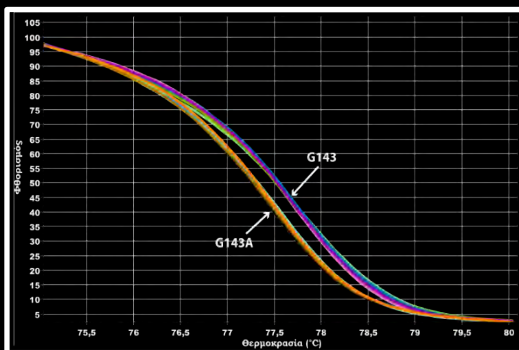
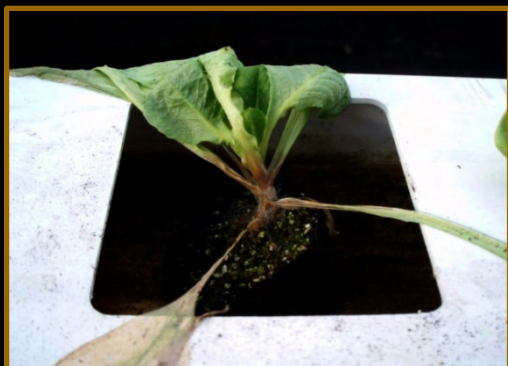




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΒΟΤΡΥΤΗ  
ΣΕ ΥΔΡΟΠΟΝΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΑΡΟΥΛΙΟΥ



ΜΙΧΑΗΛ Α. ΧΑΤΖΗΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ  
Διδακτορική διατριβή

*N. Ιωνία Μαγνησίας, 2014*

*Επιδημιολογία και αντιμετώπιση του βοτρυτή σε υδροπονική καλλιέργεια μαρουλιού*

## **Εξεταστική επιτροπή**

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

**Δρ. Α. Χ. Παππάς, επιβλέπων,**

Καθηγητής Φυτοπαθολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Δρ. Ε. Ι. Παπλωματάς,**

Καθηγητής Φυτοπαθολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Δρ. Ε. Κ. Βέλλιος,**

Επίκουρος Καθηγητής Φυτοπαθολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλη

**Δρ. Α. Χα,**

Καθηγητής Σποροπαραγωγής Καλλιεργούμενων Φυτών & Πολλαπλασιαστικού Υλικού, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Δρ. Γ. Καραογλανίδης,**

Επίκουρος Καθηγητής Φυτοπαθολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

**Δρ. Δ. Τσιτσιγιάννης,**

Επίκουρος Καθηγητής Φυτοπαθολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Δρ. Α. Μαυρομάτης,**

Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής Βελτίωσης Φυτών & Κυτταρογενετικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

**Μιχαήλ Α. Χατζηδημόπουλος**

*Επιδημιολογία και αντιμετώπιση του βοτρυτή σε υδροπονική  
καλλιέργεια μαρουλιού*

*Τί ἥδιστον; τό ἐπιτυγχάνειν*

## Περίληψη

M. Χατζηδημόπουλος, 2014. Επιδημιολογία και αντιμετώπιση του βοτρυτή σε υδροπονική καλλιέργεια μαρουλιού. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Ν. Ιωνία Μαγνησίας, αριθμός προκαταρκτικών σελίδων 22, συνολικός αριθμός σελίδων 195, αριθμός πινάκων 14, αριθμός εικόνων 25, αριθμός διαγραμμάτων 16, αριθμός παραρτημάτων 3, αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών 271.

Ο βοτρυτής (παθογόνο αίτιο *Botrytis cinerea*) είναι μία από τις σημαντικότερες ασθένειες των κηπευτικών που καλλιεργούνται σε συνθήκες θερμοκηπίου στην χώρα μας κατά την περίοδο του χειμώνα-αρχές της άνοιξης. Σε καλλιέργεια μαρουλιού το παθογόνο προσβάλλει το λαιμό των φυτών με αποτέλεσμα τη σήψη της βάσεως του στελέχους και την αποκοπή της κεφαλής από το ριζικό σύστημα. Για τρία συνεχή χρόνια (2010, 2011, 2012) έγινε μελέτη της επιδημιολογίας του παθογόνου σε μαρούλια υδροπονικής καλλιέργειας με καταγραφή των συνθηκών μικροκλίματος και του εναέριου πληθυσμού. Το παθογόνο εισερχόταν στο λαιμό των φυτών από τα κατώτερα εξασθενημένα φύλλα και προκαλούσε μόλυνση με ορατά συμπτώματα προσβολής 20 ημέρες μετά τη μεταφύτευση. Οι προσβολές ήταν αυξημένες όταν επικρατούσε παρατεταμένη υψηλή υγρασία (σχετική υγρασία, διύγρανση φύλλων) και αυξημένη συγκέντρωση εναερίου μολύσματος ενώ, η θερμοκρασία δεν είχε καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της ασθένειας. Παράλληλα, αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα διαφόρων προγραμμάτων χημικών επεμβάσεων κατά της ασθένειας. Έγιναν δύο ψεκασμοί ασφαλείας στο σπορείο σε συνδυασμό με μία ή δύο επιπλέον επεμβάσεις μετά τη μεταφύτευση, ανά 15μερα διαστήματα. Η συγκομιδή έγινε τουλάχιστον 4 εβδομάδες μετά την τελευταία επέμβαση μυκητοκτόνου. Οι ψεκασμοί ασφαλείας στο σπορείο με Daconil SC (chlorothalonil 50%) 3 ml·L<sup>-1</sup>, Teldor WG (fenhexamid 50%) 1.5 g·L<sup>-1</sup>, Signum WG (boscalid 26.7% + pyraclostrobin 6.7%) 1.5 g·L<sup>-1</sup>, Switch WG (fludioxonil 25% + cyprodinil 37.5%) 0.5 g·L<sup>-1</sup> και Ortiva Opti SC (azoxystrobin 8% + chlorothalonil 40%) 2.5 ml·L<sup>-1</sup>, μείωσαν σημαντικά τη συχνότητα και την ένταση της προσβολής σε σχέση με το μάρτυρα. Τα μυκητοκτόνα Switch WG και Signum WG έδωσαν την καλύτερη καταπολέμηση ενώ τα Teldor WG και Daconil SC ήταν λιγότερο αποτελεσματικά. Η εφαρμογή ενός ή δύο επιπλέον ψεκασμών μετά τη μεταφύτευση μείωσαν περαιτέρω το επίπεδο της ασθένειας. Η σταθερή ύπαρξη στο θερμοκήπιο ανθεκτικού πληθυσμού του παθογόνου φαίνεται ότι δεν περιορίσε την αποτελεσματικότητα των βοτρυδιοκτόνων. Δύο κυρίαρχοι φαινότυποι ανθεκτικοί σε πέντε (QoI<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>) και επτά (Hyd<sup>R</sup>QoI<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>) διαφορετικού τρόπου δράσης ομάδες μυκητοκτόνων εντοπίστηκαν είτε στο εναέριο μόλυσμα, είτε απομονώθηκαν από φυτά του πειραματικού ή του ευρύτερου χώρου του θερμοκηπίου. Για τη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας η εναλλαγή μυκητοκτόνων στο πρόγραμμα επεμβάσεων βρέθηκε απαραίτητη. Με εξαίρεση τις επεμβάσεις μετά τη μεταφύτευση με Daconil SC (chlorothalonil 50%), σε όλες τις άλλες περιπτώσεις είτε δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα μυκητοκτόνων κατά τη συγκομιδή ή

ανευρέθηκαν σε συγκεντρώσεις κατώτερες από αυτές που έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα.

Σε θρεπτικά υποστρώματα εμπλουτισμένα με διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεως βοτρυδιοκτόνων από εννιά διαφορετικές ομάδες, προσδιορίστηκε η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) της βλάστησης των σπορίων και του σχηματισμού αποικίας σε 100 απομονώσεις του *B. cinerea*. Με τη μέθοδο της σημειακής εναπόθεσης σπορίων οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν για το διαχωρισμό των επιπέδων ευαισθησίας σε 818 απομονώσεις του παθογόνου από μαρούλια και άλλα κηπευτικά. Τρεις φαινότυποι με πολλαπλή ανθεκτικότητα στις υδροξυανιλίδες (Hyd), τις στρομπιλουρίνες (Qoi), τα καρβοξαμιδικά (Bos), τις ανιλινοπυριμιδίνες (Ani), τις φαινυλοπυρρόλες (Phen), τα δικαρβοξυμιδικά (Dic) και τα βενζιμιδαζολικά (Ben), [Hyd<sup>R</sup>Qoi<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MR</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, Qoi<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, Qoi<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>] ανευρέθηκαν σε συχνότητα 7%, 12% και 6%, αντίστοιχα. Οι φαινότυποι αυτοί εντοπίστηκαν κυρίως σε καλλιέργεια θερμοκηπίου μαρουλιού στην περιοχή της Θεσσαλίας. Απομονώσεις ανθεκτικές μόνο στα βενζιμιδαζολικά (Ben<sup>HR</sup>) βρέθηκαν στο 11% του δείγματος και προέρχονταν κυρίως από υπαίθριες καλλιέργειες μαρουλιού στη Μακεδονία και Πελοπόννησο. Σε χαμηλότερη συχνότητα (<5%) διαπιστώθηκαν φαινότυποι που παρουσίαζαν από 1 έως 5 διαφορετικούς συνδυασμούς ανθεκτικότητας στις χημικές ομάδες. Στο σύνολο των απομονώσεων που εξετάστηκαν δεν ανευρέθηκαν ανθεκτικά στελέχη στα μυκητοκτόνα fluazinam (δινιτροανιλίνες) και chlorothalonil (φθαλονιτρίλια). Από τα ευρήματα διαπιστώθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα η παρουσία φαινοτύπων του *B. cinerea* με πολλαπλή ανθεκτικότητα σε επτά διαφορετικές ομάδες μυκητοκτόνων και η παρουσία στελεχών με υψηλή ανθεκτικότητα στο fenhexamid (Hyd) και μέτρια στο fludioxonil (Phen), αντίστοιχα. Για τη μείωση των ζημιών από βοτρυτή η εφαρμογή στρατηγικής διαχείρισης της ανθεκτικότητας κρίνεται απαραίτητη.

Διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα *in situ* επτά μυκητοκτόνων διαφορετικού βιοχημικού τρόπου δράσεως [pyraclostrobin (στρομπιλουρίνες), boscalid (καρβοξαμιδικά), fenhexamid (υδροξυανιλίδες), cyprodinil (ανιλινοπυριμιδίνες), fludioxonil (φαινυλοπυρρόλες), fluazinam (δινιτροανιλίνες) και chlorothalonil (φθαλονιτρίλια)], κατά εννιά επιλεγμένων με πολλαπλή ανθεκτικότητα απομονώσεων του *B. cinerea*. Νεαρά φύλλα μαρουλιού (ποικ. Penelope RZ) εμβαπτίστηκαν σε υδατικό αιώρημα μυκητοκτόνων, στη συνιστώμενη για ψεκασμό συγκέντρωση σε δ.ο. Μετά το στέγνωμα τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε τριβλία Petri με αποστειρωμένο υπόστρωμα άγαρ. Ακολούθησε μόλυνση στη πάνω επιφάνεια με εναπόθεση ανεστραμμένου μυκηλιακού δίσκου διαμέτρου 5 mm ή σταγόνας αιωρήματος σπορίων συγκέντρωσης  $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ . Η αποτελεσματικότητα αξιολογήθηκε με μέτρηση της διαμέτρου ανάπτυξης της κηλίδας προσβολής του παθογόνου, έπειτα από 3 (μόλυσμα μυκήλιο) ή 6 (μόλυσμα σπόρια) μέρες επώαση, αντίστοιχα, σε θάλαμο θερμοκρασίας 18°C και 10h φωτισμού. Τα pyraclostrobin (0.4 g·L<sup>-1</sup>) και fenhexamid (1.5 g·L<sup>-1</sup>) απέτυχαν να εμποδίσουν την ανάπτυξη κηλίδας προσβολής των ανθεκτικών σε αυτά φαινοτύπων σε όλες τις

περιπτώσεις δοκιμών. Παρόμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν για τα boscalid (0.8 g·L<sup>-1</sup>), cyprodinil (0.375 και 0.75 g·L<sup>-1</sup>) και fludioxonil (0.25 και 0.5 g·L<sup>-1</sup>) όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα μυκήλιο. Απεναντίας, τα μυκητοκτόνα fluazinam (0.4 g·L<sup>-1</sup>) και chlorothalonil (2.5 g·L<sup>-1</sup>) ήταν αποτελεσματικά σχεδόν εναντίον όλων (εκτός από μία περίπτωση) των φαινοτύπων του παθογόνου. Από τα αποτελέσματα διαφαίνεται η αδυναμία πρόσφατα εισαχθέντων μυκητοκτόνων να εμποδίσουν την προσβολή από ανθεκτικούς φαινοτύπους του *B. cinerea* που απομονώθηκαν από καλλιέργειες μαρουλιού.

Με τη νέα μέθοδο της θερμικής αποδιάταξης υψηλής ανάλυσης (HRM) τριάντα έξι διαφορετικής ευαισθησίας απομονώσεις του *B. cinerea* διαχωρίστηκαν γονοτυπικά με βάση μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα fenhexamid, boscalid, pyraclostrobin, carbendazim και iprodione. Η βασική αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι ο προσδιορισμός του ρυθμού αποδιάταξης του δίκλωνου DNA με τη βοήθεια φθορίζουσας χρωστικής και ο σχηματισμός των χαρακτηριστικών καμπυλών τήξης του κάθε γενοτύπου. Μετά από ταυτοποίηση των καμπυλών τήξης βρέθηκε ότι τα ανθεκτικά στο fenhexamid στελέχη παρουσίασαν μετάλλαξη της φαινυλαλανίνης είτε σε βαλίνη (58% των απομονώσεων) είτε σε σερίνη (42% των απομονώσεων) στη θέση 412 του γονιδίου *erg27*. Παρομοίως, τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη έφεραν τη μετάλλαξη της ιστιδίνης είτε σε αργινίνη (78%) είτε σε τυροσίνη (22%) στη θέση 272 του γονιδίου *sdhB*. Στα ανθεκτικά στο pyraclostrobin στελέχη η μετάλλαξη της γλυκίνης σε αλανίνη παρουσιαζόταν στη θέση 143 του κυτοχρώματος b αλλά όχι πάντοτε. Στην ίδια γενωματική περιοχή ανιχνεύθηκε η ύπαρξη ενός εσονίου 1205 βάσεων στο 43% των ευαίσθητων στα QoIs στελεχών. Η υψηλή και μέτρια ανθεκτικότητα στο carbendazim συνδυάστηκε με μεταλλάξεις σε δύο διαφορετικές, πολύ κοντινές θέσεις του γονιδίου *BenA* (E198A και 200Y). Έντονος πολυμορφισμός διαπιστώθηκε στα μετρίως ανθεκτικά στο iprodione στελέχη καθώς στο γονίδιο *bos1* ανιχνεύθηκαν τέσσερις διαφορετικοί γενότυποι ήτοι: α) I365N (46%), β) I365S (17%), γ) Q369P & N373S (17%), δ) V368F & Q369H (20%). Επιπρόσθετη πληθυσμιακή κατάσταση των απομονώσεων με βάση την ύπαρξη μεταθετών στοιχείων *boty* και *flipper* έδειξε ότι το 80% των απομονώσεων έφερε και τα δύο μεταθετά στοιχεία, το 15% κανένα από τα δύο ενώ το 5% μόνο το *boty* μεταθετό στοιχείο. Η γονοτύπηση έδειξε ότι στους περισσότερους φαινοτύπους πολλαπλής ανθεκτικότητας οι μεταλλάξεις ήταν τυχαίες, ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις υπήρξε υψηλή συσχέτιση ορισμένων μεταλλάξεων με συγκεκριμένους φαινοτύπους. Τα συγκριτικά πλεονεκτήματα της μεθόδου HRM έναντι των παραδοσιακών μοριακών τεχνικών την καθιστούν ιδανική για μελέτες ανίχνευσης ανθεκτικών στελεχών.



## Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί τμήμα των υποχρεώσεων του ΔΠΜΣ της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας κατά τα έτη 2009-2013.

Είμαι βαθύτατα ευγνώμων στον Καθηγητή κ. Αθανάσιο Παππά για την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής. Κοντά του έμαθα να προσέχω την κάθε λεπτομέρεια στο σχεδιασμό και την εκτέλεση των πειραματικών εφαρμογών και να είμαι ακριβής. Τα στοχευμένα του σχόλια στα πρόχειρα χειρόγραφα βελτίωσαν σημαντικά την ικανότητά μου στη συγγραφή των έντυπων δημοσιεύσεων, ενώ οι πολύτιμες οδηγίες και συμβουλές του αποτέλεσαν την εγγύηση για την υψηλή ποιότητα της διατριβής. Κ. Καθηγητά σας ευχαριστώ για τη μεγάλη συνέπεια που επιδείξατε στην τήρηση των προθεσμιών και για τις χρονοβόρες προσπάθειές σας στη διόρθωση και τελική σύνταξη των κειμένων. Ήταν μεγάλη τιμή να είμαι φοιτητής σας.

Οφείλω θερμές ευχαριστίες στον κ. Ευάγγελο Βέλλιο για την εκμάθηση των μοριακών τεχνικών και τις πολύτιμες υποδείξεις του καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών. Πάντα με προθυμία, ηρεμία και υπομονή, σε φιλικό κλίμα συνεργασίας συνέβαλε ουσιαστικά στην ανάπτυξη της κριτικής μου σκέψης για την επιλογή των κατάλληλων τεχνικών ανά περίπτωση. Επίσης στον Καθηγητή κ. Επαμεινώνδα Παπλωματά, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις συμβουλές του στην τελική κατάρτιση των κειμένων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω:

Σε καθένα από τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για την κριτική ανάγνωση και τις χρήσιμες υποδείξεις τους στη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Στον κουμπάρο μου Δρ. Εμμανουήλ Μαλανδράκη, που ως *deus ex machina* συνέβαλε στη μείωση αρκετών εργασιών.

Στους ερευνητές και φίλους Ιωάννη Γανόπουλο και Παναγιώτη Μαδέση για την εξαιρετική συνεργασία και τη συμβολή τους στην ανάπτυξη της αναλυτικής μοριακής μεθόδου HRM, καθώς επίσης και στο διευθυντή του Ινστιτούτου Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας & Τεχνολογικής Ανάπτυξης Καθηγητή κ. Αθανάσιο Τσαυτάρη για την παροχή του τεχνολογικού εξοπλισμού.

Στην εταιρεία Crocus Flora A.E που παρείχε άφθονο χώρο και υλικά για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αγρού όλα αυτά τα χρόνια.

## Δημοσιεύσεις από τη διδακτορική διατριβή

### Περιοδικά

- Chatzidimopoulos M, Papaevangelou D, Pappas AC, 2013. Detection and characterization of fungicide resistant phenotypes of *Botrytis cinerea* in lettuce crops in Greece. *European Journal of Plant Pathology* **137**, 363–76.
- Chatzidimopoulos M, Ganopoulos I, Madesis P, Vellios E, Tsaftaris A, Pappas AC, 2014. High-resolution melting (HRM) analysis for rapid detection and characterization of *Botrytis cinerea* phenotypes resistant to fenhexamid and boscalid. *Plant Pathology* **63**, 1336–43.
- Chatzidimopoulos M, Ganopoulos I, Madesis P, Vellios E, Tsaftaris A, Pappas AC, 2014. Development of a two-step high-resolution melting (HRM) analysis for screening sequence variants associated with resistance to the Qols, benzimidazoles and dicarboximides in airborne inoculum of *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* **360**, 126–31.

### Υπό επεξεργασία

- Chatzidimopoulos M, Pappas AC, 2014. Disease initiation, *Botrytis cinerea* airborne inoculum monitoring, bottom rot control and fungicide residues in hydroponic lettuce. *Crop Protection*.
- Chatzidimopoulos M, Papastergiou I, Pappas AC, 2014. Population dynamics and pathogenicity of *Botrytis cinerea* resistant strains. *Phytopathologia Mediterranea*.

### Συμμετοχές σε συνέδρια

- Χατζηδημόπουλος Μ, Μπαλωτή Φ, Τσιρόπουλος ΝΓ, Παππάς ΑΧ, 2010. Αντιμετώπιση του βοτρώτη σε υδροπονική καλλιέργεια μαρουλιού με chlorothalonil και υπολείμματα μυκητοκτόνου κατά την συγκομιδή. *Πρακτικά 15<sup>ου</sup> Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου, 2010*: Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία, σ. 72.
- Παπαστεργίου Ι, Χατζηδημόπουλος Μ, Παππάς ΑΧ, 2012. Δράση *in situ* διαφόρων βοτρυδιοκτόνων κατά επιλεγμένων ανθεκτικών φαινοτύπων του *Botrytis cinerea* από φυτά μαρουλιού. *Πρακτικά 16<sup>ου</sup> Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου, 2012*: Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία, σ. 161.
- Χατζηδημόπουλος Μ, Παππάς ΑΧ, 2012. Χαρακτηρισμός, συχνότητα και εξάπλωση ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα απομονώσεων του *Botrytis cinerea* σε καλλιέργειες μαρουλιού. *Πρακτικά 16<sup>ου</sup> Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου, 2012*: Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία, σ. 53.
- Χατζηδημόπουλος Μ, Λίγκας Ι, Παππάς ΑΧ, 2012. Χημική καταπολέμηση του βοτρώτη σε υδροπονική καλλιέργεια μαρουλιού και υπολείμματα μυκητοκτόνων κατά τη συγκομιδή. *Πρακτικά 16<sup>ου</sup> Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου, 2012*: Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία, σ. 70.
- Χατζηδημόπουλος Μ, Γανόπουλος Ι, Παππάς ΑΧ, 2014. Ανίχνευση και μοριακός χαρακτηρισμός ανθεκτικών σε μυκητοκτόνα στελεχών του *Botrytis cinerea* με εφαρμογή της θερμικής αποδιάταξης υψηλής ανάλυσης. *Πρακτικά 17<sup>ου</sup> Πανελληνίου Φυτοπαθολογικού Συνεδρίου, 2014*: Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία, σ. 51.

## Πίνακας περιεχομένων

### ΜΕΡΟΣ Α΄ – ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

<b>ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>3</b>
<b>ΠΑΘΟΓΟΝΟ</b>	<b>4</b>
<b>ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>6</b>
<b>ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ</b>	<b>9</b>
ΕΠΙΒΙΩΣΗ – ΔΙΑΣΠΟΡΑ	9
ΕΙΣΟΔΟΣ – ΜΟΛΥΝΣΗ	11
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ – ΞΕΝΙΣΤΗ	13
<b>ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ</b>	<b>15</b>
ΑΝΘΕΚΤΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	15
ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	15
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	16
ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ	16
<b>ΒΟΤΡΥΔΙΟΚΤΟΝΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ</b>	<b>19</b>
ΓΕΝΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΝΖΥΜΩΝ	19
Dichlofluanid, chlorothalonil, thiram	19
ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΔΙΑΙΡΕΣΗΣ	20
Βενζιμιδαζολικά – Φαινυλοκαρβαμικά	20
ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΩΣΜΩΤΙΚΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ	21
Δικαρβοξυμιδικά	21
Φαινυλοπυρρόλες	22
ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΟΗΣ	23
Φαινυλοπυριδιναμίνες	23
Αναστολείς μιτοχονδριακού συμπλόκου III – Στρομπιλουρίνες (QoIs)	24
Αναστολείς της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDHIs)	25
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗΣ	26
Ανλινοπυριμιδίνες	26
ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗΣ	29
Fenhexamid	30

## ΜΕΡΟΣ Β΄ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

<b><u>ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ <i>IN VITRO</i></u></b>	<b>35</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>36</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>37</b>
ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ – ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	37
ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΤΟΥ <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	38
ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΕΣ ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΜΥΚΗΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ	38
ΔΟΚΙΜΕΣ ΒΛΑΣΤΗΣΗΣ ΣΠΟΡΙΩΝ	40
ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΥΚΗΛΙΟΥ	41
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	41
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>42</b>
FENHEXAMID (HYDROXYANILIDES)	42
AZOXYSTROBIN ΚΑΙ PYRACLOSTROBIN (STROBILURINS, QoIs)	43
BOSCALID (CARBOXAMIDES, SDHIs)	48
CYPRODINIL ΚΑΙ PYRIMETHANIL (ANILINOPYRIMIDINES)	49
FLUDIOXONIL (PHENYLPYRROLES)	56
FLUAZINAM (PHENYLPYRIDINAMINES)	57
CHLOROTHALONIL (PHTHALONITRILES)	57
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>58</b>
<b><u>ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ ΣΕ ΥΔΡΟΠΟΝΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΑΡΟΥΛΙΟΥ (ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ)</u></b>	<b>63</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>64</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>65</b>
ΣΠΟΡΑ – ΜΕΤΑΦΥΤΕΥΣΗ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ NFT	66
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	66
ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΕΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΥ 2009-2010 (ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ)	68
ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΕΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΥ 2010-2011 (2 <sup>ο</sup> ΕΤΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ)	70
ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΕΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΥ 2011-2012 (3 <sup>ο</sup> ΕΤΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ)	70
ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΚΛΙΜΑΤΟΣ	71
ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΝΑΕΡΙΟΥ ΜΟΛΥΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ	72
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	75
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>76</b>
ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ 2009-2010	76
Παθογένεση – Συμπτωματολογία – Αξιολόγηση ευπάθειας ποικιλιών	76
Χημική καταπολέμηση	78

ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ 2010-2011	79
Παθογένεση – Συμπτωματολογία – Επιδημιολογία	79
Χημική καταπολέμηση	80
ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ 2011-2012	81
Παθογένεση – Συμπτωματολογία – Επιδημιολογία	81
Καταγραφή ανθεκτικού εναερίου μολύσματος σε μυκητοκτόνα	84
Προσδιορισμός φαινοτύπων παθογόνου από εναέριο μόλυσμα	87
Χημική καταπολέμηση	89
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ <i>B. CINEREA</i> ΑΠΟ ΠΡΟΣΒΕΒΛΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ	89
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ	92
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>93</b>
<b><u>ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ</u></b>	<b><u>99</u></b>
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	100
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	100
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	101
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	107
<b><u>ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ <i>B. CINEREA</i> ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ <i>IN SITU</i></u></b>	<b><u>111</u></b>
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	112
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	112
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	113
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	118
<b><u>ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ <i>B. CINEREA</i> ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ</u></b>	<b><u>121</u></b>
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	122
ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΥΨΗΛΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (HIGH-RESOLUTION MELTING, HRM)	123
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	125
ΕΞΑΓΩΓΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	125
ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	127
ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ	127
ΑΝΑΛΥΣΗ HRM	129
TWO-STEP HRM	131
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ	131

<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>132</b>
ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR	132
ΑΝΑΛΥΣΗ HRM	133
ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	141
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>144</b>
<b><u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ</u></b>	<b>153</b>
<b>ΔΙΕΘΝΕΙΣ</b>	<b>153</b>
<b>ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ</b>	<b>175</b>
<b><u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I</u></b>	<b>177</b>
<b><u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II</u></b>	<b>181</b>
<b><u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III</u></b>	<b>187</b>
<b><u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (SUMMARY IN ENGLISH)</u></b>	<b>193</b>

## Κατάλογος πινάκων

<i>Πίνακας 1.</i> Μυκητοκτόνα και χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις. _____	37
<i>Πίνακας 2.</i> Θρεπτικό υπόστρωμα ανόργανων αλάτων. _____	39
<i>Πίνακας 3.</i> Βλάστηση σπορίων δέκα απομονώσεων <i>B. cinerea</i> σε εννέα διαφορετικά μυκητοκτόνα. _____	44
<i>Πίνακας 4.</i> Ανάπτυξη μυκηλίου δέκα απομονώσεων <i>B. cinerea</i> σε εννέα διαφορετικά μυκητοκτόνα. _____	45
<i>Πίνακας 5.</i> Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για την παγίδευση και καταγραφή του εναερίου μολύσματος του <i>B. cinerea</i> . _____	73
<i>Πίνακας 6.</i> Αποτελεσματικότητα επεμβάσεων με chlorothalonil (0.1%) εναντίον του βοτρυτή σε 10 διαφορετικές ποικιλίες μαρουλιού και υπολείμματα μυκητοκτόνου κατά την συγκομιδή. _____	79
<i>Πίνακας 7.</i> Αξιολόγηση προγραμμάτων επεμβάσεων με βοτρυδιοκτόνα κατά φυσικών προσβολών από <i>B. cinerea</i> σε υδροπονική καλλιέργεια μαρουλιού και ανάκτηση φαινοτύπων από προσβεβλημένα φυτά (2010-2011). _____	83
<i>Πίνακας 8.</i> Αξιολόγηση προγραμμάτων επεμβάσεων με βοτρυδιοκτόνα κατά φυσικών προσβολών από <i>B. cinerea</i> σε υδροπονική καλλιέργεια μαρουλιού και ανάκτηση φαινοτύπων από προσβεβλημένα φυτά. _____	90
<i>Πίνακας 9.</i> Υπολείμματα μυκητοκτόνων σε μαρούλια (τύπου γαλλικής σαλάτας) υδροπονικής καλλιέργειας κατά τη συγκομιδή. _____	94
<i>Πίνακας 10.</i> Προέλευση των απομονώσεων <i>B. cinerea</i> που χρησιμοποιήθηκαν. _____	102
<i>Πίνακας 11.</i> Έλεγχος παθογένειας απομονώσεων <i>B. cinerea</i> διαφορετικών φαινοτύπων και αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνων <i>in situ</i> . <sup>1</sup> _____	115
<i>Πίνακας 12.</i> Κλάσεις SNPs όπως έχουν καθοριστεί από τους Venter <i>et al.</i> (2001). _____	124
<i>Πίνακας 13.</i> Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις μοριακές δοκιμές της παρούσας διατριβής. _____	128
<i>Πίνακας 14.</i> Γονοτύπηση διαφορετικής ευαισθησίας απομονώσεων <i>B. cinerea</i> από διαφορετικές περιοχές δειγματοληψίας. _____	134

## Κατάλογος εικόνων

**Εικόνα 1.** Συμπτώματα διαφορετικών τύπων που προκαλούνται από τον *B. cinerea* σε καλλιεργούμενα φυτά. **A** Μαλακή σήψη των ρωγών σταφυλιού και εμφάνιση χαρακτηριστικών καρποφοριών του παθογόνου. **B** Εκτεταμένο έλκος σε στέλεχος φυτού τομάτας. **Γ** Προσβολή καρπού μελιτζάνας στο σημείο της πρόσφυσης με τον κάλυκα. **Δ** Συμπτώματα κηλιδώσεως σε καρπό τομάτας (*ghost spot*). **Ε** Προσβολή του κορυφαίου τμήματος καρπού αγγουριάς. **ΣΤ** Σήψη της βάσης του στελέχους νεαρού φυτού μαρουλιού. **Z** Κηλιδώσεις σε άνθος κυκλάμινου. Πηγή [εκτός 1ΣΤ (ιδιοκτησίας συγγραφέα)]: Google images (λέξεις κλειδιά: *Botrytis cinerea* + ονόματα ξενιστών στην αγγλική γλώσσα). \_\_\_\_\_ 8

**Εικόνα 2.** Παρατήρηση βλάστησης κονιδίων στα οποία έχει εκφραστεί το γονίδιο *Bc-che1* του *B. cinerea* που εκπέμπει φθορισμό στην περιοχή του ερυθρού: **A** Από οπτικό μικροσκόπιο. **B** Από μικροσκόπιο φθορισμού [προσαρμογή από Leroch et al. (2011)]. \_\_\_\_\_ 9

**Εικόνα 3.** Κύκλος της ασθένειας του παθογόνου [προσαρμογή από Agrios (2005)]. \_\_\_\_\_ 14

**Εικόνα 4.** Το *fludioxonil* είναι παράγωγο της *pyrrolnitrin*. Οι αλλαγές στο φαινυλικό δακτύλιο το καθιστούν πιο σταθερό στη φωτοδιάσπαση. \_\_\_\_\_ 22

**Εικόνα 5.** Χημική δομή των ανιλινοπυριμιδινικών μυκητοκτόνων. Οι τρεις αντιπρόσωποι της ομάδας αυτής διαφέρουν μόνο στις χημικές ομάδες (μεθυλ-, κυκλοπροπυλ- και προπυνυλ-, αντίστοιχα) στον πυριμιδινικό δακτύλιο. \_\_\_\_\_ 28

**Εικόνα 6.** Επισήμανση της κάτω επιφάνειας τριβλίων *Petri* με μαρκαδόρο για τη διεξαγωγή των δοκιμών *in vitro*: **A** Της σημειακής εναπόθεσης. **B** Της βλάστησης των спорίων. \_\_\_\_\_ 40

