάδο με την ομάδα DicMRBenHR. Τέλος το άγριο στέλεχος κατελάμβανε ξεχωριστό κλάδο με μεγάλη γενετική απόσταση από τις ομάδες των ανθεκτικών στελεχών και ξεχώριζε σαφώς από τις άλλες ομάδες απομονώσεων. Διαφορετικά πρότυπα έχουν και απομονώσεις με τον ίδιο φαινότυπο ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα που αποκτήθηκαν από διαφορετικούς ξενιστές (απομονώσεις 7a και 7b) ενώ οι απομονώσεις BenHR ομαδοποιούνταν σε διαφορετική ομάδα RAPD όταν εμφάνιζαν ταυτόχρονα φαινότυπο Pcm HR ή Dic MR κάνοντας έτσι δυνατή τη διάκριση φαινοτύπων πολλαπλής ανθεκτικότητας.



Έντονα μη πολυμορφικά τμήματα DNA αντιγράφονταν με την PCR με τους εκκινητές #84, #71 και #77. Μεταξύ των 7 απομονώσεων, ο αριθμός των διαφορετικών προτύπων RAPD ανά εκκινητή, κυμαίνονταν από 1 ως 6. Κανένας από τους εκκινητές από μόνος του δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να διαχωρίσει όλα τα στελέχη του *B.cinerea* που δοκιμάστηκαν. Παρόλα αυτά συνδυάζοντας τα πρότυπα RAPD από διαφορετικούς εκκινητές, ήταν προφανές ότι και οι 7 απομονώσεις έδειχναν πολυμορφισμούς στα κομμάτια DNA που αντιγράφονταν. Ο #82 όπως και ο # 73, παρήγαγαν πρότυπα ζωνών διαφορετικά για τις 6 από τις 7 απομονώσεις, που τις διέκριναν εύκολα από τις άλλες. Αρκετοί εκκινητές (#84, #77) παρήγαγαν κατ'επανάληψη δείκτες ταυτόσημους και για τα 7 στελέχη, δηλώνοντας ότι κάποιοι δείκτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τόσο σαν ενδοειδικοί όσο και σαν διαειδικοί δείκτες.

Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση των προτύπων RAPD με τη γεωγραφική προέλευση ή τον ξενιστή από τον οποίο απομονώθηκε το στέλεχος που δοκιμάστηκε ίσως και λόγω του μικρού αριθμού των απομονώσεων.

Η μελέτη αυτή δίνει μια πρώτη ένδειξη της δυνατότητας διάκρισης και ταξινόμησης στελεχών του *B.cinerea* ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα με μοριακούς δείκτες, με ανάλυση RAPD- PCR. Για να εφαρμοστεί η τεχνική αυτή σαν διαγνωστικό μέσο στην ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών σε πληθυσμούς του *B.cinerea* χρειάζεται να γίνουν πρόσθετες μελέτες στις οποίες θα χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερος αριθμός απομονώσεων, ώστε να πιστοποιηθούν τόσο η αξιοπιστία όσο και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων της τεχνικής αλλά και οι περιορισμοί της μεθόδου. Επίσης θα πρέπει να συνυπολογιστεί και το αυξημένο κόστος της μεθόδου σε σύγκριση με τις κλασσικές βιοδοκιμές σε άγαρ.

Ένας περιορισμός της μεθόδου είναι η εμφάνιση ή εξαφάνιση RAPD δεικτών που παρατηρείται σε διαφορετικές αναλύσεις RAPD. Καθώς η ένταση των προϊόντων αντιγραφής στο πήκτωμα μπορεί να ποικίλει ελαφρά μεταξύ δύο διαφορετικών δειγμάτων DNA του ίδιου στελέχους ή ακόμη και μεταξύ δύο ταυτόσημων αντιδράσεων που τρέχουν σε διαφορετικές μέρες, η επιλογή των ζωνών που θα σημειωθούν σαν μοριακοί δείκτες και θα χρησιμοποιηθούν στην ταξινόμηση των στελεχών πρέπει να είναι προσεκτική (Van der Vlugt- Bergmans *et al.*, 1993). Ως τέτοιοι δείκτες επιλέγονται προϊόντα αντιγραφής που παράγονται κατ'επανάληψη και βάφονται έντονα με τη χρωστική

Η εμφάνιση ή εξαφάνιση δεικτών RAPD θα μπορούσε να είναι πιθανόν ένας περιορισμός της τεχνικής RAPD καθώς τα πρότυπα RAPD που προκύπτουν διαφοροποιούνται και η σύγκριση γίνεται δύσκολη. Στην περίπτωση του *B.cinerea* σημασία πρέπει να δοθεί στην ετεροκαρυωτική φύση του μύκητα. Έχει δείχθει ότι στο μυκήλιο του μύκητα υπάρχει ένας πληθυσμός πυρήνων και μια συνεχής ροή πυρήνων στο μυκήλιο του μύκητα. Στελέχη του μύκητα εμφανίζονται ετεροκαρυωτικά λόγω της παρουσίας ενός μίγματος πυρήνων είτε σε ένα θαλλό (ετεροκάρυο) είτε σε πολλούς θαλλούς (μίγμα ομοκάρυων). Η ποικιλότητα αυτή στον αριθμό των πυρήνων, θα μπορούσε να αλλάξει το γενετικό υπόβαθρο και να επηρεάσει τον ανταγωνισμό των τμημάτων του DNA που πρόκειται να αντιγραφούν στην ανάλυση RAPD. Έτσι αν σε μια απομόνωση που δοκιμάζεται, συμμετέχει στο σχηματισμό του ετεροκάρυου ένας πυρήνας ο οποίος δεν κωδικοποιεί για ένα συγκεκριμένο δείκτη RAPD η παρουσία του οποίου ελέγχεται, αυτός ο συγκεκριμένος δείκτης δεν θα σημειωθεί στο πρότυπο RAPD της απομόνωσης που θα προκύψει. Παρόμοια αν ένας δείκτης RAPD είναι παρόν σε ένα πυρήνα ο οποίος όμως εμφανίζεται σε χαμηλή συχνότητα στον πληθυσμό των πυρήνων του στελέχους, αυτός ο δείκτης μπορεί να μην ανιχνευθεί λόγω φαινομένων επικάλυψης. Στην



επίδραση της ετεροκαρύωσης στην εμφάνιση ή εξαφάνιση δεικτών στα πρότυπα RAPD, αναφέρεται ο Van der Vlugt – Bergmans *et al.*, (1993),

Κατά την αντιγραφή τμημάτων γενομικού DNA υπάρχει έντονος ανταγωνισμός μεταξύ των αλληλουχιών DNA (Van der Vlugt – Bergmans *et al.*, (1993) και πιθανόν ο ανταγωνισμός ειδικά από DNA από άλλες πηγές κατά τη διάρκεια της αντιγραφής έχει σαν αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται ένα τμήμα DNA (Thompson & Latorre, 1999), γι αυτό πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα για την αποφυγή μολύνσεων με ξένο DNA κατά τη διάρκεια των δοκιμών. Οι συνθήκες στις οποίες οι πολυμορφισμοί είχαν αρχικά βρεθεί πρέπει να ακολουθούνται πιστά καθώς η επαναληψιμότητα της ανάλυσης εξαρτάται πλήρως από τις συνθήκες της αντίδρασης (Van der Vlugt – Bergmans *et al.*, 1993).

Από τα δεδομένα της εργασίας αυτής προκύπτει αναμφίβολα η δυνατότητα ταυτοποίησης των διαφόρων ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα στελεχών του *Botrytis cinerea* με ανάλυση RAPDs παρέχοντας τη δυνατότητα ταξινόμησης των διαφόρων στελεχών με μοριακούς δείκτες ενώ ενισχύεται η άποψη ύπαρξης γενετικής φύσεως ανθεκτικότητας και παρέχεται η δυνατότητα προσδιορισμού τυχόν γενετικής φύσεως συγγένειας μεταξύ των διαφόρων ανθεκτικών φαινοτύπων.

## Μέρος Γ΄: Παράρτημα Παρουσίασης Δεδομένων

**Πίνακας 2.1.** Μέθοδος ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα στελεχών του *B. cinerea*, με βάση τον τρόπο βλάστησης των спорίων. Πηγή: Μπέσα, 1995.

| ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ  | ΜΑΡΤΥΡΑΣ | DICHLORFLUANID | IPRODIONE | CARBENDAZIM | DIETHOFENCARB | CARBENDAZIM +<br>DIETHOFENCARB |
|--|----------|----------------|-----------|-------------|---------------|--------------------------------|
| ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (µg / ml)  |          | 1              | 3         | 10          | 100           | 100                            |
| ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ<br>ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ   |          | 3              | 3         | 10          | 100           | 100                            |
| Άγριο  |          |                |           |             |               |                                |
| Μειωμένης ευαισθησίας<br>στο dichlorfluanid                                  |          |                |           |             |               |                                |
| Μετριας ανθεκτικότητας<br>στα dicarboximidides                               |          |                |           |             |               |                                |
| Υψηλής ανθεκτικότητας<br>στα dicarboximidides                                |          |                |           |             |               |                                |
| Μετριας ανθεκτικότητας<br>στα benzimidazoles                                 |          |                |           |             |               |                                |
| Υψηλής ανθεκτικότητας<br>στα benzimidazoles                                  |          |                |           |             |               |                                |
| Διασταυρωτής<br>ανθεκτικότητας στα<br>benzimidazoles και<br>phenylcarbamides |          |                |           |             |               |                                |

1. Ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών του *Botrytis cinerea* στα μυκητοκτόνα

**Πίνακας 2.2.** Ανίχνευση ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα επιλεγμένων απομονώσεων *Botrytis cinerea*. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση x10, για τον προσδιορισμό σπορίων που έχουν βλαστήσει και του τρόπου που έχουν βλαστήσει μετά από επώαση στους 22° C για 20h, σε ΜΕΑ εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )

|           |                        | Συγκέντρωση μυκητοκτόνου ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) |   |           |     |              |     |               |     |                             |     |
|-----------|------------------------|--|---|-----------|-----|--------------|-----|---------------|-----|-----------------------------|-----|
|           |                        | Dichlofluanid                                      |   | Iprodione |     | Carben-dazim |     | Diethofencarb |     | Carbendazim + diethofencarb |     |
| Απομόνωση | Πηγή                   | 1  | 3 | 3         | 10  | 1            | 100 | 1             | 100 | 1                           | 100 |
| A1        | Τομάτα, Βόλος 97       | -  | - | -         | -   | +/-          | +/- | +             | +   | +/-                         | +/- |
| A2        | Τομάτα, Τυμπάκι 93     | -  | - | -         | -   | +/-          | +/- | +             | +   | +/-                         | +/- |
| A3        | Τομάτα, Βόλος 97       | -  | - | -         | -   | +/-          | +/- | +             | +   | +/-                         | +/- |
| B1        | Τομάτα, Τυμπάκι 94     | -  | - | +         | +/- | +            | +/- | +             | +   | +                           | +/- |
| B2        | Αεροπαγίδα Τυμπάκι 94  | -  | - | +         | +/- | +            | +/- | +             | +   | +                           | +/- |
| B3        | Τομάτα, Τυμπάκι 95     | -  | - | +         | +/- | +            | +/- | +             | +   | +                           | +/- |
| C1        | Τομάτα, Βόλος 94       | -  | - | -         | -   | +            | +   | +/-           | +/- | +/-                         | +/- |
| C2        | Τομάτα, Τυμπάκι 94     | -  | - | -         | -   | +            | +   | +/-           | +/- | +/-                         | +/- |
| C3        | Τομάτα, Τυμπάκι 95     | -  | - | -         | -   | +            | +   | +/-           | +/- | +/-                         | +/- |
| D1        | Αγγούρι, Ισραήλ, 89    | -  | - | -         | -   | +            | +   | +             | +   | +                           | +   |
| D2        | Αεροπαγίδα, Τυμπάκι 96 | -  | - | -         | -   | +            | +   | +             | +   | +                           | +   |
| D3        | Αεροπαγίδα, Τυμπάκι 96 | -  | - | -         | -   | +            | +   | +             | +   | +                           | +   |
| E1        | Μελιντζάνα Κυπαρισσία  | -  | - | +         | +/- | +            | +/- | +             | +   | +                           | +/- |
| E5        | Μελιντζάνα Κυπαρισσία  | -  | - | +         | +/- | +            | +/- | +             | +   | +                           | +/- |
| E6        | Τομάτα, Τυμπάκι 93     | -  | - | +         | +/- | +            | +/- | +             | +   | +                           | +/- |
| F2        | Τομάτα, Τυμπάκι 95     | -  | - | +         | +/- | +            | +   | +/-           | +/- | +/-                         | +/- |
| F3        | Καλανγχόα, Κρόκιο 99   | -  | - | +         | +/- | +            | +   | +/-           | +/- | +/-                         | +/- |
| F5        | Καλανγχόα, Κρόκιο 99   | -  | - | +         | +/- | +            | +   | +/-           | +/- | +/-                         | +/- |
| G1        | Σταφύλια, Γαλλία 93    | +/-  | - | +         | +/- | +            | +/- | +             | +   | +                           | +/- |
| G2        | Τριαντάφυλλα           | +/-  | - | +         | +/- | +            | +/- | +             | +   | +                           | +/- |