**Εικόνα 7.** Βλάστηση спорίων απομονώσεων διαφορετικού επιπέδου ευαισθησίας στο *fenhexamid*. Η ευαίσθητη απομόνωση B-47 είχε τιμές  $EC_{50}$  βλάστησης спорίων και επιμήκυνσης βλαστικού σωλήνα  $>10$  και  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  αντίστοιχα. Ένα μικρό ποσοστό των спорίων της απομόνωσης αυτής (5 %) βλάστησε στη συγκέντρωση των  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Η ανθεκτική απομόνωση C-39 εμφάνισε τιμές  $EC_{50} >100 \text{ mg L}^{-1}$  και για τις δύο περιπτώσεις. \_\_\_\_\_ 46

**Εικόνα 8.** Μυκηλιακή ανάπτυξη ευαίσθητης και ανθεκτικής στο *fenhexamid* απομόνωσης, σε διαφορετικό εύρος συγκεντρώσεων ( $\text{mg L}^{-1}$ ). \_\_\_\_\_ 47

**Εικόνα 9.** Βλάστηση спорίων απομονώσεων διαφορετικού επιπέδου ευαισθησίας στις στρομπιλουρίνες. Οι ευαίσθητες απομονώσεις δε βλάστησαν στη συγκέντρωση του  $1 \text{ mg L}^{-1}$  *pyraclostrobin* +  $100 \text{ mg L}^{-1}$  SHAM ενώ όλες οι ανθεκτικές απομονώσεις βλάστησαν στα  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . \_\_\_\_\_ 50

**Εικόνα 10.** Μυκηλιακή ανάπτυξη ευαίσθητης και ανθεκτικής στις στρομπιλουρίνες (+  $100 \text{ mg L}^{-1}$  SHAM) απομόνωσης. \_\_\_\_\_ 51

**Εικόνα 11.** Βλάστηση спорίων απομονώσεων διαφορετικού επιπέδου ευαισθησίας στο *boscalid*. \_\_\_\_\_ 52

**Εικόνα 12.** Μυκηλιακή ανάπτυξη ευαίσθητης και ανθεκτικής στο *boscalid* απομόνωσης, σε διαφορετικό εύρος συγκεντρώσεων ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Η συγκέντρωση των  $10 \text{ mg L}^{-1}$  παρεμπόδισε πλήρως την ανάπτυξη του μυκηλίου των ευαίσθητων απομονώσεων και σε συνδυασμό με τις δοκιμές βλάστησης спорίων επιλέχθηκε για το διαχωρισμό των δύο επιπέδων ευαισθησίας. \_\_\_\_\_ 53



- Εικόνα 13.** Βλάστηση σπορίων διαφορετικού επιπέδου ευαισθησίας απομονώσεων στις ανιλινοπυριμιδίνες. Η διάκριση της ευαισθησίας βασίστηκε κυρίως στην επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα. Η ευαίσθητη απομόνωση C-09 εμφάνισε τιμή  $EC_{50}$   $0.07 \text{ mg L}^{-1}$  ενώ η ανθεκτική B-35  $0.33 \text{ mg L}^{-1}$  αντίστοιχα. \_\_\_\_\_ 54
- Εικόνα 14.** Μυκηλιακή ανάπτυξη ευαίσθητης και ανθεκτικής απομόνωσης στις ανιλινοπυριμιδίνες. Η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) του  $1 \text{ mg L}^{-1}$  χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των δυο επιπέδων ευαισθησίας. \_\_\_\_\_ 55
- Εικόνα 15.** Βλάστηση σπορίων ευαίσθητης και ανθεκτικής απομόνωσης στο fludioxonil. Καμία ευαίσθητη απομόνωση δε βλάστησε στη συγκέντρωση  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  του μυκητοκτόνου. \_\_\_\_\_ 56
- Εικόνα 16.** Παραλλακτικότητα στις δοκιμές ευαισθησίας στο chlorothalonil. Αν και στη συγκέντρωση των  $10 \text{ mg L}^{-1}$  δεν παρατηρήθηκε βλάστηση σπορίων σε καμία απομόνωση (A), η ανάπτυξη του μυκηλίου ήταν διαφορετική μεταξύ των απομονώσεων (B, Γ). Εφόσον η κύρια δράση του chlorothalonil εντοπίζεται στη βλάστηση των σπορίων όλες οι απομονώσεις θεωρήθηκαν ευαίσθητες. \_\_\_\_\_ 58
- Εικόνα 17.** Επεμβάσεις στο στάδιο ανάπτυξης των φυτών στο σπορείο. Σε όλες τις περιπτώσεις οι ψεκασμοί με μυκητοκτόνα έγιναν στα στάδια του ενός και των τεσσάρων πραγματικών φύλλων (BBCH-11 και BBCH-14). \_\_\_\_\_ 69
- Εικόνα 18.** Διάταξη φυτών με αριθμημένες θέσεις του πειραματικού 'αγρού' στο υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας. Κάθε υδρορορή αφορά και μια διαφορετική επέμβαση. Σε κάθε επέμβαση έγιναν 3 επαναλήψεις με 50 φυτά/επανάληψη. Ο 3<sup>ος</sup> ή/και ο 4<sup>ος</sup> ψεκασμός διεξήχθησαν στα στάδια των επτά και εννέα πραγματικών φύλλων (BBCH-17 και BBCH-19). \_\_\_\_\_ 69
- Εικόνα 19.** Ο αισθητήρας επιφανειακής υγρασίας SKLW 1900 (Skye Instruments Ltd.) χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή των κλιματικών παραμέτρων στο χώρο του θερμοκηπίου. \_\_\_\_\_ 72
- Εικόνα 20.** Ογκομετρικός δειγματολήπτης αέρα (Burkard Manufacturing Co. Ltd.) που στο επάνω πεπλατυσμένο μέρος εμπεριέχεται τριβλίο Petri με εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για παγίδευση μολυσματικών μονάδων του *B. cinerea*. \_\_\_\_\_ 74
- Εικόνα 21.** Καταγραφή των εναέριων μολυσματικών μονάδων του *B. cinerea* κατόπιν παγίδευσης σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα. Η αρίθμηση κατέστη δυνατή μακροσκοπικά λόγω της εμφάνισης καστανής άλω γύρω από κάθε μολυσματική μονάδα του παθογόνου. \_ 75
- Εικόνα 22.** Έναρξη και εξέλιξη της ασθένειας A Τα σπόρια του παθογόνου μόλυναν τα γηρασμένα κάτω φύλλα του φυτού και στη συνέχεια η προσβολή επεκτείνεται στο λαιμό από το σημείο πρόσφυσης του μίσχου. B Αρχικά συμπτώματα σήψης του λαιμού. Γ. Ολοσχερής καταστροφή φυτού. \_\_\_\_\_ 77
- Εικόνα 23.** Ανάπτυξη κηλίδας προσβολής του *B. cinerea* σε φύλλα μαρουλιού εμβαπτισμένα σε μυκητοκτόνα, που μολύνθηκαν με την πολλαπλής ανθεκτικότητας απομόνωση CR-32. \_\_\_\_ 116
- Εικόνα 24.** Ανίχνευση ανθεκτικών στα Qols απομονώσεων *B. cinerea* με εφαρμογή AS-PCR. R=ανθεκτική, S=ευαίσθητη. \_\_\_\_\_ 139
- Εικόνα 25.** Ανίχνευση των μεταθετών στοιχείων boty και flipper με εφαρμογή PCR. Διακρίνονται 2 απομονώσεις που φέρουν μόνο το boty μεταθετό στοιχείο (τύπος boty), 5 που δε φέρουν κανένα από τα δύο (τύπος vacuata) και 30 που έχουν και τα δύο (τύπος transposa). \_\_\_\_\_ 145

## Κατάλογος διαγραμμάτων

**Διάγραμμα 1.** Σχηματική απεικόνιση των συμπλόκων που εμπλέκονται στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Τα σκιασμένα με πράσινο κελιά αναφέρονται σε ενεργές υπομονάδες για το παθογόνο *Botryotinia fuckeliana* και παραπέμπουν σε γονιδιώματα σύνθεσης πρωτεϊνών στην ιστοσελίδα [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?bfu00190](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bfu00190). Τελευταία είσοδος: 21.05.2014. Στο διάγραμμα διακρίνονται τα σημεία δράσης των Qols και SDHs μυκητοκτόνων καθώς και του fluazinam. \_\_\_\_\_ 27

**Διάγραμμα 2.** Ενζυμικοί στόχοι των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης της εργοστερόλης [προσαρμογή από Leroux et al. (2002)]. \_\_\_\_\_ 31

**Διάγραμμα 3.** Συχνότητα προσβολής από βοτρυτή 10 διαφορετικών ποικιλιών μαρουλιού στο διάστημα από 24/10 έως 17/02 της καλλιεργητικής περιόδου 2009-2010. Η ποικιλία μαρουλιού (τύπου γαλλικής σαλάτας) που εμφανίστηκε λιγότερο ευπαθής ήταν η Penelope και στο πλαίσιο της ολοκληρωμένης καταπολέμησης επιλέχτηκε για την περαιτέρω διεξαγωγή πειραμάτων αντιμετώπισης της ασθένειας. \_\_\_\_\_ 78

**Διάγραμμα 4.** Απεικόνιση παραμέτρων μικροκλίματος του θερμοκηπίου, εναέριου μολύσματος του *B. cinerea* και χρόνου χημικών επεμβάσεων κατά την καλλιεργητική περίοδο 2010-2011. Η διύγρανση είχε τιμές στην κλίμακα 0-2 Volt. Η τιμή 0 αντιστοιχούσε στην τιμή διύγρανσης όπου δεν υπήρχε καθόλου υγρασία επάνω στο φύλλο και η 2 στην ύπαρξη ελεύθερης υγρασίας στην επιφάνεια του φύλλου. Το σημείο **A** προσδιορίζει την έναρξη των προσβολών στο μάρτυρα. \_\_\_\_\_ 82

**Διάγραμμα 5.** Απεικόνιση παραμέτρων μικροκλίματος του θερμοκηπίου, εναέριου μολύσματος του *B. cinerea* και χρόνου εφαρμογής χημικών επεμβάσεων την καλλιεργητική περίοδο 2011-2012. Η διύγρανση είχε τιμές στην κλίμακα 0-2 Volt. Η τιμή 0 αντιστοιχούσε στην τιμή διύγρανσης όπου δεν υπάρχει καθόλου υγρασία επάνω στο φύλλο και η 2 στην ύπαρξη ελεύθερης υγρασίας στην επιφάνεια του φύλλου. Το σημείο **A** προσδιορίζει την έναρξη των προσβολών στο μάρτυρα. \_\_\_\_\_ 85

**Διάγραμμα 6.** Ποσοστιαία κατανομή του εναέριου πληθυσμού του *B. cinerea* κατά την καλλιεργητική περίοδο 2011-2012 με βάση την ευαισθησία σε έξι μυκητοκτόνα διαφορετικού τρόπου δράσης. Ο πληθυσμός προσδιοριζόταν με μέτρηση των μολυσματικών μονάδων σε θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμένο με τις συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων για το διαχωρισμό των επιπέδων ευαισθησίας: 1 mg L<sup>-1</sup> fenhexamid, 10 mg L<sup>-1</sup> boscalid, 10 mg L<sup>-1</sup> pyraclostrobin + 100 mg L<sup>-1</sup> SHAM, 10 mg L<sup>-1</sup> cyprodinil, 1 mg L<sup>-1</sup> fludioxonil και 3 mg L<sup>-1</sup> iprodione. \_\_\_\_\_ 86

**Διάγραμμα 7.** Ποσοστιαία κατανομή φαινοτύπων που εντοπίστηκαν σε παγίδες εμπλουτισμένες με 7 μυκητοκτόνα διαφορετικού τρόπου δράσης. Το παθογόνο απομονώθηκε από τις αποικίες που αναπτύσσονταν στις παγίδες με εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα και κατόπιν εφαρμογής της μεθόδου σημειακής εναπόθεσης σπορίων ελέγχθηκε η ευαισθησία σε όλα τα υπόλοιπα μυκητοκτόνα. Σε αντιστοιχία με τις απομονώσεις που παγιδεύτηκαν από προσβεβλημένα φυτά, τρεις κυρίαρχοι φαινότυποι ανιχνεύθηκαν. \_\_\_\_\_ 88

**Διάγραμμα 8.** Εξέλιξη της ανθεκτικότητας του *B. cinerea* σε έξι διαφορετικές ομάδες μυκητοκτόνων σε πειραματική καλλιέργεια θερμοκηπίου στην περιοχή Κρόκιο Αλμυρού κατά την καλλιεργητική περίοδο 2010. Η ανθεκτικότητα των απομονώσεων στα μυκητοκτόνα

*fenhexamid (Hyd)*, *pyraclostrobin (Qol's)*, *boscalid (Bos)*, *cyprodinil (Ani)*, *carbendazim (Ben)* και *iprodione (Dic)* εξετάστηκε με τη μέθοδο της σημειακής εναπόθεσης σπορίων. Οι απομονώσεις που εξετάστηκαν εμφάνιζαν συνήθως πολλαπλή ανθεκτικότητα. \_\_\_\_\_ 103

**Διάγραμμα 9.** Προσδιορισμός των πιο συχνά εμφανιζόμενων φαινοτύπων σε προσβεβλημένα μαρούλια πειραματικής υδροπονικής καλλιέργειας κατά τη διάρκεια τριών διαδοχικών ετών δειγματοληψίας. Ο έλεγχος ευαισθησίας διεξήχθη στα μυκητοκτόνα *fenhexamid (Hyd)*, *pyraclostrobin (Qol's)*, *boscalid (Bos)*, *cyprodinil (Ani)*, *fludioxonil (Phen)*, *carbendazim (Ben)*, *iprodione (Dic)*, *chlorothalonil (Chlo)* και *fluazinam (Flu)*. Δύο φαινότυποι πολλαπλής ανθεκτικότητας ( $Qol^R Bos^R Ani^R Ben^{HR} Dic^{MR}$ ,  $Hyd^R Qol^R Bos^R Ani^R Phen^{MR} Ben^{HR} Dic^{MR}$ ) τελικά επικράτησαν ενώ τα άγριου τύπου στελέχη μειώθηκαν σημαντικά. \_\_\_\_\_ 104

**Διάγραμμα 10.** Ποσοστιαία κατανομή φαινοτύπων *B. cinerea* σε έξι διαφορετικές θέσεις δειγματοληψίας. \_\_\_\_\_ 106

**Διάγραμμα 11.** Ανίχνευση πολυμορφισμών με θερμική αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης στη θέση 412 της πρωτεΐνης Erg27. Α Ομαλοποιημένα δεδομένα. Β Γράφημα διαχωρισμού το οποίο σχηματίστηκε με τη χρήση του γενοτύπου 'άγριου τύπου' A-22 ως άξονας χ. Οι ενδεικτικές καμπύλες τήξης σχηματίζουν τρεις διακριτές ομάδες που αντιστοιχούν στην κωδικοποίηση της φαινυλαλανίνης (F), βαλίνης (V) ή σερίνης (S) στην αλληλουχία του προϊόντος. Οι F412S και F412V μεταλλάξεις σχετίζονται με ανθεκτικότητα στο *fenhexamid*. \_\_\_\_\_ 136

**Διάγραμμα 12.** Ανίχνευση πολυμορφισμών με θερμική αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης στη θέση 272 της πρωτεΐνης SdhB. Α Ομαλοποιημένα δεδομένα. Β Γράφημα διαχωρισμού το οποίο σχηματίστηκε με τη χρήση του γενοτύπου 'άγριου τύπου' C-04 ως άξονας χ. Οι ενδεικτικές καμπύλες τήξης σχηματίζουν τρεις διακριτές ομάδες που αντιστοιχούν στην κωδικοποίηση της ιστιδίνης (H), αργινίνης (R) ή τυροσίνης (Y) στην αλληλουχία του προϊόντος. Οι H272R και H272Y μεταλλάξεις σχετίζονται με ανθεκτικότητα στο *boscalid*. \_\_\_\_\_ 137

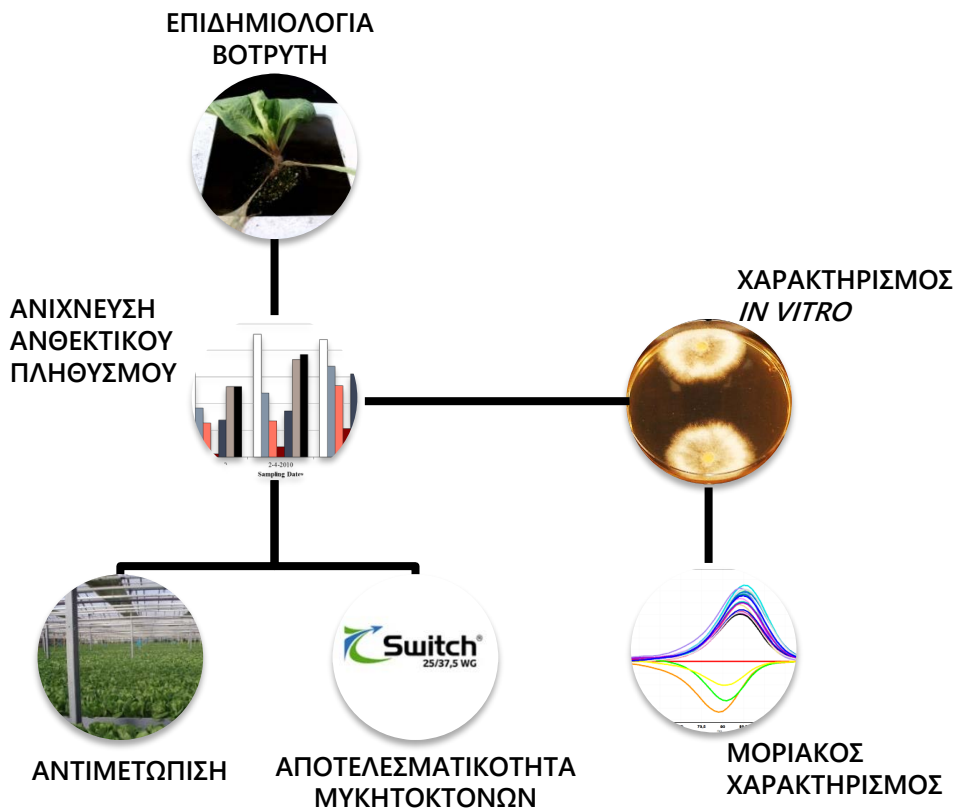
**Διάγραμμα 13.** Ανίχνευση πολυμορφισμών με θερμική αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης στη θέση 143 του κυτοχρώματος *b*. Α Μετά από ομαλοποίηση των δεδομένων σχηματίστηκαν τρεις διακριτές ομάδες καμπυλών τήξης εκ των οποίων η μία χαρακτηρίστηκε από την ύπαρξη του εσωνίου Bcbi-143/144 και διαφοροποιήθηκε από τις άλλες δύο κατά 4 °C. Β Η διάκριση των δύο γενοτύπων που δεν φέρουν το εσόνιο στο προϊόν της PCR κωδικοποιούν είτε τη γλυκίνη (G) είτε την αλανίνη (A). Η G143A μετάλλαξη συνδέεται με υψηλή ανθεκτικότητα στα Qols μυκητοκτόνα. \_\_\_\_\_ 138

**Διάγραμμα 14.** Ανίχνευση πολυμορφισμών με θερμική αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης στη θέση 129 του κυτοχρώματος *b*. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στο γενότυπο μεταξύ των δειγμάτων. \_\_\_\_\_ 140

**Διάγραμμα 15.** Ανίχνευση πολυμορφισμών με θερμική αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης στις θέσεις 198 και 200 της πρωτεΐνης BenA. Α Ομαλοποιημένα δεδομένα. Β Γράφημα διαχωρισμού το οποίο σχηματίστηκε με τη χρήση του γενοτύπου 'άγριου τύπου' A-22 ως άξονας χ. Οι ενδεικτικές καμπύλες τήξης σχηματίζουν τρεις διακριτές ομάδες. Σε σχέση με τον άγριου τύπου γενότυπο που κωδικοποιεί το γλουταμικό οξύ (E) στη θέση 198 και τη φαινυλαλανίνη στη θέση 200, η κωδικοποίηση της αλανίνης στη θέση 198 (E198A) και της τυροσίνης στη θέση 200 (F200Y) προσδίδει υψηλή και μέτρια ανθεκτικότητα στο *carbendazim*, αντίστοιχα. \_\_\_\_\_ 142

**Διάγραμμα 16.** Ανίχνευση πολυμορφισμών που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα δικαυβοξιμιδικά μυκητοκτόνα με θερμική αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης σε τμήμα της πρωτεΐνης *Bos1*. **A** Ομαλοποιημένα δεδομένα. **B** Γράφημα διαχωρισμού το οποίο σχηματίστηκε με τη χρήση του γενότυπου 'άγριου τύπου' C-04 ως άξονας χ. Στις ενδεικτικές καμπύλες τήξης διακρίνονται πέντε διαφορετικές ομάδες. Σε σχέση με τον άγριου τύπου γενότυπο διακρίνονται οι μεταλλάξεις της ισολευκίνης σε ασπαραγίνη (I365N) ή σερίνη (I365S), οι ταυτόχρονες μεταλλάξεις της γλουταμίνης και ασπαραγίνης σε προλίνη και σερίνη (Q369P & N373S), και οι ταυτόχρονες μεταλλάξεις της βαλίνης και γλουταμίνης σε φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη (V368F & Q369H), αντίστοιχα. \_\_\_\_\_ 143

# Οργανόγραμμα διδακτορικής διατριβής



## Συντμήσεις - επεξηγήσεις

Χρησιμοποιήθηκαν τα λεξικά των Ζάχος *et al.* (1984) και Konstantinidis (2005)

<b>Ani</b>	Anilinoypyrimidines	Ανιλινόπυριμιδινικά μυκητοκτόνα
<b>AS PCR</b>	Allele-specific PCR	PCR με εκκινήτες που στοχεύουν σε εξειδικευμένο αλληλόμορφο
<b>Ben</b>	Benzimidazoles	Βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα
<b>Bos</b>	Boscalid	Μυκητοκτόνο της ομάδας των SDHIs
<b>bp</b>	Base pair	Ζεύγος βάσεων
<b>CTAB</b>	Cetyltrimethylammonium bromide	Βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλοαμμώνιο
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonate	Ο διαιθυλικός εστέρας του διανθρακικού οξέος χρησιμοποιείται για αδρανοποίηση των RNAσών στο νερό
<b>Dic</b>	Dicarboximides	Δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
<b>DS</b>	Direct sequencing	Αλληλούχιση
<b>dsDNA</b>	Double stranded DNA	Δίκλωνο DNA
<b>EC<sub>50</sub></b>	Effective concentration 50 %	Συγκέντρωση μυκητοκτόνου που προκαλεί 50 % αναστολή βιολογικής διεργασίας του παθογόνου
<b>HR</b>	Highly resistant	Υψηλής ανθεκτικότητας
<b>HRM</b>	High-resolution melting analysis	Θερμική αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης
<b>Hyd</b>	Hydroxylanilides	Μυκητοκτόνα της ομάδας των υδροξυανιλιδών
<b>MEA</b>	Malt extract agar	Θρεπτικό υλικό με εκχύλισμα βύνης, πεπτόνη και άγαρ
<b>MR</b>	Moderately resistant	Μέτριας ανθεκτικότητας
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>PDA</b>	Potato dextrose agar	Θρεπτικό υλικό με εκχύλισμα πατάτας, γλυκόζη και άγαρ
<b>PDB</b>	Potato dextrose broth	Υγρό θρεπτικό υλικό με εκχύλισμα πατάτας και γλυκόζη
<b>Phen</b>	Phenylpyrroles	Φαινυλοπυρρολικά μυκητοκτόνα
<b>PIRA-PCR</b>	Primer-introduced restriction analysis PCR	Μοριακή μέθοδος δημιουργίας τεχνητών RFLPs με τη χρήση εκκινήτη ο οποίος διαφοροποιείται κατά ένα ζεύγος βάσεων από το συμπληρωματικό του τμήμα DNA
<b>PVP<sub>25</sub></b>	Polyvinylpyrrolidone K 25	Πολυβινυλοπυρρολιδόνη
<b>Qols</b>	Quinone outside inhibitors	Μυκητοκτόνα που αναστέλλουν τη δράση του κυτοχρώματος b στο σημείο οξειδωσης της κινόλης (Q <sub>o</sub> )
<b>qPCR</b>	Quantitative PCR	Ποσοτική PCR ή PCR πραγματικού χρόνου
<b>QTL</b>	Quantitative trait loci	Γονιδιακές θέσεις ποσοτικών χαρακτήρων
<b>R</b>	Resistant	Ανθεκτικό
<b>RAPD</b>	Random amplified polymorphic DNA	Τυχαία ενισχυόμενο πολυμορφικό DNA

<b>RF</b>	Resistance factor	Παράγοντας ανθεκτικότητας: Ο λόγος των τιμών EC <sub>50</sub> ανθεκτικών/ EC <sub>50</sub> ευαίσθητων απομονώσεων
<b>RFLP</b>	Restriction fragment length polymorphism analysis	Ανάλυση πολυμορφισμού τμήματος DNA του οποίου το μήκος καθορίζεται από περιοριστικά ένζυμα
<b>SDHIs</b>	Succinate dehydrogenase inhibitors	Μυκητοκτόνα που αναστέλλουν τη δράση της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος
<b>SHAM</b>	Salicylhydroxamic acid	Σαλικυλυδροξαμικό οξύ
<b>SNP</b>	Single-nucleotide polymorphism	Μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός
<b>ssDNA</b>	Single stranded DNA	Μονόκλωνο DNA
<b>SSRs</b>	Simple sequence repeats	Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 2-5 βάσεων στο γένωμα
<b>WA</b>	Water agar	Υλικό με άγαρ διαλυόμενο σε νερό
<b>YBA</b>	Yeast bacto acetate medium	Θρεπτικό υλικό με εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη και οξικό νάτριο

ΜΕΡΟΣ Α΄  
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ





# ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## Παθογόνο

Το γένος *Botrytis* δημιουργήθηκε από τον Micheli (1729) και από πολύ νωρίς ήταν ευρύτατα γνωστό για τη μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα των ειδών του και ειδικότερα για το πολυφάγο είδος *B. cinerea* (Brierley, 1921). Στη διεθνή βιβλιογραφία ο *B. cinerea* αναφέρεται ως νεκροτροφικό παθογόνο σε 235 και πλέον ξενιστές που ανήκουν σε διαφορετικές βοτανικές οικογένειες. Τα άλλα είδη του γένους *Botrytis* είναι πιο εξειδικευμένα όσον αφορά τον παρασιτισμό τους και έχουν περιορισμένο κύκλο ξενιστών. Τα είδη *B. allii*, *B. squamosa*, *B. gladiolorum*, *B. tulipae*, και *B. fabae* έχουν κατά καιρούς σημειωθεί στη χώρα μας χωρίς όμως να αποτελούν ιδιαίτερο πρόβλημα (Παππάς, 1992).

Η τέλεια μορφή του παθογόνου ονομάζεται *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (Jarvis, 1977) και ταξινομικά εντάσσεται στους ασκομύκητες (δισκομύκητες). Τα αποθήκια, σχηματίζονται ύστερα από βλάστηση των σκληρωτίων κάτω από ειδικές συνθήκες και είναι εύκολο σχετικά να σχηματιστούν *in vitro* (Faretra & Antonacci, 1987). Σε συνθήκες αγρού ωστόσο, εντοπίζονται πολύ σπάνια (Polach & Abawi, 1975). Για το λόγο αυτό έχει επικρατήσει στη διεθνή βιβλιογραφία η χρήση του ονόματος της ατελούς μορφής (*B. cinerea*) αν και σύμφωνα με τον Διεθνή Κώδικα Ονοματολογίας οι ατελείς μύκητες των οποίων είναι γνωστή η εγγενής αναπαραγωγή, θα πρέπει να αναφέρονται με το όνομα της τέλει μορφής (Γεωργόπουλος, 1984).

Το παθογόνο στην ατελή του μορφή σχηματίζει κονιδιοφόρους που αποτελούνται από ένα ποδίσκο καστανού χρώματος ο οποίος φέρει στην κορυφή του επί μικρών διακλαδώσεων τα υαλώδη μονοκύτταρα κονίδια διαστάσεων 9-12 x 7-10 μm κατά κεφαλές σε μορφή βότρυος. Η ατελής μορφή εντάσσεται στην τάξη των *Moniliales* της οικογένειας *Moniliaceae* των αδηλομυκητών (Jarvis, 1977, Παναγόπουλος, 2000). Τα κονίδια και τα κύτταρα του μυκηλίου είναι πολυπύρνα με αριθμό πυρήνων συνήθως από 3 έως 6. Στο στάδιο της μετάφασης κατά τη διαδικασία της μίτωσης όπως επίσης και κατά το σχηματισμό των ασκών διαπιστώθηκε ότι οι πυρήνες έχουν 16 χρωμοσώματα (Lorenz & Eichhorn, 1983, Shirane *et al.*, 1989). Από τη στιγμή που η τέλεια μορφή του παθογόνου σπάνια απαντάται στη φύση, το φαινόμενο της ετεροκαρύωσης (συνύπαρξη μέσα στο ίδιο κύτταρο του μυκηλίου δύο ή περισσότερων πυρήνων με διαφορετική γονοτυπική σύσταση) μπορεί να ερμηνεύσει κατά ένα μέρος τη γενετική παραλλακτικότητα του *B. cinerea* (Jarvis, 1977). Αν και *in vitro* είναι συχνό το φαινόμενο να προκύπτουν καλλιέργειες που να διαφέρουν μορφολογικά από την αρχική κατά τη δημιουργία μονόσπορων καλλιεργειών, εν τούτοις οι γνώσεις για τη συνεισφορά της

ετεροκαρύωσης στη γενετική παραλλακτικότητα στον αγρό είναι μάλλον περιορισμένες (Beever & Weeds, 2007).

Ο *B. cinerea* θεωρείται ετερόθαλλο είδος με διπολικό ετεροθαλλισμό το οποίο χαρακτηρίζεται από δυο συζευκτικούς τύπους, τους MAT1-1 και MAT1-2. Ενώ οι περισσότερες απομονώσεις συμπεριφέρονται με το ετερόθαλλο πρότυπο, περιστασιακά εντοπίζονται απομονώσεις οι οποίες μπορούν να συζευχθούν και με τους δυο τύπους αλληλομόρφων και επιπλέον κάποιες από αυτές μπορούν να αυτογονιμοποιηθούν ως πραγματικά ομόθαλλοι οργανισμοί (Faretra *et al.*, 1988). Πρόσφατα χαρτογραφήθηκε ολόκληρο το γένωμα του *B. cinerea* και διαπιστώθηκε ότι ο ετεροθαλλισμός αποτελεί εξέλιξη του ομοθαλλισμού αν και έχει αναφερθεί ακριβώς το αντίθετο σε άλλα παθογόνα (Amsellem *et al.*, 2011).

Η ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών με χρήση των μοριακών δεικτών επέτρεψε το διαχωρισμό του *B. cinerea* σε απλότυπους και την ταξινόμησή του σε πληθυσμούς. Ένας διαχωρισμός βασίστηκε αρχικά στα μεταθετά στοιχεία *boty* και *flipper* τα οποία είναι τμήματα γενώματος 6000 (Diolez *et al.*, 1995) και 1842 βάσεων (Levis *et al.*, 1997) αντίστοιχα, που μεταπηδούν θέσεις στο γονιδίωμα με διαφορετικό μηχανισμό το καθένα. Μεταγενέστερα, ο πληθυσμός του *B. cinerea* διαχωρίστηκε ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι των δυο μεταθετών στοιχείων. Οι απομονώσεις οι οποίες περιείχαν και τα δυο μεταθετά στοιχεία ονομάστηκαν *transposa* ενώ όσες δεν περιείχαν κανένα *vacuma* (Giraud *et al.*, 1997, Giraud *et al.*, 1999). Από πολλές έρευνες που βασίστηκαν σε αυτή τη διάκριση προέκυψε ότι τα στελέχη τύπου *transposa* είναι κυρίαρχα σε πολλές καλλιέργειες και ειδικά στο αμπέλι, ενώ ένα μικρό ποσοστό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μόνο του *boty* ή του *flipper* μεταθετού στοιχείου (Giraud *et al.*, 1999, Albertini *et al.*, 2002, Munoz *et al.*, 2002, Kretschmer & Hahn, 2008). Η παρουσία των *vacuma* στελεχών εντοπίζεται σε πολύ χαμηλά ποσοστά, βρέθηκαν να είναι όμως κυρίαρχα στη χώρα μας όταν απομονώθηκαν από ακτινίδια και μήλα (Samuel *et al.*, 2012). Οι απομονώσεις τύπου *vacuma* βρέθηκαν να έχουν καλύτερη σαπροφυτική ανάπτυξη, ενώ οι *transposa* ήταν ελαφρώς πιο μολυσματικές σε πειράματα παθογένειας *in situ* αλλά αναπτύσσονταν πιο αργά (Martinez *et al.*, 2003, Martinez *et al.*, 2005). Πιο πρόσφατα όμως, με βάση φυλογενετική εξέταση του πολυμορφισμού στο γονίδιο *Bc-hch* που εκφράζει τη βλαστική συμβατότητα, αποδείχθηκε ότι ο *B. cinerea* αποτελεί ένα σύμπλεγμα δύο ειδών τα οποία διαφέρουν γενετικά μεταξύ τους και δεν αντιστοιχούν πάντοτε στο πρότυπο *transposa/vacuma* (Fournier *et al.*, 2003, Fournier *et al.*, 2005).

Ο *B. cinerea sensu stricto* (ομάδα II) φαίνεται ότι είναι το κυρίαρχο είδος ενώ ο *B. pseudocinerea* (ομάδα I) ανιχνεύεται σε πολύ χαμηλότερα ποσοστά (περίπου 15

%). Ο *B. pseudocinerea* έχει μέτρια ανθεκτικότητα στο fenhexamid η οποία φαίνεται καλύτερα στις δόκιμες μυκηλιακής ανάπτυξης και εμφανίζει αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα fenpropridin και fenproprimorph (Leroux *et al.*, 1999). Με βάση επιπρόσθετες φυλογενετικές μελέτες, θεωρείται πλέον ότι αποτελεί ξεχωριστό 'κρυπτικό' είδος (Walker *et al.*, 2011). Ο *B. pseudocinerea* εντοπίζεται κυρίως την άνοιξη στα υπολείμματα των ανθέων και φαινοτυπικά μπορεί να διακριθεί από τον *B. cinerea sensu stricto* μόνο από βιοδοκιμές ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα. Πρέπει να δοθεί έμφαση στο γεγονός ότι μεταξύ των δυο διαφορετικών φυλογενετικών ειδών δεν μπορούν να γίνουν διασταυρώσεις και η διάκριση στους μπορεί να γίνει εύκολα με βάση ορισμένους μοριακούς δείκτες.

## Συμπτωματολογία

Ο *B. cinerea* προκαλεί σημαντικές ζημιές μεγάλης οικονομικής σημασίας οι οποίες διακρίνονται σε ποιοτικές και ποσοτικές ανάλογα με τον ξενιστή και τις συνθήκες που ακολουθούν τη μόλυνση. Ο βοτρώτης (τεφρά σήψη) είναι από τις πιο συνηθισμένες ασθένειες καλλιεργειών θερμοκηπίου και σε πολλά κηπευτικά προκαλείται σημαντική μείωση της παραγωγής εξαιτίας της προσβολής ανθέων και καρπών πριν τη συγκομιδή. Η παρουσία του παθογόνου αποτελεί σύνηθες φαινόμενο σε εξασθενημένους ή γηρασμένους ιστούς δικοτυλήδων ξενιστών. Συνήθως εισέρχεται στους υγιείς ιστούς σε πρώιμοτερο στάδιο κατά τη διαδικασία ανάπτυξης της καλλιέργειας. Εκεί παραμένει σε λανθάνουσα φάση και όταν συντελέσουν οι κατάλληλες συνθήκες και αλλάξει η φυσιολογία του ξενιστή, τότε η προσβολή εξελίσσεται ραγδαία (Williamson *et al.*, 2007). Σημαντικής οικονομικής σημασίας είναι και οι μετασυλλεκτικές σήψεις καρπών και ανθέων (ακτινίδιο, φράουλα, μήλα, σταφύλια τριαντάφυλλα) κατά τη μεταφορά ή αποθήκευση εντός ψυκτικών θαλάμων. Οι σήψεις αυτές συνήθως προέρχονται από λανθάνουσες προσβολές που έγιναν πριν τη συγκομιδή (Παππάς, 1992).

Το παθογόνο δύναται να προσβάλει φυτά όλων των σταδίων ανάπτυξης. Όλα σχεδόν τα εναέρια μέρη του φυτού μπορεί να προσβληθούν και να εμφανίσουν συμπτώματα διαφόρων τύπων. Η ασθένεια εμφανίζεται πιο σοβαρή στο αμπέλι και σε καλλιέργειες 'μικρών φρούτων' (φράουλα, σμέουρα). Στη χώρα μας ο βοτρώτης προκαλεί ιδιαίτερο πρόβλημα σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες κηπευτικών και ανθοκομικών καλλιεργειών. Στο αμπέλι προσβάλλονται κυρίως οι βότρες και προκαλείται τεφρά μαλακή σήψη των ρωγών (Εικόνα 1Α). Σε θερμαινόμενα θερμοκήπια με καλλιέργεια τομάτας η προσβολή δύναται να εμφανιστεί με τη μορφή ξηρού καστανού έλκους γύρω από τομές κλαδέματος, ουλές φύλλων

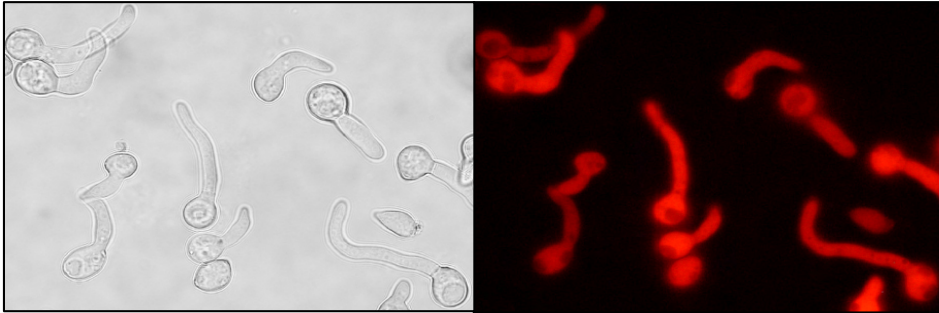
(τακούνη) ή ποδίσκους καρπών. Τα έλκη αυτά εξελίσσονται βραδέως, περιζώνουν το στέλεχος και επιφέρουν την ξήρανση του υπεράνω αυτών τμήματος των φυτών (Εικόνα 1B). Στους καρπούς η προσβολή συνήθως ξεκινά από τα παγιδευμένα, γηρασμένα πέταλα τα οποία είναι πολύ ευπαθή στις μολύνσεις και μέσω αυτών εξαπλώνεται στα σέπαλα και τελικά στη βάση του καρπού. Οι προσβολές σε καρπούς μελιτζάνας (Εικόνα 1Γ) και φράουλας εντοπίζονται στη βάση του καρπού στο σημείο πρόσφυσης με τον κάλυκα, ενώ αντίθετα σε καρπούς αγγουριάς η σήψη του καρπού αρχίζει από την κορυφή όπου υπάρχουν τα νεκρά μολυσμένα υπολείμματα του άνθους (Εικόνα 1Ε). Στο μαρούλι η προσβολή εκδηλώνεται στην περιοχή του λαιμού των φυτών (Εικόνα 1ΣΤ) που έχει ως αποτέλεσμα τη σήψη της βάσης του στελέχους και την αποκοπή της κεφαλής από το ριζικό σύστημα. Στα άνθη πολλών καλλωπιστικών φυτών και σε καρπούς τομάτας (Εικόνες 1Δ & 1Ζ) παρουσιάζονται μικρές κηλίδες με χλωρωτική άλω και τεφρό νεκρωτικό κέντρο (ghost spot), ενώ παρόμοιες κηλιδώσεις εμφανίζονται κάτω από ειδικές συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας σε νεαρούς πράσινους καρπούς τομάτας (Παππάς, 1992, Παναγόπουλος, 2000, Agrios, 2005, Dik & Wubben, 2007, Koike *et al.*, 2007).

Το παθογόνο έχει αναφερθεί ότι μολύνει τους σπόρους πολλών καλλιεργούμενων φυτών (πάνω από 50) όπως του ρεβιθιού (Burgess *et al.*, 1997) και του λιναριού (Harold *et al.*, 1997). Στις περισσότερες δε των περιπτώσεων προκαλεί εν συνεχεία τήξεις στα νεαρά φυτάρια. Αν και οι Burgess *et al.* (1997) δεν βρήκαν να προκαλείται διασυστηματική μόλυνση του φυτού από μολύνσεις στους σπόρους ρεβιθιού, πρόσφατα ανακοινώθηκε η δυνατότητα ασυμπτωματικής διασυστηματικής προσβολής των φυτών μαρουλιού από τον *B. cinerea* που μπορεί να ξεκινήσει από το σπόρο ή δια μέσω των ριζών κατά το στάδιο ανάπτυξης στο σπορείο (Sowley *et al.*, 2010).

Για τη μικροσκοπική παρατήρηση των διασυστηματικών λανθανουσών μολύνσεων καθώς και άλλων συμβάντων τα οποία λαμβάνουν χώρα στα κύτταρα των ξενιστών έχουν αναπτυχθεί πλέον καινούριες τεχνικές όπως είναι η έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (green fluorescent protein-GFP) η οποία αρχικά απομονώθηκε από το είδος μέδουσας *Aequorea victoria* (Chiu *et al.*, 1996). Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της πρωτεΐνης, πλέον κατασκευάζονται γονίδια που εκπέμπουν φθορισμό και σε διαφορετικά μήκη κύματος (Εικόνα 2), ενσωματώνεται στο γένωμα του *B. cinerea* συνήθως μέσω ενός πλασμιδιακού φορέα. Η έκφραση της φθορίζουσας χρωστικής μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω με τεχνητές μεταλλάξεις (η πιο συνηθισμένη είναι η S65T) στην περιοχή του χρωμοφόρου (Li *et al.*, 2006, Leroch *et al.*, 2011).



**Εικόνα 1.** Συμπτώματα διαφορετικών τύπων που προκαλούνται από τον *B. cinerea* σε καλλιεργούμενα φυτά. **A** Μαλακή σήψη των ρωγών σταφυλιού και εμφάνιση χαρακτηριστικών καρποφοριών του παθογόνου. **B** Εκτεταμένο έλκος σε στελέχος φυτού τομάτας. **Γ** Προσβολή καρπού μελιτζάνας στο σημείο της πρόσφυσης με τον κάλκα. **Δ** Συμπτώματα κηλιδώσεως σε καρπό τομάτας (ghost spot). **Ε** Προσβολή του κορυφαίου τμήματος καρπού αγγουριάς. **ΣΤ** Σήψη της βάσης του στελέχους νεαρού φυτού μαρουλιού. **Ζ** Κηλιδώσεις σε άνθος κυκλάμινου. Πηγή [εκτός 1ΣΤ (διοικητικής συγγραφεία)]: Google images (λέξεις κλειδιά: *Botrytis cinerea* + ονόματα ξενιστών στην αγγλική γλώσσα).



**Εικόνα 2.** Παρατήρηση βλάστησης κονιδίων στα οποία έχει εκφραστεί το γονίδιο *Bc-sche1* του *B. cinerea* που εκπέμπει φθορισμό στην περιοχή του ερυθρού: **A** Από οπτικό μικροσκόπιο. **B** Από μικροσκόπιο φθορισμού [προσαρμογή από Leroch *et al.* (2011)].

## Στοιχεία επιδημιολογίας

### Επιβίωση – Διασπορά

Σε περιοχές όπου το κλίμα είναι ψυχρό και υγρό το παθογόνο δραστηριοποιείται στα αμπέλια κατά τη διάρκεια της άνοιξης-τέλη καλοκαιριού και στα θερμοκήπια κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Υπό αυτές τις συνθήκες ο σημαντικότερος παράγοντας που έχει επίδραση στην επιβίωση του παθογόνου είναι οι χαμηλές θερμοκρασίες (Elad & Shtienberg, 1995). Σε αντίξοες συνθήκες το παθογόνο μπορεί να παράγει μακράς διάρκειας όργανα επιβίωσης, τα σκληρώτια, τα οποία μπορεί να σχηματίζονται σε εξασθενημένους φυτικούς ιστούς ή σε υπολείμματα καλλιεργειών στο έδαφος (Holz *et al.*, 2007). Πρόκειται για ανθεκτικές μυκηλιακές κατασκευές που περιβάλλονται από ένα στρώμα β-γλυκανών. Το εξωτερικό περίβλημα (ψευδοπαρέγχυμα) περιέχει μελανές χρωστικές και προστατεύει από τη ξήρανση, την ακτινοβολία UV και από τις μικροβιακές προσβολές το προσέγγυμα (Backhouse & Willetts, 1984, Williamson *et al.*, 2007).

Σε θερμές περιοχές με ζεστά και ξηρά καλοκαίρια ο βοτρώτης εμφανίζεται σε θερμοκήπια κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Ιδανικές συνθήκες για ανάπτυξη επιδημίας επικρατούν κατά την περίοδο του χειμώνα-αρχές άνοιξης στις μη θερμαινόμενες καλλιέργειες κηπευτικών υπό κάλυψη της Δυτικής Ελλάδας και της Κρήτης (Παππάς, 1992). Σε αυτές τις περιοχές το παθογόνο επιβιώνει την περίοδο του θέρους σε φυτικά υπολείμματα και συγκεκριμένα σε προσβεβλημένα στελέχη τα οποία παρέχουν προστασία από δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (Yunis & Elad, 1989). Σε μια έρευνα στη νοτιοανατολική περιοχή της Ισπανίας οι Raposo *et al.* (2001) διαπίστωσαν ότι ο μύκητας επιβιώνει κατά τους θερινούς μήνες αποκλειστικά



με τη μυκηλιακή του μορφή. Τα σκληρώτια δεν εμφανίζονται καθόλου και κατ' επέκταση είναι μάλλον απίθανο να σχηματιστεί και η τέλεια μορφή του παθογόνου, τα αποθήκια. Το παθογόνο έχει βρεθεί επίσης ότι επιβιώνει κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού σε εναλλακτικούς ξενιστές όπως είναι τα αυτοφυή ζιζάνια (Elad & Shtienberg, 1995).

Τα κονίδια που παράγονται στις διάφορες πηγές μολύσματος (υπολείμματα καλλιέργειας, προσβεβλημένα όργανα) αποτελούν τις πιο σημαντικές μονάδες του παθογόνου, που συνήθως διασπείρονται με τα ρεύματα του αέρα σε μεγάλες αποστάσεις. Αρκετές έρευνες όμως έδειξαν ότι τα σπόρια δυσκολεύονται να διαφύγουν από τους στροβιλισμούς που δημιουργούνται στην κόμη του φυλλώματος για να εισέλθουν στα ανώτερα ρεύματα αέρα και ως εκ τούτου εναποτίθενται σε πολύ κοντινές αποστάσεις. Επίσης έχει αναφερθεί ότι τα σπόρια μπορούν να μεταφερθούν με τη βροχή και τα έντομα αλλά αυτοί οι μηχανισμοί διασποράς είναι μικρότερης σημασίας (Jarvis, 1962b, Holz *et al.*, 2007). Η βροχόπτωση συνήθως συνδέεται με μεγάλη παραγωγή σπορίων εξαιτίας της αυξημένης διύγρανσης της φυλλικής επιφάνειας των φυτών. Τα σπόρια όμως απελευθερώνονται από τους κονιδιοφόρους όταν η σχετική υγρασία παρουσιάσει απότομη μείωση (Jarvis, 1962a, Elad & Shtienberg, 1995, Holz *et al.*, 2007).

Ο σχηματισμός των κονιδίων διεγείρεται από συγκεκριμένα μήκη κύματος υπεριώδους ακτινοβολίας. *In vitro* βρέθηκε ότι επαγωγή της σποριοποίησης σε μέγιστο βαθμό μπορεί να επιτευχθεί όταν υπάρξει ανάπτυξη των καλλιεργειών του παθογόνου σε συνθήκες σκότους για 4-6 μέρες, στη συνέχεια έκθεση σε black light (300-420nm) για 24 ώρες (ακτινοβολία κοντά στο υπεριώδες φάσμα εκπομπής) και τελικά ανάπτυξη για 24 ώρες σε συνθήκες σκότους (Tan & Epton, 1973). Η απελευθέρωση των κονιδίων από τους κονιδιοφόρους ελέγχεται από ένα υγροσκοπικό μηχανισμό κατά τον οποίο μία απότομη διακύμανση στην ατμόσφαιρα (πτώση στην υγρασία με αύξηση της θερμοκρασίας συνήθως κατά τις πρώτες πρωινές ώρες) προκαλεί ταλαντώσεις στους κονιδιοφόρους και μηχανική απελευθέρωση των κονιδίων στον αέρα. Τα κονίδια βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στην ατμόσφαιρα κατά τη διάρκεια της μέρας, φτάνοντας στη μέγιστη λίγο πριν ή μετά το μεσημέρι (Jarvis, 1962a). Οι Elad & Shtienberg (1995) σε πειράματα καλλιέργειας αγγουριάς θερμοκηπίου επιπλέον διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση των κονιδίων στο χώρο εξωτερικά του θερμοκηπίου ήταν σημαντικά χαμηλότερη από ότι στο εσωτερικό του.

## Είσοδος – Μόλυνση

Ο *B. cinerea* μπορεί να σχηματίσει είτε κηλίδες προσβολής σε διάφορους ιστούς είτε λανθάνουσες προσβολές σε καρπούς που εκδηλώνονται συνήθως κατά την ωρίμανση. Οι διαφορετικοί τρόποι εισόδου στους ιστούς των ξενιστών έχουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό των δύο τύπων μολύνσεων. Ο μύκητας εισέρχεται στο εσωτερικό των φυτών ευκολότερα μέσα από πληγές και προκαλεί μολύνσεις. Σε μία ανασκόπηση των Holz *et al.* (2007) περιγράφεται ότι σχεδόν όλα τα πειράματα τεχνητών μολύνσεων που διεξάγονταν σε νωπές πληγές με υδατικό αιώρημα σποριών ήταν επιτυχή. Επίσης, τα κονίδια δύνανται να προκαλέσουν μολύνσεις με απευθείας διάτρηση της εφυμενίδας των φύλλων (Williamson *et al.*, 1995, Παναγόπουλος, 2000). Έχει αναφερθεί επίσης και είσοδος κατευθείαν από τα στομάτια και από άλλα φυσικά ανοίγματα με σχηματισμό πλάκας συγκρατήσεως (Garcia-Arenal & Sagasta, 1980, van den Heuvel & Waterreus, 1983).

Στην περίπτωση των 'μικρών φρούτων' τα μέρη των ανθέων αποτελούν διόδους έναρξης της λανθάνουσας προσβολής η οποία συνήθως εκδηλώνεται κατά την ωρίμανση εξαιτίας της ύπαρξης ουσιών στους άωρους καρπούς με μυκητοστατική δράση. Στη φράουλα όπως και στο κόκκινο σμέουρο τα στάδια του ανοιχτού άνθους και της πτώσης των πετάλων είναι τα πλέον ευαίσθητα στη μόλυνση (Παππάς & Jordan, 1997). Η βλάστηση και η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα των κονιδίων του παθογόνου ευνοείται από τα εκκρίματα του στίγματος των ανθέων. Οι βλαστικές υφές δια μέσου του στύλου ακολουθούν την πορεία του γυρεοσωλήνα προς την ωοθήκη και προκαλούν διασυστηματική μόλυνση (McNicol *et al.*, 1985). Επίσης στην άμπελο η προσβολή των ανθέων έχει αναφερθεί ότι ξεκινάει πρωτίστως από την ανθοδόχη, ενώ στα άνθη της απιδιάς, κύρια πύλη εισόδου είναι οι στήμονες (de Kock & Holz, 1992, Viret *et al.*, 2004).

Η διαδικασία της μόλυνσης με σπόρια περιλαμβάνει τρεις διαδοχικές φάσεις: τη βλάστηση, την είσοδο και την τελική εγκατάσταση στους ιστούς του ξενιστή. Κατά τις δύο πρώτες φάσεις τα σπόρια είναι πολύ ευαίσθητα και επηρεάζονται σημαντικά από τις διακυμάνσεις του μικροκλίματος ενώ κατά την τρίτη φάση η ανάπτυξη του μυκηλίου εξαρτάται αποκλειστικά από τις συνθήκες που επικρατούν στο εσωτερικό του ξενιστή. Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο συνθηκών είναι η πρόσβαση του παθογόνου στην ελεύθερη υγρασία (Elad & Shtienberg, 1995). Για να γίνει η μόλυνση απαιτείται η διατήρηση ενός λεπτού στρώματος νερού πάνω στους φυτικούς ιστούς για μερικές ώρες, ανεξάρτητα από τη σχετική υγρασία στην ατμόσφαιρα (Carre & Coyier, 1984). Όταν δεν έχει δημιουργηθεί αυτό το λεπτό στρώμα νερού τότε απαραίτητη προϋπόθεση για να επιτευχθεί η μόλυνση είναι η ύπαρξη σχετικής

ατμοσφαιρικής υγρασίας >93 % (Snow, 1949, Williamson *et al.*, 1995). Οι Yunis *et al.* (1994) σε πειράματα θερμοκηπίου παρατήρησαν ότι σε ελεύθερη υγρασία, η βλάστηση των σπορίων επιτυγχάνεται ύστερα από 4 ώρες, ενώ σε κορεσμένη ατμόσφαιρα (σχ. υγρασία 100 %) απουσία ελεύθερης υγρασίας, η βλάστηση επιτυγχάνεται μετά από 30 ώρες σε θερμοκρασία 22 °C.

Ο *B. cinerea* δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας γιατί μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος που κυμαίνονται μεταξύ 1 και 30 °C με βέλτιστη για την ανάπτυξη τους 18-23 °C (Παναγόπουλος, 2000). Σε πειράματα που χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα αιώρημα σπορίων σε άνθη ζέρμπερας, οι βλαστικοί σωλήνες των σπορίων ήταν βραχείς (<20 μm) σε ένα εύρος θερμοκρασίας 4-25 °C ενώ δεν βλάσταναν στους 30 °C (Salinas *et al.*, 1989). Πάντως σε πειράματα *in vitro* βρέθηκε ότι τα σπόρια του μύκητα βλαστώνουν σε ένα εύρος θερμοκρασίας από 5 έως 35 °C. Η επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών (10 °C) είχε ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της βλάστησης καθώς το 60 % των σπορίων βλάστανε σε 48 ώρες πλην όμως το απρεσσόριο ήταν καλά σχηματισμένο, ενώ αντίθετα στους 25-30 °C η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα ήταν ταχύτερη όμως δεν σχηματιζόνταν απρεσσόριο (Shiraishi *et al.*, 1970).

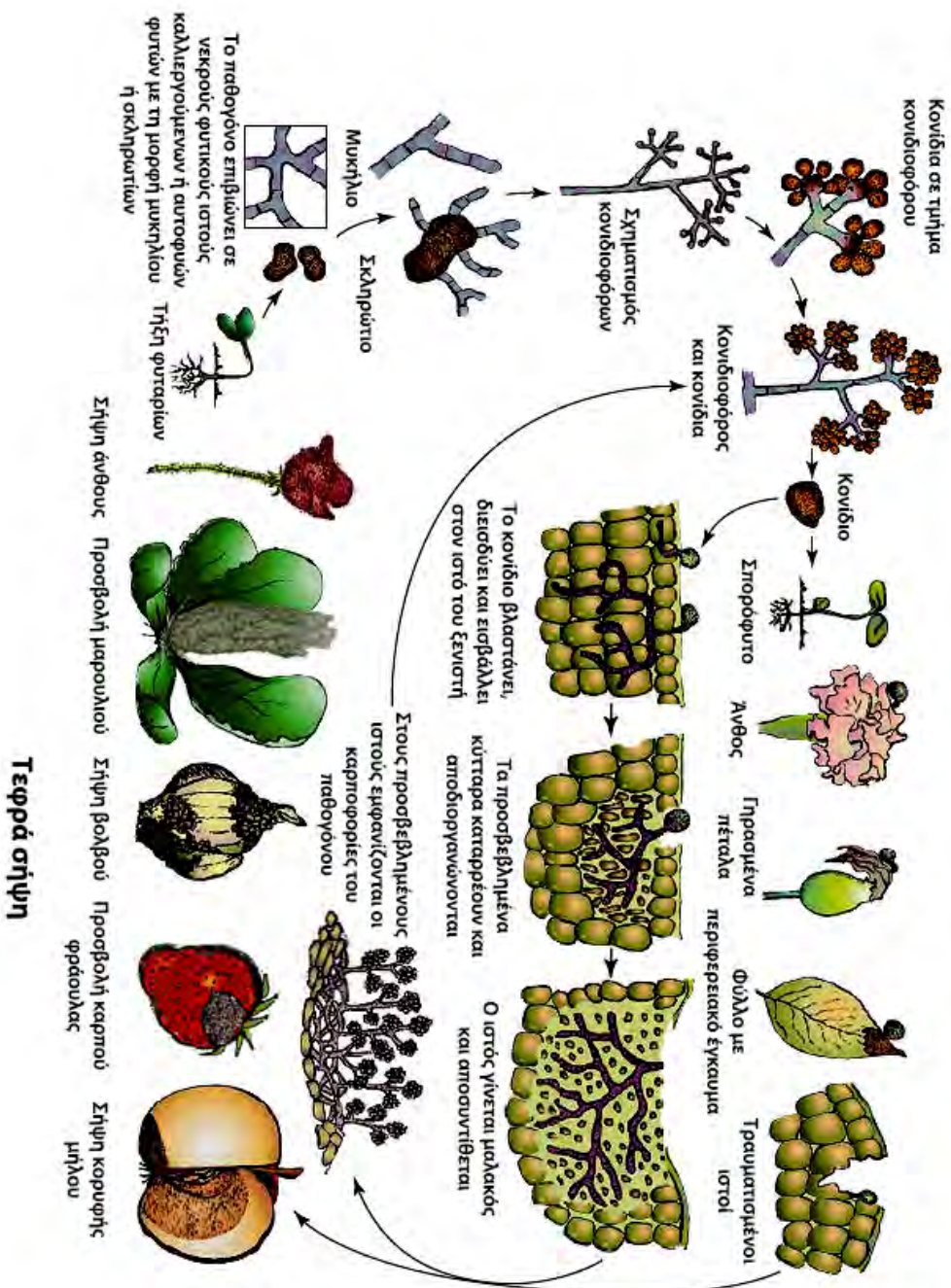
Η διαδικασία της εισόδου του παθογόνου στους ιστούς του ξενιστή διαδέχεται τη βλάστηση και διαρκεί περίπου 2-3 ώρες. Επομένως, κατά μέσο όρο το παθογόνο είναι εκτεθειμένο σε διακυμάνσεις του μικροκλίματος για 9-10 ώρες (7 ώρες για βλάστηση και 2-3 για την είσοδο). Σε βέλτιστες συνθήκες, ο χρόνος επώασης της ασθένειας διαρκεί 5-8 μέρες (Elad & Shtienberg, 1995). Η υψηλή συγκέντρωση σπορίων βρέθηκε να συντελεί στην απευθείας είσοδο του παθογόνου με τις βλαστικές υφές και μάλιστα μέσα σε διάστημα 12-14 ωρών από τη μόλυνση. Αντίθετα χαμηλότερες συγκεντρώσεις είχαν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό πλάκας συγκράτησης (απρεσσορίου) και να επιτυγχάνεται ικανοποιητική είσοδος μετά από 2-4 μέρες (van den Heuvel & Waterreus, 1983). Προκειμένου να επιτευχθεί επιτυχής μόλυνση στους περισσότερους ιστούς των ξενιστών, απαραίτητη είναι η ύπαρξη θρεπτικών συστατικών. Σε πειράματα τεχνητών μολύνσεων με σπόρια του *B. cinerea* σε υδατικά αιωρήματα, η προσθήκη θρεπτικών συστατικών εξασφάλιζε υψηλά ποσοστά επιτυχών μολύνσεων, τα οποία υπό φυσικές συνθήκες πιθανότατα εκκρίνονται από πηλές, φύλλα ή άλλους ιστούς (Harper *et al.*, 1981, Rossall & Mansfield, 1981). Στην Εικόνα 3 περιγράφονται παραστατικά τα στάδια του κύκλου της ασθένειας.

## Αλληλεπιδράσεις παθογόνου – ξενιστή

Ο *B. cinerea* καταστρέφει τα κύτταρα του ξενιστή πριν αυτά αποικιστούν από τις υφές του παθογόνου (Clark & Lorbeer, 1976). Ενώ μέχρι πρόσφατα ήταν παραδεκτό ότι οι ξενιστές είχαν παθητικό ρόλο κατά τη διαδικασία της παθογένεσης, τελευταίες έρευνες έδειξαν ότι ενεργοποιείται μία ακολουθία προγραμματισμένου θανάτου των κυττάρων μέσω της πυρηνικής συμπίκνωσης στα κύτταρα του ξενιστή και της έκφρασης του γονιδίου για την αντίδραση υπερευαισθησίας *hsr203j* (Govrin & Levine, 2000). Φαίνεται λοιπόν ότι ενώ το φαινόμενο της αντίδρασης υπερευαισθησίας εμποδίζει την είσοδο και εγκατάσταση βιοτροφικών παθογόνων στους ιστούς των ξενιστών, απεναντίας διευκολύνει τα νεκροτροφικά, όπως το *B. cinerea*, κατά την παθογένεση. Η διάτρηση της εφυμενίδας και ο σχηματισμός αρχικής κηλίδας προσβολής ενεργοποιεί μια οξειδωτική μεταβολική έκρηξη σε στρώματα κυττάρων, δακτυλιοειδώς γύρω από τις άκρες των υφών του παθογόνου. Η υψηλή συγκέντρωση δραστικών μορφών οξυγόνου (κυρίως υπεροξειδίου του υδρογόνου) που βρέθηκε στις θέσεις αλληλεπίδρασης παθογόνου-ξενιστή, πιθανότατα συνδέεται με αυτή τη μεταβολική έκρηξη. Ορισμένα ένζυμα-διεγέρτες του παθογόνου πιθανώς να σχετίζονται με την παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου.

Τέτοια ένζυμα που εμπλέκονται κατά τη διαδικασία της παθογένεσης και βρέθηκαν να έχουν φυτοτοξική δράση είναι η *botcinolide*, ένα υποκατάστατο λακτόνης (Cutler *et al.*, 1993) και η *botrydial*, ένα τρικυκλικό σεσκιτερπένιο (Colmenares *et al.*, 2002). Επίσης αρχικά είχε αναφερθεί και πιθανή έκκριση οξαλικού οξέος όπως στην περίπτωση του *S. sclerotiorum*, ενός στενά συγγενικού είδους του *B. cinerea* (Godoy *et al.*, 1990). Αυτό πρόσφατα επαληθεύτηκε με την ταυτοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν το οξαλικό οξύ (Amselem *et al.*, 2011). Το οξαλικό οξύ είναι υπεύθυνο για μια σειρά συμβάντων κατά την παθογένεση όπως αναστολή φυτοαλεξινών, επαγωγή πολυγαλακτονουρασών για αποδιοργάνωση των κυτταρικών τοιχωμάτων, αλλαγή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων κ.α.

Η εγκατάσταση του παθογόνου στους ιστούς του ξενιστή διευκολύνεται από μια σειρά εκλυόμενων ενζυμικών τα οποία προκαλούν τη ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος και την έκλυση υδρογονανθράκων που αποτελούν πηγή ενέργειας. Τα κύρια συστατικά των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η πηκτίνη. Ένζυμα όπως οι κυτταρινάσες, οι ξυλανάσες και αραβινάσες καθώς και οι πηκτινάσες αποδιοργανώνουν αντίστοιχα κάθε συστατικό των τοιχωμάτων με αποτέλεσμα τη λύση του κυττάρου. Τα ένζυμα που έχουν δράση



**Εικόνα 3.** Κύκλος της ασθένειας του παθογόνου [Προσαρμογή από Agrios (2005)].

κατά την αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή περιγράφονται με λεπτομέρεια από τους Kars & van Kan (2007) ενώ πληροφορίες για τα εμπλεκόμενα γονίδια παρέχονται από τους Amselem *et al.* (2011).

## Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση της ασθένειας γίνεται με τη χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών, καταλλήλων καλλιεργητικών τεχνικών και βιολογικών παραγόντων σε συνδυασμό με την εφαρμογή χημικών ουσιών.