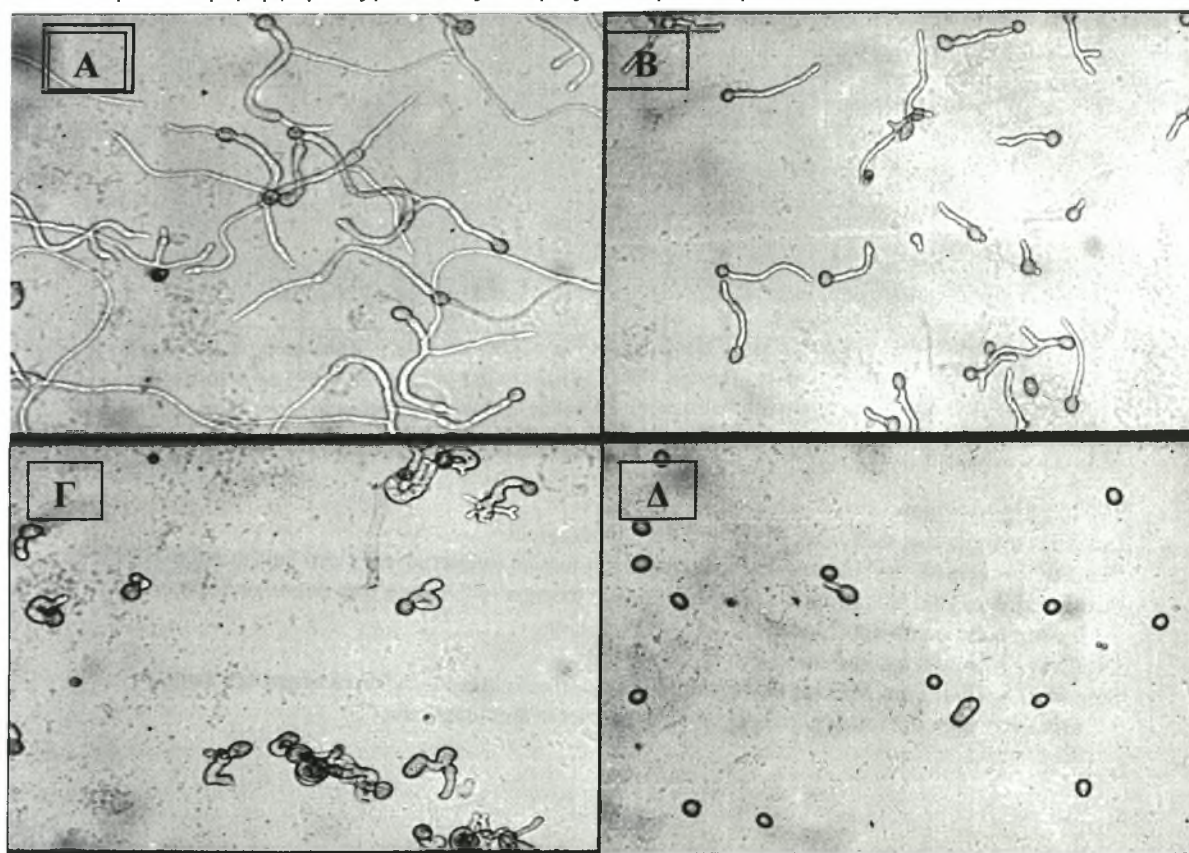
- +, κανονική βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα  
+/-, βλάστηση σπορίων με κοντό ή παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα  
-, μη βλάστηση σπορίων μετά από επώαση στους 20 °C στο σκοτάδι για 20 ώρες



**Πίνακας 2.3.** Επιδράσεις των μυκητοκτόνων στη βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα σε απομονώσεις του *Botrytis cinerea*, μετά από επώαση στους 22 °C για 20 h. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση x 10.

|   | Συγκέντρωση μυκητοκτόνου (μg ml <sup>-1</sup> ) |               |   |           |    |             |     |               |     |                             |     |
|---|---|---------------|---|-----------|----|-------------|-----|---------------|-----|-----------------------------|-----|
|   | Μάρτυρας  | Dichlofluamid |   | Iprodione |    | Carbendazim |     | diethofencarb |     | Carbendazim + diethofencarb |     |
| Φαινότυπος <sup>a</sup>                     | 0   | 1             | 3 | 3         | 10 | 1           | 100 | 1             | 100 | 1                           | 100 |
| W   | A <sup>β</sup>                                  | Δ             | Δ | Δ         | Δ  | Γ           | Γ   | A             | A   | Γ                           | Γ   |
| DicMR, PcmHR                                | A   | -             | - | A         | B  | Γ           | Γ   | A             | A   | Γ                           | Γ   |
| BenHR, Pcm S                                | A   | -             | - | -         | -  | A           | A   | Γ             | Γ   | Γ                           | Γ   |
| BenHR PcmHR<br>Ben+ Pcm HR                  | A   | -             | - | -         | -  | A           | A   | A             | A   | A                           | A   |
| DicMR, Ben MR<br>PcmHR<br>Ben+PcmMR         | A   | -             | - | A         | B  | A           | Γ   | A             | A   | A                           | Γ   |
| DicMR, BenHR<br>PcmS, Ben+Pcm S             | A   | -             | - | A         | B  | A           | A   | Γ             | Γ   | Γ                           | Γ   |
| Dich MS, DicMR<br>BenMR PcmHR,<br>Ben+PcmMR | A   | B             | Δ | A         | B  | A           | Γ   | A             | A   | A                           | Γ   |
| DicMR, BenHR<br>PcmHR Ben+PcmS              | A   | -             | - | A         | B  | A           | A   | A             | A   | Γ                           | Γ   |

<sup>a</sup>W: άγριου τύπου, DicMR μετρίας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξυμιδικά, BenHR υψηλή ανθεκτικότητα, BenMR μετρίας ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, PcmHR υψηλή ανθεκτικότητα στα φαινυλοκαρβαμιδικά, (Ben+ Pcm) HR και (Ben+ Pcm) MR : υψηλή και ενδιάμεση ανθεκτικότητα στο μίγμα carbendazim + diethofencarb αντίστοιχα, DichMS: μειωμένης ευαισθησίας στο dichlofluamid  
<sup>β</sup>A, κανονική βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα, B, κοντή ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα, Γ παραμορφωμένος βλαστικός σωλήνας Δ, σπόρια δεν βλαστάνουν.



**Εικόνα 2.1 :** A: κανονική βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα. B: κοντή ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα. Γ: παραμορφωμένος βλαστικός σωλήνας. Δ: κονίδια που δεν βλαστάνουν



## 2. Μέτρηση της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα, ανάλογα με τον τρόπο βλάστησης των σπορίων. Κατάταξη των απομονώσεων στους αντίστοιχους φαινοτύπους ανθεκτικότητας με βάση τις τιμές MIC.

**Πίνακας 2.4.** Ευαισθησία επιλεγμένων απομονώσεων του *Botrytis cinerea* στα μυκητοκτόνα, εκφρασμένη ως ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση μυκητοκτόνου (minimum inhibitory concentration, MIC), για τη βλάστηση των σπορίων ή την κανονική ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα. Κατάταξη των απομονώσεων στους αντίστοιχους φαινοτύπους ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα με βάση τις τιμές MIC.

| MIC για τη βλάστηση των σπορίων ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) |                              |               |           |             |               |                             |
|---|------------------------------|---------------|-----------|-------------|---------------|-----------------------------|
| Απομόνωση   | Φαινότυπος                   | Dichlofluanid | Iprodione | Carbendazim | Diethofencarb | Carbendazim + diethofencarb |
| A1  | Wild <sup>a</sup>            | <1            | <3        | <1          | >100          | <1                          |
| A2  | Pcm HR                       | <1            | <3        | <1          | >100          | <1                          |
| A3  |                              | <1            | <3        | <1          | >100          | <1                          |
| B1  | DicMR<br>Pcm HR              | <1            | 10        | <1          | >100          | <1                          |
| B2  |                              | <1            | 10        | <1          | >100          | <1                          |
| B3  |                              | <1            | 10        | <1          | >100          | <1                          |
| C1  | BenHR                        | <1            | <3        | >100        | <1            | <1                          |
| C2  | Pcm S                        | <1            | <3        | >100        | <1            | <1                          |
| C3  |                              | <1            | <3        | >100        | <1            | <1                          |
| D1  | BenHR<br>PcmHR               | <1            | <3        | >100        | >100          | >100                        |
| D2  | Ben +Pcm HR                  | <1            | <3        | >100        | >100          | >100                        |
| D3  |                              | <1            | <3        | >100        | >100          | >100                        |
| E1  | DicMR<br>Ben MR              | <1            | 10        | >1          | >100          | 1                           |
| E5  | PcmHR                        | <1            | 10        | >1          | >100          | 1                           |
| E6  | Ben+PcmMR                    | <1            | 10        | >1          | >100          | 1                           |
| F2  | DicMR<br>BenHR               | <1            | 10        | >100        | <1            | <1                          |
| F3  | PcmS                         | <1            | 10        | >100        | <1            | <1                          |
| F5  | Ben+Pcm S                    | <1            | 10        | >100        | <1            | <1                          |
| G1  | DichMS, DicMR                | 1             | 10        | 1           | >100          | 1                           |
| G2  | BenMR<br>PcmHR<br>Ben+Pcm MR | 1             | 10        | 1           | >100          | 1                           |

<sup>a</sup> Wild : άγριου τύπου,

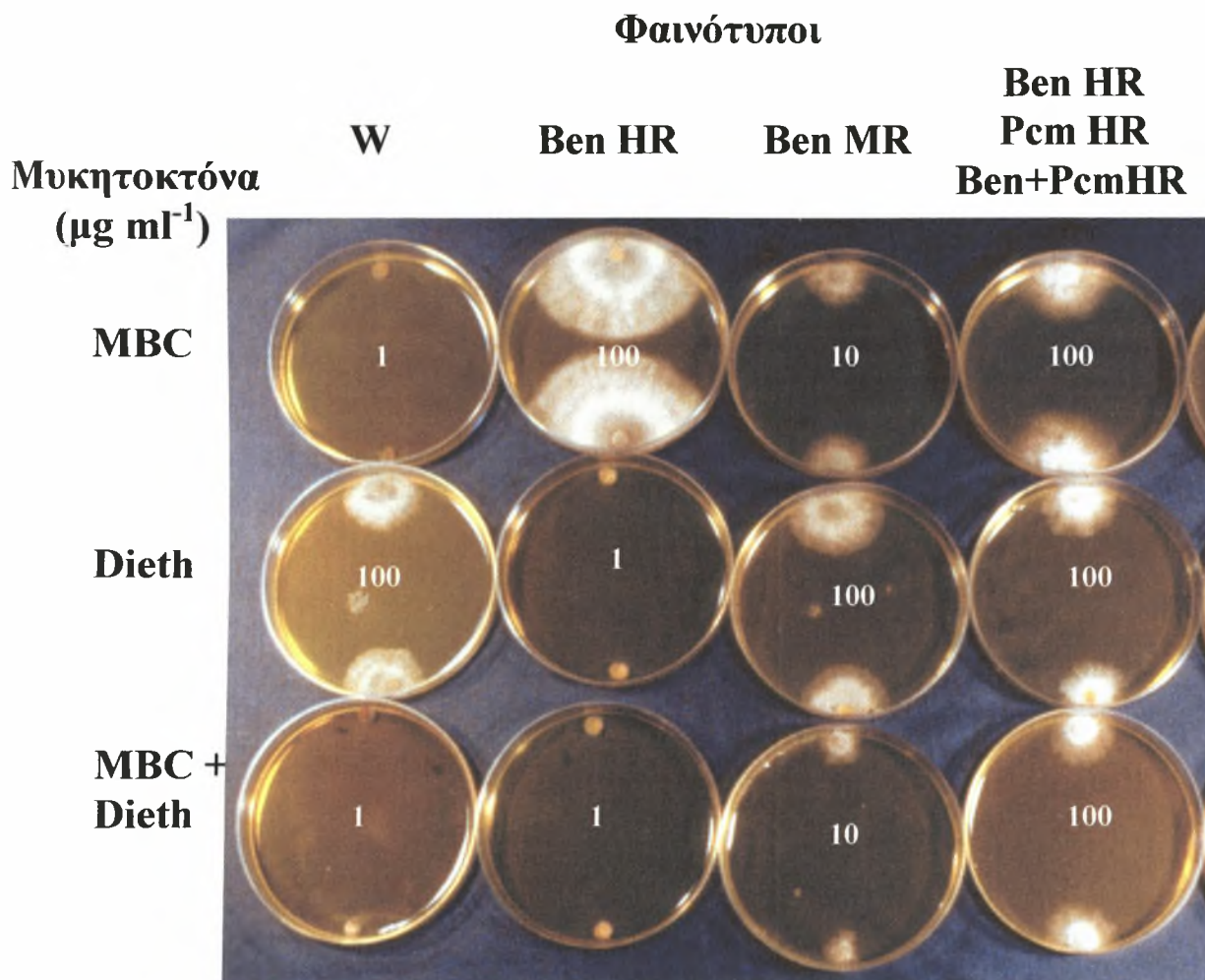
Dic MR : ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στα δικαρβοξυμιδικά

Ben MR και BenHR: ενδιάμεση ανθεκτικότητα και υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά  
Pcm S και Pcm HR: Ευαισθησία και υψηλή ανθεκτικότητα αντίστοιχα στα φαινυλοκαρβαμιδικά  
(ανθεκτικότητα αγρίου τύπου)

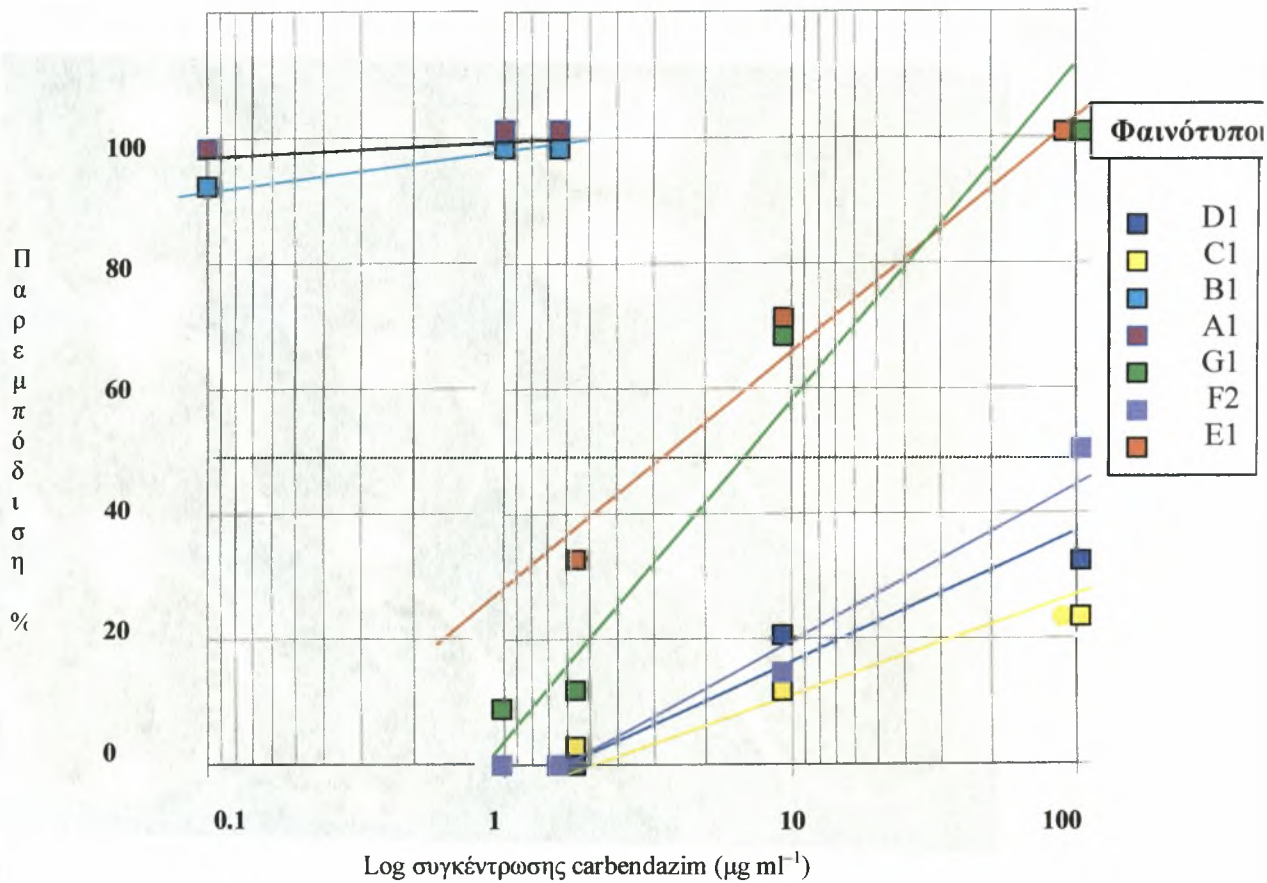
Dich MS : Μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid.