### Ανθεκτικές ποικιλίες

Αρκετές προσπάθειες έχουν γίνει προκειμένου να αναπτυχθούν καλλιεργούμενες ποικιλίες φυτών με ανοχή στο βοτρυτή αλλά πολλές φορές φαίνεται ότι υπάρχουν δυσκολίες και το αποτέλεσμα δεν είναι το επιθυμητό (Williamson *et al.*, 2007). Οι περισσότερες μελέτες διεξάγονται πάνω σε φυτά τομάτας, στα οποία ενσωματώνονται γονίδια με ανοχή στην ασθένεια από περιοχές με ποσοτικά γνωρίσματα (Quantitative trait loci-QTL). Τέτοιες περιοχές εντοπίζονται στο γένωμα συγγενικών άγριων ειδών (Guimarães *et al.*, 2004, Stotz *et al.*, 2007). Φαίνεται λοιπόν πως υπάρχει μια κατεύθυνση εντοπισμού γονιδίων για τη δημιουργία πρωτεϊνών με δράση κατά των ενζύμων που εμπλέκονται στην παθογένεση, μέσα από την παραλλακτικότητα στο διαειδικό γενετικό υλικό. Τέτοιες πρωτεΐνες των οποίων ο ρόλος έχει διερευνηθεί είναι διάφορες χιτινάσες και γλυκανάσες, όπως επίσης και πηκτινάσες, ενδοπολυγαλακτουρονάσες και κυτταρινάσες (Barkai-Golan *et al.*, 1988, Johnston & Williamson, 1992, Reignault *et al.*, 1994).

### Καλλιεργητικές τεχνικές

Μεγάλης σημασίας θεωρείται η λήψη καλλιεργητικών πρακτικών για την αντιμετώπιση της ασθένειας σύμφωνα με τους κανόνες ορθής γεωργικής πρακτικής που προωθείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Για τη διατήρηση του μολύσματος σε χαμηλά επίπεδα και τη δημιουργία συνθηκών που θα αποτρέπουν την ανάπτυξη της ασθένειας συνιστώνται: α) μείωση της υγρασίας με καλό αερισμό, αποφυγή υπερβολικής άρδευσης και μεγάλων διακυμάνσεων θερμοκρασίας στα θερμοκήπια, β) ελάττωση του μολύσματος με τήρηση καλής υγιεινής και απομάκρυνση προσβεβλημένων, γηρασμένων ή νεκρών φυτικών ιστών, γ) χρήση κατάλληλων φίλτρων UV στα θερμοκήπια για αποτροπή επαγωγής της σποριοποίησης, δ) επαρκείς ποσότητες ασβεστούχου λίπανσης καθώς συνδέεται με αύξηση της

συνεκτικότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων και ως εκ τούτου μείωση της ενζυμικής αποδιοργάνωσης από τον *B. cinerea* (Παππάς, 1992, Παναγόπουλος, 2000, Dik & Wubben, 2007).

#### Βιολογικοί παράγοντες

Η έρευνα της δράσης βιολογικών παραγόντων κατά του *B. cinerea* οδήγησε στην ανάπτυξη βιολογικών σκευασμάτων ως μεθόδου καταπολέμησης του παθογόνου. Οι βιολογικοί παράγοντες έχει αποδειχθεί ότι ανταγωνίζονται τον *B. cinerea* στη φυλλόσφαιρα. Ο *B. cinerea* είναι πολύ ευπαθής στον ανταγωνισμό, εξαιτίας της ανάγκης να προσλάβει θρεπτικά συστατικά από μια εξωτερική πηγή. Η παρεμπόδιση της ασθένειας μέσω του ανταγωνισμού μπορεί να οφείλεται στη μείωση της σαπροφυτικής ανάπτυξης, της διασποράς των σπορίων και της μολυσματικότητας ή της επαγωγής των μηχανισμών άμυνας των φυτών (Elad & Stewart, 2007). Βιολογικοί παράγοντες με δράση κατά του βοτρώτη μπορεί να είναι μύκητες (*Trichoderma harzianum*, *Ulocladium oudemansii*, *Gliocladium roseum*), ζύμες (*Candida oleophila*), ή βακτήρια του γένους *Bacillus* και *Pseudomonas* (Williamson *et al.*, 2007). Από τα βιολογικά σκευάσματα που εφαρμόζονται στην πράξη το πιο σημαντικό κατά του βοτρώτη είναι του *Trichoderma harzianum*, το οποίο συνήθως εφαρμόζεται σε θερμοκήπια όπου οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι πιο σταθερές (Elad, 2000). Ένα γενικό μειονέκτημα των βιολογικών σκευασμάτων είναι ότι δεν μπορούν να διατηρήσουν την αποτελεσματικότητά τους πέρα από ένα εύρος θερμοκρασίας και υγρασίας και γι' αυτό θα πρέπει να εφαρμόζονται όταν δεν υπάρχει μεγάλη πίεση μολύσματος σε συνδυασμό με άλλα μέτρα αντιμετώπισης.

#### Χημική καταπολέμηση

Όταν επικρατούν συνθήκες ευνοϊκές για την ανάπτυξη επιδημίας η εφαρμογή μυκητοκτόνων είναι η μόνη αποτελεσματική μέθοδος για την καταπολέμηση της ασθένειας. Επειδή τα τελευταία χρόνια υπάρχουν πιέσεις από μερίδα των καταναλωτών για πιθανές επιπτώσεις στο περιβάλλον, η χρήση των μυκητοκτόνων πλέον αποτιμάται μέσα από τις αρχές της ολοκληρωμένης καταπολέμησης. Γενικά τα βοτρωδιοκτόνα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε έξι ομάδες σύμφωνα με τους βιοχημικούς τρόπους δράσης τους: 1) Γενικοί αναστολείς ενζύμων (π.χ. thiram, dichlofluanid), 2) παρεμποδιστές της κυτταροδιαίρεσης (βενζιμιδαζολικά, φαινυλοκαρβαμιδικά), 3) μυκητοκτόνα που δρουν στην ώσμωση των κυττάρων (φαινυλοπυρρόλες, δικαρβοξιμιδικά), 4) μυκητοκτόνα που δρουν στην αναπνοή

(QoIs, SDHIs, φαινυλοπυριδιναμίνες), 5) αναστολείς βιοσύνθεσης μεθειονίνης (ανιλινοπυριμιδίνες), 6) παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης (fenhexamid). Ο τρόπος δράσης των μυκητοκτόνων αυτών αναφέρεται παρακάτω στην ενότητα 'Βοτρυδιοκτόνα και ανάπτυξη ανθεκτικότητας'.

Στις περισσότερες καλλιέργειες τα μυκητοκτόνα εφαρμόζονται προληπτικά ανά διαστήματα 7-12 ημερών είτε όταν οι καιρικές συνθήκες είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη της ασθένειας είτε με την εμφάνιση των πρώτων προσβολών. Σε καλλιέργειες αμπέλου ένα συνιστώμενο πρόγραμμα καταπολέμησης περιλαμβάνει 3-6 εφαρμογές μυκητοκτόνων μεταξύ των σταδίων της άνθησης και της συγκομιδής (Shtienberg, 2007). Κατά τους Walker *et al.* (2013), σε αμπελώνες της Βόρειας Γαλλίας οι εφαρμογές περιορίζονται σε τρεις εξαιτίας της ανθεκτικότητας που έχει αναπτύξει το παθογόνο: στο τέλος της άνθησης, μόλις οι ρώγες αρχίσουν να ενώνονται και στην αρχή της ωρίμανσης των ρωγών. Συνήθως εφαρμόζονται κατά σειρά τα μυκητοκτόνα fenhexamid, fludioxonil και pyrimethanil (Petit *et al.*, 2011). Εκτός από τα χημικά και βιολογικά σκευάσματα, κατά του βοτρώτη σε καλλιέργειες αμπέλου έχει δοκιμαστεί και η ουσία χιτοσάνη (διεγέρτης άμυνας των φυτών), η οποία σε πειράματα αγρού με εφαρμογές 21 και/ή 5 ημέρες πριν τη συγκομιδή μείωσε το ποσό της ασθένειας κατά 55 % (Romanazzi *et al.*, 2002, Reglinski *et al.*, 2010). Αν και οι βιολογικές μέθοδοι κρίνονται ανεπαρκείς για την αντιμετώπιση του παθογόνου στην πράξη, πολλοί ερευνητές θεωρούν ότι μίγματα βιολογικών παραγόντων/ουσιών διέγερσης μηχανισμών ανοχής έχουν θέση σε συστήματα ολοκληρωμένης καταπολέμησης (Elmer & Reglinski, 2006, Παναγόπουλος, 2007).

Στα μηλοειδή το παθογόνο προκαλεί μετασυσπλεκτικές σήψεις περισσότερο σε αχλάδια και λιγότερο σε μήλα. Εισέρχεται από τη κορυφή του καρπού (περιοχή του κάλυκα) κατά την άνθιση και παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση μέχρι τη συγκομιδή. Το παθογόνο δραστηριοποιείται στις αποθήκες-ψυγεία όπου τα προϊόντα μπορούν να παραμείνουν μέχρι και 12 μήνες και μπορεί να προκαλέσει σημαντικές ζημιές (Παναγόπουλος, 2007). Για την αντιμετώπιση της ασθένειας στις ΗΠΑ γίνονται μετασυσπλεκτικές εφαρμογές με τα μυκητοκτόνα cyprodinil ή fludioxonil ενώ παλαιότερα χρησιμοποιούνταν το thiabendazole (Kim & Xiao, 2010). Ωστόσο, ιδιαίτερα κατά τα τελευταία χρόνια και σύμφωνα με τους κανόνες της ολοκληρωμένης καταπολέμησης, η αντιμετώπιση του βοτρώτη μετασυσπλεκτικά μπορεί να γίνεται με εφαρμογές μυκητοκτόνων πριν τη συγκομιδή. Ιδιαίτερα αποτελεσματικό έχει βρεθεί το μίγμα pyraclostrobin+boscalid καθώς μείωσε την προσβολή κατά 92 % σε σχέση με το μάρτυρα όταν εφαρμόστηκε 7 ημέρες πριν τη συγκομιδή στο στάδιο του ώριμου προς συγκομιδή καρπού (Xiao & Boal, 2009). Σύμφωνα με τις εγκεκριμένες χρήσεις από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης &



Τροφίμων, οι εφαρμογές με τα μυκητοκτόνα cyprodinil και fludioxonil επιτρέπεται να γίνονται όταν ο καρπός έχει το μέγεθος καρυδιού. Από πρόσφατα δεδομένα φαίνεται ότι η παρουσία ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου σε αποθηκευμένα μήλα ίσως θέτει σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων αυτών (Yan *et al.*, 2014).

Σε καλλιέργειες φράουλας και άλλων 'μικρών φρούτων' όπως είναι το σμέουρο και το ριβήσιο, το παθογόνο προκαλεί μεγάλης οικονομικής σημασίας ζημιές. Η πιο συνηθισμένη πρακτική, σε περιοχές όπου ευνοείται η ανάπτυξη του παθογόνου, είναι οι εφαρμογές μυκητοκτόνων από την άνθηση έως το δεύτερο στάδιο συγκομιδής σε εβδομαδιαία βάση. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τα στάδια της άνθησης είναι πολύ ευπαθή στις μολύνσεις και ιδιαίτερα το στάδιο του ανοικτού άνθους και της πτώσης των πετάλων (Παππάς & Jordan, 1997). Ειδικά για την περίπτωση της φράουλας υπάρχουν διαθέσιμα για εφαρμογή σε προγράμματα με εναλλαγή σχεδόν όλα τα σύγχρονα βοτρυδιοκτόνα, εξαιτίας της ανθεκτικότητας. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι παρόλο που υπάρχει ανθεκτικός πληθυσμός του παθογόνου σε όλες τις σύγχρονες ομάδες μυκητοκτόνων, τα μυκητοκτόνα fenhexamid και pyraclostrobin+boscalid έχουν διατηρήσει τη δράση τους, ενώ οι εφαρμογές με iprodione αντίστοιχα δεν ήταν και τόσο αποτελεσματικές (Fernández-Ortuño *et al.*, 2012b, Grabke *et al.*, 2013, Grabke *et al.*, 2014). Επίσης κάποιες καλλιεργητικές πρακτικές όπως η απομάκρυνση των γηρασμένων φύλλων είχαν θετική επίδραση στη μείωση των προσβολών, όχι όμως και η απομάκρυνση των προσβεβλημένων καρπών (Shtienberg, 2007). Τέλος, η επιλογή κατάλληλων ποικιλιών είναι μεγάλης σημασίας καθώς μερικές παρουσιάζουν πολύ σημαντική αντοχή στην ασθένεια (π.χ. ποικ. Rosa Linda) ενώ κάποιες άλλες είναι πολύ ευπαθείς (π.χ. ποικ. Sweet Charlie) ακόμα και όταν γίνει εφαρμογή χημικών ουσιών (Legard *et al.*, 2002).

Για την προστασία των εναέριων μερών των κηπευτικών καλλιεργειών συνιστώνται εβδομαδιαίες εφαρμογές με εγκεκριμένα μυκητοκτόνα από την άνθηση έως την ωρίμανση του καρπού (Παναγόπουλος, 2000). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως σε περιπτώσεις με μικρή πίεση μολύσματος μπορούν να γίνουν εφαρμογές με βιολογικούς παράγοντες όπως είναι τα *Trichoderma harzianum* ή *Bacillus subtilis* με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Μάλιστα σε καλλιέργεια τομάτας έχει αναπτυχθεί και ένα σύστημα προειδοποίησης (BOTMAN) για εκδήλωση επιδημίας με βάση μετεωρολογικά δεδομένα στο Ισραήλ (Shtienberg & Elad, 1997). Με βάση αυτό το σύστημα: α) όταν οι συνθήκες δεν ευνοούν την ανάπτυξη της ασθένειας δεν γίνονται ψεκασμοί, β) σε ευνοϊκές συνθήκες εφαρμόζεται χημική καταπολέμηση ενώ γ) σε όλες τις άλλες περιπτώσεις γίνονται επεμβάσεις με το

*Trichoderma harzianum*. Το σύστημα αυτό ωστόσο φαίνεται ότι δεν λειτούργησε καθόλου στην Ισπανία και οι ψεκασμοί αποκλειστικά με μυκητοκτόνα ήταν οι πιο αξιόπιστοι (Moyano *et al.*, 2003b). Πάντως σε πειράματα 3ετούς διάρκειας που έγιναν σε τομάτα θερμοκηπίου με 4-6 εφαρμογές ανά καλλιεργητική περίοδο ο θειικός χαλκός και το fenhexamid ήταν τα πιο αποτελεσματικά περιορίζοντας το παθογόνο στο 16 % των φυτών. Κατά σειρά ακολουθούσαν τα: *Bacillus subtilis* (20 %), fludioxonil+cyprodinil (26.7 %), pyraclostrobin+boscalid (40 %) και pyrimethanil (53 %) ενώ η προσβολή στο μάρτυρα ήταν 53 % (Ingram & Meister, 2006).

### Βοτρυδιοκτόνα και ανάπτυξη ανθεκτικότητας

Μέχρι τη δεκαετία του 1960, κατά του βοτρυτή χρησιμοποιούνταν μυκητοκτόνα που δρούσαν ως γενικοί αναστολείς ενζύμων. Τα μυκητοκτόνα αυτά (ουσίες που είχαν ως βάση το χαλκό και το θείο, φθαλιμίδια και συγγενή σουλφίδια, διθειοκαρβαμιδικά, φθαλονιτρίλια) έχουν χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για πάνω από 40 χρόνια. Αυτές οι ουσίες διατήρησαν την αποτελεσματικότητά τους και χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα ευρέως εξαιτίας του πολυθεσικού τρόπου δράσης τους και κατ' επέκταση του χαμηλού κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Brent & Hollomon, 2007). Η εποχή των μυκητοκτόνων με εξειδικευμένο τρόπο δράσης σε ενζυμικά σημεία-στόχους των κυττάρων των παθογόνων ξεκίνησε από τα τέλη της δεκαετίας του 1960 με την εμφάνιση των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων. Από εκείνη την περίοδο και μετέπειτα, με την εισαγωγή νέων μυκητοκτόνων με εξειδικευμένη δράση, το πρόβλημα της ανάπτυξης ανθεκτικότητας κλιμακώθηκε (Russell, 1995). Παρακάτω γίνεται μια ιστορική αναφορά στα κυριότερα μυκητοκτόνα με βοτρυδιοκτόνο δράση και τα αντίστοιχα προβλήματα ανθεκτικότητας.

Γενικοί αναστολείς ενζύμων

#### ***Dichlofluanid, chlorothalonil, thiram***

Το chlorothalonil (φθαλονιτρίλια) μαζί με τα διθειοκαρβαμιδικά (π.χ. thiram), τα φθαλιμίδια (captan) και τα συγγενή σουλφίδια (π.χ. dichlofluanid) είναι από τα παλαιότερα μυκητοκτόνα με δράση κατά του βοτρυτή. Δρουν ως γενικοί αναστολείς ενζύμων σε πολλαπλά σημεία στόχους των κυττάρων και εξαιτίας του τρόπου δράσης τους υπάρχει μειωμένος κίνδυνος εμφάνισης ανθεκτικότητας. Σε πειράματα τεχνητών μολύνσεων σε αγγούρια θερμοκηπίου με απομονώσεις μειωμένης ευαισθησίας στο dichlofluanid, καταγράφηκε τη δεκαετία του 1980 μειωμένη αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου (Malathrakis, 1989). Στην πράξη ωστόσο

διαπιστώθηκε ότι το dichlofluanid είχε διατηρήσει τη δράση του, παρόλο που είχε αυξηθεί ο ανθεκτικός στο μυκητοκτόνο πληθυσμός του παθογόνου (Pappas & Elena, 1992). Σε *in vitro* δοκιμές το chlorothalonil και τα άλλα μυκητοκτόνα είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά κατά της βλάστησης των σπορίων αλλά η δράση τους στην ανάπτυξη του μυκηλίου είναι μειωμένη (Leroux, 2007). Η μονομερής εξέταση της μυκηλιακής ανάπτυξης δεν αποτελεί ασφαλές κριτήριο για τον προσδιορισμό των επιπέδων ευαισθησίας (Zhang *et al.*, 2009). Τα μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής πιθανότατα αναστέλλουν τη δράση μερικών ενζύμων που περιέχουν θειόλες στις αντιδράσεις της αναπνοής (Slawewski *et al.*, 2002, Leroux, 2007).

Παρεμποδιστές της κυτταροδιαίρεσης

### **Βενζιμιδαζολικά – Φαινυλοκαρβαμιδικά**

Τα βενζιμιδαζολικά (carbendazim, benomyl, thiophanate methyl) είναι ευρέως φάσματος διασυστηματικά μυκητοκτόνα, παράγωγα της βενζιμιδαζόλης τα οποία εμφανίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1960. Τα μυκητοκτόνα της κατηγορίας αυτής ήταν αποτελεσματικά κατά του βοτρώτη και αποτέλεσαν την αφετηρία για τη δημιουργία μυκητοκτόνων με δράση σε σημεία στόχους (Georgoroulos, 1977). Όμως σε δυο μόλις χρόνια από την εφαρμογή τους στην πράξη εμφανίστηκαν προβλήματα ανθεκτικότητας του παθογόνου. Η γρήγορη εμφάνιση ανθεκτικότητας σε αυτή την ομάδα των μυκητοκτόνων και η διαπίστωση ότι τα φαινυλοκαρβαμιδικά (diethofencarb) εμφάνιζαν αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα με τα βενζιμιδαζολικά (Kato *et al.*, 1984) οδήγησε στην παρασκευή του μίγματος carbendazim+diethofencarb ως στρατηγική ταυτόχρονης αντιμετώπισης των ανθεκτικών και των ευαίσθητων στα βενζιμιδαζολικά στελεχών του παθογόνου. Φαινότυποι με υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και μέτρια στα δικαρβοξυμιδικά αποτελούν ένα μεγάλο τμήμα του πληθυσμού του *B. cinerea* και εντοπίζονται εύκολα ακόμα και σε περιπτώσεις όπου δεν υπάρχουν πλέον εφαρμογές με αυτά τα μυκητοκτόνα (Pappas, 1997, Yourman & Jeffers, 1999, Leroux *et al.*, 2002).

Τα βενζιμιδαζολικά είναι αναστολείς του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων στη διαδικασία της μίτωσης κατά την κυτταροδιαίρεση καθώς δεσμεύονται στην ετεροδιμερή υπομονάδα της β-τουμπουλίνης (Davidse, 1986). Η ανθεκτικότητα στην ομάδα αυτή των μυκητοκτόνων οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου *Mbc1* που κωδικοποιεί την β-τουμπουλίνη και αλλάζει τον τρόπο πρόσδεσης στην πρωτεΐνη (Faretra & Pollastro, 1991). Τα φαινυλοκαρβαμιδικά έχουν τρόπο δράσης όμοιο με εκείνο των βενζιμιδαζολικών (Suzuki *et al.*, 1984). Στον *B.*

*cinerea* η μετάλλαξη στη θέση 198 του γλουταμινικού οξέος σε αλανίνη (E198A) εντοπίζεται σε φαινοτύπους υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά. Αυτά τα στελέχη είναι ευαίσθητα στο diethofencarb. Οι μεταλλάξεις του γλουταμινικού οξέος σε λυσίνη στην ίδια θέση (E198K) και της φαινυλαλανίνης σε τυροσίνη στη θέση 200 του ίδιου γονιδίου επιφέρει μέτρια ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και υψηλή στο diethofencarb (Yarden & Katan, 1993).

Ρυθμιστές της ωσμωτικής πίεσης του κυττάρου

### **Δικαρβοξιμιδικά**

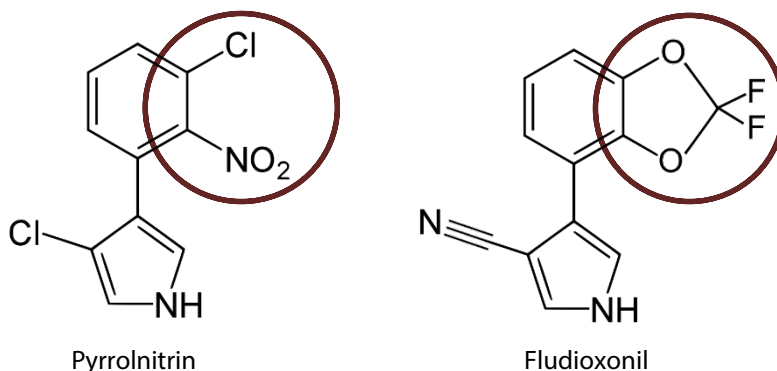
Στα μέσα της δεκαετίας του 1970 αναπτύχθηκαν τα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα (iprodione, vinclozolin, procymidone). Τα μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής αποδείχθηκε ότι είχαν εξαιρετική δράση κατά του βοτρώτη και αντικατέστησαν στις εφαρμογές τα βενζιμιδαζολικά, εξαιτίας των προβλημάτων ανθεκτικότητας που είχε προκύψει (Leroux, 2007). Σε αντίθεση με τα βενζιμιδαζολικά, η απώλεια της δραστηριότητας των δικαρβοξιμιδικών μυκητοκτόνων έγινε σταδιακά, μέσα σε μία δεκαετία. Σε αυτό συνετέλεσε η εκτεταμένη χρήση των μυκητοκτόνων αυτών σε συνδυασμό με την έλλειψη εναλλακτικών ουσιών για την αντιμετώπιση του βοτρώτη. Σε συνθήκες αγρού ωστόσο, ουδέποτε παρατηρήθηκε πλήρης απώλεια της δραστηριότητας των δικαρβοξιμιδικών μυκητοκτόνων και αυτό διαφαίνεται από την κυριαρχία των μετρίως ανθεκτικών στελεχών (Topolovec-Pintarić, 2011).

Η γενετική ανάλυση απομονώσεων του *B. cinerea* έδειξε ότι η ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα καθορίζεται από το γονίδιο *Daf1* (Faretra & Pollastro, 1991). Σε περαιτέρω μελέτες διαπιστώθηκε ότι τα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα παρεμποδίζουν τη διαδικασία μεταγωγής σημάτων κατά τρόπο ανάλογο με εκείνο των φαινυλοπυρρολών όμως σε διαφορετικό σημείο ήτοι στην ιστιδινική κινάση που ελέγχεται από το γονίδιο *bos1* (πρώην *Daf1*). Μεταλλάξεις στο γονίδιο του *B. cinerea bos1* που είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό της ιστιδινικής κινάσης έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί τρεις τύποι ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά που σχετίζονται με διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *bos1*. Ο ένας τύπος χαρακτηρίζεται από μετάλλαξη της ισολευκίνης σε σερίνη στη θέση 365 (I365S) που είναι και η κυρίαρχη μετάλλαξη, ο δεύτερος από τις ταυτόχρονες μεταλλάξεις της βαλίνης σε φαινυλαλανίνη και της γλουταμίνης σε ιστιδίνη στις θέσεις 368 και 369 (V368F και Q369H) και ο τρίτος από τις μεταλλάξεις της γλουταμίνης σε προλίνη και ασπαραγίνης σε σερίνη στις θέσεις 369 και 373 (Q369P και N373S), αντίστοιχα

(Oshima *et al.*, 2006, Banno *et al.*, 2008). Αυτοί οι διαφορετικοί τύποι ανθεκτικότητας εντοπίζονται σε μετρίως ανθεκτικά στα δικαρβοξυμιδικά στελέχη του παθογόνου.

### Φαινυλοπυρρόλες

Οι ουσίες αυτές είναι παράγωγα του αντιβιοτικού pyrrolnitrin που είναι προϊόν του βακτηρίου *Pseudomonas pyrocinia* (Arima *et al.*, 1964). Το fludioxonil είναι παράγωγο του μορίου αυτού με αλλαγές στο φαινυλικό δακτύλιο που το καθιστούν πιο σταθερό στη φωτοδιάσπαση (Εικόνα 4). Είναι μη διασυστηματικό προστατευτικό μυκητοκτόνο το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως σε μίγμα με το cyprodinil της ομάδας των ανιλινοπυριμιδινών (Rosslenbroich & Stuebler, 2000).



**Εικόνα 4.** Το fludioxonil είναι παράγωγο της pyrrolnitrin. Οι αλλαγές στο φαινυλικό δακτύλιο το καθιστούν πιο σταθερό στη φωτοδιάσπαση.

Σε πειράματα *in vitro* το fludioxonil είναι αποτελεσματικό σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης του *B. cinerea* και μάλιστα προκαλεί περιελίξεις στους βλαστικούς σωλήνες κατά τρόπο ανάλογο με εκείνο των δικαρβοξυμιδικών μυκητοκτόνων. Επιπλέον διαπιστώθηκε επαγωγή ουδέτερων πολυολίων (γλυκερόλης) στο μυκήλιο άγριων στελεχών (αλλά όχι ανθεκτικών) του *Neurospora crassa* μετά από έκθεση σε διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου (Pillonel & Meyer, 1997, Zhang *et al.*, 2002). Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές τελικά βρέθηκε ότι ο τρόπος δράσης των μυκητοκτόνων της κατηγορίας αυτής σχετίζεται με τη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης του μιτογόνου (Mitogen-activated protein kinase-MAPK) υπεύθυνης για τη ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *os2* (*HOG1*). Η φωσφορυλίωση από τις πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένας κύριος μηχανισμός μεταγωγής εξωκυτταρικών σημάτων στον πυρήνα από μεμβρανικούς υποδοχείς, που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα για τη ρύθμιση λειτουργιών όπως είναι η μυκηλιακή ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, η αναπαραγωγή, ο μεταβολισμός

και η ανοχή σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες (Yoshimi *et al.*, 2005, Noguchi *et al.*, 2007).

Οι Kanetis *et al.* (2008) σε πειράματα ανθεκτικότητας του *Penicillium digitatum* στο fludioxonil διαπίστωσαν ότι τα ευαίσθητα ( $EC_{50}$  0.02-0.04 mg L<sup>-1</sup>) και μέτριας ανθεκτικότητας ( $EC_{50}$  0.08-0.65 mg L<sup>-1</sup>) στελέχη συνθέτουν αυξημένες ποσότητες γλυκερόλης, όχι όμως και τα ανθεκτικά ( $EC_{50}$  >40 mg L<sup>-1</sup>). Απομονώσεις του *B. cinerea* μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί να παρουσιάζουν μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας ( $EC_{50}$  0.1-1 mg L<sup>-1</sup>) στο fludioxonil (Weber, 2011, Korolev *et al.*, 2011, Fernández-Ortuño *et al.*, 2013). Οι απομονώσεις αυτές πιθανότατα ανήκουν στους φαινότυπους πολλαπλής ανθεκτικότητας MDR οι οποίοι έχουν ως μηχανισμό ανθεκτικότητας την υπερέκφραση του γονιδίου *Bc-atrB* (Vermeulen *et al.*, 2001). Ένας άλλος φαινότυπος πολλαπλής ανθεκτικότητας του *B. cinerea*, με τιμές  $EC_{50}$  για το fludioxonil και το cyprodinil περίπου 1.5 και 10 mg L<sup>-1</sup> αντίστοιχα, εντοπίστηκε πρόσφατα από τους Leroch *et al.* (2013) σε καλλιέργειες φράουλας στη Γερμανία και θεωρήθηκε ότι πρόκειται για ένα γενετικά διαφοροποιημένο είδος (*B. cinerea* group S).

Παρεμποδιστές της αναπνοής

### **Φαινυλοπυριδιναμίνες**

Ο μοναδικός εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας με δράση κατά του βοτρώτη είναι το fluazinam το οποίο έχει εξαιρετική δράση και κατά των περonosπόρων, όπως της πατάτας (*Phytophthora infestans*). Σε *in vitro* δοκιμές μυκητοτοξικότητας εμφανίζεται ιδιαίτερα αποτελεσματικό κατά του *B. cinerea* σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Kalamarakis *et al.*, 2000). Το fluazinam έχει αναφερθεί ότι δρα ως αποσυζευκτής της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια (Guo *et al.*, 1991). Οι ουσίες αποσύζευξης λειτουργούν με τέτοιο τρόπο ώστε η ενέργεια που παράγεται από τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής (σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια) να μην μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη σύζευξη (φωσφορυλίωση)  $ADP + Pi + 34 KJ$  (ενέργεια) =  $ATP + H_2O$  (Διάγραμμα 1). Αποτέλεσμα της αποσύζευξης είναι η αναστολή της σύνθεσης ATP (χωρίς να επηρεάζεται η αναπνευστική αλυσίδα και η ATP-συνθετάση) και η παύση όλων των μεταβολικών δραστηριοτήτων του κυττάρου (Terada, 1990).

Εξαιτίας του τρόπου δράσης του fluazinam μέχρι στιγμής έχει αναφερθεί μόνο μια περίπτωση εμφάνισης ανθεκτικότητας στην Ιαπωνία, όπου η ουσία χρησιμοποιείται από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 (Tamura, 2000). Η εμφάνιση

ανθεκτικότητας πιθανότατα να οφείλεται σε κάποιο μηχανισμό αποτοξικοποίησης μέσω της σύζευξης με γλουταθειόνη (Guo *et al.*, 1991, Leroux, 2007).

### **Αναστολείς μιτοχονδριακού συμπλόκου III – Στρομπιλουρίνες (QoIs)**

Οι στρομπιλουρίνες (kresoxim-methyl, azoxystrobin, pyraclostrobin κ.α.) είναι συνθετικά παράγωγα της στρομπιλουρίνης A, που αποτελεί δευτερογενή μεταβολίτη του Βασιδιομύκητα *Strobilurus tenacellus* (Anke *et al.*, 1977). Δρουν ως παρεμποδιστές των αντιδράσεων αναπνοής στα μιτοχόνδρια των μυκήτων, με προσκόλληση στη θέση Q<sub>o</sub> του κυτοχρώματος *b*. Συγκεκριμένα αναστέλλουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του κυτοχρώματος *b* και του κυτοχρώματος *c*<sub>1</sub> στο ενζυμικό σύμπλοκο *bc*<sub>1</sub> (σύμπλοκο III), το οποίο εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Διάγραμμα 1). Έτσι διακόπτεται ο ενεργειακός κύκλος του μύκητα και σταματά η παραγωγή ATP οξέος (Bartlett *et al.*, 2002).