Ben+Pcm S, Ben+Pcm MR και Ben+Pcm HR, ευαισθησία, μέτρια ανθεκτικότητα και υψηλή ανθεκτικότητα αντίστοιχα στο μίγμα carbendazim + diethofencarb.

3. Μέτρηση της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα, ανάλογα με την παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μυκηλίου.

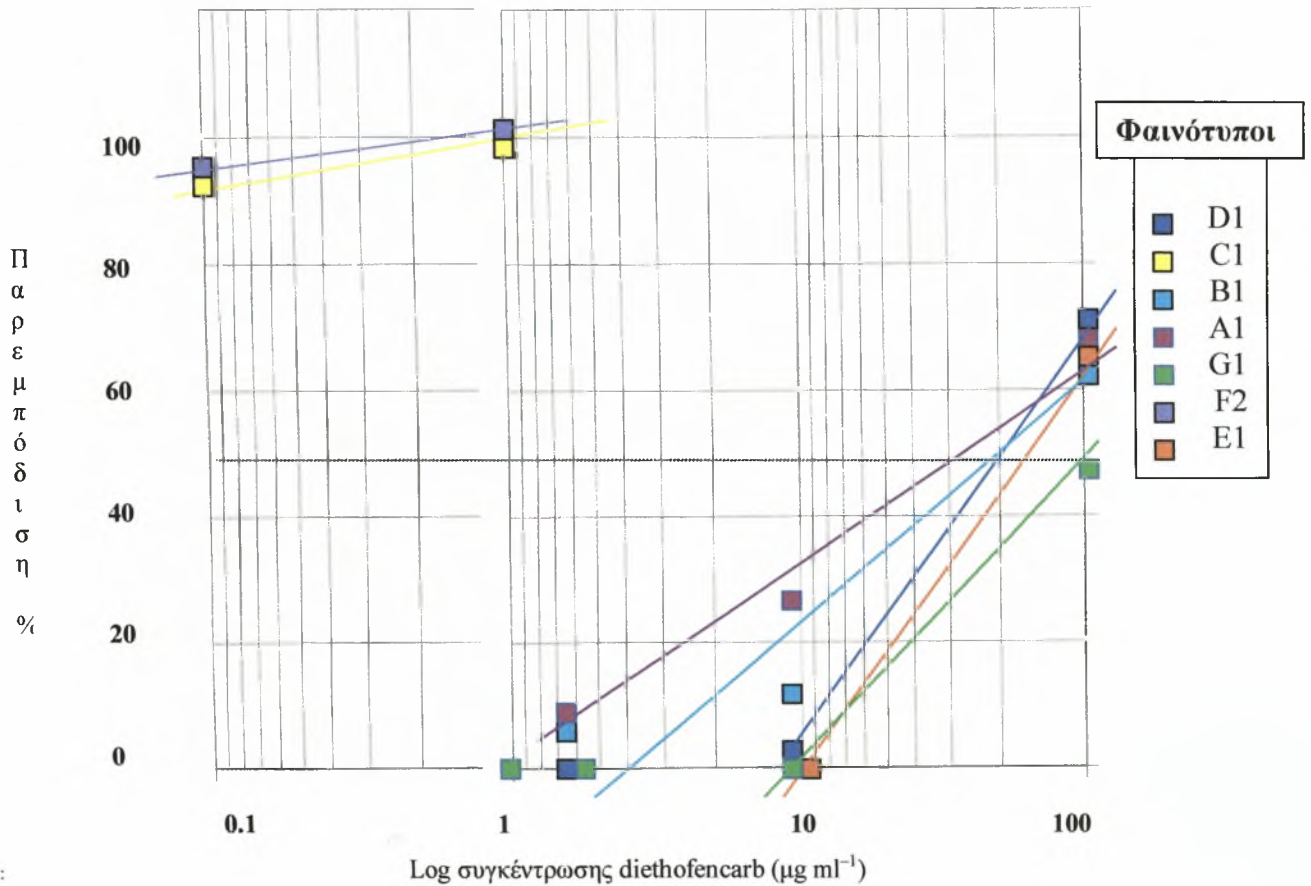


**Εικόνα 2.2 :** Φαινότυποι ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά (Ben), Φαινυλοκαρβαμιδικά (Pcm) και στο μίγμα τους (Ben+Pcm) (W= ευαίσθητος, MR= μετρίας ανθεκτικότητας, HR= υψηλής ανθεκτικότητας) απομονώσεων του *B. cinerea*, όπως αναπτύσσονται σε MEA εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις carbendazim (MBC), diethofencarb (Dieth) και του μίγματος MBC+ Dieth (σε  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

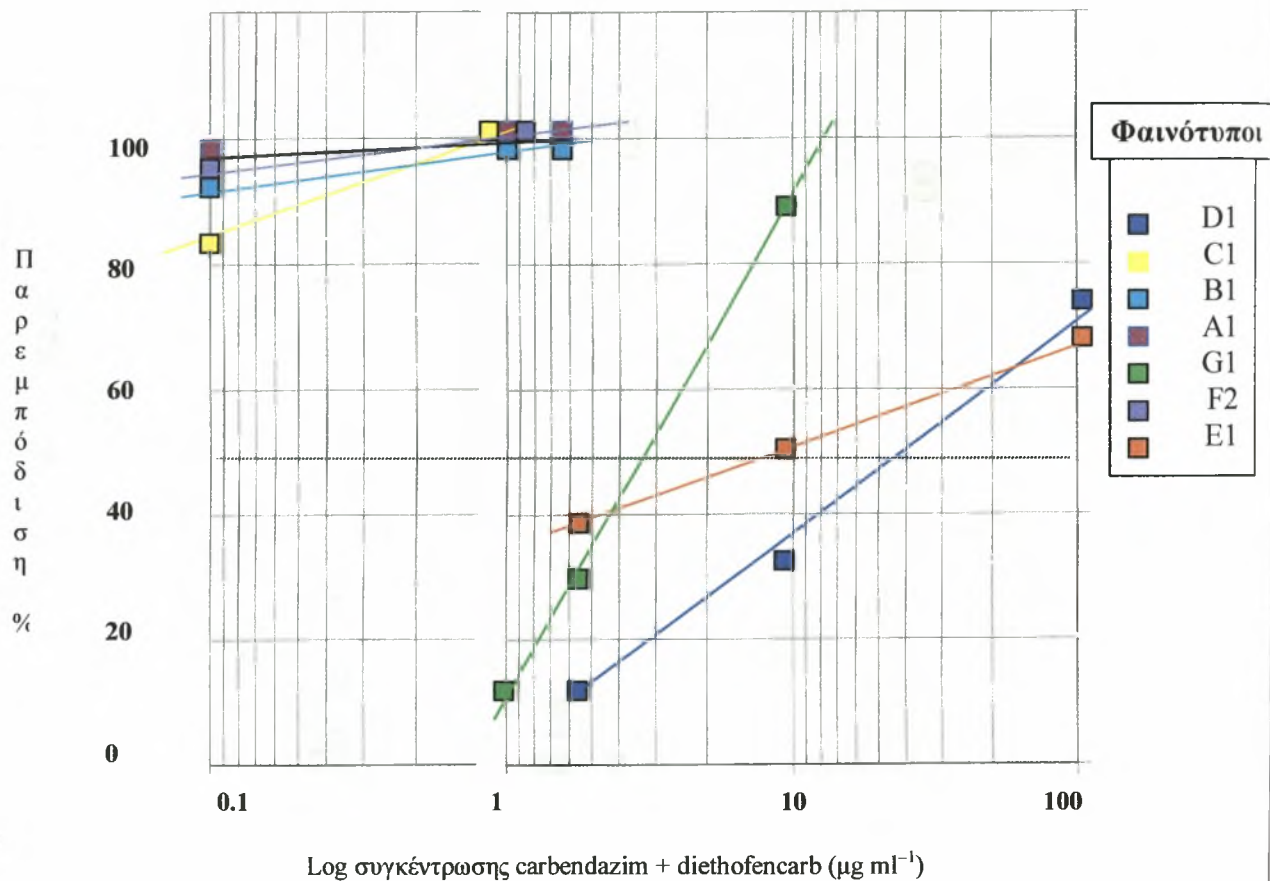


**Διάγραμμα 2.1.** Αντιπροσωπευτικές καμπύλες δόσης carbendazim – παρεμπόδισης στην ανάπτυξη του μυκηλίου απομονώσεων του *B. cinerea* που αναπτύσσονται σε MEA εμπλουτισμένο με carbendazim σε διάφορες συγκεντρώσεις ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Ξεχωρίζουν τρεις ομάδες φαινοτύπων, οι απομονώσεις που είναι ευαίσθητες στο carbendazim (A1, B1) με  $ED_{50}$  0.05, οι απομονώσεις με μέτρια ανθεκτικότητα στο carbendazim (B1, G1) με  $ED_{50}$  8 και 9 και οι απομονώσεις με υψηλή ανθεκτικότητα (D1, C1, F2) με τιμές  $ED_{50}$  μεγαλύτερες από 100.

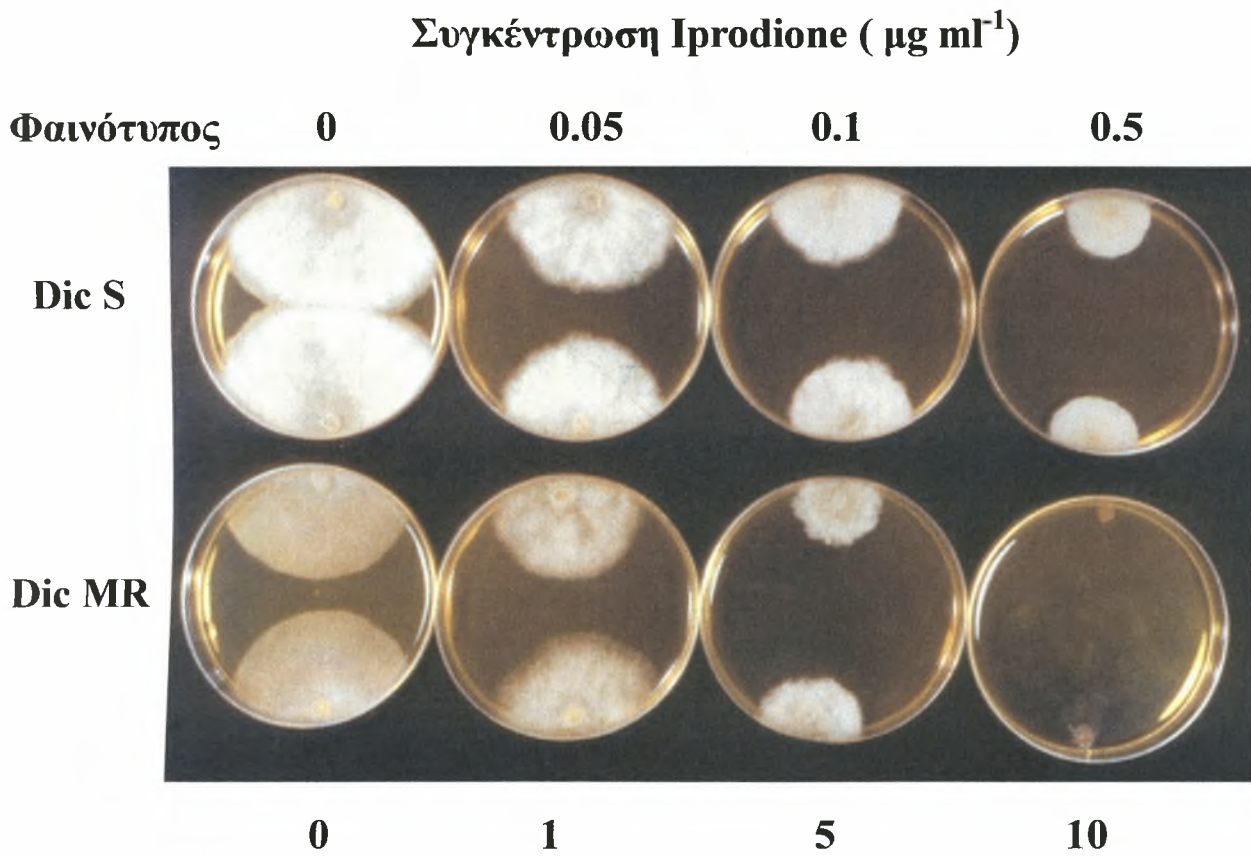




**Διάγραμμα 2.2.** Αντιπροσωπευτικές καμπύλες δόσης diethofencarb – παρεμπόδισης στην ανάπτυξη του μυκηλίου απομονώσεων του *B. cinerea* που αναπτύσσονται σε MEA εμπλουτισμένο με diethofencarb σε διάφορες συγκεντρώσεις ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Ξεχωρίζουν δύο ομάδες φαινοτύπων, οι απομονώσεις που είναι ευαίσθητες στο diethofencarb (C1, F2) με  $ED_{50}$  0.05 και οι απομονώσεις με υψηλή ανθεκτικότητα στο diethofencarb (D1,G1,E1,B1, A1) με τιμές  $ED_{50}$  από 80 ως 100.

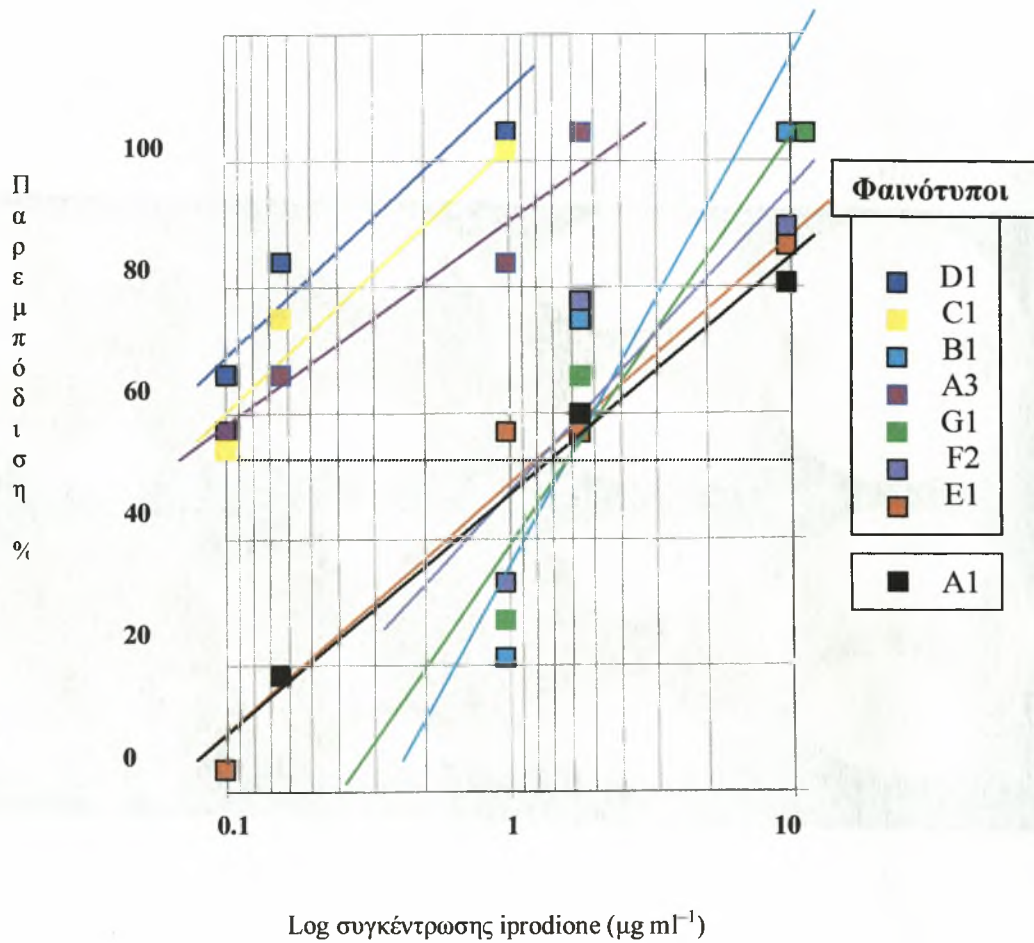


**Διάγραμμα 2.3.** Αντιπροσωπευτικές καμπύλες δόσης μίγματος carbendazim + diethofencarb (Sumico) – παρεμπόδισης στην ανάπτυξη του μυκηλίου απομονώσεων του *B. cinerea* που αναπτύσσονται σε ΜΕΑ εμπλουτισμένο με Sumico σε διάφορες συγκεντρώσεις ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Ξεχωρίζουν τρεις ομάδες φαινοτύπων, οι απομονώσεις που είναι ευαίσθητες στο Sumico (C1, B1, F2, A1) με  $\text{ED}_{50}$  0.05, οι απομονώσεις με μέτρια ανθεκτικότητα στο Sumico (E1, G1) με  $\text{ED}_{50}$  8 και 10 και η απομόνωση με υψηλή ανθεκτικότητα (D1) με  $\text{ED}_{50}$  70.

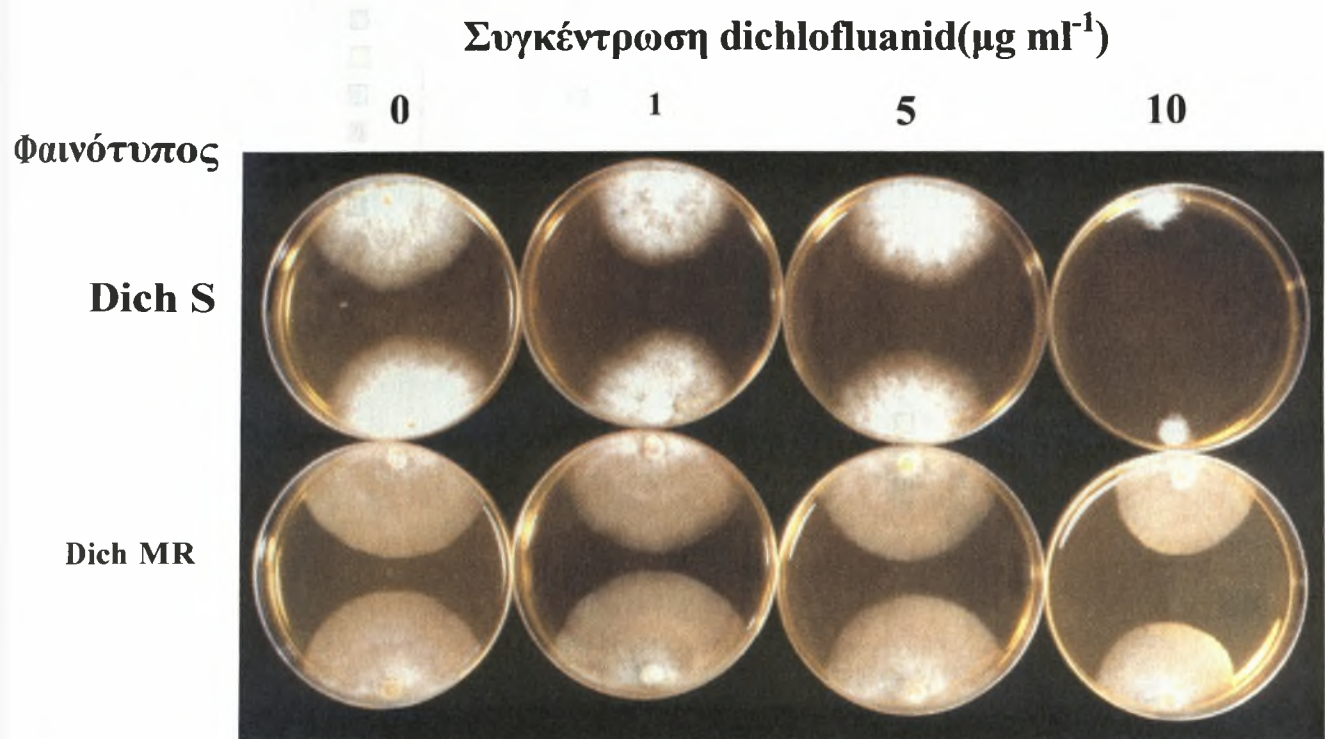


**Εικόνα 2.3 :** Φαινότυποι ανθεκτικότητας στο iprodione, (DicS= ευαίσθητοι, MR= μετρίου ανθεκτικότητας) όπως αναπτύσσονται σε MEA εμπλουτισμένο με συγκεντρώσεις iprodione (σε  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

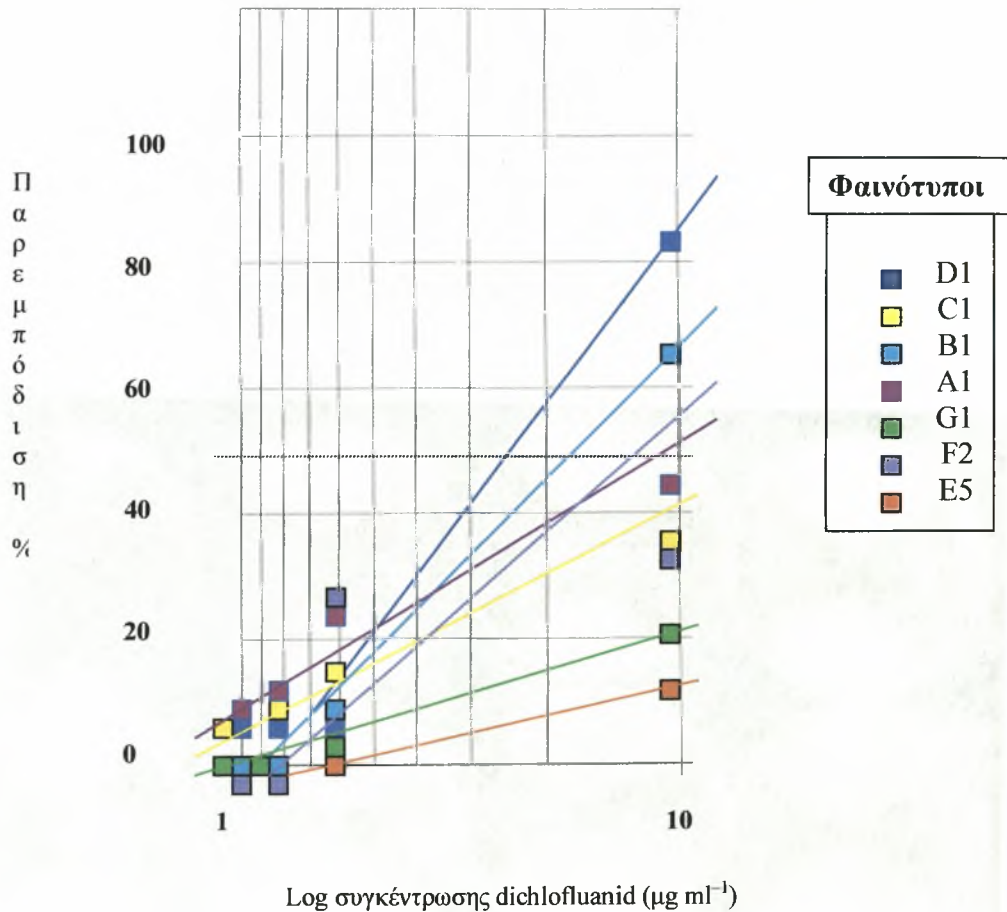




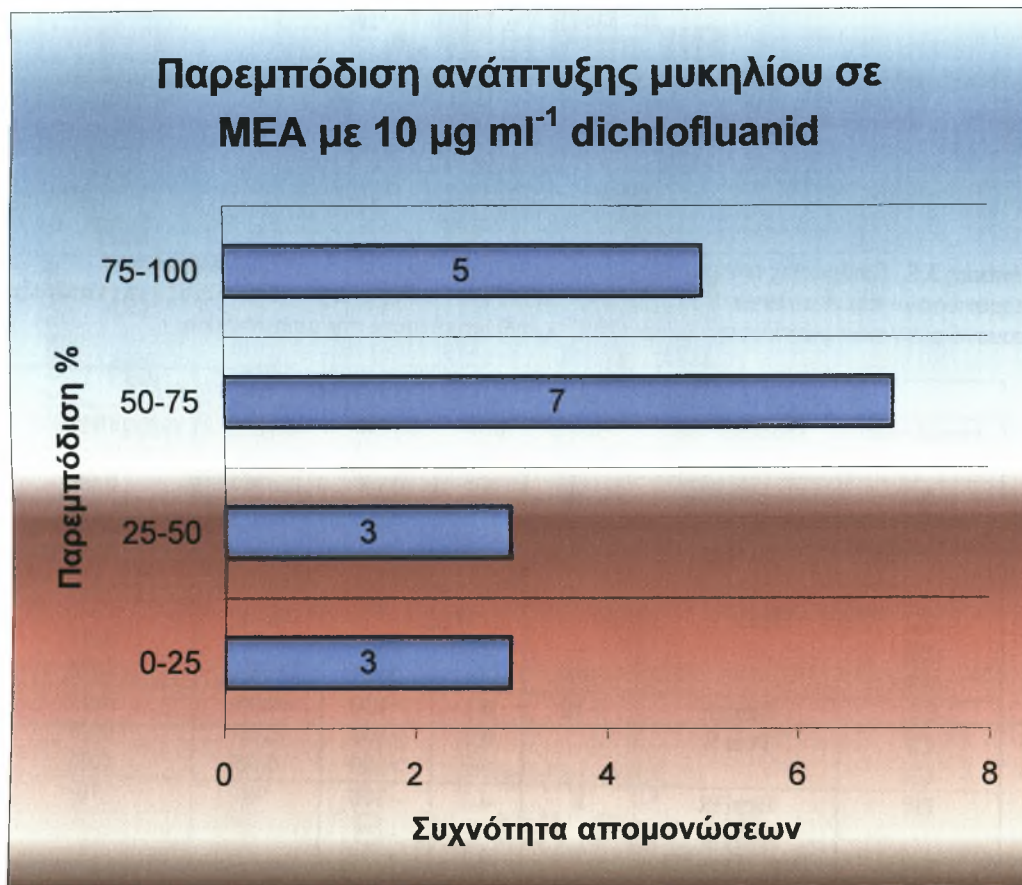
**Διάγραμμα 2.4.** Αντιπροσωπευτικές καμπύλες δόσης iprodione – παρεμπόδισης στην ανάπτυξη του μυκηλίου απομονώσεων του *B. cinerea* που αναπτύσσονται σε ΜΕΑ εμπλουτισμένο με iprodione σε διάφορες συγκεντρώσεις ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Ξεχωρίζουν δύο ομάδες φαινότυπων, οι απομονώσεις που είναι ευαίσθητες στο iprodione (D1, C1, A3) με  $ED_{50}$  0.1 και οι απομονώσεις με μέτρια ανθεκτικότητα στο iprodione (B1, G1, F2, E1 καθώς και η A1) με τιμές  $ED_{50}$  από 3 ως 5.