Η μοριακή ανάλυση απομονώσεων αγρού του *B. cinerea* που εμφάνιζαν υψηλή ανθεκτικότητα στην ομάδα αυτή των μυκητοκτόνων έδειξε ότι οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο του κυτοχρώματος *b* (*cytb*) με κυρίαρχη την αντικατάσταση της γλυκίνης από αλανίνη (G143A) στη θέση 143 (Gisi *et al.*, 2002, Ma & Michailides, 2005b, Grasso *et al.*, 2006). Σε άλλα παθογόνα και σε χαμηλότερη συχνότητα εμφανίζεται η μετάλλαξη F129L η οποία συνδέεται με μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας στις στρομπιλουρίνες όπως επίσης και η G137R η οποία βρέθηκε πρόσφατα στο παθογόνο *Pyrenophora tritici-repentis* (Sierotzki *et al.*, 2007). Η δράση των μυκητοκτόνων της κατηγορίας αυτής όμως ενεργοποιεί μια εναλλακτική οδό μεταφοράς ηλεκτρονίων με λειτουργία της εναλλακτικής οξειδάσης (AOX) που παρακάμπτει την αναστολή του συμπλόκου III. *In vitro*, η εναλλακτική αναπνοή αναστέλλεται παρουσία σαλικυλυδροξαμικού οξέος (SHAM), ενώ *in planta* από τη δράση φυσικών αντιοξειδωτικών όπως είναι τα φλαβονοειδή (Wood & Hollomon, 2003, Fernández-Ortuño *et al.*, 2008).

Σε αρκετές απομονώσεις διαφόρων παθογόνων των φυτών συμπεριλαμβανομένου και του *B. cinerea* έχει διαπιστωθεί το φαινόμενο να εμφανίζεται υψηλή ανθεκτικότητα στις στρομπιλουρίνες *in vitro* αλλά να μη διαπιστώνονται μεταλλάξεις στο γονίδιο του κυτοχρώματος *b*. Σ' αυτές τις περιπτώσεις εικάζεται ότι ίσως να παίζει ρόλο η πολύ μεγάλη ετεροπλασμία που εμφανίζεται στο μιτοχονδριακό DNA ή να υπάρχουν και άλλοι άγνωστοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που να σχετίζονται με άλλες μεταβολικές οδούς στην αναπνοή (Steinfeld *et al.*, 2001, Fernández-Ortuño *et al.*, 2008, Ishii *et al.*, 2009). Η παρουσία ενός επιπρόσθετου εσονίου που ταυτοποιήθηκε πρόσφατα σε πληθυσμούς του *B. cinerea* από τους Banno *et al.* (2009) περιπλέκει ακόμα πιο πολύ την κατάσταση. Το

εσόνιο αυτό παρόλο που εμφανίζεται μόνο στα ευαίσθητα στους QoIs στελέχη του παθογόνου, αλλάζει τη δομή του κυτοχρώματος. Ως εκ τούτου έχει διατυπωθεί η άποψη από τον Ishii (2010) ότι η ανάλυση του κυτοχρώματος b για τυχόν μεταλλάξεις ενδεχομένως να μην είναι η ενδεδειγμένη μοριακή τεχνική.

### **Αναστολείς της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDHs)**

Τα καρβοξαμιδικά μυκητοκτόνα (π.χ. carboxin, benodanil κ.α.) εισήχθηκαν στην πράξη στα τέλη της δεκαετίας του 1960 ως διασυστηματικά μυκητοκτόνα με δράση κατά των Βασιδιομυκήτων (Leroux, 2007). Τα 2<sup>ης</sup> γενιάς μυκητοκτόνα της κατηγορίας αυτής είναι ευρέως φάσματος και εισήχθησαν στην πράξη στα μέσα της δεκαετίας του 2000. Ανάμεσα στις 17 διαφορετικές ουσίες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία, κατά του βοτρώτη χρησιμοποιείται κυρίως το boscalid το οποίο διατίθεται στο εμπόριο ως μίγμα με το pyraclostrobin από την ομάδα των στρομπιλουρινών (Sierotzki & Scalliet, 2013). Κατά του *B. cinerea* το boscalid είναι αποτελεσματικό σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του παθογόνου αλλά κυρίως αναστέλλει τη βλάστηση των σπορίων (Stammler *et al.*, 2008).

Ο τρόπος δράσης τους είναι η παρεμπόδιση της αναπνοής στα μιτοχόνδρια αναστέλλοντας τη λειτουργία του συμπλόκου II. Το σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (σύμπλοκο II) αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες (Διάγραμμα 1):

- Μία φλαβοπρωτεϊνική (SdhA) όπου γίνεται η κατάλυση του ηλεκτρικού οξέος σε φουμαρικό με το συνένζυμο FAD.
- Μία πρωτεϊνική σιδήρου-θείου (SdhB) με τρεις επιμέρους ομάδες (2Fe-2S, 4Fe-4S, 3Fe-4S) για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων που προέκυψαν από την προηγούμενη οξειδωση στην ουμπικινόνη.
- Δύο υπομονάδες (SdhC και SdhD) που είναι προσαρτημένες στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και συγκρατούν τις δύο πρώτες υπομονάδες, μια προσθετική ομάδα αίμης και την ουμπικινόνη (Cecchini, 2003).

Τα SDHs διακόπτουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από την ομάδα 3Fe-4S στο σημείο πρόσδεσης της ουμπικινόνης, το οποίο σχηματίζεται από τμήματα των υπομονάδων SdhB, SdhC και SdhD (Hägerhäll, 1997, Horsefield *et al.*, 2006).

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά σε ανθεκτικά στελέχη του παθογόνου *Ustilago maydis* (Georgopoulos *et al.*, 1972). Μεταλλάξεις στις συνθέσεις των αμινοξέων των υπομονάδων SdhB, SdhC και SdhD συνδέονται με



ανθεκτικότητα σε ένα αρκετά μεγάλο αριθμό παθογόνων των φυτών όπως είναι στους μύκητες *Alternaria alternata*, *Mycosphaerella graminicola*, *Aspergillus oryzae* κ.α. (Avenot & Michailides, 2010).

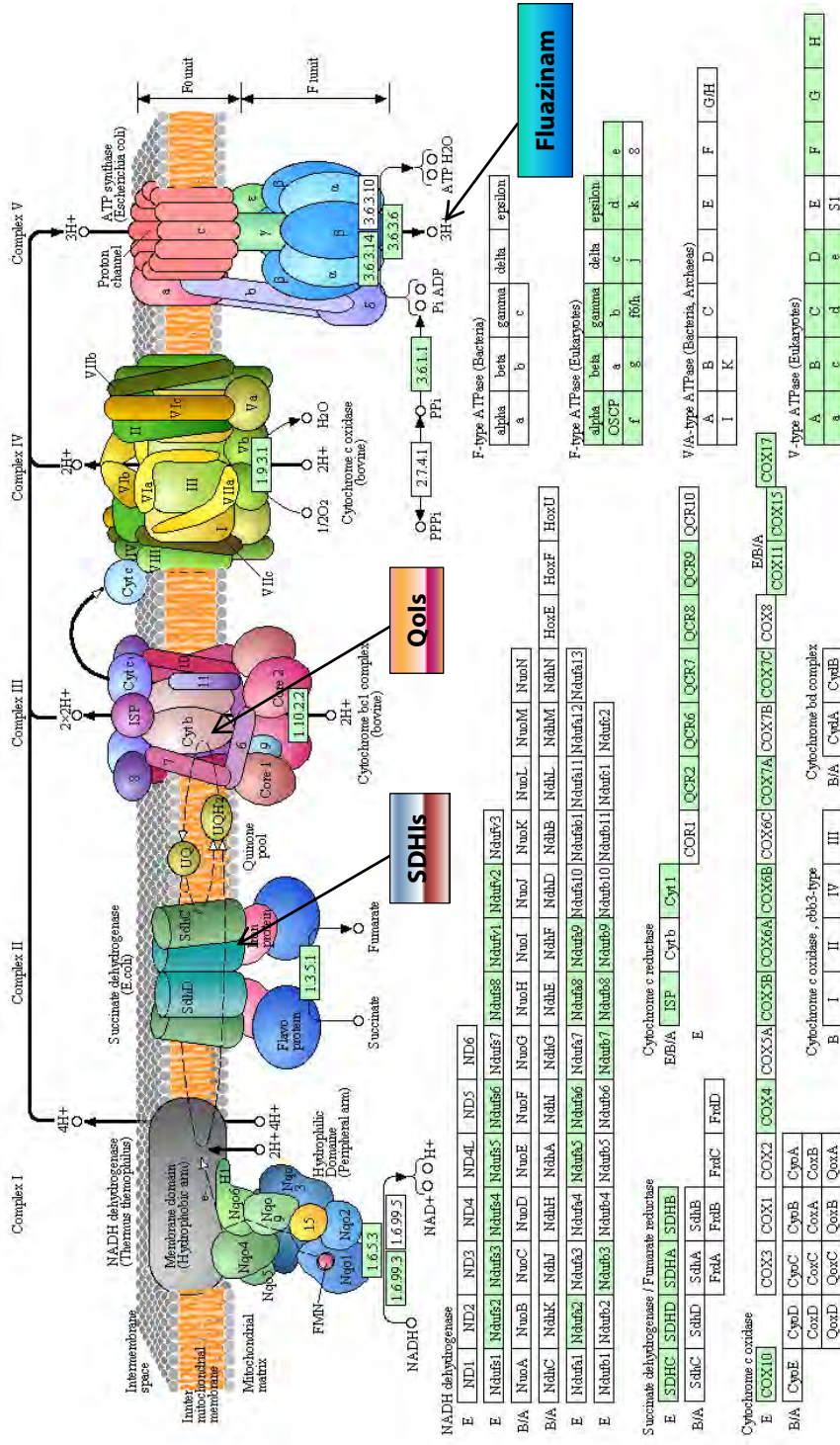
Σε ανθεκτικές απομονώσεις του *B. cinerea* στο boscalid κυρίαρχες εμφανίζονταν οι μεταλλάξεις H272R/Y στην υπομονάδα SdhB ενώ σε χαμηλότερη συχνότητα εντοπίζονταν οι H272L, P225F/L/T και N230I (Leroux *et al.*, 2010, Veloukas *et al.*, 2011, Yin *et al.*, 2011). Η διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ των SDHI's είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο γιατί πολλές από τις μεταλλάξεις στα κωδικόνια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για τις υπομονάδες προσδίδουν πλήρη διασταυρωτή ανθεκτικότητα ενώ άλλες όχι (Veloukas *et al.*, 2013, Sierotzki & Scalliet, 2013). Πάντως μέχρι στιγμής σε περιπτώσεις όπου ανιχνεύθηκαν ανθεκτικά στελέχη του *B. cinerea* από τον αγρό δεν διαπιστώθηκε και απώλεια της αποτελεσματικότητας των μυκητοκτόνων της ομάδας αυτής κατά της ασθένειας.

Αναστολείς βιοσύνθεσης μεθειονίνης

### **Ανιλινοπυριμιδίνες**

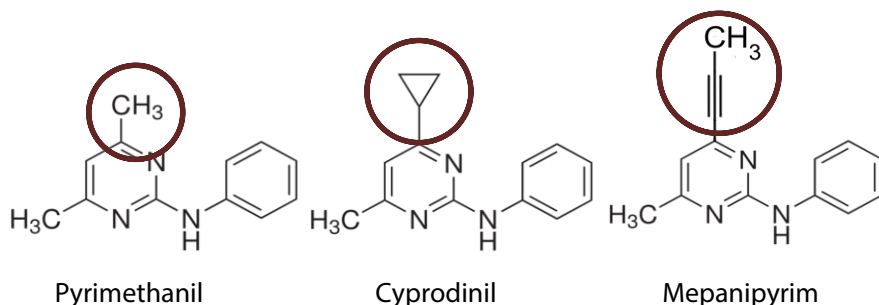
Τα ανιλινοπυριμιδιδικά μυκητοκτόνα pyrimethanil, cyprodinil και mepanipyrim χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση διαφόρων Ασκομυκήτων και Αδηλομυκήτων από τα μέσα της δεκαετίας του 1990. Οι τρεις αντιπρόσωποι της κλάσης αυτής σχετίζονται χημικά στενά μεταξύ τους διαφέροντας μόνο ως προς τις ομάδες μεθυλ-, κυκλοπροπυλ- και προπυνυλ- (Εικόνα 5) στον πυριμιδιδικό δακτύλιο (Rosslensbroich & Stuebler, 2000). Σε *in vitro* δοκιμές σε υποστρώματα ανάπτυξης ανοργάνων αλάτων, παρατηρήθηκε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναστέλλεται η επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα και η ανάπτυξη του μυκηλίου άγριων στελεχών του *B. cinerea*. Σε σύνθετα θρεπτικά υλικά ανάπτυξης η αντίδραση του παθογόνου είναι ποικίλη, εξαιτίας της ικανότητάς του να προσλαμβάνει θρεπτικά στοιχεία από το υπόστρωμα, τα οποία αλλοιώνουν τον τρόπο δράσης των μυκητοκτόνων αυτών (Leroux *et al.*, 2002).

Σε έρευνες που έγιναν με το mepanipyrim (Miura *et al.*, 1994) και το pyrimethanil (Milling & Richardson, 1995) διαπιστώθηκε ότι αναστέλλεται η έκκριση υδρολυτικών ενζύμων (κυτταρινάσες, πηκτινάσες, πρωτεϊνάσες κ.α.) που χρειάζεται το παθογόνο, προκειμένου να εισβάλλει στα κύτταρα του ξενιστή κατά την παθογένεση. Παρόμοια αποτελέσματα για το pyrimethanil διαπιστώθηκαν και σε πειράματα *in vivo* καθώς παρατηρήθηκε μειωμένη ανάπτυξη της αρχικής κηλίδας προσβολής στα σημεία μόλυνσης (Daniels & Lucas, 1995).



**Διάγραμμα 1.** Σχηματική απεικόνιση των συμπλοκών που εμπλέκονται στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης στα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Τα σκιασμένα με πράσινο κελιά αναφέρονται σε ενεργές υπομονάδες για το παθογόνο *Botryotinia fuckeliana* και παραπέμπουν σε γονιδιώματα σύνθεσης πρωτεϊνών στην ιστοσελίδα [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?bfu00190](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bfu00190). Τελευταία εισόδος: 21.05.2014. Στο διάγραμμα διακρίνονται τα σημεία δράσης των QoIs και SDHIs μικητοκτόνων καθώς και του fluazinam.

Επίσης σε πειράματα *in vitro* βρέθηκε ότι οι ανιλνοπυριμιδίνες έχουν δράση και στη βιοσύνθεση της μεθειονίνης στο στάδιο σχηματισμού της πρόδρομης κυσταθειονίνης (Masner *et al.*, 1994). Αρχικά θεωρήθηκε ότι η κυσταθειονίνη β-λυάση ίσως να αποτελεί στόχο των ανιλνοπυριμιδινών (Fritz *et al.*, 1997), αργότερα όμως διατυπώθηκε η άποψη ότι επιφέρουν μικρή μόνο αναστολή του ενζύμου (Fritz *et al.*, 2003). Φαίνεται λοιπόν ότι ο κύριος τρόπος δράσης των ανιλνοπυριμιδινών δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως και χρειάζεται περαιτέρω έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση.



**Εικόνα 5.** Χημική δομή των ανιλνοπυριμιδινικών μυκητοκτόνων. Οι τρεις αντιπρόσωποι της ομάδας αυτής διαφέρουν μόνο στις χημικές ομάδες (μεθυλ-, κυκλοπροπυλ- και προπυνυλ-, αντίστοιχα) στον πυριμιδινικό δακτύλιο.

Απομονώσεις αγρού του *B. cinerea* με υψηλή ανθεκτικότητα (παράγοντας ανθεκτικότητας η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα, RF >15) στην ομάδα αυτή των μυκητοκτόνων έχουν πλέον βρεθεί σε διάφορες χώρες συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας (Baroffio *et al.*, 2003, Moyano *et al.*, 2004, Myresiotis *et al.*, 2007). Οι Chapeland *et al.* (1999) χαρακτήρισαν τους φαινότυπους αυτούς ως Ani<sup>R1</sup> και τους διέκριναν από τους Ani<sup>R2</sup> και Ani<sup>R3</sup>, οι οποίοι παρουσίαζαν μειωμένη ευαισθησία (RF 3-25) και ταυτόχρονα εμφάνιζαν μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας σε άλλες ομάδες μυκητοκτόνων (Leroux *et al.*, 2002). Οι φαινότυποι Ani<sup>R2</sup> και Ani<sup>R3</sup> έχουν χαρακτηριστεί τελευταία ως MDR1 και MDR2 φαινότυποι πολλαπλής ανθεκτικότητας (Multi Drug Resistant) αντίστοιχα. Οι φαινότυποι αυτοί εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία σε μερικές ομάδες μυκητοκτόνων εξαιτίας της αυξημένης εκροής των δραστικών ουσιών στο χώρο εξωτερικά του κυττάρου, μέσω των συμπλεγμάτων πρωτεϊνών μεταφοράς ABC και MFS. Η υπερέκφραση των γονιδίων *atrB* και *mfsM2* είναι υπεύθυνη για την αυξημένη λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών (Kretschmer *et al.*, 2009).

Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης

Τα μυκητοκτόνα της κατηγορίας αυτής φαίνεται να έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα στον αγρό κατά του *B. cinerea* πιθανότατα λόγω της χαμηλής συνιστώμενης δοσολογίας. Σε αντίθετη περίπτωση, αύξηση της δοσολογίας των τριαζολικών μυκητοκτόνων για καλύτερη αντιμετώπιση του βοτρυτή ενδεχομένως να προκαλέσει φαινόμενα φυτοτοξικότητας στα φυτά (Leroux, 2007). Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης της εργοστερόλης μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις κύριες ομάδες σύμφωνα με τα σημεία-στόχους δράσης τους στο μηχανισμό σύνθεσης της εργοστερόλης (Leroux *et al.*, 2002).

Αναστέλλουν είτε:

1. Την εποξείδωση του σκουαλενίου [Αλλυλαμίνες] (π.χ. naftifine, terbinafine).
2. Την 14α-απομεθυλίωση της λανοστερόλης [DMIs] (π.χ. prochloraz, pyrifenoxy, triadimenol, tebuconazole).
3. Την  $\Delta^{14}$  αναγωγή και/ή τον  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$  ισομερισμό [Αμίνες] (π.χ. fenpropidin, fenpropimorph, spiroxamine, tridemorph).
4. Την απομεθυλίωση του C-4 [Υδροξυανιλίδες] (π.χ. fenhexamid).

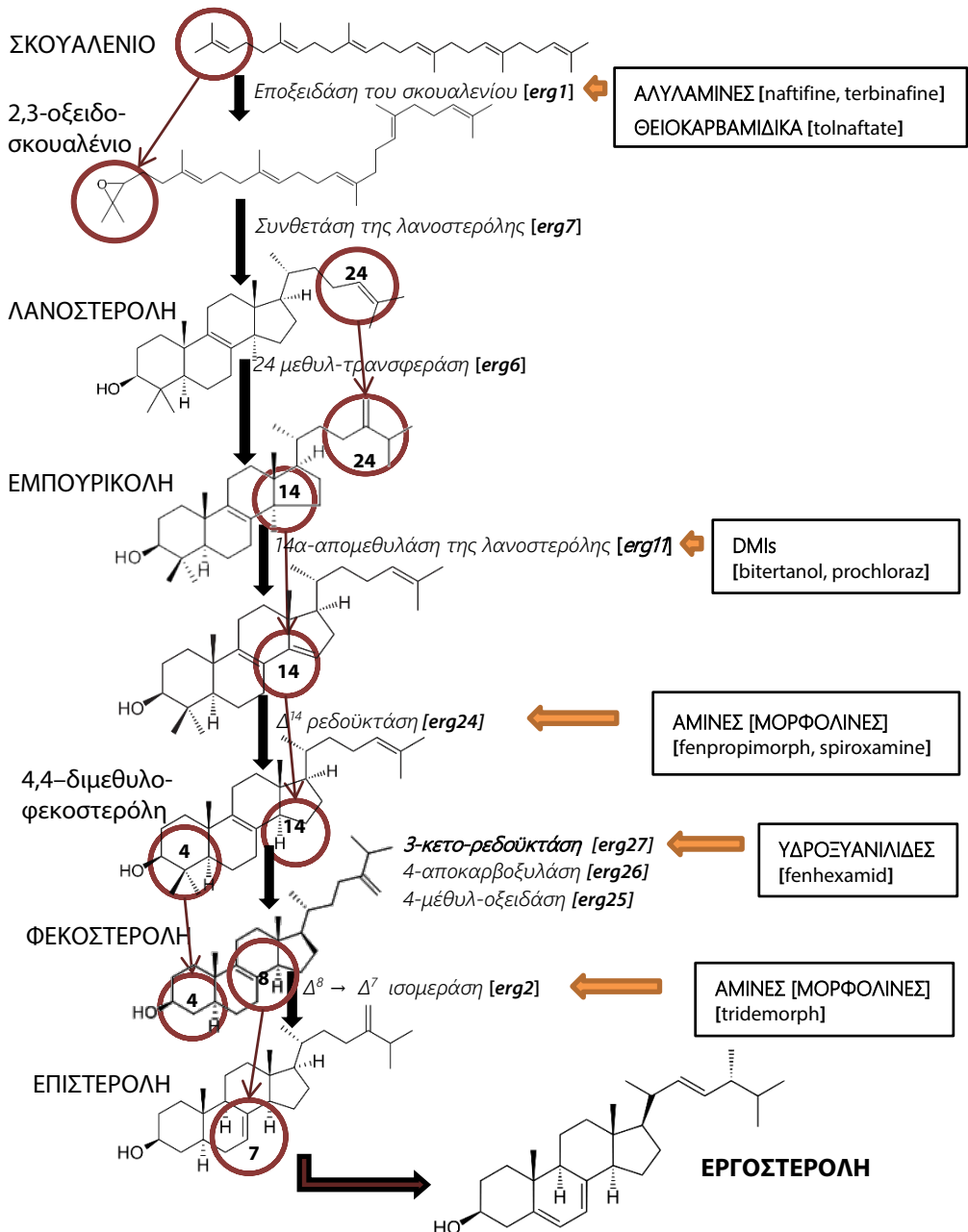
Από τις τέσσερις ομάδες η κυριότερη που έχει εφαρμογές στη γεωργία είναι τα τριαζολικά και ιμιδαζολικά μυκητοκτόνα με δράση στη 14α-απομεθυλάση (γονίδιο *erg11* ή *CYP51*) της λανοστερόλης που καταλύει την απομεθυλίωση του μορίου της εμπουρικόλης (Διάγραμμα 2) και γι' αυτό ονομάζονται και παρεμποδιστές απομεθυλίωσης των στερολών (de-methylation inhibitors, DMIs). Οι κύριοι μηχανισμοί που σχετίζονται με ανθεκτικότητα στους DMIs είναι: α) αλλαγή του ενζύμου-στόχου που συνδέεται με 11 μεταλλάξεις στο γονίδιο (*CYP51*) που κωδικοποιεί πρωτεΐνες για τη 14α-απομεθυλάση (Cools *et al.*, 2011, Leroux & Walker, 2011), β) εκροή της δραστηκής ουσίας από το κυτόπλασμα στον εξωτερικό χώρο του κυττάρου μέσω των ATP-εξαρτώμενων μεταφορέων (ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών ABC) με αποτέλεσμα τη μικρότερη συσσώρευση στο μυκήλιο (Del Sorbo *et al.*, 1997, Nakaune *et al.*, 1998, Hayashi *et al.*, 2002) και γ) υπερέκφραση του ενζύμου-στόχου της 14α-απομεθυλάσης ( $P450_{14DM}$ ) από την εμφάνιση διαδοχικών επαναλήψεων ενός τμήματος DNA στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου (Hamamoto *et al.*, 2000). Επίσης σε χαμηλότερη συχνότητα έχουν αναφερθεί και άλλοι μηχανισμοί που σχετίζονται με μειωμένη ευαισθησία στα DMIs, που εμφανίζουν όμως μικρό κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας (De Waard, 1996, Ma & Michailides, 2005b). Από τα μορφολινικά μυκητοκτόνα κατά του βοτρυτή χρησιμοποιείται το tridemorph με δράση στην  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$  ισομεράση (Διάγραμμα 2). Τα

μυκητοκτόνα που δρουν στην εποξειδάση του σκουαλενίου χρησιμοποιούνται αποκλειστικά εναντίον παθογόνων του ανθρώπου.

### **Fenhexamid**

Το πιο αποτελεσματικό από τους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης κατά του *B. cinerea* είναι το fenhexamid το οποίο έχει εξαιρετικά στενό φάσμα δράσης μόνο κατά των συγγενικών ειδών *Monilinia* spp. και *Sclerotinia* spp. (Rosslenbroich & Stuebler, 2000). Σε αρχικά πειράματα εναντίον του *B. cinerea in vitro*, σχετικά με τον τρόπο δράσης του μυκητοκτόνου αυτού, παρατηρήθηκε ότι προκαλείται μείωση της ποσότητας της εργοστερόλης και αύξηση της συγκέντρωσης πρόδρομων 3-κετο στερολών. Συνεπώς, ως τρόπος δράσης προτάθηκε η αναστολή του ενζύμου 3-κετορεδοουκτάση που εμπλέκεται στην απομεθυλίωση του C4 (Διάγραμμα 2) κατά τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης (Debieu *et al.*, 2001). Αργότερα αυτό επαληθεύτηκε με πειράματα δράσης του ενζύμου σε πληθυσμούς του *B. cinerea sensu stricto* και του *B. pseudocinerea* (Debieu *et al.*, 2013). Το fenhexamid δεν παρεμποδίζει τη βλάστηση των σπορίων σε συγκεντρώσεις <math>10 \text{ mg L}^{-1}</math> αλλά αναστέλλει την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα και τη μυκηλιακή ανάπτυξη (Hänbeler & Pontzen, 1999, Leroux, 2007).

Απομονώσεις του *B. cinerea* οι οποίες εμφάνιζαν μειωμένη ευαισθησία στο fenhexamid (φαινότυπος Hyd<sup>R1</sup>) με ανθεκτικότητα κυρίως στην ανάπτυξη του μυκηλίου τώρα είναι γνωστό πως ανήκουν στο 'κρυπτικό είδος' *B. pseudocinerea* (Leroux *et al.*, 1999, Leroux, 2007). Εκτός από το φαινότυπο Hyd<sup>R1</sup> οι Leroux *et al.* (2002) διέκριναν άλλους δυο φαινοτύπους, τους Hyd<sup>R2</sup> και Hyd<sup>R3</sup>. Ο φαινότυπος Hyd<sup>R2</sup> όπως και ο Hyd<sup>R1</sup>, χαρακτηρίζεται από μικρή μείωση ευαισθησίας και ο μηχανισμός ανθεκτικότητας πιθανότατα να στηρίζεται σε αποτοξικοποίηση δραστικής ουσίας με εμπλοκή της P-450 μονοοξυγενάσης (Leroux *et al.*, 2002). Οι φαινότυποι Hyd<sup>R3</sup> διακρίνονται όλοι για τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *erg27* της 3-κετορεδοουκτάσης. Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται οι φαινότυποι υψηλής ανθεκτικότητας που επιφέρουν μειωμένη αποτελεσματικότητα του fenhexamid στον αγρό. Η μετάλλαξη στη θέση 412 της φαινυλαλανίνης σε σερίνη (F412S), βαλίνη (F412V) ή ισολευκίνη (F412I) φαίνεται να είναι η κυρίαρχη στους υψηλά ανθεκτικούς (EC<sub>50</sub> επιμ. βλ. σωλήνα >10 mg L<sup>-1</sup> – Hyd<sup>R3+</sup>) στις υδροξυανιλίδες φαινοτύπους. Μεταλλάξεις σε άλλες θέσεις του ίδιου γονιδίου έχουν βρεθεί να σχετίζονται με μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας (EC<sub>50</sub> επιμ. βλ. σωλήνα 0.3-3 mg L<sup>-1</sup> – Hyd<sup>R3-</sup>) στο fenhexamid (Fillinger *et al.*, 2008, Esterio *et al.*, 2011).



**Διάγραμμα 2.** Ενζυμικοί στόχοι των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης της εργοστερόλης [προσαρμογή από Leroux *et al.* (2002)].



ΜΕΡΟΣ Β΄  
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ





# ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ IN VITRO

---

## Εισαγωγή

Ο *B. cinerea* συγκαταλέγεται ανάμεσα στα παθογόνα υψηλού κινδύνου όσον αφορά την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα. Σε περιόδους έξαρσης της ασθένειας, η αντιμετώπισή της επιτυγχάνεται αποτελεσματικά με την εφαρμογή μυκητοκτόνων με βοτρυδιοκτόνο δράση. Αρκετά από τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται κατά του βοτρώτη αναφέρθηκαν προηγουμένως στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. Στον Πίνακα 1 περιλαμβάνονται τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Ο *B. cinerea* χαρακτηρίζεται φυσιολογικά από μία ενδογενή τάση για ανάπτυξη ανθεκτικότητας, γεγονός το οποίο δυσχεραίνει την επί μακρόν αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων (Torolovec-Pintarić, 2011). Ανθεκτικότητα πρακτικής σημασίας στον αγρό υπάρχει όταν η επικράτηση των ανθεκτικών στελεχών φτάσει ένα κρίσιμο όριο, όπου πλέον δεν γίνεται αντιμετώπιση της ασθένειας (Georgopoulos & Skylakakis, 1986, Beckerman, 2013).

Συνήθως, τα ανθεκτικά στελέχη εντοπίζονται μέσω των βιοδοκιμών μυκητοτοξικότητας *in vitro* ενώ στη συνέχεια μπορεί να γίνει συσχέτιση και με μοριακούς δείκτες. Σε μερικές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται και μεθοδολογίες φυλογενετικών αναλύσεων ανάμεσα σε διασταυρώσεις ανθεκτικών και ευαίσθητων απομονώσεων, για περαιτέρω ενίσχυση της συσχέτισης αυτής (Faretra & Pollastro, 1993a, Faretra & Pollastro, 1993b). Οι εργαστηριακές δοκιμές πάντως είναι απαραίτητες προκειμένου να καθοριστούν τα επίπεδα ευαισθησίας σε πολυάριθμες απομονώσεις του παθογόνου, πριν να γίνει εκτίμηση της υφιστάμενης κατάστασης ανθεκτικότητας στον αγρό. Παραδοσιακά αυτό επιτυγχάνεται με καθορισμό της αναστολής της βλάστησης των σπορίων ή της ανάπτυξης του μυκηλίου του παθογόνου σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου (Beckerman, 2013).

Το 2009 είχε παρατηρηθεί αυξημένη προσβολή από βοτρώτη σε καλλιέργειες μαρουλιού. Σε προηγούμενη μελέτη διαπιστώθηκε ότι σε πολλές περιπτώσεις ο πληθυσμός του παθογόνου ήταν ανθεκτικός σε διάφορα μυκητοκτόνα και σε αρκετά υψηλή συχνότητα (Παπαευαγγέλου, 2010). Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν: α) να διαπιστωθεί η *in vitro* ευαισθησία επιλεγμένων απομονώσεων του *B. cinerea* σε εννέα μυκητοκτόνα επτά διαφορετικών χημικών ομάδων, β) να καθοριστούν οι δόσεις διαχωρισμού των επιπέδων ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα, γ) να αναπτυχθεί μία απλή και εύχρηστη μέθοδος για την ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου στον αγρό. Τα αποτελέσματα της ενότητας αυτής αποτέλεσαν την αφετηρία για τον καθορισμό προγραμμάτων χημικών

επεμβάσεων που εφαρμόστηκαν στη συνέχεια για την αντιμετώπιση της ασθένειας σε υδροπονική καλλιέργεια μαρουλιού σε συνθήκες θερμοκηπίου.

## Υλικά και μέθοδοι

Μυκητοκτόνα – Θρεπτικά υποστρώματα

Σε όλες τις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκαν μυκητοκτόνα με τη μορφή των εμπορικών σκευασμάτων (Πίνακας 1). Για να ληφθούν οι τελικές συγκεντρώσεις κάθε μυκητοκτόνου ( $\text{mg L}^{-1}$  δραστικής ουσίας) σε θρεπτικό υλικό, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις από διαλύματα πυκνής συγκέντρωσης  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  σε κατάλληλους διαλύτες.

**Πίνακας 1.** Μυκητοκτόνα και χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις.

Δραστική ουσία	Εμπορικό σκεύασμα	Συγκεντρώσεις ( $\text{mg L}^{-1}$ )
<u>Υδροξυανιλίδες</u>		
fenhexamid	Teldor 50 WG, Bayer CropScience	0.005-0.01-0.05-0.1-1-10-50-100
<u>QoIs<sup>1</sup></u>		
azoxystrobin	Quadris 25 SC, Syngenta	0.001-0.005-0.01-0.05-0.1-0.5-
pyraclostrobin	F-500 25 EC, BASF	1-5-10-50-100
<u>SDHIs</u>		
boscalid	510F 50 WG, BASF	0.1-0.5-1-5-10-50-100
<u>Ανιλινοπυριμιδίνες</u>		
cyprodinil	Chorus 50 WG, Syngenta	0.001-0.01-0.1-1-10-50-100
pyrimethanil	Scala 40 SC, BASF	
<u>Φαινυλοπυρρόλες</u>		
fludioxonil	Geoxe 50 WG, Syngenta	0.001-0.01-0.1-1-10
<u>Δινιτροανιλίνες</u>		
fluazinam	Ohayo 50 SC, ISK Biosciences	0.001-0.01-0.05-0.1-1
<u>Χλωρονιτρίλια</u>		
chlorothalonil	Daconil 500 SC, Syngenta	0.1-0.5-1-5-10-50

<sup>1</sup>Στα QoIs μυκητοκτόνα οι βιοδοκιμές έγιναν είτε με είτε χωρίς την προσθήκη  $100 \text{ mg L}^{-1}$  σαλικυλδροξαμικού οξέος (SHAM).

Όλα τα μυκητοκτόνα διαλύθηκαν σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) εκτός του fludioxonil το οποίο διαλύθηκε σε αποστειρωμένο-απιονισμένο νερό. Το DMSO επιλέχθηκε για τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης επιμολύνσεων και τον καλύτερο διαχωρισμό της ελάχιστης παρεμποδιστικής συγκέντρωσης των μυκητοκτόνων

μεταξύ των ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2012). Οι δοκιμές με τα μυκητοκτόνα azoxystrobin και pyraclostrobin της ομάδας των στρομπιλουρινών διεξήχθησαν είτε με, είτε χωρίς την προσθήκη 100 mg L<sup>-1</sup> σαλικυλδροξαμικού οξέος (SHAM), παρεμποδιστή της λειτουργίας εναλλακτικής αναπνοής. Η τελική συγκέντρωση του διαλύτη στο θρεπτικό υπόστρωμα δεν ξεπερνούσε σε καμία περίπτωση το 1 %.

Με εξαίρεση τα ανιλνοπυριμιδινικά και φαινυλοπυρρολικά μυκητοκτόνα όλες οι δοκιμές μυκητοτοξικότητας έγιναν σε θρεπτικό υπόστρωμα malt extract agar (MEA, Oxoid Ltd.). Για τα μυκητοκτόνα cyprodinil και pyrimethanil καθώς και για το fludioxonil, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα ανόργανων αλάτων, εξαιτίας της ιδιότητας του παθογόνου να παρακάμπτει τον τρόπο δράσης των μυκητοκτόνων αυτών σε πιο σύνθετα οργανικά υποστρώματα (Πίνακας 2).

#### Απομονώσεις του *Botrytis cinerea*

Το παθογόνο απομονώθηκε από φυτά μαρουλιού διαφόρων θέσεων καλλιέργειας, τα οποία έφεραν τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της τεφράς σήψης στη βάση του στελέχους. Κάθε προσβεβλημένο φυτό μεταφέρονταν από τον αγρό σε κατάλληλο χώρο του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, μέσα σε αεροστεγή σακούλα πολυαιθυλενίου. Για την εμφάνιση επανθήσεων του παθογόνου στα σημεία προσβολής, οι σακούλες των δειγμάτων διαβρέχονταν εσωτερικά με νερό, με τη χρήση χειροκίνητου ψεκαστήρα, και αποθηκεύονταν για 24-36 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η απομόνωση γίνονταν με ελαφρά επαφή ενός αποστειρωμένου με φωτιά βακτηριολογικού κρίκου πάνω στις καρποφορίες του παθογόνου και εναπόθεση των спорίων σε αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό MEA μέσα σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Από κάθε δείγμα προσβεβλημένου φυτού γινόταν μία απομόνωση.

#### Προκαταρκτικές βιοδοκιμές μυκητοτοξικότητας

Το 2010 προκειμένου να εντοπιστεί το εύρος ευαισθησίας των απομονώσεων του *B. cinerea* στα διάφορα μυκητοκτόνα, εφαρμόστηκε η μέθοδος της σημειακής εναπόθεσης спорίων (Pappas, 1997). Με τη μέθοδο αυτή λαμβάνονταν μία μάζα спорίων από καλλιέργειες 8 ημερών με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου και εναποτίθεντο σε προκαθορισμένα σημεία στην περιφέρεια τριβλίου με θρεπτικό υλικό, εμπλουτισμένο με διάφορες (10x) δόσεις μυκητοκτόνων (Εικόνα 6Α). Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 100 τυχαίες απομονώσεις οι οποίες προέρχονταν από φυτά μαρουλιού διαφορετικής προέλευσης αγρού (Παπαευαγγέλου, 2010). Δέκα

από αυτές τις απομονώσεις που εμφάνισαν διάφορα επίπεδα ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα, επιδέχθηκαν περαιτέρω δοκιμές προκειμένου να καθοριστούν οι τιμές διαχωρισμού των επιπέδων ευαισθησίας.

**Πίνακας 2.** Θρεπτικό υπόστρωμα ανόργανων αλάτων.

Συστατικά σε 1 L απιονισμένο–απεσταγμένο H <sub>2</sub> O			
Άλατα		Πηγή ενέργειας	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0g	Σακχαρόζη (sucrose, Sigma-Aldrich)	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	1.5g		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g	Στερεοποιητής	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0g	Άγαρ (agar for Microbiology, Sigma-Aldrich)	12.5g

+2g εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract, Sigma-Aldrich) στις δοκιμές με ανιλινοπυριμιδινικά μυκητοκτόνα

#### Παρασκευή

Σε κωνική φιάλη τύπου Erlenmeyer χωρητικότητας 2 L προστίθεται 1 L απιονισμένου-απεσταγμένου H<sub>2</sub>O και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Προηγουμένως αφαιρείται μια μικρή ποσότητα από το H<sub>2</sub>O, η οποία τοποθετείται σε κατάλληλο ποτήρι ζέσεως για τη διάλυση των αλάτων και στη συνέχεια το σχηματιζόμενο διάλυμα επανατοποθετείται στην αρχική κωνική φιάλη. Κατά τον ίδιο τρόπο διαλύονται στη συνέχεια οι υπόλοιπες ουσίες (σακχαρόζη, εκχύλισμα ζύμης) και τέλος το άγαρ. Μόλις το τελικό μίγμα άρχισε να βράζει απομακρύνεται από το μέσο θέρμανσης και μοιραζόταν (100 ml) σε κατάλληλους θερμοανθεκτικούς περιέκτες (medicine bottles) ή κωνικές φιάλες.

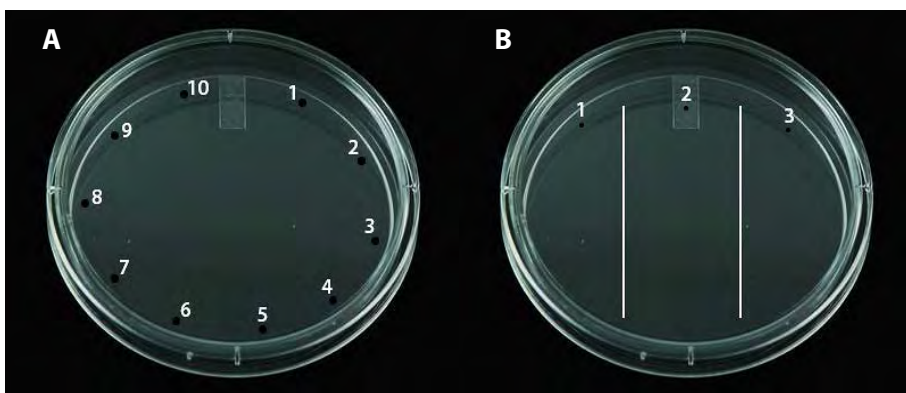
Στη συνέχεια το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά σε αυτόκαυστο (autoclave).

Για την παρασκευή του εμπλουτισμένου με μυκητοκτόνα θρεπτικού υλικού ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: ποσότητα 1 mL από πυκνά διαλύματα μυκητοκτόνου κατάλληλα αραιωμένα σε διαλύτη προστίθεται σε 100 mL αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού μέσα σε θερμοανθεκτικές φιάλες χωρητικότητας 200 mL. Οι φιάλες ανακινούνταν και το εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο υλικό διανέμονταν εξ' ίσου σε 10 τριβλία Petri (10 mL ανά τριβλίο περίπου). Οι τελικές συγκεντρώσεις που επιτεύχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση μυκητοκτόνου παρατίθενται στον Πίνακα 1.

### Δοκιμές βλάστησης σπορίων

Ως μόλυσμα χρησιμοποιήθηκαν σπόρια από καλλιέργειες του παθογόνου ηλικίας 8 ημερών που αναπτύσσονταν σε τριβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα malt extract agar (MEA). Η ανάπτυξη των καλλιεργειών γινόταν σε θάλαμο επώασης στους 20 °C σε συνθήκες σκότους, ενώ για να επιτευχθεί επαγωγή της σποριοποίησης οι καλλιέργειες κατά την 5<sup>η</sup> ημέρα ανάπτυξης, εκτίθεντο σε υπεριώδη ακτινοβολία 3100-4100 Å (black light) για 15 ώρες.

Για την παρασκευή του υδατικού αιωρήματος σπορίων απαιτούντο τα εξής αποστειρωμένα υλικά: 10 mL απιονισμένου νερού σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, μικρά γυάλινα χωνιά κατάλληλου μεγέθους για προσαρμογή στους δοκιμαστικούς σωλήνες και ύφασμα μουσελίνης. Ποσότητα 10 mL νερού προστίθεται στην καλλιέργεια του παθογόνου μέσα στο τριβλίο Petri και με τη βοήθεια μιας γυάλινης ράβδου τα σπόρια απελευθερώνονταν από τους κονιδιοφόρους στην υδατική φάση. Στη συνέχεια το αιώρημα αφού διαπερνούσε μέσα από διπλό στρώμα μουσελίνας, το οποίο είχε προσαρμοστεί σε γυάλινο χωνί για κατακράτηση θραυσμάτων μυκηλίου, συλλέγεται σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Η μέτρηση της συγκέντρωσης των σπορίων του αιωρήματος γινόταν με χρήση αιματοκυττόμετρου (Neubauer, Rhône-Poulenc) και μηχανικού χειροκίνητου μετρητή. Η τελική συγκέντρωση των σπορίων καθορίστηκε με αραιώσεις στις 200.000 σπόρια ανά mL.



**Εικόνα 6.** Επισήμανση της κάτω επιφάνειας τριβλίων Petri με μαρκαδόρο για τη διεξαγωγή των δοκιμών *in vitro*: **A** Της σημειακής εναπόθεσης. **B** Της βλάστησης των σπορίων.

Σε κάθε τριβλίο που περιείχε θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο τοποθετούνταν μία σταγόνα (περίπου 30  $\mu$ L) αιωρήματος σπορίων, με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur, σε καθεμία από τρεις προσημειωμένες θέσεις. Τριβλία

που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα με διαλύτη χρησιμοποιούνταν ως μάρτυρες. Με τη χρήση ενός μαρκαδόρου το τριβλίο χωρίζονταν σε τρεις ευδιάκριτες ζώνες, στο άνω άκρο των οποίων τοποθετούνταν οι σταγόνες με το αιώρημα σπορίων (Εικόνα 6B). Στη συνέχεια το τριβλίο ανασηκώνονταν ελαφρά έτσι ώστε οι σταγόνες να διατρέξουν την επιφάνεια του υλικού κατά μήκος των ζωνών (Pappas, 1982). Τα τριβλία αφήνονταν στον Εργαστηριακό πάγκο έως ότου στεγνώσουν πλήρως οι σταγόνες (περίπου 20 λεπτά) και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε θάλαμο επώασης. Μετά από 17-24 ώρες επώασης στους 20 °C σε συνθήκες σκότους, καταγράφονταν η βλάστηση των σπορίων και η επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα σε 200 σπόρια από τυχαία οπτικά πεδία, για κάθε απομόνωση/συγκέντρωση μυκητοκτόνου. Ένα κονίδιο θεωρείτο ότι είχε βλαστήσει όταν ο βλαστικός του σωλήνας είχε το μήκος τουλάχιστον της μεγαλύτερης διαμέτρου του.

#### Δοκιμές ανάπτυξης μυκηλίου

Μυκηλιακοί δίσκοι διαμέτρου 5 mm αφαιρούνταν με φελοτρυπητή (cork borer) από την περιφέρεια καλλιέργειών, που αναπτύσσονταν για 3 ημέρες στους 20 °C σε τριβλίο Petri με θρεπτικό υπόστρωμα MEA και μεταφέρονταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικά υποστρώματα εμπλουτισμένα με διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων. Σε κάθε τριβλίο τοποθετούνταν κάθε φορά δυο μυκηλιακοί δίσκοι εφαιπόμενοι στην περιφέρεια, αντιδιαμετρικά, ενώ για κάθε απομόνωση/συγκέντρωση μυκητοκτόνου έγιναν συνολικά 4 επαναλήψεις. Τριβλία που περιείχαν θρεπτικά υποστρώματα μόνο με διαλύτη (1 %) χρησιμοποιούνταν ως μάρτυρες. Μετά από 72 ώρες επώαση στους 20 °C σε συνθήκες σκότους γινόταν καταγραφή της ακτίνας ανάπτυξης της αποικίας.

#### Στατιστική επεξεργασία

Προκειμένου να προσδιορισθούν οι τιμές  $EC_{50}$  (συγκέντρωση παρεμπόδισης του 50 % της βλάστησης των σπορίων ή της ανάπτυξης του παθογόνου) για κάθε μυκητοκτόνο, τα αποτελέσματα από κάθε επανάληψη/συγκέντρωση συγκρίνονταν με αυτά του μάρτυρα. Οι τιμές  $EC_{50}$  για τη βλάστηση σπορίων, την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα και τη μυκηλιακή ανάπτυξη υπολογίστηκαν από τη γραμμική συσχέτιση της αναστολής κάθε σταδίου ανάπτυξης εκφραζόμενη σε μονάδες probits, με το δεκαδικό λογάριθμο των συγκεντρώσεων κάθε μυκητοκτόνου. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πακέτο SPSS (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0).



## Αποτελέσματα

Fenhexamid (hydroxyanilides)

Το μυκητοκτόνο αυτό δεν παρεμπόδισε πλήρως τη βλάστηση των σπορίων αλλά είχε επίδραση στην επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα. Οι τιμές  $EC_{50}$  για τη βλάστηση των σπορίων έξι απομονώσεων συμπεριλαμβανομένου και του άγριου τύπου (A-41, B-47, C-07, C-09, TR-23, TR-43,) ήταν πάνω από  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Στη συγκέντρωση αυτή το 80 % των σπορίων είχε βλαστήσει, αλλά το μήκος του βλαστικού σωλήνα περιορίστηκε στο τριπλάσιο περίπου του μήκους του σπορίου (Εικόνα 7). Στη συγκέντρωση των  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , μόνο το 2 % των σπορίων των απομονώσεων βλάστησε αλλά με μήκος μικρότερο ή ίσο του μήκους του σπορίου. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι βλαστικές υφές του παθογόνου εμφανίστηκαν ελαφρώς παραμορφωμένες και διογκωμένες εξαιτίας της δράσης του fenhexamid. Οι αντίστοιχες τιμές  $EC_{50}$  των απομονώσεων αυτών για την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα κυμάνθηκαν από  $0.04$  έως  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ , ενώ οι τιμές  $EC_{50}$  για τη μυκηλιακή ανάπτυξη ήταν στο εύρος  $0.03$  με  $0.63 \text{ mg L}^{-1}$  (Πίνακες 3 & 4). Στη συγκέντρωση  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  η ανάπτυξη του μυκηλίου δεν διέφερε από του μάρτυρα, ενώ παρεμποδίστηκε πλήρως στη συγκέντρωση του  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (Εικόνα 8). Όλες αυτές οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες στο fenhexamid με ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση για την ανάπτυξη του μυκηλίου το  $1 \text{ mg L}^{-1}$ .

Τέσσερις απομονώσεις (B-18, B-35, C-14, C-39) είχαν τιμές  $EC_{50}$  για τη βλάστηση των σπορίων  $>100 \text{ mg L}^{-1}$  και για τη μυκηλιακή ανάπτυξη από  $3.2$  έως  $15.1 \text{ mg L}^{-1}$ , αντίστοιχα (Πίνακες 3 & 4). Κατά συνέπεια, οι απομονώσεις αυτές διαχωρίστηκαν από τις ευαίσθητες με ένα παράγοντα ανθεκτικότητας RF που ήταν  $>10$  για τη βλάστηση σπορίων και από  $35.6$  έως  $167.8$  για τη μυκηλιακή ανάπτυξη. Η επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα δεν επηρεάστηκε καθόλου στη συγκέντρωση του  $1 \text{ mg L}^{-1}$  με fenhexamid και οι τιμές  $EC_{50}$  ήταν σταθερά πάνω από  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (Εικόνα 7B). Μικρής ανάπτυξης αποικία (ακτίνας  $7 \text{ mm}$  περίπου) σχηματίστηκε ακόμα και στην υψηλότερη συγκέντρωση των  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (Εικόνα 8). Αυτές οι τέσσερις απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικές στο fenhexamid (**Hyd<sup>R</sup>**).

Συμπερασματικά, με βάση τα συνδυασμένα αποτελέσματα των βιοδοκιμών μυκητοτοξικότητας η συγκέντρωση του  **$1 \text{ mg L}^{-1}$**  καθορίστηκε ως η δόση διαχωρισμού των δυο επιπέδων ευαισθησίας στο **fenhexamid**.

## Azoxystrobin και Pyraclostrobin (strobilurins, Qols)

Από τα δύο αυτά μυκητοκτόνα της ομάδας των στρομπιλουρινών το pyraclostrobin εμφανίστηκε πιο αποτελεσματικό κατά της βλάστησης των σπορίων και της μυκηλιακής ανάπτυξης των απομονώσεων του *B. cinerea*. Σε απουσία SHAM, πέντε απομονώσεις (A-41, B-47, C-09, C-39, TR-43) είχαν τιμές  $EC_{50}$  για τη βλάστηση των σπορίων από 1.05 έως 6.06 mg L<sup>-1</sup> του azoxystrobin και 0.08 έως 10.4 mg L<sup>-1</sup> του pyraclostrobin (Πίνακας 3). Οι τιμές  $EC_{50}$  για τη μυκηλιακή ανάπτυξη των απομονώσεων αυτών κυμάνθηκε από 5.9 έως >100 mg L<sup>-1</sup> του azoxystrobin και από 0.19 έως 2.54 mg L<sup>-1</sup> του pyraclostrobin, αντίστοιχα (Πίνακας 4). Η προσθήκη SHAM μείωσε περαιτέρω τις τιμές  $EC_{50}$  όλων των απομονώσεων και στα δύο μυκητοκτόνα και όλες χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες στα Qols. Χαρακτηριστικό επίσης της επίδρασης του SHAM ήταν η μείωση των τιμών  $EC_{50}$  στην επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα από >10 σε 0.01 mg L<sup>-1</sup> για το azoxystrobin και από 0.07-1 mg L<sup>-1</sup> σε <0.01 mg L<sup>-1</sup> για το pyraclostrobin. Παρουσία SHAM, παρεμποδίστηκε πλήρως η βλάστηση των σπορίων στη συγκέντρωση του 1 mg L<sup>-1</sup> με pyraclostrobin και 10 mg L<sup>-1</sup> με azoxystrobin, αντίστοιχα (Εικόνα 9).

Πέντε απομονώσεις (B-18, B-35, C-07, C-14, TR-23) εμφάνισαν τιμές  $EC_{50}$  για τη βλάστηση των σπορίων >100 mg L<sup>-1</sup> και για τα δύο μυκητοκτόνα (Πίνακας 3). Αντίστοιχα, οι τιμές  $EC_{50}$  για τη μυκηλιακή ανάπτυξη ήταν σταθερά πάνω από τα 100 mg L<sup>-1</sup> για το azoxystrobin ενώ κυμάνθηκε από 13.5 έως 22.7 mg L<sup>-1</sup> για το pyraclostrobin (Πίνακας 4). Η προσθήκη του SHAM μείωσε ελαφρά τις τιμές  $EC_{50}$  για το pyraclostrobin κυρίως, σε αντίθεση με τις ευαίσθητες απομονώσεις όπου σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των τιμών (π.χ. η τιμή  $EC_{50}$  της TR-43 απομόνωσης από >100 μειώθηκε στα 0.05 mg L<sup>-1</sup> για τη μυκηλιακή ανάπτυξη στο azoxystrobin). Οι τιμές  $EC_{50}$  της επιμήκυνσης του βλαστικού σωλήνα ήταν κατά μέσο όρο μεταξύ των τιμών 10-50 mg L<sup>-1</sup> και στα δύο μυκητοκτόνα παρουσία SHAM (στην περίπτωση της C-14 απομόνωσης η τιμή ήταν >100 mg L<sup>-1</sup> με azoxystrobin). Χαρακτηριστική ήταν η δημιουργία αποικίας ακτίνας 11 mm περίπου στη συγκέντρωση των 10 mg L<sup>-1</sup> με pyraclostrobin, όπου είχαν προστεθεί και 100 mg L<sup>-1</sup> SHAM (Εικόνα 10).

**Πίνακας 3.** Βλάστηση σπορίων δέκα απομονώσεων *B. cinerea* σε εννέα διαφορετικά μυκητοκτόνα.

Απομ.	Fenhexamid		Azoxystrobin		Pyraclostrobin		Boscalid		Cyprodinil		Pyrimethanil		Fludioxonil		Fluazinam		Chlorothalonil					
	EC <sub>50</sub> <sup>1</sup>	RF <sup>2</sup>	EC <sub>50</sub> -SHAM <sup>3</sup>	RF	EC <sub>50</sub> +SHAM	RF	EC <sub>50</sub> -SHAM	EC <sub>50</sub>	RF	EC <sub>50</sub>	RF	EC <sub>50</sub>	RF	EC <sub>50</sub>	RF	EC <sub>50</sub>	RF	EC <sub>50</sub>	RF			
A-41	>10	-	1.05	-	0.10	-	0.08	-	0.01	-	3.81	-	19.5	-	20.1	-	0.01	-	0.03	-	0.42	-
B-18	>100	-	>100	>95.2	>100	>1000	>100	>1250	>100	>10000	>100	>26.2	>100	>5.1	85.1	4.2	0.16	16	0.03	-	0.98	2.3
B-35	>100	-	>100	>95.2	>100	>1000	>100	>1250	>100	>10000	5.24	1.4	>100	>5.1	37.2	1.9	0.03	3	0.03	-	0.55	1.3
B-47	>10	-	4.10	3.9	0.84	8.4	0.34	4.25	0.02	2	2.00	-	>100	>5.1	17.2	-	0.02	2	0.04	1.3	0.44	1.1
C-07	>10	-	>100	>95.2	>100	>1000	>100	>1250	>100	>10000	>100	>26.2	>100	>5.1	68.8	3.4	0.02	2	0.05	1.6	0.52	1.2
C-09	>10	-	5.01	4.8	0.69	6.9	3.52	44	0.02	2	6.32	1.7	>100	>5.1	79.6	3.9	0.01	-	0.04	1.3	0.78	1.9
C-14	>100	-	>100	>95.2	>100	>1000	>100	>1250	>100	>10000	3.37	-	>100	>5.1	48.9	2.4	0.02	2	0.04	1.3	0.68	1.6
C-39	>100	-	6.06	5.8	0.70	7	10.4	130	0.02	2	8.14	2.1	>100	>5.1	24.6	1.2	0.02	2	0.05	1.6	0.55	1.3
TR-23	>10	-	>100	>95.2	>100	>1000	>100	>1250	>100	>10000	4.40	1.2	>100	>5.1	33.4	1.7	0.01	-	0.03	-	0.46	1.1
TR-43	>10	-	5.94	5.7	0.18	1.8	0.18	2.3	0.03	3	3.31	-	86	4.4	11.4	-	0.02	2	0.04	1.3	0.40	-

<sup>1</sup> Συγκέντρωση μυκητοκτόνου που προκαλεί αναστολή του 50% της βλάστησης των σπορίων.

<sup>2</sup> Οι συντελεστές ανθεκτικότητας RF υπολογίστηκαν από τη διαίρεση της τιμής EC<sub>50</sub> κάθε απομόνωσης με την τιμή EC<sub>50</sub> της άγριου τύπου απομόνωσης A-41.

<sup>3</sup> Χωρίς ή με την προσθήκη 100 mg L<sup>-1</sup> σαλικυλοδεξαμικού οξέος (SHAM).

Οι συντελεστές ανθεκτικότητας δεν υπολογίστηκαν για το fenhexamid καθώς δεν καθορίστηκε η τιμή EC<sub>50</sub> της απομόνωσης A-41.

**Πίνακας 4.** Ανάπτυξη μυκηλίου δέκα απομονώσεων *B. cinerea* σε εννέα διαφορετικά μυκητοκτόνα.

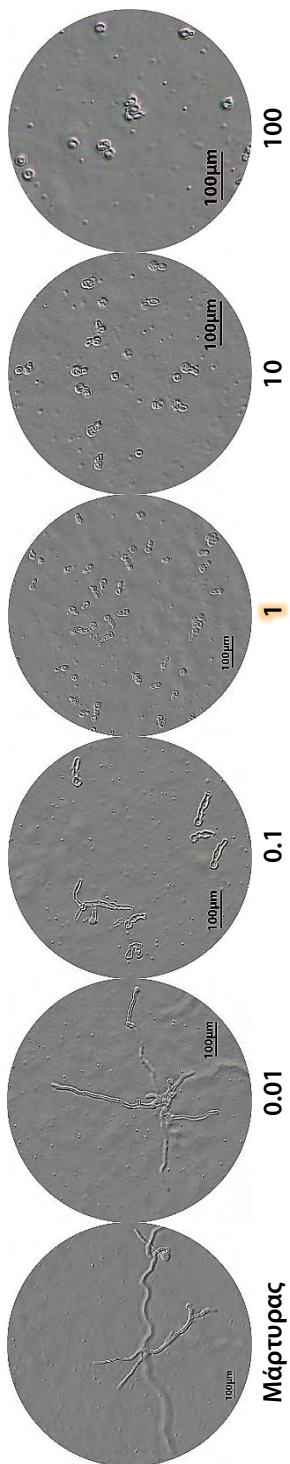
Ατομ.	Fenhexamid		Azoxystrobin		Pyraclostrobin		Boscalid		Cyprodinil		Pyrimethanil		Fludioxonil		Fluazinam		Chlorothalonil			
	EC <sub>50</sub> <sup>1</sup>	RF <sup>2</sup>	EC <sub>50</sub> -SHAM <sup>3</sup>	RF	EC <sub>50</sub> +SHAM	RF	EC <sub>50</sub> +SHAM	EC <sub>50</sub>	RF	EC <sub>50</sub>	RF	EC <sub>50</sub>	RF	EC <sub>50</sub>	RF	EC <sub>50</sub>	RF	EC <sub>50</sub>	RF	
A-41	0.09	-	5.90	-	0.25	-	0.70	-	0.01	-	0.87	-	0.05	-	0.30	-	0.004	-	0.39	-
B-18	10.1	112.2	>100	>16.9	>100	>400	13.5	19.3	13.0	1300	>100	>114.9	2.80	56	14.3	47.7	0.007	1.75	26.8	68.7
B-35	3.20	35.6	>100	>16.9	>100	>400	16.6	23.7	17.5	1750	1.02	1.17	92.0	1840	99.5	331.7	0.004	4	0.39	-
B-47	0.04	-	>100	>16.9	0.09	-	0.19	-	0.02	2	0.38	-	0.02	-	0.47	1.6	0.005	125	5.25	13.5
C-07	0.06	-	>100	>16.9	>100	>400	22.7	32.4	13.8	1380	>100	>114.9	1.41	28.2	2.46	8.2	0.001	-	5.59	14.3
C-09	0.63	7	>100	>16.9	0.14	-	2.54	3.6	0.02	2	0.79	-	1.24	24.8	1.98	6.6	0.002	2	39.6	101.5
C-14	15.1	167.8	>100	>16.9	>100	>400	18.1	25.9	15.5	1550	0.60	-	18.8	376	19.6	43.6	0.002	2	7.14	18.3
C-39	4.43	49.2	30.8	5.2	0.06	-	0.38	-	0.01	-	1.37	1.6	0.01	-	0.45	1.5	0.001	-	7.53	19.3
TR-23	0.03	-	>100	>16.9	>100	>400	18.2	26	13.3	1330	0.61	-	0.06	12	0.75	2.5	0.003	3	9.5	24.4
TR-43	0.42	4.7	>100	>16.9	0.05	-	0.91	1.3	0.01	-	2.70	3.1	0.01	-	0.18	-	0.001	-	1.01	2.6

<sup>1</sup> Συγκέντρωση μυκητοκτόνου που προκαλεί αναστολή του 50% της μυκηλιακής ανάπτυξης.

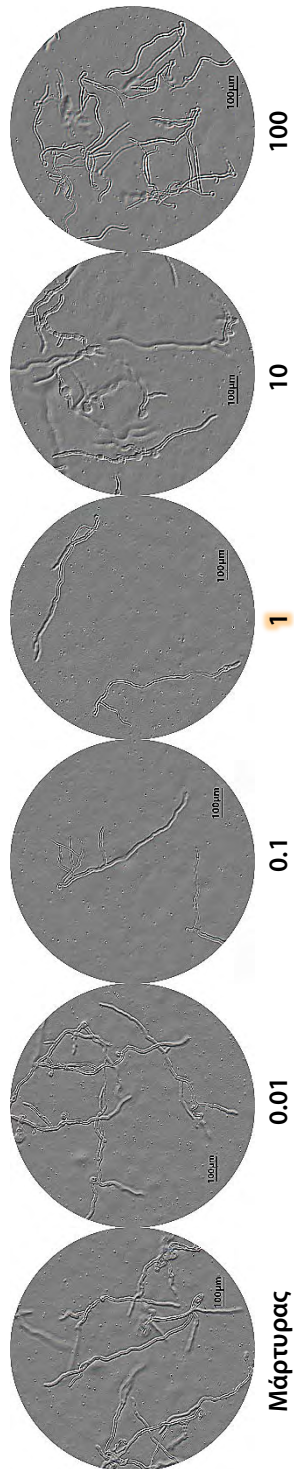
<sup>2</sup> Οι συντελεστές ανθεκτικότητας RF υπολογίστηκαν από τη διαίρεση της τιμής EC<sub>50</sub> κάθε απομόνωσης με την τιμή EC<sub>50</sub> της άγριου τύπου απομόνωσης A-41.

<sup>3</sup> Χωρίς ή με την προσθήκη 100 mg L<sup>-1</sup> σαλικυλοδεξαμικού οξέος (SHAM).

**A. Ευαίσθητη στο fenhexamid απομόνωση [B-47]**



**B. Ανθεκτική στο fenhexamid απομόνωση [C-39]**



**Εικόνα 7.** Βλάστηση спорίων απομονώσεων διαφορετικού επιπέδου ευαισθησίας στο fenhexamid. Η ευαίσθητη απομόνωση B-47 είχε τιμές  $EC_{50}$  βλάστησης спорίων και επιμηκυνσης βλαστικού σωλήνα  $>10$  και  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  αντίστοιχα. Ένα μικρό ποσοστό των спорίων της απομόνωσης αυτής (5 %) βλάστησε στη συγκέντρωση των  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Η ανθεκτική απομόνωση C-39 εμφάνισε τιμές  $EC_{50} >100 \text{ mg L}^{-1}$  και για τις δύο περιπτώσεις.

A. Ευαίσθητη στο fenhexamid απομόνωση [B-47]



Μάρτυρας

0.01

0.1

1

B. Ανθεκτική στο fenhexamid απομόνωση [C-39]



Μάρτυρας

0.1

1

10

100

**Εικόνα 8.** Μυκηλιακή ανάπτυξη ευαίσθητης και ανθεκτικής στο fenhexamid απομόνωσης, σε διαφορετικό εύρος συγκεντρώσεων ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

Ο παράγοντας ανθεκτικότητας των απομονώσεων αυτών με τη χρησιμοποίηση του SHAM ήταν πάνω από 1000 και πάνω από 10000 για τη βλάστηση σπορίων στο azoxystrobin και το pyraclostrobin, αντίστοιχα (Πίνακας 3). Ο αντίστοιχος παράγοντας ανθεκτικότητας για τη μυκηλιακή ανάπτυξη ξεπέρασε την τιμή 400 για το azoxystrobin ενώ κυμάνθηκε από 1300 έως 1750 για το pyraclostrobin (Πίνακας 4). Αυτές οι πέντε απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικές στα QoIs (**QoI<sup>R</sup>**).