**Εικόνα 2.4** . Φαινότυποι ανθεκτικότητας στο dichlofluanid (DichS = ευαίσθητος, MS = μειωμένης ευαισθησίας) όπως αναπτύσσονται σε ΜΕΑ που περιέχει dichlofluanid σε διάφορες συγκεντρώσεις (σε  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).



**Διάγραμμα 2.5.** Αντιπροσωπευτικές καμπύλες δόσης dichlofluanid- παρεμπόδισης στην ανάπτυξη του μυκηλίου σε ΜΕΑ, απομονώσεων του *B. cinerea*. Δεν διακρίνεται σαφής διαχωρισμός ομάδων φαινότυπων. Ξεχωρίζουν οι φαινότυποι C1, G1, E5 με τιμές  $ED_{50}$  μεγαλύτερες από 10 και οι φαινότυποι D1, B1, F2 και A1 με τιμές  $ED_{50}$  μικρότερες από 10.



**Διάγραμμα 2.6:** Παρεμπόδιση ανάπτυξης μυκηλίου 18 απομονώσεων *B. cinerea*, σε ΜΕΑ εμπλουτισμένο με 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  dichlofluanid.



### Κατάταξη των απομονώσεων στους αντίστοιχους φαινότυπους ανθεκτικότητας με βάση τις τιμές ED<sub>50</sub>.

**Πίνακας 2.5.** Επιδράσεις των μυκητοκτόνων στην ανάπτυξη του μυκηλίου επιλεγμένων απομονώσεων του *B. cinerea*. Υπολογισμός τιμών ED<sub>50</sub> για τη μυκηλιακή ανάπτυξη και κατάταξη των απομονώσεων στους αντίστοιχους φαινότυπους ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα.

| Τιμές ED <sub>50</sub> για την ανάπτυξη του μυκηλίου (σε µg ml <sup>-1</sup> ) |                      |               |            |              |                |                             |
|--|----------------------|---------------|------------|--------------|----------------|-----------------------------|
| Απομόνωση  | Φαινότυπος           | dichlofluanid | ipro dione | carben dazim | dietho fencarb | carbendazim + diethofencarb |
| A2   | Wild <sup>a</sup>    | 10            | 0,2        | 0,05         | 80             | 0,05                        |
| A3   | PcmHR                | 10            | 0,1        | 0,05         | -              | 0,05                        |
| B1   | DicMR<br>PcmHR       | 9             | 4          | 0,05         | 90             | 0,05                        |
| B2   |                      | -             | -          | -            | -              | -                           |
| B3   |                      | -             | 4          | 0,05         | -              | 0,05                        |
| A1   |                      | 10            | 3          | 0,05         | 80             | 0,05                        |
| C1   | BenHR                | >10           | 0,1        | >100         | 0,05           | 0,05                        |
| C2   | Pcm S                |               | 0,1        | >100         | 0,05           | 0,05                        |
| C3   |                      |               | 0,1        | >100         | 0,05           | 0,05                        |
| D1   | BenHR<br>PcmHR       | 8             | 0,1        | >100         | 90             | 70                          |
| D2   | Ben +Pcm HR          | -             | 0,1        | >100         | -              | -                           |
| D3   |                      | -             | 0,1        | >100         | -              | -                           |
| E1   | DicMR<br>Ben MR      | -             | 3          | 8            | 90             | 10                          |
| E5   | PcmHR                | >10           | 4          | 9            | 100            | 8                           |
| E6   | Ben+PcmMR            | -             | -          | -            | -              | -                           |
| F2   | DicMR<br>BenHR       | >10           | 3          | >100         | 0,05           | 0,05                        |
| F3   | PcmS                 |               | 1          | >100         | 0,05           | 0,05                        |
| F5   | Ben+Pcm S            |               | 1          | >100         | 0,05           | 0,05                        |
| G1   | DicMR BenMR          | >10           | 5          | 9            | 100            | 8                           |
| G2   | PcmHR,<br>Ben+Pcm MR | -             | 4          | 8            | -              | -                           |

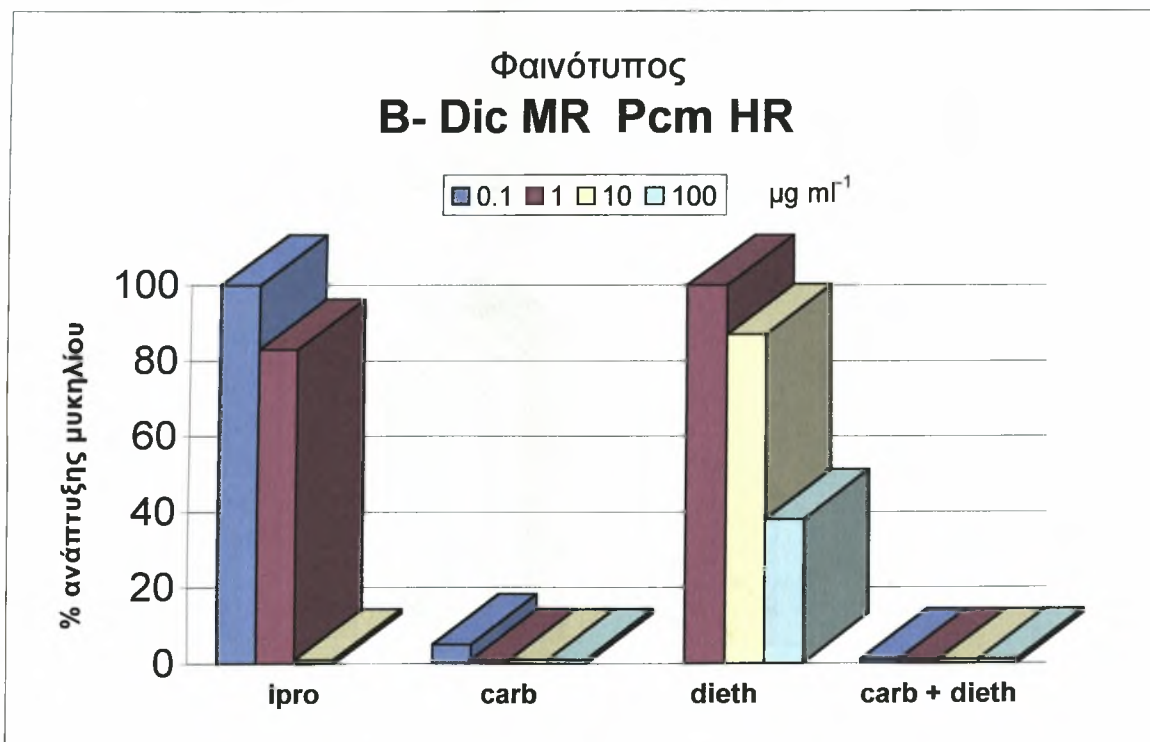
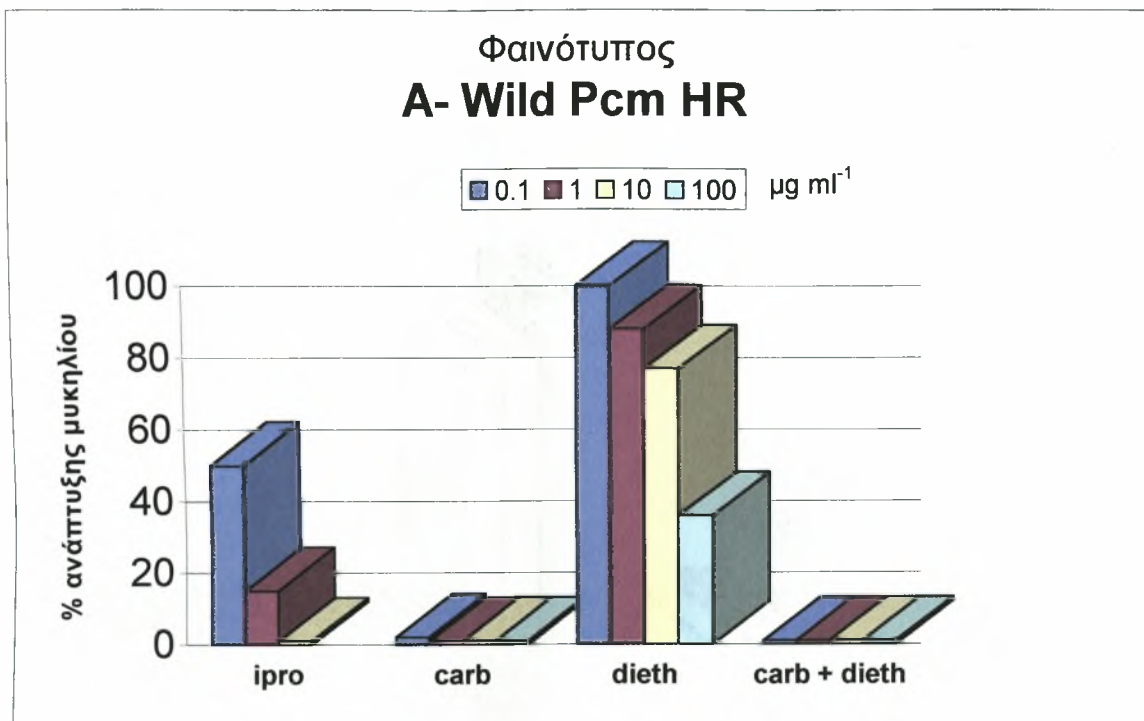
<sup>a</sup>Wild : άγριου τύπου,

Dic MR : μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμικά

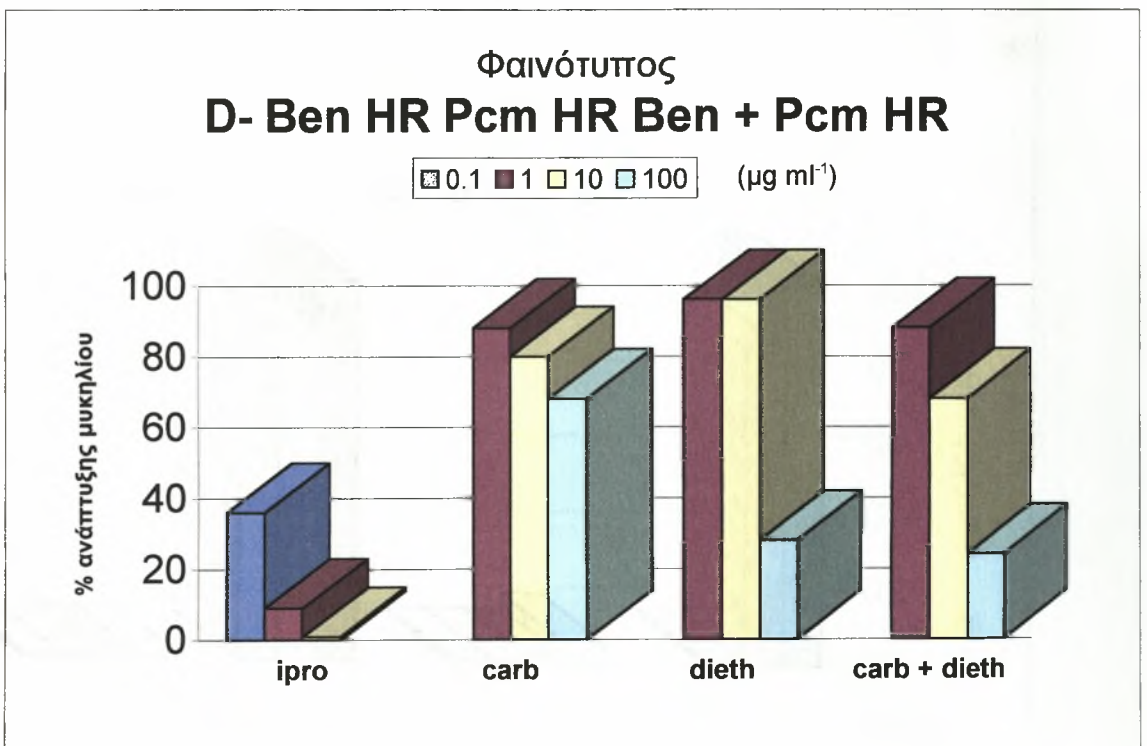
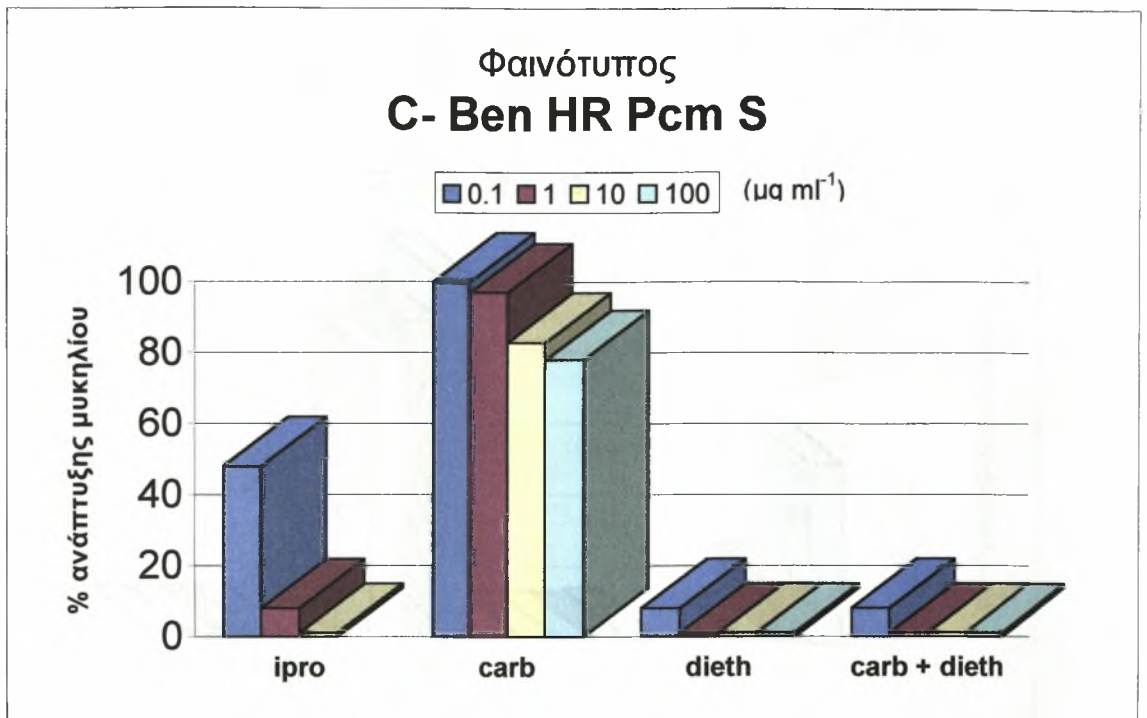
Ben MR και BenHR: μέτρια ανθεκτικότητα και υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά

Pcm S και Pcm HR: Ευαισθησία και υψηλή ανθεκτικότητα αντίστοιχα στα φαινυλοκαρβαμικά (ανθεκτικότητα αγριου τύπου)

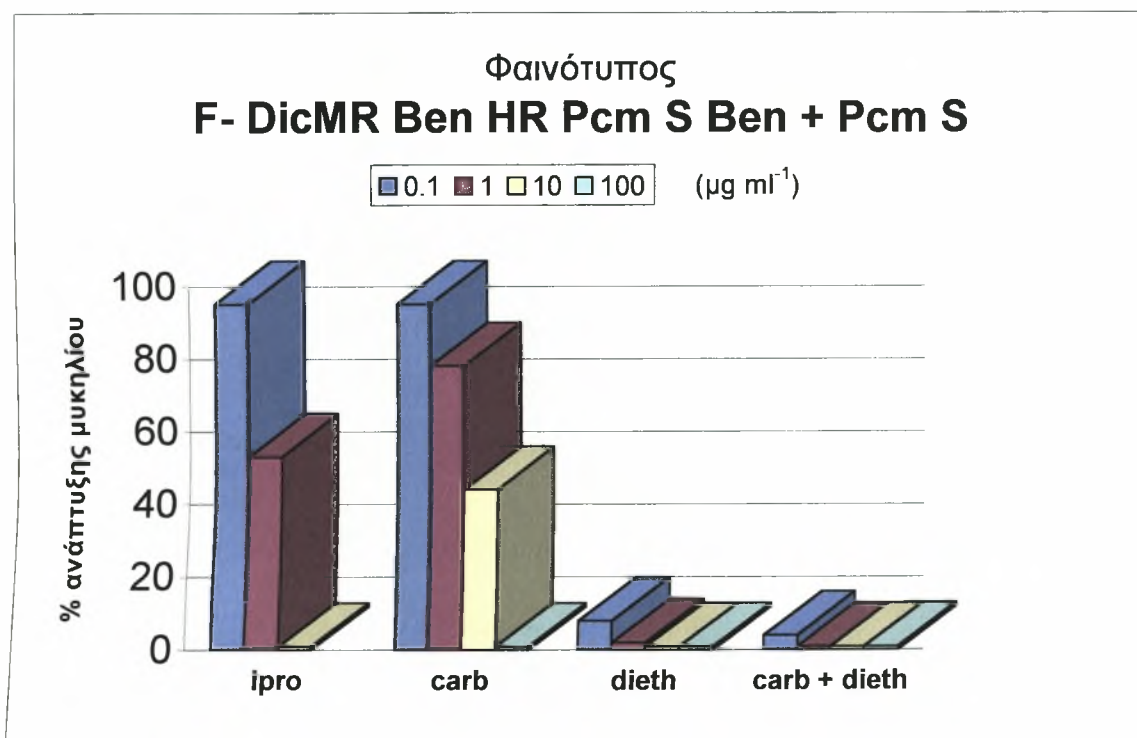
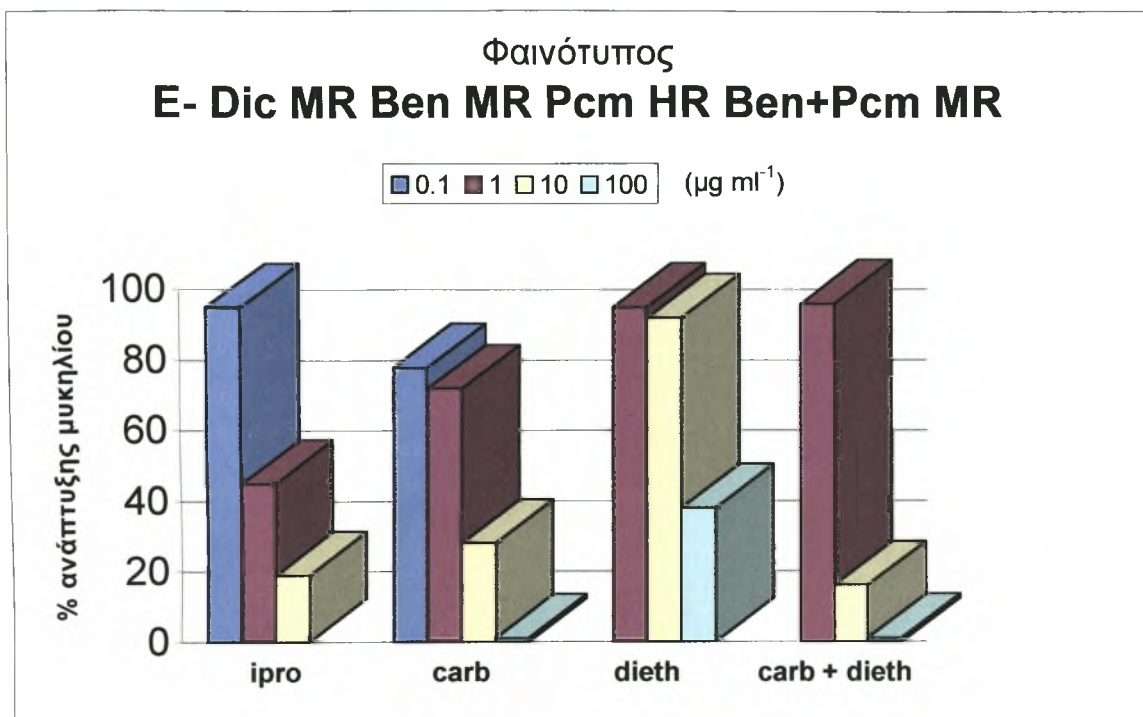
Ben+Pcm S, Ben+Pcm MR και Ben+Pcm HR, ευαισθησία, μέτρια ανθεκτικότητα και υψηλή ανθεκτικότητα αντίστοιχα στο μίγμα carbendazim + diethofencarb.



**Διάγραμμα 2.7α:** Μυκηλιακή ανάπτυξη αντιπροσωπευτικών απομονώσεων του *B. cinerea*, σε MEA εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων (σε µg ml<sup>-1</sup>). Σχετική ανάπτυξη μυκηλίου (ποσοστό % ανάπτυξης μυκηλίου σε σχέση με το μάρτυρα) των αντίστοιχων φαινοτύπων ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα ipro = iprodione, carb = carbendazim, dieth = diethofencarb, carb + dieth = carbendazim+ diethofencarb.



**Διάγραμμα 2.7β:** Μυκηλιακή ανάπτυξη αντιπροσωπευτικών απομονώσεων του *B. cinerea*, σε MEA εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων (σε µg ml<sup>-1</sup>). Σχετική ανάπτυξη μυκηλίου (ποσοστό % ανάπτυξης μυκηλίου σε σχέση με το μάρτυρα) των αντίστοιχων φαινοτύπων ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα ipro = iprodione, carb = carbendazim, dieth = diethofencarb, carb + dieth = carbendazim+ diethofencarb.



**Διάγραμμα 2.7γ:** Μυκηλιακή ανάπτυξη αντιπροσωπευτικών απομονώσεων του *B. cinerea*, σε MEA εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων (σε µg ml<sup>-1</sup>). Σχετική ανάπτυξη μυκηλίου (ποσοστό % ανάπτυξης μυκηλίου σε σχέση με το μάρτυρα) των αντίστοιχων φαινοτύπων ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα ipro = iprodione, carb = carbendazim, dieth = diethofencarb, carb + dieth = carbendazim+ diethofencarb.



#### 4. Ανάλυση RAPD σε απομονώσεις του *Botrytis cinerea* γνωστού φαινοτύπου ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα.

**Πίνακας 2.6:** Απομονώσεις του *B. cinerea* γνωστού φαινοτύπου ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα, που χρησιμοποιήθηκαν στην RAPD ανάλυση.

| Απομόνωση | Πηγή                   | Φαινότυπος                                 |
|-----------|------------------------|--|
| 1a        | Τομάτα, Βόλος 97       | Wild Pcm HR                                |
| 6a        | Τομάτα, Βόλος 94       | BenHR Pcm S                                |
| 7a        | Αγγούρι, Ισραήλ, 89    | BenHR Pcm HR Ben + Pcm HR                  |
| 7b        | Αεροπαγίδα, Τυμπάκι 96 | BenHR Pcm HR Ben + Pcm HR                  |
| 8a        | Αεροπαγίδα, Τυμπάκι 96 | Dic MR BenHR Pcm HR<br>Ben + Pcm MR        |
| 9a        |                        | DicMR BenMR Pcm HR                         |
| 10a       | Τριαντάφυλλα           | Dich MS DicMR BenMR<br>Pcm HR Ben + Pcm MR |

**Πίνακας 2.7:** Συντελεστές ομοιότητας<sup>a</sup> για απομονώσεις του *Botrytis cinerea* που έχουν χαρακτηριστεί ως προ την ευαισθησία τους σε διάφορα μυκητοκτόνα<sup>b</sup>

|                 | 1a     | 6a     | 7a     | 7b     | 8a     | 9a     |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1a <sup>b</sup> |        |        |        |        |        |        |
| 6a              | 0.2405 |        |        |        |        |        |
| 7a              | 0.1948 | 0.3157 |        |        |        |        |
| 7b              | 0.0789 | 0.1645 | 0.2564 |        |        |        |
| 8a              | 0.1315 | 0.1891 | 0.1168 | 0.3157 |        |        |
| 9a              | 0.1688 | 0.0886 | 0.0909 | 0.1750 | 0.2405 |        |
| 10a             | 0.1139 | 0.1315 | 0.1794 | 0.1578 | 0.1898 | 0.3333 |

<sup>a</sup> Ο υπολογισμός των συντελεστών ομοιότητας έγινε σε πρότυπα RAPD που προέκυψαν από ανάλυση RAPD με 7 δεκαμερείς εκκινητές. Σημειώθηκε η παρουσία ή η απουσία των μοριακών δεικτών που αντιγράφονταν κατ' επανάληψη και αποκτούσαν έντονη χρώση κατά την ανάλυση RAPD και υπολογίστηκε ο συντελεστής ομοιότητας DICE για κάθε ζεύγος απομονώσεων, με το υπολογιστικό πρόγραμμα RAPDISTANCE.

<sup>b</sup> 1a : Wild άγριου τύπου

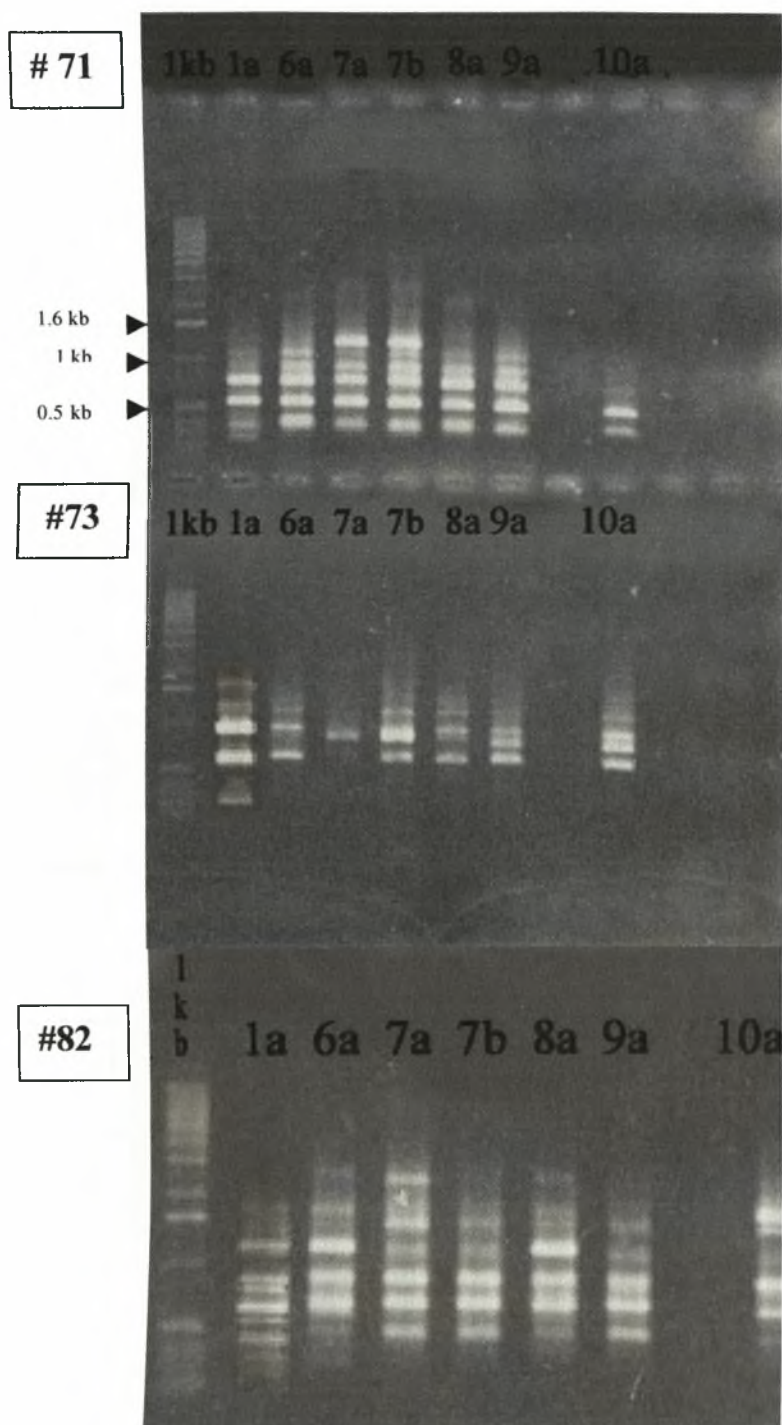
6a: BenHR Υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά

7a,7b: Ben HR Pcm HR Υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμικά

8a: DicMR Ben HR, μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξυμιδικά, υψηλής στα βενζιμιδαζολικά

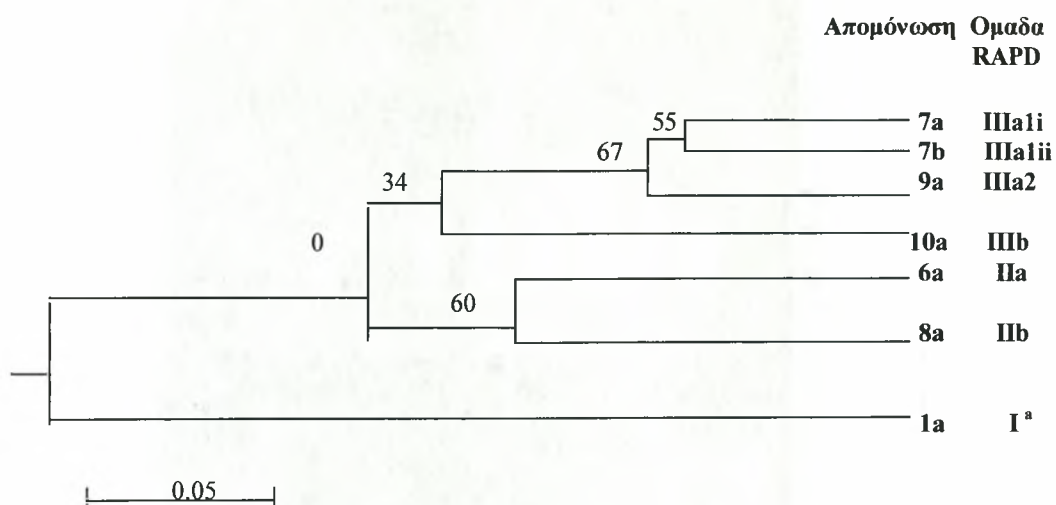
9a: DicMR BenMR Pcm HR, μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξυμιδικά και τα βενζιμιδαζολικά και υψηλής στα φαινυλοκαρβαμικά

10a: DicMs μειωμένης ευαισθησίας στο dichlofluanid.

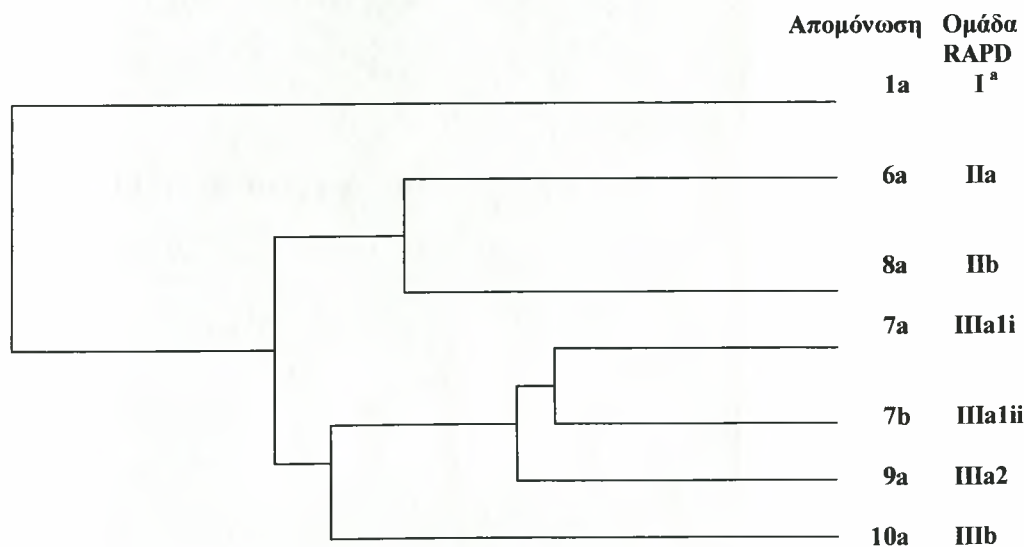


**Εικόνα 2.5.** Πρότυπα RAPD 7 απομονώσεων του *B. cinerea* γνωστού φαινοτύπου ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα που αποκτήθηκαν με τους εκκινητές #71, # 73 και # 82. Οι στήλες 1a, 6a, 7a, 7b, 8a, 9a, 10a αντιπροσωπεύουν τις απομονώσεις ενώ η στήλη 1kb αντιπροσωπεύει μια κλίμακα DNA 1kb. (Προσφορά: Δρ Ε. Παπλωματά).

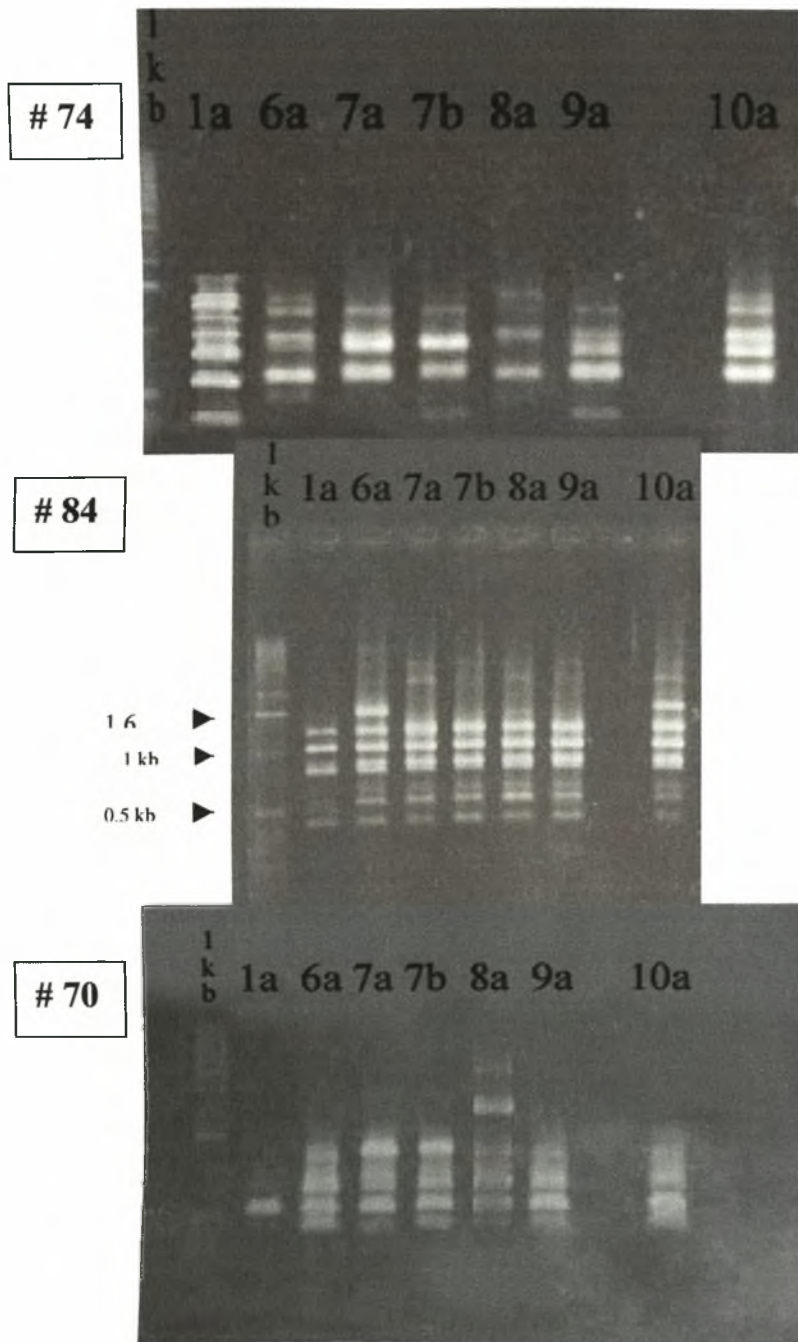
**Διάγραμμα 2.8.** Φαινογράμματα που προέκυψαν από την ανάλυση ομαδοποίησης, των συντελεστών ομοιότητας της ανάλυσης RAPD. Στα φαινογράμματα, απεικονίζονται οι γενετικές ομοιότητες μεταξύ των 7 απομονώσεων του *B. cinerea*. Το πρώτο φαινογράμμα έγινε με βάση τους συντελεστές ομοιότητας με τιμές bootstrap, με το υπολογιστικό πρόγραμμα Mega. Το δεύτερο φαινογράμμα βασίστηκε στον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων με βάση το συντελεστή ομοιότητας του Dice, με το υπολογιστικό πρόγραμμα RAPDISTANCE και κατασκευάστηκε με το λογισμικό Phylip. Η ομαδοποίηση των απομονώσεων δεν αλλάζει και με στα δύο φαινογράμματα.



**1a** : Wild **6a**: BenHR **7a**: Ben HR Pcm HR **7b**: Ben HR PcmHR **8a**: DicMR Ben HR  
**9a**: DicMR BenMR Pcm HR **10a**: DichMs, όπου Ben HR και Ben MR, υψηλή και ενδιάμεση ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, DicMR ενδιάμεση ανθεκτικότητα στα δικαρβοξυμιδικά, PcmHR υψηλή ανθεκτικότητα στα φαινυλοκαρβαμίδια και DichMS μειωμένης ευαισθησίας στο dichlofluanid.



<sup>a</sup> Η ομάδα I περιλαμβάνει την απομόνωση Wild, η ομάδα II περιλαμβάνει τις απομονώσεις BenHR (IIa) και DicMR Ben HR (IIb) και η ομάδα III περιλαμβάνει τις απομονώσεις Ben HR Pcm HR (IIIa1), DicMR BenMR Pcm HR (IIIa2) και DichMS (IIIb).



**Εικόνα 2.6.** Πρότυπα RAPD 7 απομονώσεων του *B. cinerea* γνωστού φαινοτύπου ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα που αποκτήθηκαν με τους εκκινητές # 74, # 84 και # 70. Οι στήλες 1a, 6a, 7a, 7b, 8a, 9a, 10a αντιπροσωπεύουν τις απομονώσεις ενώ η στήλη 1kb αντιπροσωπεύει μια κλίμακα DNA 1kb.(Προσφορά Δρ. Ε. Παπλωματά).





## Μέρος Δ': Βιβλιογραφία

- Arnheim, N., White, T. and Rainey, W.E. (1990) Application of PCR: Organismal and population biology. *BioScience* **40**, 174-182.
- Auger, S., Esterio, G.M, Munoz, F.M.A. (1995) Immunodetection and quantification assays of *Botrytis cinerea* on table grapes. *Fitopatologia* **30**, 149- 159.
- Βακαλουνάκης Δ.Ι. (1998) Φαιά Σήψη. *Οδηγός Αντιμετώπισης Ασθενειών των Φυτών*, σελ. 81-82, Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία, Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα.
- Beever, R.E., Laracy, E. P. and Pak H. A. (1989) Strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximide and bendimidazole fungicides in New Zeland vineyards. *Plant Pathology* **38**, 427-437.
- Brent, K.J. (1991) Monitoring fungicide resistance: Purposes, Procedure and progress. *Resistance 91 – Achievement and developments in combating Pesticide Resistance*, eds. Ian Denholm, Alan Devonshire and Derek Hollomon , SCI.
- Brown, T.M. and Brogdon, WG. (1987) Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. *Ann. Rev. Entomol.* **32**, 145-162.
- Bruns, T.D., White, T.J. and Taylor, J.W. (1992) Fungal Molecular Systematics. *Annu Rev Ecol. Syst.* **22**, 525- 564.
- Butters, J.A., Kendall, S.J., Wheeler, I.E. and Hollomon, D.W (1995). Tubulins: lessons from existing products that can be applied to target new antifungals. *Antifungal Agents. Discovery and Mode of action*, pp 131- 142, eds. Dixon, G.K., Copping, L. G. and Hollomon, D.W. BIOS Scientific, Oxford.
- Buttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quiddle, T., Risch, S., Blaich, R., Bruckner, B.,Tudzynski, P. (1994) Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics* **25**, 445-450.
- Γεωργόπουλος, Σ. Γ. και Ζιώγας, Β.Ν. (1992) *Αρχές και Μέθοδοι Καταπολέμησης των Ασθενειών των Φυτών*, Αθήνα 1992.
- Conkle, M.J., Hodgekiss, P.D., Nunally, L.B., and Hunter, S.C. (1982) Starch and gel electrophoresis of conifer trees: A laboratory manual. *General Technical Report PSW- 64*, pp. 18, Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Berkeley, CA.
- Correll, J.C. (1993) Genetic, Biochemical and Molecular techniques for the identification and detection of Soilborne Plant Pathogenic Fungi. *Methods for research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*, pp 7- 16. Eds. Singleton, L.L., Mihail, J..D. and Rush, C.M., APS Press.
- Dekker, J. and Georgopoulos, S.G., eds. (1982) *Fungicide resistance in Crop Protection*, 265 pp. Center for Agricultural Publications and Documentation, Wageningen, Netherlands.
- DeScenzo, R.A. and Harrington, T.C. (1991) DNA fingerprinting of *Heterobasidion annosum* clones with oligonucleotide probes. (Abstr.) *Phytopathology* **81**, 1190.