Από τα συνδυασμένα αποτελέσματα βιοδοκιμών μυκητοτοξικότητας των απομονώσεων *B. cinerea* στα QoIs διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση των **10 mg L<sup>-1</sup> με azoxystrobin ή pyraclostrobin** μαζί με την προσθήκη **100 mg L<sup>-1</sup> SHAM** παρεμποδίζει πλήρως τόσο τη βλάστηση των σπορίων όσο και την ανάπτυξη αποικίας των ευαίσθητων απομονώσεων. Επομένως η συγκέντρωση αυτή καθορίστηκε ως η δόση διαχωρισμού των δύο επιπέδων ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής.

Boscalid (carboxamides, SDHIs)

Στο μυκητοκτόνο αυτό βρέθηκαν δύο σαφώς καθορισμένα επίπεδα ευαισθησίας, τόσο στη βλάστηση των σπορίων όσο και στην ανάπτυξη αποικίας. Οι τιμές EC<sub>50</sub> οχτώ απομονώσεων (A-41, B-35, B-47, C-09, C-14, C-39, TR-23, TR-43) κυμάνθηκαν από 2 έως 8.14 mg L<sup>-1</sup> για τη βλάστηση των σπορίων και από 0.38 έως 2.7 mg L<sup>-1</sup> για τη μυκηλιακή ανάπτυξη (Πίνακες 3 & 4). Οι απομονώσεις αυτές δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στην ευαισθησία, καθότι το εύρος των τιμών EC<sub>50</sub> ήταν μόλις 2.1 και 3.1x για τα δύο στάδια, αντίστοιχα. Οι τιμές EC<sub>50</sub> για την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα βρέθηκαν από 0.15 έως 0.4 mg L<sup>-1</sup>. Στη συγκέντρωση των 5 mg L<sup>-1</sup> βλάστησε το 35 % περίπου των σπορίων το οποίο είχε μήκος 20-40 μm. Στις συγκεντρώσεις των 10, 50 και 100 mg L<sup>-1</sup> παρατηρήθηκε βλάστηση του 4 % περίπου των σπορίων το οποίο βρέθηκε να έχει μήκος 20 μm (Εικόνα 11A). Αντίστοιχα, στη συγκέντρωση των 10 mg L<sup>-1</sup> με boscalid όλες αυτές οι απομονώσεις απέτυχαν να σχηματίσουν αποικία (Εικόνα 12A).

Δύο απομονώσεις (B-18, C-07) είχαν τιμές EC<sub>50</sub> πάνω από 100 mg L<sup>-1</sup> για τη βλάστηση των σπορίων, την επιμήκυνση βλαστικού σωλήνα και την ανάπτυξη αποικίας. Η επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα των απομονώσεων αυτών δεν παρουσίασε διαφορές στη συγκέντρωση των 10 mg L<sup>-1</sup> από εκείνη του μάρτυρα (Εικόνα 11B). Ακόμη και στη συγκέντρωση των 100 mg L<sup>-1</sup> η ακτίνα της αποικίας διέφερε από εκείνη του μάρτυρα μόλις κατά 5 mm (Εικόνα 12B). Οι απομονώσεις αυτές διαχωρίστηκαν από την άγριου τύπου απομόνωση A-41 με ένα παράγοντα

ανθεκτικότητας που ήταν >26.2 για τη βλάστηση σπορίων (Πίνακας 3) και >114.9 για τη μυκηλιακή ανάπτυξη (Πίνακας 4).

Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, η συγκέντρωση με **boscalid** των **10 mg L<sup>-1</sup>** καθορίστηκε ως η δόση διαχωρισμού για την ανίχνευση των ανθεκτικών στα SDHI's μυκητοκτόνα (**Bos<sup>R</sup>**).

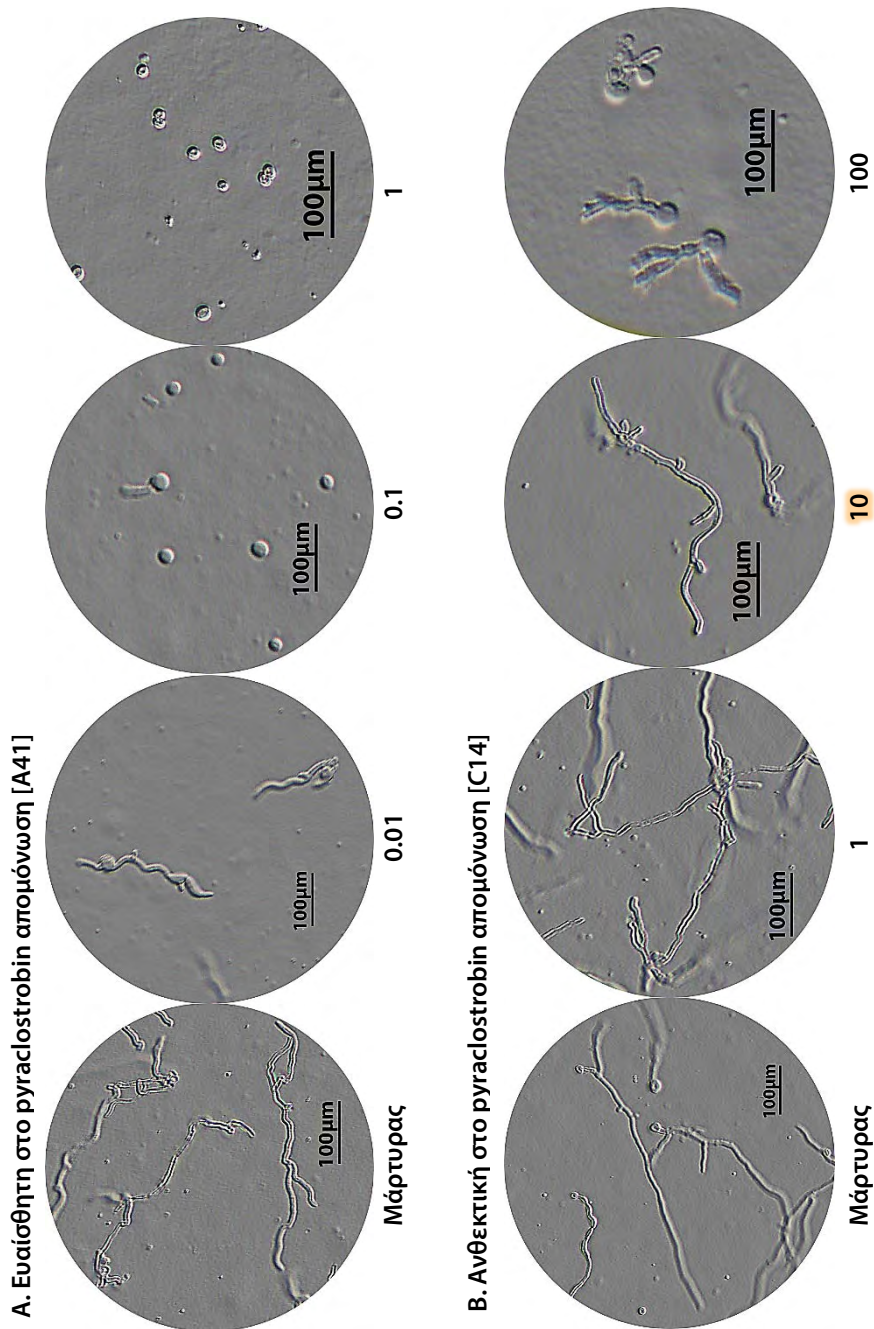
Cyprodinil και Pyrimethanil (anilinopyrimidines)

Τα δύο αυτά μυκητοκτόνα δεν ήταν αποτελεσματικά κατά της βλάστησης των σπορίων πάρα μονάχα σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις (Εικόνα 13). Οι τιμές EC<sub>50</sub> κυμάνθηκαν από 19.5 έως πάνω από 100 mg L<sup>-1</sup> για το cyprodinil και από 11.4 έως 85.1 mg L<sup>-1</sup> για το pyrimethanil (Πίνακας 3).

Το στάδιο της επιμήκυνσης του βλαστικού σωλήνα καθώς και της μυκηλιακής ανάπτυξης ήταν πιο ευαίσθητο στη δράση των μυκητοκτόνων της κατηγορίας αυτής. Πέντε απομονώσεις (A-41, B-47, C-39, TR-23, TR-43) είχαν τιμές EC<sub>50</sub> για την ανάπτυξη του μυκηλίου από 0.01 έως 0.06 mg L<sup>-1</sup> στο cyprodinil και από 0.18 έως 0.75 mg L<sup>-1</sup> στο pyrimethanil (Πίνακας 4). Όμως, οι τιμές EC<sub>50</sub> για την επιμήκυνση της βλαστικής υφής ήταν μεταξύ 0.05 και 0.1 mg L<sup>-1</sup> και για τα δύο μυκητοκτόνα. Το pyrimethanil στη συγκέντρωση των 100 mg L<sup>-1</sup> παρεμπόδιζε πλήρως τη βλάστηση των σπορίων. Αντίθετα, στη συγκέντρωση αυτή του cyprodinil παρατηρήθηκε βλάστηση της τάξης του 30-50 % των σπορίων με μήκος όμως <50 μm (Εικόνα 13A). Πάντως, ήδη από τη συγκέντρωση των 10 mg L<sup>-1</sup> cyprodinil το μήκος της βλαστικής υφής άρχισε να ελαττώνεται σημαντικά και να κυμαίνεται από 50-120 μm. Καμία από αυτές τις απομονώσεις δεν ανέπτυξε αποικία στη συγκέντρωση του 1 mg L<sup>-1</sup> και χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες στις ανιλινοπυριμιδίνες.

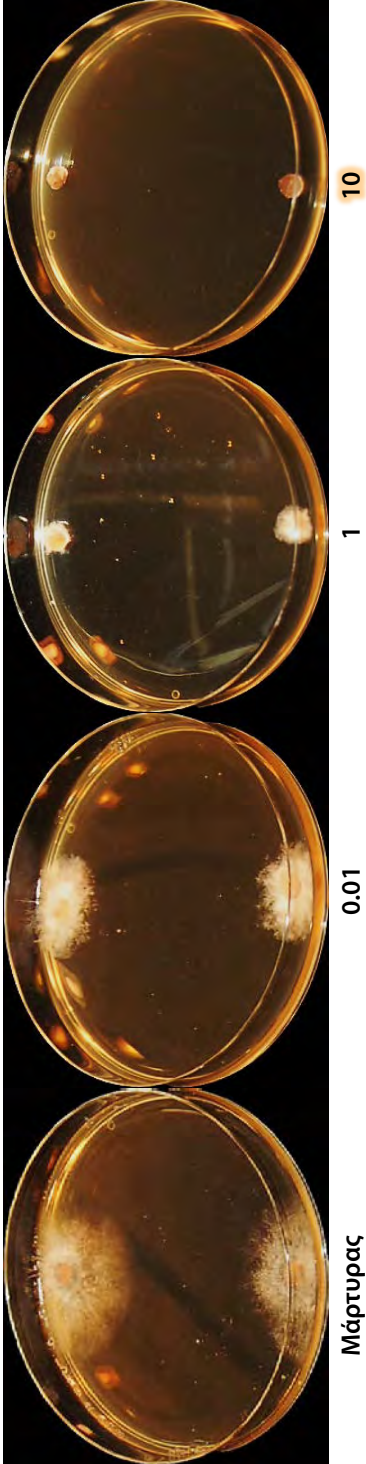
Οι υπόλοιπες πέντε απομονώσεις (B-18, B-35, C-07, C-09, C-14) είχαν τιμές EC<sub>50</sub> για τη μυκηλιακή ανάπτυξη από 1.24 ως 92 mg L<sup>-1</sup> στο cyprodinil και από 1.98 ως 99.5 mg L<sup>-1</sup> για το pyrimethanil (Πίνακας 4). Η ανάπτυξη της αποικίας όλων των απομονώσεων στη συγκέντρωση του 1 mg L<sup>-1</sup> ήταν σχεδόν όπως στο μάρτυρα, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις η ακτίνα της αποικίας έφτασε τα 14 mm στη συγκέντρωση των 50 mg L<sup>-1</sup> (Εικόνα 14). Οι απομονώσεις αυτές διαχωρίστηκαν από τις ευαίσθητες με ένα παράγοντα ανθεκτικότητας που κυμάνθηκε από 24.8 έως 1840 για το cyprodinil και από 6.6 έως 331.7 για το pyrimethanil αντίστοιχα (Πίνακας 4). Οι τιμές EC<sub>50</sub> για την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα ήταν πάνω από το 1 mg L<sup>-1</sup> σε όλες τις περιπτώσεις. Αυτές οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικές στις ανιλινοπυριμιδίνες (**Ani<sup>R</sup>**).



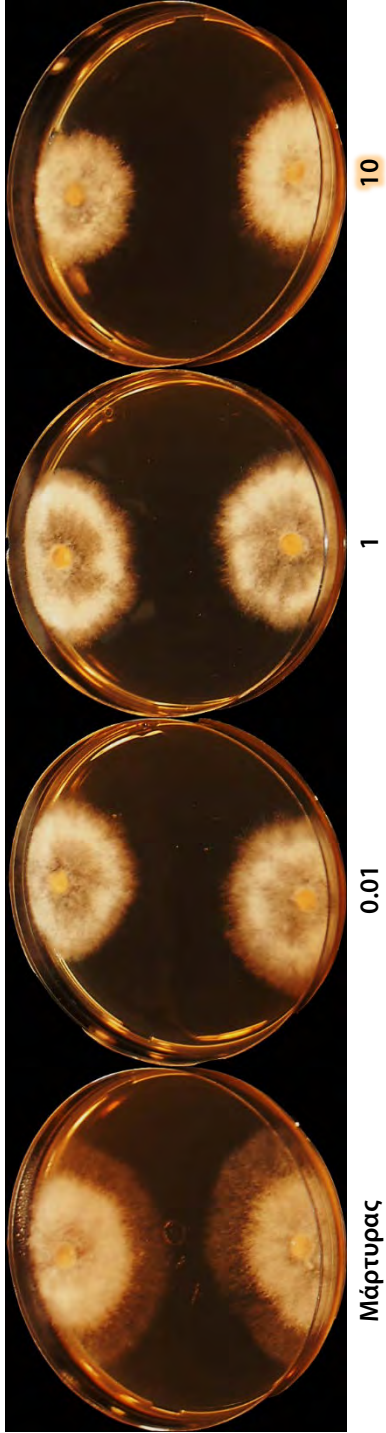


**Εικόνα 9.** Βλάστηση σπορίων απομονώσεων διαφορετικού επιπέδου ευαισθησίας στις στρομπιλουρίνες. Οι ευαίσθητες απομονώσεις δε βλάστησαν στη συγκέντρωση του  $1 \text{ mg L}^{-1}$  pyraclostrobin +  $100 \text{ mg L}^{-1}$  SHAM ενώ όλες οι ανθεκτικές απομονώσεις βλάστησαν στα  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .

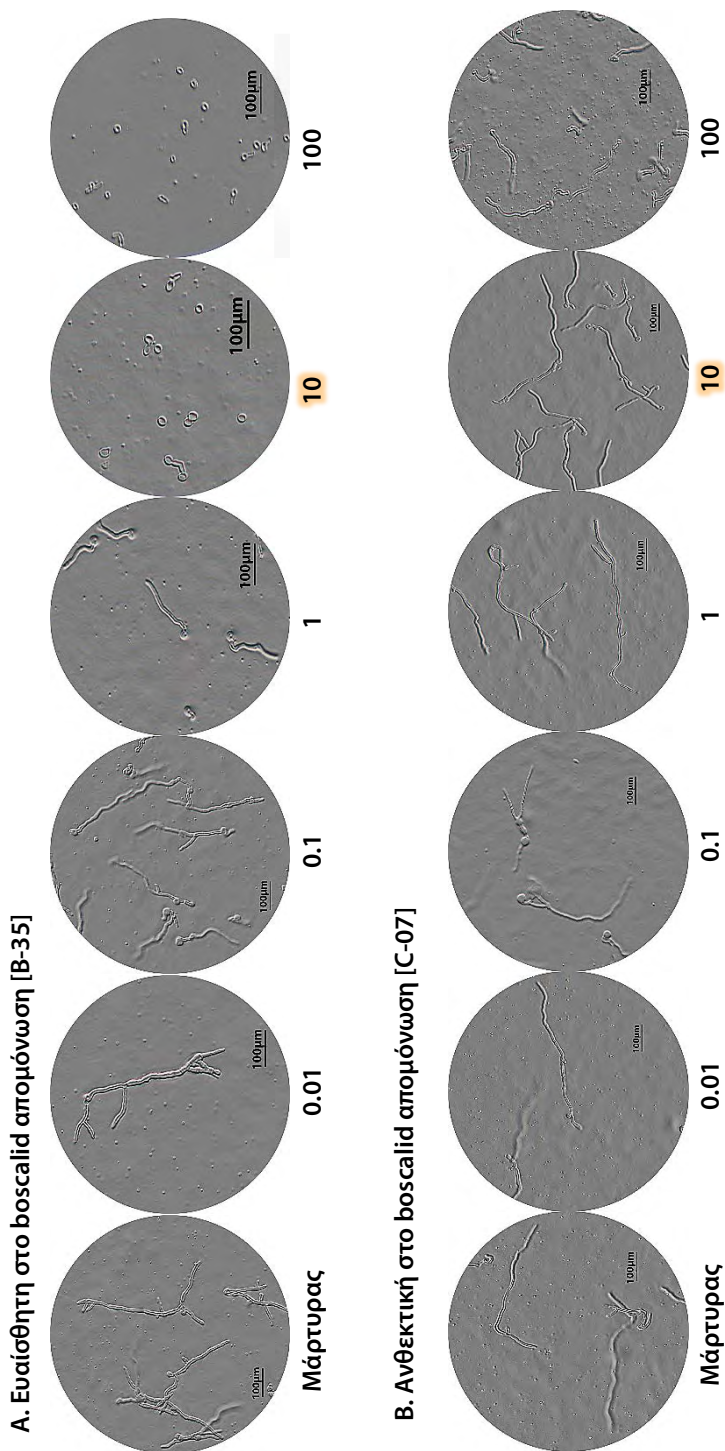
**A. Ευαίσθητη στο pyraclostrobin απομόνωση [A41]**



**B. Ανθεκτική στο pyraclostrobin απομόνωση [C14]**

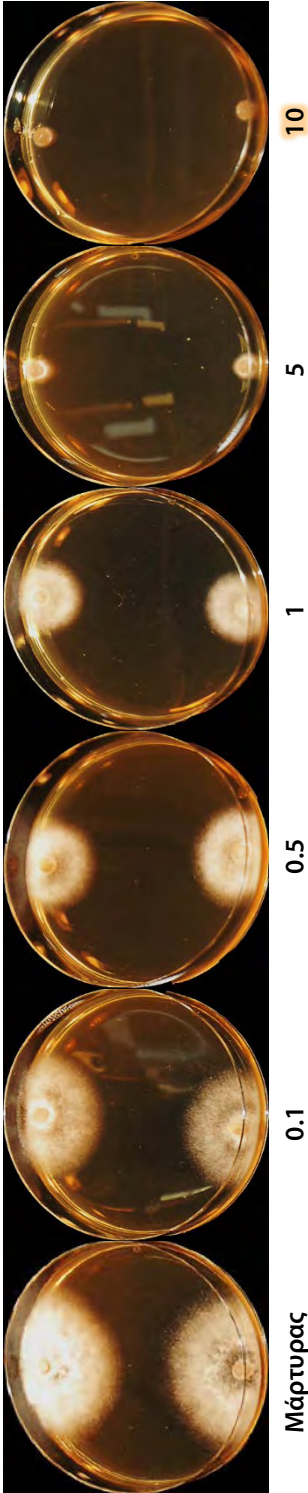


**Εικόνα 10.** Μυκηλιακή ανάπτυξη ευαίσθητης και ανθεκτικής στις στρομπιλοϋρίνες (+ 100 mg L<sup>-1</sup> SHAM) απομόνωσης.



**Εικόνα 11.** Βλάστηση σπορίων απομονώσεων διαφορετικού επιπέδου ευαισθησίας στο boscalid.

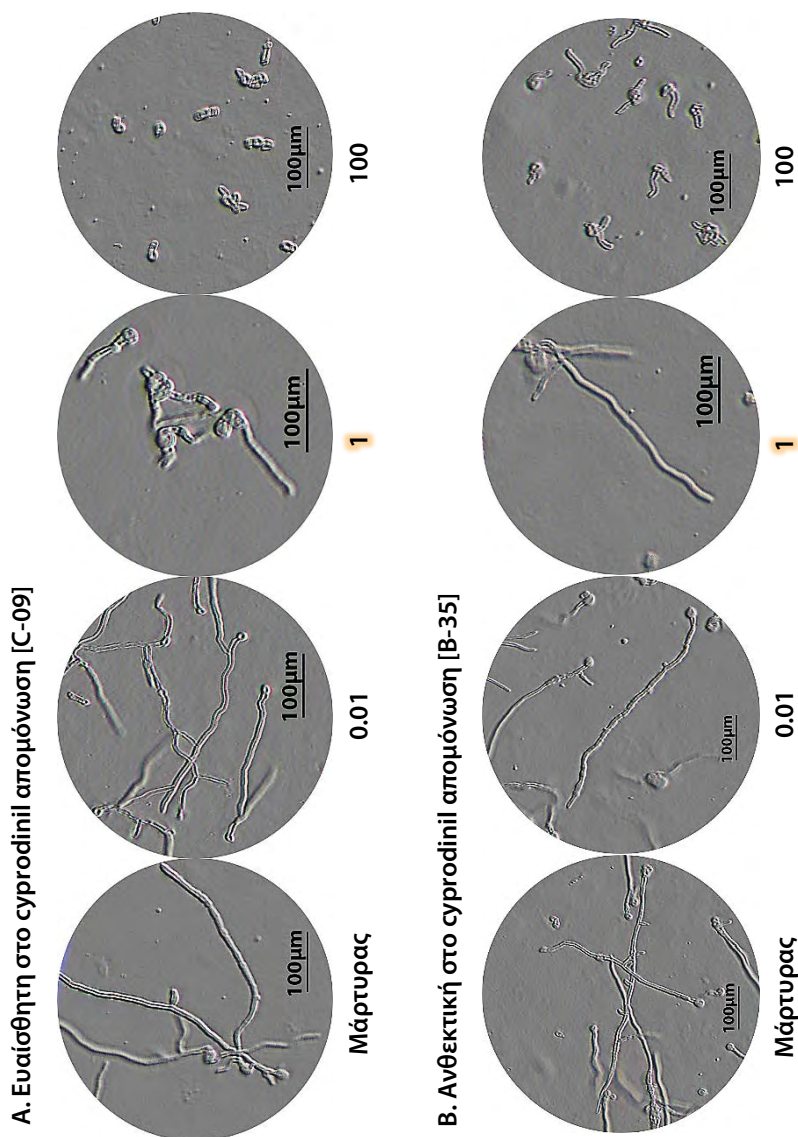
## Α. Ευαίσθητη στο boscalid απομόνωση [B-35]



## Β. Ανθεκτική στο boscalid απομόνωση [C-07]

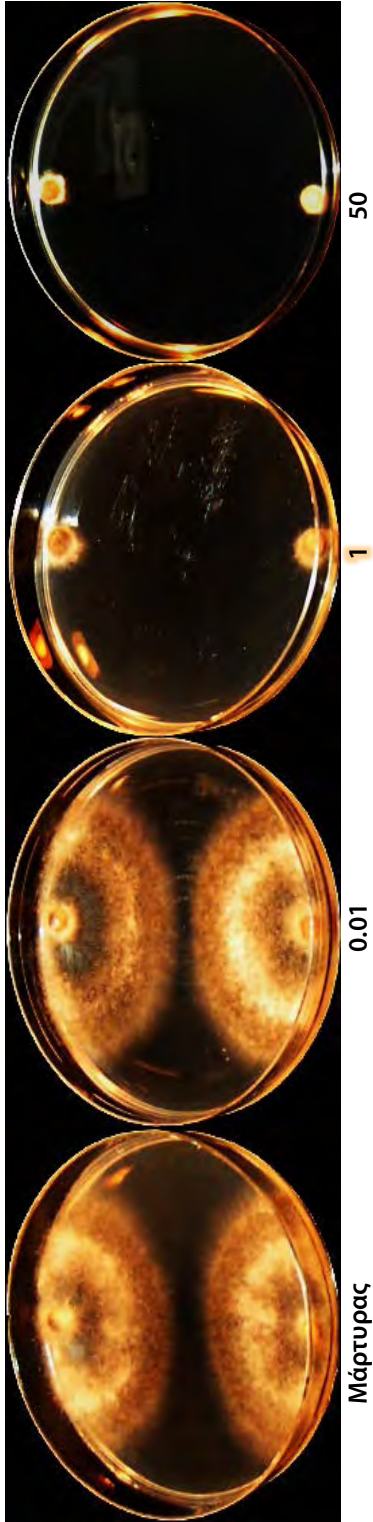


**Εικόνα 12.** Μυκηλιακή ανάπτυξη ευαίσθητης και ανθεκτικής στο boscalid απομόνωσης, σε διαφορετικό εύρος συγκεντρώσεων ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Η συγκέντρωση των  $10 \text{ mg L}^{-1}$  παρεμπόδισε πλήρως την ανάπτυξη του μικρήλιου του ευαίσθητων απομονώσεων και σε συνδυασμό με τις δοκιμές βλάστησης σπορίων επιλέχθηκε για το διαχωρισμό των δύο επιπέδων ευαισθησίας.

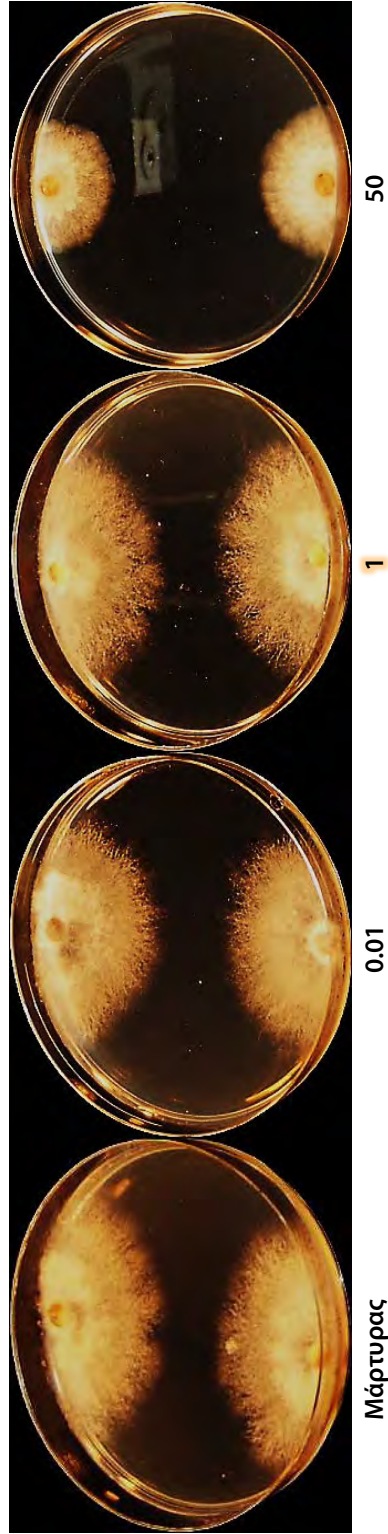


**Εικόνα 13.** Βλάστηση спорίων διαφορετικού επιπέδου ευαισθησίας απομονώσεων στις ανλινωπυριμιδίνες. Η διάκριση της ευαισθησίας βασίστηκε κυρίως στην επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα. Η ευαίσθητη απομόνωση C-09 εμφάνισε τιμή  $EC_{50}$  0.07  $mg L^{-1}$  ενώ η ανθεκτική B-35 0.33  $mg L^{-1}$  αντίστοιχα.

A. Ευαίσθητη στο cyprodinil απομόνωση [C-09]



B. Ανθεκτική στο cyprodinil απομόνωση [B-35]

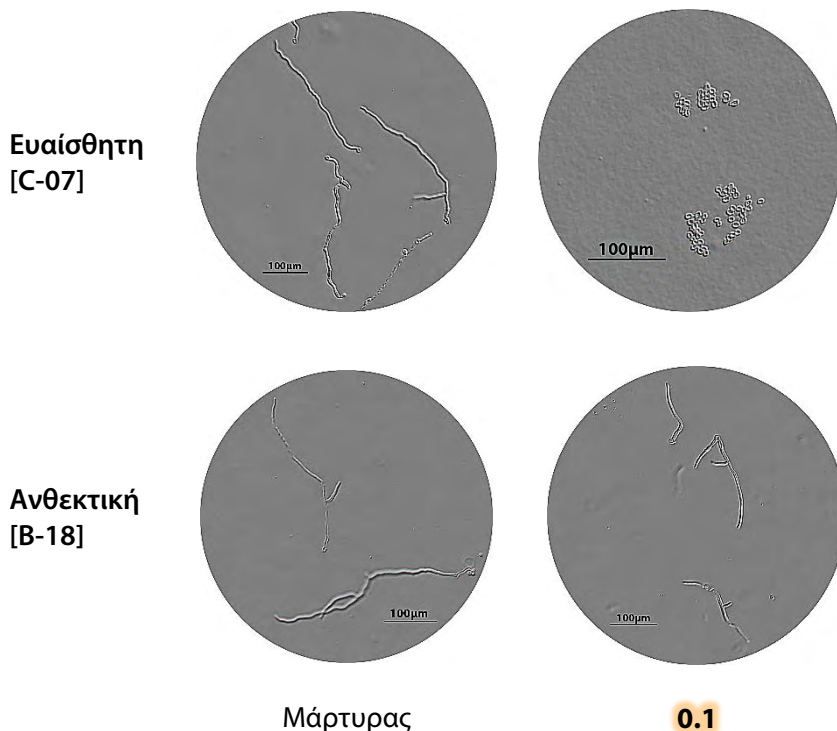


**Εικόνα 14.** Μυκηλιακή ανάπτυξη ευαίσθητης και ανθεκτικής απομόνωσης στις ανιλνοπυριμιδίνες. Η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση (MIC) του  $1 \text{ mg L}^{-1}$  χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των δυο επιπέδων ευαισθησίας.

Από τα συνδυασμένα αποτελέσματα των βιοδοκιμών προέκυψε ότι τα σπόρια ευαίσθητων απομονώσεων μπορεί να βλαστάνουν κανονικά στη συγκέντρωση του **1 mg L<sup>-1</sup> cyprodinil** ή **pyrimethanil** αλλά δεν σχηματίζουν αποικία. Επομένως η συγκέντρωση αυτή χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των δύο επιπέδων ευαισθησίας.

Fludioxonil (phenylpyrroles)

Το μυκητοκτόνο αυτό εμφανίστηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικό *in vitro* κατά του *B. cinerea*. Εκτός από μία απομόνωση (B-18) οι τιμές EC<sub>50</sub> τόσο για τη βλάστηση των σπορίων όσο και για την ανάπτυξη αποικίας κυμάνθηκαν μεταξύ των τιμών 0.01 με 0.03 mg L<sup>-1</sup> και 0.001 με 0.004 mg L<sup>-1</sup>, αντίστοιχα (Πίνακες 3 & 4). Η συγκέντρωση 0.1 mg L<sup>-1</sup> fludioxonil παρεμπόδισε πλήρως τόσο τη βλάστηση των σπορίων (Εικόνα 15) όσο και την ανάπτυξη αποικίας. Αυτές οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες στο fludioxonil.



**Εικόνα 15.** Βλάστηση σπορίων ευαίσθητης και ανθεκτικής απομόνωσης στο fludioxonil. Καμία ευαίσθητη απομόνωση δε βλάστησε στη συγκέντρωση 0.1 mg L<sup>-1</sup> του μυκητοκτόνου.