- Devonshire, A.L. (1990) Biochemical and genetic analysis of insect populations resistant to insecticides. *Proc. Brighton Crop Protection Conf. Pests and Diseases*, 889-896.
- Diolez, A., Marches, F., Fortini, D. and Brygoo, Y. (1995) Boty, a long- terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 103- 108.
- Edlich, W. and Lyr, H. (1992) Target sites of fungicides with primary effects on lipid peroxidation. *Target Sites of Fungicide Action*, pp. 53- 63. Editor, W. Koller, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Elad, Y., Yunis, H. and Katan T . (1992) Multiple fungicide resistance to bendimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathology* **41**,41-46.
- Elad, Y. (1992) Reduced sensitivity of *Botrytis cinerea* to two sterol- biosynthesis inhibiting fungicides: fenetrazole and fenethanil. *Plant Pathology* **41**, 47 –54.
- Ελενα, Κ. και Παππάς, Α.Χ. (1989) Ευαισθησία απομονώσεων του *Botrytis cinerea* Pers. στο dichlofluanid, chlorothalonil and captan. *5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο*, Θεσ/νίκη, 47.
- FAO (1982) Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides—Detection and measurement of fungicide resistance 1982: FAO Method Nos. 24-30. *FAO Plant Protection Bulletin* **30**, 36-71.
- Faretra, F. and Pollastro, S. (1991) Genetic basis of resistance to benzimidazoles and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research* **95**, 943-951.
- Faretra, F. and Pollastro, S. (1993) Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cineera*) from nine countries. *Plant Pathology* **42**, 48 – 57.
- Foster, B. and Staub, T. (1996) Basis for use strategies of anilinopyrimidine and phenylprrole fungicides against *Botrytis cinerea*. *Crop Protection* **15**, 529 –537.
- Fox, R.T.V. (1993) *Principles of diagnostic techniques in Plant Pathology*. CAB International, Wallingford, UK.
- FRAC, (1991) FRAC methods for monitoring fungicide resistance. *EPPO Bulletin*, 1991, **2**, 292-354.
- Fujumura, M., Oeda, K., Inoue, H. and Kato, T. (1990) Mechanism of action of *N*-phenyl- carbamates in benzimidazole- resistant *Neurospora* strains. *Managing resistance to Agrochemicals*, pp. 224- 236, eds. Green, M.B., Lebaron, H.M. and Moberg, W.K., ACS, Washington, DC.
- Gardes, M., White, T.S., Fortin, J.A., Bruns, T.D. and Taylor, J.W. (1991) Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* **69**, 180 – 190.
- Georgopoulos, S. G. (1982) Detection and measurement of fungi resistance. *Fungicide resistance in Crop Protection*, pp. 24 –31, eds. J. Deker and S.G. Georgopoulos PUDOC, Wageningen, The Netherlands.
- Gjaerum, H.B. and Munthe, K. (1985) Resistance to dichlo- and tolyfluanid in *Botrytis cinerea* on strawberries. *Vaxtskyddsnotise* **49**, 79-82.
- Gjaerum, H.B. and Munthe, K (1987) Germination of gray mould conidia on agar containing tolyfluanid or benomyl. *Vaxtskyddsnotiser* **51**, 116-117.

- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P. and Brygoo, Y. (1997) RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 1177-1185.
- Goodwin, P.H., English, J.T., Neher, D.A., Duniway, J.M. and Kirkpatrick, B. C. (1990) Detection of *Phytophthora parasitica* from soil and host tissue with a species specific DNA probe. *Phytopathology* **79**, 716 – 721.
- Grindle, M. (1979) Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 109-120.
- Groves, J.D, Fox, R.T.V. (1988) Tubulin from *Botrytis cinerea* and the potential for development of an immunodiagnostic for bendimidazole resistance. *Proc. of Brighton Crop protection Conference – Pests and Diseases-1988*, 415-420.
- Hewitt, H.G. (1998) Fungicide performance. *Fungicides in Crop Protection*. Editor H.G. Hewitt, CAB International, 1998.
- Hilber, V.W. and Hilber-Bodmer, M. (1998) A reliable method for testing the sensitivity of *Botryotinia Fuckeliana* to anilinopyrimidines *in vitro*. *Pestic. Sci.* **47**, 241-247.
- Hollomon, D.W. (1991) Molecular Biology and diagnostics in Disease control. *Resistance 91 – Achievement and developments in combating Pesticide Resistance*, eds. Ian Denholm, Alan Devonshire and Derek Hollomon, SCI.
- Hunter, T., Brent, K.J., Carter, G.A. and Hutcheon, J.A. (1987) Effects of fungicide spray regimes on incidence of dicarboximide resistance in gray mould ( *Botrytis cinerea*) on strawberry plants. *Annals of Applied Biology* **110**, 515-525.
- Hunter, T., Locke, T. and Carter, T. (1988) Influence of test medium and age of inoculum on the sensitivity of *Botrytis cinerea* to dichlofluanid in laboratory assays. *ISPP Chemical Control Newsletter* n. **10**, 30-31.
- Katan, T., Elad, Y. and Yunis H.(1989) Resistance to diethofencarb (NPC) in benomyl-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* **38**, 86-92.
- Kersies, A., Bosker-van Zessen, A.I., Wagemakers, C.A.M., van Kan J.A.L. (1997) Variation in Pathogenicity and DNA Polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Disease* **81**, 781 – 786.
- Kistler, H.C., Momol, E.A. and Benny, U. (1991) Repetitive genomic sequences for determining relatedness among strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **81**, 331- 336.
- Kurtzman, C.P. (1985) Molecular taxonomy of the fungi. In *Gene Manipulation in Fungi*, pp. 35- 63, eds. J. W. Bennet and L.L. Lasure, Academic Press, Orlando.
- Λάσκαρης, Δ., Παππάς, Α.Χ. και Κυριακόπουλος, Χ.Κ.(1994) Εμφάνιση στελεχών του *Botrytis cinerea* Pers. με διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα σε καλλιέργειες θερμοκηπίου. 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Αθήνα.
- Λεκανίδου Ρ.(1992) Μεταφορά τύπου Southern και Northern. *Κεφάλαια Μοριακής Βιολογίας*. Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Αθήνα 1992.
- Leroux, P. and Gredt, M. (1979) Negative cross resistance phenomena in *B. cinerea* Pers., between benzimidazole fungicides and carbamate herbicides. *Phytiatrie-Phytopharmacie* **28**, 79-86.
- Leroux, P. and Clerjeau, M. (1985) Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. and *Plasmopora viticola* (Berk and Curt) Berk and De Toni, to fungicides in French vineyards. *Crop Protection* **4**, 137 –160.



- Leroux, P. and Gredt, M. (1989) Negative cross- resistance of benzimidazole – resistant strains of *Botrytis cinerea*, *Fusarium nivale* and *Pseudocercospora herpotrichoides* to various pesticides. *Netherland J. of Plant Pathol.* **99** (S1), 121-127.
- Leroux, P. (1996) Recent developments in the mode of action of fungicides. *Pesticide Science* **47**, 191-197.
- Leroux, P. and Descotes, A. (1996) Resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides and strategies for its control in the Champagne vineyards. *Proceedings of the 1996 Brighton Crop Protection Conference Pests and Diseases*, pp.131-136, British Crop Protection Council, Surrey, UK.
- Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., Gredt M. (1999) Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* **18**, 687-697.
- Levis, C., Fortini, D., Brygoo, Y. (1997) Flipper, a mobile Fot-1 like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Molecular and general genetics* **254**, 674-680.
- Lorenz, G. (1994) Dicarboximide Fungicides: History of resistance development and monitoring methods. *Fungicide resistance in North America*, pp.45- 52, Editor Charles, J. Delp, , APS Press
- Malathrakis, N.E. (1989) Resistance of *Botrytis cinerea* to dichlofluanid in greenhouse vegetables. *Plant Disease* **73**, 138-141.
- Maniatis, T.E., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 545pp, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Martin, L.A. and Fox, R.T.V. (1992) Use of Polymerase chain reaction for the diagnosis of MBC resistance in *Botrytis cinerea*. *Proc. of Brighton Crop protection Conference – Pests and Diseases*, 207-214.
- Miao, V.W.P. (1990) Using karyotype variability to investigate the origins and relatedness of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. In *Fusarium Wilt of Banana*, pp 55-62, R.C. Ploetz, ed. APS Press.
- Micales, J.A., Bonde, M.R., and Peterson, G.L. (1986) The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon* **27**, 405 –449.
- Mills, D., and Mc Cluskey, K. (1990) Electrophoretic karyotypes of fungi: the new cytology. *Mol Plant- Microbe Interact.* **3**, 351-357.
- Μπέσα Α. Π. (1995) Βιολογικές ιδιότητες στελεχών του *Botrytis cinerea* με ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα. Πτυχιακή μελέτη, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Γεωπονίας Ζωικής και Φυτικής Παραγωγής, 1995.
- Munoz, G., Hinrichsen, P. and Alvarez., M. (1999) Variabilidad genetica de cepas de *Botrytis cinerea* provenientes de vid y tomate con resistencia a dicarboximidias. *I Agric. Tecnica* (Chile) **59**, 1- 12.
- ΟΕΔΒ, (1999) Τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη Βιολογία. *Βιολογία Θετικής κατεύθυνσης Γ'Ενιαίου Λυκείου*, σελ.180, Οργανισμός Εκδοσης Διδακτικών Βιβλίων Αθήνα.
- Ogawa, J. M., Manjii, B.T., Heaton, C.R., Petrie, J. and Sonoda, R. M. (1979) Methods for detecting and monitoring the resistance of plant pathogens to chemicals. *Pest Resistance to fungicides*, pp 117 – 162, eds. G.P. Georghiou, and T. Saito, Plenum Press, New York.
- Orth, A.B., Rzhetszkaya, M., Pell, E.J. and Tien, M. (1995) A serine (threonine) proteine kinase confers resistance in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2341- 2345.

- Παπλωματάς, Ε.Γ., Αντωνιάδης, Δ.Γ., Παππάς, Α.Χ. (2000) Χαρακτηρισμός ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα στελεχών του *Botrytis cinerea* με χρήση βιοχημικών και μοριακών τεχνικών. 10<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό συνέδριο, Καλαμάτα.
- Παναγόπουλος Χ.Γ. (1995) Ασθένειες Τομάτας, Μελιτζάνα, Πιπεριάς και Μπάμιας. Ασθένειες κηπευτικών καλλιέργειών, σελ.76-87, Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα.
- Παναγόπουλος Χ.Γ. (1997) Ασθένειες καρποφόρων δέντρων και Αμπέλου σελ.74, 387-390. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα.
- Pappas, A.C. (1982) Inadequate control of grey mould on cyclamen by dicarboximide fungicides in Greece. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **89**, 52- 58.
- Pappas, A.C. (1997) Evolution of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in protected crops in Greece. *Crop Protection* **16**, 257-263.
- Pappas, A.C. and Elena, K. (1992) Effect on gray mould of presence of *Botrytis cinerea* strains showing reduced sensitivity to dichlofluanid. 10<sup>th</sup> International Botrytis Symposium, 5- 10 April 1992, Heraklion, Crete, Greece. *Recent advances Botrytis Research*, pp. 252- 256, eds. K. Verhoeff, N.E Malathrakis. and B. Williamson, Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Pollastro, S., Faretra, F., Di Canio, V. and De Guido, A. (1996) Characterization and genetic analysis of field isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to dichlofluanid. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**, 607-613.
- Raposo, R., Delcan, J., Melgarejo, P. and Gomez, V. (1994) Multiple fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from commercial green houses in southeastern Spain. Crop Protection Conference Pest and Diseases, 21- 24 November 1994, Brighton, UK. *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference*, pp. 493 –498, British Crop Protection Council, Surrey, UK.
- Reader, U. and Broda, P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* **1**, 17- 20.
- Reignault, P., Mercier, M., Bompeix, G., Boccara, M. (1994) Pectin Methylesterase from *Botrytis cinerea*: Physiological, Biochemical and immunochemical Studies. *Microbiology* **140**, 3249-3255.
- Rewal, N., Coley-Smith, J.R. and Sealy – Lewis, H.M. (1991) Studies on resistance to dichlofluanid and other fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* **40**, 554-560.
- Sansiviero, F., Di Canio V., Pollastro, S., Santomauro, A., Grassi, L. and Faretra, F. (1995) Protezione antibotritica della gerbera in serra ed influenza dei trattamenti sulle popolazioni di *Botryotinia fuckeliana*. *Difesa Piante* **18**, 32-41.
- Schumacher, M.M., Enderlin, C.S. and Sellternnikoff, C.P. (1997) The osmotic-1 locus of *Neurospora crassa* encodes a putative histidine kinase similar to osmosensors of Bacteria and yeast. *Curr. Microbiol.* **34**, 340 –347.
- Staub, T., Dahmen, H., Urech, P. A., Schwinn, F. (1979) Failure to select for *in vivo* resistance in *Phytophthora infestans* to acylalanine fungicides. *Plant Dis.Rep.* **64**,385-389.
- Staub, T. and Sozzi D. (1984) Fungicide resistance: a continuing challenge. *Plant disease* **68**, 1026-1031.
- Steel, C.C. and Nair, N. G. (1993) The physiological basis of resistance to the dicarboximide fungicide iprodione in *Botrytis cinerea*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **47**, 60-68.

- Stehmann, C. and De Waard, M. (1995) Accumulation of tebuconazole by isolates of *Botrytis cinerea* differing in sensitivity to sterol demethylation inhibiting fungicides. *Pesticide Science* **45**, 311- 318
- Thompson, J.R. and Latorre, B.A.(1999) Characterization of *Botrytis cinerea* from Table Grapes in Chile Using RAPD- PCR. *Plant Disease* **83**, 1090-1094
- Vallejo, I., Santos, M., Cantoral, J.M., Collado, I.G., Rebordinos, L. (1996) Chromosomal polymorphism in *Botrytis cinerea* strains. *Hereditas* **124**, 31- 38
- Van der Vlugt- Bergmans, C.J.B., Brandwagt, B. F., van' t Klooster, J. W., Wagemakers, C.A.M. and van Kan, J. A. L. (1993) Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **97**, 1193 –1200.
- Van Kan, J.A.L., Goverse, A, Van der Vlugt-Bergmans, C.J.B. (1993) Electrophoretic karyotype analysis of *Botrytis cinerea* *Neth.J. Pl.Path* **99** S3: 119- 128
- Washington W.S., Shanmuganathan N. and Forbes C. (1992) Fungicide control of strawberry fruit rots, and the field occurrence of resistance of *Botrytis cinerea* to iprodione, benomyl and dichlofluanid. *Crop Protection* **11**, 355-360.
- Yarden, O. and Katan, T. (1993) Mutation leading to substitutions at aminoacids 198 and 200 of beta tubulin that correlated with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **83**, 1478-1483.
- Ζιώγας, Β.Ν., Παναγιωτάρου – Πέτσικου, Ν., Καλαμαράκη, Α. (1998) Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας των παθογόνων των φυτών στις αντιμικροβιακές ενώσεις. *Πρακτικά 2<sup>ης</sup> συνάντησης Φυτοπροστασίας*, 5- 7 Μαΐου, Λάρισα, 1998.







ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



0040000724 15