Η απομόνωση B-18 είχε τιμή  $EC_{50}$  για τη βλάστηση σποριών  $0.16 \text{ mg L}^{-1}$  και διαχωρίστηκε από τις υπόλοιπες με ένα παράγοντα ανθεκτικότητας της τάξης του 16 (Πίνακας 3, Εικόνα 15). Το 10 % σποριών βλάστησαν ακόμα και στη συγκέντρωση του  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . Η τιμή  $EC_{50}$  της μυκηλιακής ανάπτυξης ήταν  $0.042 \text{ mg L}^{-1}$  ενώ παρατηρήθηκε και χαμηλή ανάπτυξη (3 mm) στη συγκέντρωση των  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Ο παράγοντας ανθεκτικότητας για την ανάπτυξη του μυκηλίου της απομόνωσης B-18 ήταν 42 (Πίνακας 4). Η απομόνωση αυτή χαρακτηρίστηκε ως μετρίως ανθεκτική στο fludioxonil (**Phen<sup>MR</sup>**). Σε μεταγενέστερο έλεγχο ανίχνευσης ανθεκτικών στελεχών, δέκα ακόμα απομονώσεις του *B. cinerea* είχαν τιμές  $EC_{50}$  για τη βλάστηση των σποριών, την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα και τη μυκηλιακή ανάπτυξη που κυμάνθηκαν από 0.14-0.48, 0.008-0.06 και 0.084-0.231  $\text{mg L}^{-1}$ , αντίστοιχα.

Η συγκέντρωση του **0.1 mg L<sup>-1</sup> fludioxonil** καθορίστηκε ως δόση διαχωρισμού ευαίσθητων και μετρίως ανθεκτικών απομονώσεων του παθογόνου.

#### Fluazinam (phenylpyridinamines)

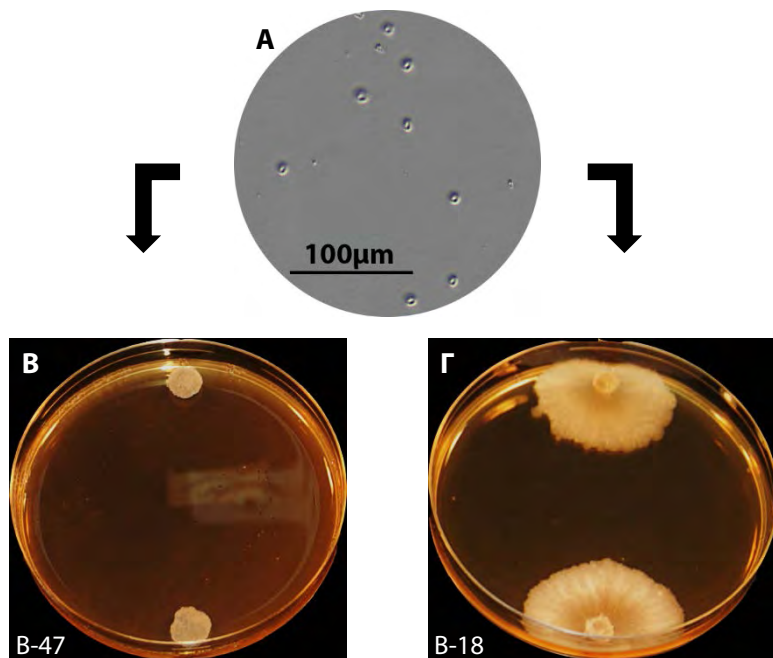
Οι δοκιμές μυκητοτοξικότητας που διεξήχθησαν ανάμεσα στις απομονώσεις στο μυκητοκτόνο αυτό δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές στην ευαισθησία. Το fluazinam αποδείχτηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικό τόσο κατά της βλάστησης των σποριών όσο και κατά του σχηματισμού αποικίας με τιμές  $EC_{50}$  από 0.03 έως  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  και από 0.001 έως  $0.013 \text{ mg L}^{-1}$ , αντίστοιχα (Πίνακες 3 & 4). Πάντως στη συγκέντρωση  $0.001 \text{ mg L}^{-1}$  fluazinam, τα σπόρια όλων των απομονώσεων βλάστησαν κανονικά όπως στο μάρτυρα. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα για τη μυκηλιακή ανάπτυξη (η ακτίνα της αποικίας διέφερε κατά 4 mm από εκείνη του μάρτυρα). Οι τιμές  $EC_{50}$  για την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα ήταν μεταξύ των στενών ορίων 0.005 και  $0.006 \text{ mg L}^{-1}$ . Η συγκέντρωση του **0.1 mg L<sup>-1</sup> fluazinam** παρεμπόδισε πλήρως τη βλάστηση των σποριών και τη δημιουργία αποικίας και γι' αυτό καθορίστηκε ως δόση διαχωρισμού για την τυχόν ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών.

#### Chlorothalonil (phthalonitriles)

Όλες οι εξετασθείσες απομονώσεις εμφανίστηκαν ευαίσθητες στο στάδιο της βλάστησης των σποριών σε αυτό το πολυθεσικού τρόπου δράσης μυκητοκτόνο. Οι τιμές  $EC_{50}$  κυμάνθηκαν από 0.4 έως  $0.98 \text{ mg L}^{-1}$  (Πίνακας 3), ενώ η συγκέντρωση των  $5 \text{ mg L}^{-1}$  παρεμπόδισε πλήρως τη βλάστηση. Η ευαισθησία της μυκηλιακής ανάπτυξης στο chlorothalonil ήταν μικρότερη και εμφανίστηκε μεγάλη παραλλακτικότητα μεταξύ των απομονώσεων. Κάποιες δεν σχημάτισαν καθόλου αποικία στη συγκέντρωση των  $10 \text{ mg L}^{-1}$  ενώ κάποιες άλλες δημιούργησαν αποικία



14 mm στη συγκέντρωση των  $50 \text{ mg L}^{-1}$  chlorothalonil (Εικόνα 16). Οι τιμές  $EC_{50}$  για την ανάπτυξη αποικίας κυμάνθηκαν από 0.39 έως  $39.6 \text{ mg L}^{-1}$  μυκητοκτόνου (Πίνακας 4).



**Εικόνα 16.** Παραλλακτικότητα στις δοκιμές ευαισθησίας στο chlorothalonil. Αν και στη συγκέντρωση των  $10 \text{ mg L}^{-1}$  δεν παρατηρήθηκε βλάστηση σπορίων σε καμία απομόνωση (Α), η ανάπτυξη του μυκηλίου ήταν διαφορετική μεταξύ των απομονώσεων (Β, Γ). Εφόσον η κύρια δράση του chlorothalonil εντοπίζεται στη βλάστηση των σπορίων όλες οι απομονώσεις θεωρήθηκαν ευαίσθητες.

Δεδομένου ότι η κύρια δράση του chlorothalonil είναι ενάντια της βλάστησης των σπορίων, όλες οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες στο μυκητοκτόνο αυτό. Από το συνδυασμό των βιοδοκιμών μυκητοτοξικότητας η συγκέντρωση των  **$10 \text{ mg L}^{-1}$  chlorothalonil** για τον έλεγχο της βλάστησης των σπορίων, επιλέχθηκε ως η δόση διαχωρισμού δύο επιπέδων ευαισθησίας.

## Συζήτηση

Η συνεχής δυνατότητα προσαρμογής του *B. cinerea* στα νέα μυκητοκτόνα απαιτεί συστηματική παρακολούθηση της αλλαγής ευαισθησίας του άγριου πληθυσμού για την αποφυγή του κινδύνου επικράτησης ανθεκτικών στελεχών που θα επιφέρουν αποτυχία στην καταπολέμηση της ασθένειας. Με επιμέρους εξέταση της βλάστησης των σπορίων, της επιμήκυνσης του βλαστικού σωλήνα και της μυκηλιακής

ανάπτυξης, τα στελέχη του παθογόνου διαχωρίστηκαν σε διάφορα επίπεδα ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα. Η κατάταξη αυτή θεωρήθηκε πρωτίστης σημασίας για την πορεία της παρούσας έρευνας καθώς τα ποσοστά ανίχνευσης ανθεκτικών στελεχών θα είχαν άμεσο αντίκτυπο στη στρατηγική των προγραμμάτων εφαρμογής μυκητοκτόνων στα πειράματα αγρού. Οι επιλεγθείσες συγκεντρώσεις διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου με εφαρμογή της μεθόδου σημειακής εναπόθεσης σπορίων (περισσότερα στο κεφάλαιο 'Ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών').

Πολλές μέθοδοι ανίχνευσης της ανθεκτικότητας βασίζονται σε εξέταση επιμέρους φάσεων ανάπτυξης του παθογόνου όπως είναι η επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα (Weber & Hahn, 2011). Η εφαρμογή της μεθόδου σημειακής εναπόθεσης σπορίων επιτρέπει την ταυτόχρονη μελέτη τριών σταδίων ανάπτυξης του παθογόνου σε ένα τριβλίο: μέτρηση της βλάστησης των σπορίων και της επιμήκυνσης του βλαστικού σωλήνα σε 18 ώρες και της ανάπτυξης της αποικίας σε 72 ώρες, αντίστοιχα. Ο συνδυασμός παρατηρήσεων όλων των σταδίων προσδίδει μία ακριβή διάκριση της ευαισθησίας των απομονώσεων χωρίς την πιθανότητα εκδήλωσης λανθασμένων αποτελεσμάτων. Έως δέκα διαφορετικές απομονώσεις μπορούν να χαρακτηρισθούν ως προς την ευαισθησία τους σε μυκητοκτόνα σε ένα μόνο τριβλίο και επομένως υπάρχει η δυνατότητα εξέτασης πολλών απομονώσεων *in vitro* σε σύντομο χρονικό διάστημα (Pappas, 1982, Pappas, 1997).

Το fenhexamid αποδείχθηκε αποτελεσματικό κατά της επιμήκυνσης του βλαστικού σωλήνα και της μυκηλιακής ανάπτυξης ενώ αναστολή της βλάστησης των σπορίων δεν παρατηρήθηκε σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 10 mg L<sup>-1</sup>. Οι τιμές EC<sub>50</sub> για την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα και την ανάπτυξη αποικίας ήταν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Hänßler & Pontzen (1999) και Debieu *et al.* (2001), ανεξαρτήτως θρεπτικού υποστρώματος. Παρομοίως, για τις ανθεκτικές στις υδροξυανιλίδες απομονώσεις παρατηρήθηκε κανονική ανάπτυξη της βλαστικής υφής στη συγκέντρωση 1 mg L<sup>-1</sup> fenhexamid με τιμή EC<sub>50</sub> για την ανάπτυξη αποικίας μεγαλύτερη των 2 mg L<sup>-1</sup> σε σύνθετα υποστρώματα όπως αναφέρθηκε και από τους Weber (2010) και Esterio *et al.* (2011). Μερικές απομονώσεις οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ευαίσθητες *in vitro* (C-09 και TR-43), διαφοροποιήθηκαν από την άγριου τύπου A-41 με ένα παράγοντα ανθεκτικότητας που κυμάνθηκε από 4.7 έως 7 για τη μυκηλιακή ανάπτυξη. Πιθανότατα να εμφανίζουν κάποια μορφή μειωμένης ευαισθησίας στο fenhexamid και να ανήκουν στους φαινοτύπους Hyd<sup>R2</sup> κατά τους Leroux *et al.* (2002) ή Hyd<sup>R3</sup> κατά τους Esterio *et al.* (2011). Σκοπός της παρούσας έρευνας εξάλλου ήταν η ανίχνευση ισχυρής ανθεκτικότητας, η οποία είναι εμφανής

σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του παθογόνου και έχει πρακτική σημασία για την αντιμετώπιση του παθογόνου στον αγρό.

Εξαιτίας της αρνητικής επίδρασης της λειτουργίας της εναλλακτικής αναπνοής (Joseph-Horne & Hollomon, 2000) στη δράση των μυκητοκτόνων azoxystrobin και pyraclostrobin της ομάδας των QoIs, η προσθήκη SHAM κρίθηκε απαραίτητη στις δοκιμές *in vitro*. Δύο ευδιάκριτα επίπεδα ευαισθησίας βρέθηκαν στην ομάδα αυτή των QoIs. Φαίνεται πως οι ευαίσθητες απομονώσεις παρουσιάζουν τιμές  $EC_{50}$  για τη βλάστηση των σπορίων στο στενό εύρος των 0.02-0.03 mg L<sup>-1</sup>, ακόμα και σε διαφορετικά υποστρώματα όπως είναι τα MEA, WA και PDA (Markoglou *et al.*, 2006, Myresiotis *et al.*, 2008, De Miccolis Angelini *et al.*, 2012). Οι ανθεκτικές στις στρομπιλουρίνες απομονώσεις βρέθηκαν ικανές να σχηματίσουν αποικία ακόμα και σε συγκεντρώσεις με 100 mg L<sup>-1</sup> δραστικής ουσίας, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής. Είναι μάλιστα αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τιμές  $EC_{50}$  της μυκηλιακής ανάπτυξης ανθεκτικών απομονώσεων βρέθηκαν σχεδόν ίδιες με προηγούμενες μελέτες όπως των Banno *et al.* (2009) και Jiang *et al.* (2009).

Στην περίπτωση του boscalid αν και μεταξύ των ευαίσθητων απομονώσεων παρατηρήθηκε μία σημαντική παραλλακτικότητα, οι απομονώσεις διαχωρίστηκαν σε δύο επίπεδα ευαισθησίας. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Yin *et al.* (2011), η ίδια παραλλακτικότητα διαπιστώθηκε και μεταξύ ανθεκτικών απομονώσεων, όταν σε προκαταρκτικές δοκιμές μυκητοτοξικότητας επιλέχθηκε ως θρεπτικό υπόστρωμα το YBA (Stammeler & Sreakman, 2006). Έχει αναφερθεί ότι η φαινοτυπική σύγκριση κατά τις δοκιμές μυκητοτοξικότητας μπορεί να διαφέρει, ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής (Beckerman, 2013). Όταν ως βάση ενέργειας επιλέγεται η γλυκόζη, η τοξικότητα του boscalid είναι χαμηλότερη, αν και δεν ενεργοποιείται η εναλλακτική αναπνοή. Υψηλότερες τοξικότητες επιτυγχάνονται όταν επιλέγονται άλατα οξικού ή ηλεκτρικού οξέος στα θρεπτικά υποστρώματα (Leroux, 2007). Αν και στην περίπτωση του boscalid συνιστάται οι δοκιμές βλάστησης σπορίων να διεξάγονται σε υλικό YBA (περισσότερα στις Συντημήσεις-Επεξηγήσεις) από την επιτροπή διαχείρισης ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα (Fungicide Resistance Action Committee, FRAC), εντούτοις προβλήματα στην ανάπτυξη του μυκηλίου οδήγησαν στην επιλογή του MEA για τη μέθοδο της σημειακής εναπόθεσης σπορίων.

Στην περίπτωση των ανιλινοπυριμιδικών μυκητοκτόνων cyprodinil και pyrimethanil, τα επίπεδα διαχωρισμού της ευαισθησίας καθορίστηκαν κυρίως από τις δοκιμές μυκηλιακής ανάπτυξης. Η επιλογή υποστρώματος ανόργανων αλάτων κρίθηκε απαραίτητη για τη διεξαγωγή των βιοδοκιμών, εξαιτίας της ικανότητας του

παθογόνου να προσλαμβάνει θρεπτικά στοιχεία από σύνθετα οργανικά υποστρώματα, που δεν επιτρέπουν τον έλεγχο του τρόπου δράσης των μυκητοκτόνων αυτών *in vitro* (Leroux *et al.*, 2002). Μεταξύ των ανθεκτικών στελεχών διαπιστώθηκε μια μεγάλη διακύμανση στις τιμές  $EC_{50}$ . Ωστόσο, στη συγκέντρωση του  $1 \text{ mg L}^{-1}$  με cyprodinil ή pyrimethanil όλα αυτά τα στελέχη αναπτύχθηκαν σχεδόν κανονικά. Πολυετή πειράματα αγρού έδειξαν ότι η αυξημένη συχνότητα ανθεκτικών απομονώσεων με τιμές  $EC_{50} > 1 \text{ mg L}^{-1}$  τόσο για την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα όσο και για την ανάπτυξη του μυκηλίου φαίνεται να έχει αρνητική επίδραση στην αποτελεσματικότητα των ανιλνοπυριμιδικών μυκητοκτόνων (Baroffio *et al.*, 2003, Myresiotis *et al.*, 2007, Weber, 2011). Αντίθετα, η μείωση των επιπέδων ευαισθησίας από τους Chapeland *et al.* (1999), με ένα παράγοντα ανθεκτικότητας 1-4 στην επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα (φαινότυποι Ani<sup>R2</sup> και Ani<sup>R3</sup>), δεν επιδρά στην αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων κατά της ασθένειας στον αγρό. Οι Kretschmer *et al.* (2009) διαπίστωσαν ότι Ani<sup>R2</sup> και Ani<sup>R3</sup> είναι στην πραγματικότητα φαινότυποι πολλαπλής ανθεκτικότητας του *B. cinerea* (ονομάστηκαν MDR1 και MDR2, αντίστοιχα) και αντιμετωπίζονται στην πράξη πολύ αποτελεσματικά με εφαρμογή της μέγιστης συνιστώμενης δόσης των μυκητοκτόνων (Walker *et al.*, 2013).

Στο fludioxonil ανιχνεύθηκε μικρή μόνο μείωση της ευαισθησίας του *B. cinerea*. Τα μετρίως ανθεκτικά στο fludioxonil στελέχη είχαν μέσες τιμές  $EC_{50}$  για τη βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη του μυκηλίου  $0.31$  και  $0.16 \text{ mg L}^{-1}$ , αντίστοιχα. Παρόμοια μείωση της ευαισθησίας με ανάλογες τιμές  $EC_{50}$  ( $0.1-0.65 \text{ mg L}^{-1}$ ) για το fludioxonil έχει καταγραφεί στη Γερμανία και το Ισραήλ (Korolev *et al.*, 2011, Weber, 2011). Σ' αυτές τις δύο περιπτώσεις όπως και στην παρούσα μελέτη, η μέτρια ανθεκτικότητα στο fludioxonil συνδυαζόταν σχεδόν πάντα με υψηλή ανθεκτικότητα στο cyprodinil πιθανότατα εξαιτίας της εφαρμογής στην πράξη του αντίστοιχου μίγματος. Επιπλέον, όλες οι απομονώσεις που εμφάνισαν μειωμένη ευαισθησία στο fludioxonil βρέθηκαν να είναι και μετρίως ανθεκτικές στο iprodione, αν και παλαιότερα η ανθεκτικότητα εμφανιζόταν είτε στη μία είτε στην άλλη ομάδα μυκητοκτόνων (Hilber *et al.*, 1994). Μέχρι στιγμής πάντως δεν έχει αναφερθεί περίπτωση εμφάνισης στελεχών με υψηλή ανθεκτικότητα στο fludioxonil αν και τέτοια στελέχη μπορούν να δημιουργηθούν εύκολα *in vitro* (Leroux, 2007). Οι απομονώσεις αυτές που εντοπίστηκαν στο χώρο του θερμοκηπίου, κατά πάσα πιθανότητα, κατατάσσονται στους φαινότυπους πολλαπλής ανθεκτικότητας MDR (Kretschmer *et al.*, 2009, Mernke *et al.*, 2011).

Τα μυκητοκτόνα fluazinam και chlorothalonil εμφανίστηκαν ιδιαίτερα αποτελεσματικά κατά της βλάστησης των σπορίων σε όλες τις περιπτώσεις

απομονώσεων. Μάλιστα το fluazinam ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικό και κατά της μυκηλιακής ανάπτυξης σε πολύ πιο χαμηλές συγκεντρώσεις από αυτές κατά της βλάστησης των σπορίων. Η υψηλή τοξικότητα του fluazinam έχει καταγραφεί και σε άλλες μελέτες (Kalamarakis *et al.*, 2000, Leroux, 2007). Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι αν και το μυκητοκτόνο αυτό χρησιμοποιείται στην πράξη για 10ετίες, έχει καταγραφεί μόνο μία περίπτωση ανθεκτικότητας στην Ιαπωνία (Tamura, 2000).

Η δράση του chlorothalonil φαίνεται να περιορίζεται κυρίως στη βλάστηση των σπορίων (Leroux, 2007). Το μυκητοκτόνο αυτό χρησιμοποιείται για πολλές δεκαετίες κατά του βοτρώτη και πλήθος ερευνητών έχουν καταγράψει την αυξημένη δραστηριότητά του στη βλάστηση των σπορίων *in vitro* (Katan & Onadia, 1985, Slawewski *et al.*, 2002). Η μεγάλη παραλλακτικότητα που βρέθηκε στις δοκιμές της παρούσας εργασίας κατά της μυκηλιακής ανάπτυξης διαπιστώθηκε και από τους Zhang *et al.* (2009). Ωστόσο, εξαιτίας του κύριου τρόπου δράσης κατά της βλάστησης των σπορίων του πολυθεσικού αυτού μυκητοκτόνου, οι απομονώσεις θεωρήθηκαν ότι ανήκουν στην ίδια ομάδα ευαισθησίας στο chlorothalonil.

Από τα αποτελέσματα της ενότητας αυτής διαφάνηκε η ύπαρξη στελεχών με διακριτά επίπεδα ευαισθησίας του *B. cinerea* σε αρκετά μυκητοκτόνα που εφαρμόζονται σε καλλιέργειες κηπευτικών και όχι μόνο, την τελευταία δεκαετία στη χώρα μας. Ανθεκτικότητα στο fenhexamid και το fludioxonil διαπιστώθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα. Επιπλέον σε απομονώσεις του *B. cinerea* από καλλιέργειες μαρουλιού επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών σε μυκητοκτόνα των ομάδων QoIs, SDHIs και ανιλινοπυριμιδινικών που διαπιστώθηκαν σχετικά πρόσφατα και σε άλλες καλλιέργειες στην Ελλάδα (Myresiotis *et al.*, 2007, Bardas *et al.*, 2010). Ο καθορισμός των επιπέδων ευαισθησίας με τη μέθοδο της σημειακής εναπόθεσης σπορίων αποτελεί στη συνέχεια τη βάση ανίχνευσης ανθεκτικών απομονώσεων τόσο στον χώρο διεξαγωγής του πειράματος σε υδροπονική καλλιέργεια μαρουλιού όσο και σε καλλιέργειες της ευρύτερης επικράτειας.

**ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ ΣΕ ΥΔΡΟΠΟΝΙΚΗ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΑΡΟΥΛΙΟΥ (ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-  
ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ)**

---

## Εισαγωγή

Ο βοτρυτής είναι μια από τις σοβαρότερες ασθένειες των κηπευτικών που καλλιεργούνται σε συνθήκες θερμοκηπίου στην χώρα μας κατά την περίοδο του χειμώνα-αρχές της άνοιξης. Το παθογόνο αίτιο είναι ο μύκητας *Botrytis cinerea*, ένα κοινό σαπρόφυτο που αναπτύσσεται στα υπολείμματα της καλλιέργειας και σε άλλους ημιθανείς ή τραυματισμένους φυτικούς ιστούς. Σε υδροπονική καλλιέργεια μαρουλιού το παθογόνο προκαλεί δύο τύπους ασθένειας. Η πιο συνηθισμένη και περισσότερο σημαντική είναι η προσβολή του λαιμού των φυτών που έχει ως αποτέλεσμα τη σήψη της βάσεως του στελέχους και την αποκοπή της κεφαλής από το ριζικό σύστημα (Koike *et al.*, 2007). Η ασθένεια δύναται να εκδηλωθεί καθ' όλα τα στάδια ανάπτυξης των φυτών από τη μεταφύτευση μέχρι τη συγκομιδή. Ο δεύτερος, λιγότερο σημαντικός τύπος, παρουσιάζεται ως σήψη της κεφαλής και εμφανίζεται στις περιπτώσεις κακής διατροφής των φυτών με ασβέστιο. Η προσβολή ξεκινά από την καψαλισμένη (νεκρή) περιφέρεια των φύλλων όπου το παθογόνο αναπτύσσεται σαπροφυτικά και στη συνέχεια η προσβολή επεκτείνεται στους υγιείς ιστούς και καταλαμβάνει ολόκληρη την κεφαλή του φυτού (Παναγόπουλος, 2000). Η μορφή αυτή της προσβολής αντιμετωπίζεται με ρύθμιση του θρεπτικού διαλύματος και της συχνότητας άρδευσης για την κανονική τροφοδοσία των φυτών με ασβέστιο (Yunis *et al.*, 1990, Nicot & Baille, 1996, Resh, 2013).

Ο *B. cinerea* μαζί με τα *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia* spp. και *Pythium* spp. συγκαταλέγεται ανάμεσα στα κύρια παθογόνα που προκαλούν σήψη της βάσης του στελέχους σε φυτά μαρουλιού θερμοκηπιακής καλλιέργειας (Van Beneden *et al.*, 2009). Το υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας ωστόσο έχει μια ιδιομορφία· στερείται εδάφους, καθιστώντας αυτόματα το *B. cinerea* το πιο σημαντικό από αυτά τα παθογόνα. Σε σχέση με την κατάσταση στον αγρό, η επιδημιολογία είναι πιο προβλέψιμη και δεν εξαρτάται από τον καιρό στον ίδιο βαθμό. Επιπλέον, οι αυξημένες καλλιεργητικές φροντίδες και οι συνεχείς συγκομιδές επιβάλλουν την ύπαρξη αυξημένου αριθμού εργατών. Αυτό συνεπάγεται αύξηση των εστιών προσβολής και μεταφορά σπορίων του παθογόνου με το εργατικό δυναμικό (Parras, 2000). Η δυνατότητα ανάπτυξης υδροπονικών καλλιεργειών σε υποστρώματα πετροβάμβακα ή τύρφης προσδίδει επιπρόσθετα το πλεονέκτημα επέμβασης στην θρέψη των φυτών, επηρεάζοντας έμμεσα την ευπάθειά τους σε ασθένειες (Dik & Wubben, 2007).

Τα υδροπονικά θερμοκήπια είναι εξοπλισμένα με τεχνολογία ρύθμισης του μικροκλίματος μέσω συστημάτων αερισμού και θέρμανσης. Η προσβολή από βοτρυτή περιορίζεται σχεδόν αποκλειστικά στη βάση του στελέχους των

καλλιεργούμενων φυτών. Αν και οι ρυθμίσεις αυτές σε συνδυασμό με επιπρόσθετα καλλιεργητικά μέτρα συντελούν τα μέγιστα στον περιορισμό της πλεονάζουσας σχετικής υγρασίας, εντούτοις σε περιόδους έξαρσης της ασθένειας, σε καμία περίπτωση δεν επαρκούν για την αντιμετώπισή της. Η καταπολέμηση του βοτρώτη επιτυγχάνεται αποτελεσματικά κυρίως με την προληπτική χρήση μυκητοκτόνων με βοτρυδιοκτόνο δράση. Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα η προσβολή μπορεί να ξεκινήσει από το στάδιο ανάπτυξης των φυτών στο σπορείο και το παθογόνο μπορεί να συνεχίσει να αναπτύσσεται ενδοφυτικά χωρίς την εκδήλωση συμπτωμάτων (Sowley *et al.*, 2010).

Όπως αναφέρθηκε και στη γενική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, η αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων στον αγρό δύναται να μειωθεί σημαντικά εξαιτίας της ιδιότητας του παθογόνου να αναπτύσσει ανθεκτικότητα. Από τα αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας εξάλλου διαφάνηκε η ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου σε καλλιέργειες μαρουλιού. Ο κύριος σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν: α) η μελέτη της επιδημιολογίας της ασθένειας σε υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας μαρουλιού, β) η δυναμική του ανθεκτικού πληθυσμού του παθογόνου σε θερμοκηπιακά συστήματα καλλιέργειας, γ) η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας σύγχρονων βοτρυδιοκτόνων για την αντιμετώπιση της ασθένειας, δ) ο χρόνος και ο αριθμός εφαρμογής των χημικών επεμβάσεων και ε) ο έλεγχος ύπαρξης υπολειμμάτων μυκητοκτόνων κατά τη συγκομιδή στα διάφορα προγράμματα χημικών επεμβάσεων.

## Υλικά και μέθοδοι

Τα πειράματα διήρκεσαν τρεις καλλιεργητικές περιόδους (2009-2012) και διεξήχθησαν σε θερμοκήπιο υδροπονικής καλλιέργειας μαρουλιού τύπου NFT (Nutrient Film Technique) ιδιοκτησίας της εταιρείας Crocus Flora A.E. στην περιοχή Κρόκιου Αλμυρού (39°13'10" Β, 22°45'24" Α).

Κατά τη διάρκεια της 1<sup>ης</sup> καλλιεργητικής περιόδου (2009-2010) συγκεντρώθηκαν στοιχεία για το χρόνο εμφάνισης και εξέλιξης της ασθένειας και τη δυνατότητα χρησιμοποίησης ενός μυκητοκτόνου χωρίς εξειδικευμένο τρόπο δράσης, του chlorothalonil. Το μυκητοκτόνο αυτό επιλέχθηκε εξαιτίας του μικρού κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικότητας. Ελήφθησαν παρατηρήσεις σε δέκα ποικιλίες μαρουλιού ώστε να διαπιστωθεί ποιες εμφάνιζαν μεγαλύτερο βαθμό ανοχής στην ασθένεια και από πιο στάδιο ανάπτυξης των φυτών αρχίζει η προσβολή.

Κατά τις επόμενες δύο καλλιεργητικές περιόδους διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα σύγχρονων μυκητοκτόνων με διαφορετικό τρόπο δράσης σε



μια ποικιλία μαρουλιού σχετικώς ανθεκτική στην ασθένεια. Την καλλιεργητική περίοδο 2010-2011 έγιναν προγράμματα εφαρμογής δύο, τριών ή τεσσάρων επεμβάσεων με το ίδιο μυκητοκτόνο. Την 3<sup>η</sup> καλλιεργητική περίοδο (2011-2012) εφαρμόστηκαν προγράμματα εναλλαγής των χημικών επεμβάσεων. Μετά το πέρας του πειραματισμού τα φυτά καταστρέφονταν δια παραχώματος. Τα φυτά διατηρούνταν κατά μέσο όρο για 30-40 μέρες στο σπορείο και από 45-65 μέρες στο υδροπονικό σύστημα NFT ανάλογα την εποχή. Η αναφορά στα στάδια ανάπτυξης της καλλιέργειας γινόταν μέσω της κλίμακας Meier (2001) BBCH (Παράρτημα Ι).

#### Σπορά – Μεταφύτευση στο σύστημα NFT

Η σπορά των κουφετοποιημένων σπόρων γινόταν σε παλέτες πολυστυρενίου 66 θέσεων (5 x 5 cm) με τύρφη (Florland, Streichenberger) και ακολουθούσε επικάλυψη από ένα λεπτό στρώμα βερμικουλίτη (AGRA-RHP, Kausek GmbH). Οι παλέτες παρέμεναν σε ειδικό θάλαμο προβλάστησης σχετικής υγρασίας 100 % για τρεις μέρες έως ότου γίνει η βλάστηση των σπόρων. Στη συνέχεια τα σπορόφυτα μεταφέρονταν στο σπορείο όπου παρέμεναν μέχρι τη μεταφύτευση για περίπου 30 ημέρες (Εικόνα 17). Τα νεαρά φυτάρια αρδεύονταν όποτε κρίνονταν απαραίτητο (ανά 2-3 ημέρες), με λάστιχο πάνω στο οποίο είχε προσαρμοστεί κατάλληλο ακροφύσιο για ρύθμιση της πίεσης του νερού.

Στο στάδιο των πέντε πραγματικών φύλλων (BBCH-15) γινόταν η μεταφύτευση στο σύστημα NFT. Τα φυτά τοποθετούνταν σε 58 προαριθμημένες θέσεις κατά μήκος των υδρορροών σε αποστάσεις 18 cm. Τα τέσσερα πρώτα και τελευταία φυτά κάθε υδρορροής δεν προσμετρώνταν στις τελικές αξιολογήσεις. Το θρεπτικό διάλυμα άρδευσης των φυτών είχε την εξής σύνθεση ( $\text{mg L}^{-1}$ ): Ca=200, Mg=40, K=210, P ( $\text{PO}_4^{3-}$ )=50, N ( $\text{NH}_4^+$ )=25, N ( $\text{NO}_3^-$ )=165, Fe=5, Mn=0.5, Cu=0.1, Zn=0.1, B=0.5, Mo=0.05. Το pH και η ηλεκτρική αγωγιμότητα του θρεπτικού διαλύματος διατηρούνταν μεταξύ των τιμών 5.5-5.8 και 1.5-2.0 mS, αντίστοιχα (Resh, 2013). Η συχνότητα παροχής του θρεπτικού διαλύματος ήταν κάθε 15 λεπτά κατά τη διάρκεια της ημέρας.

#### Πειραματικός σχεδιασμός

Τα προγράμματα επεμβάσεων με μυκητοκτόνα στο υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας κατά τις τρεις καλλιεργητικές περιόδους (2009-2012), εφαρμόστηκαν σε πειραματικό 'αγρό' πλήρως τυχαιοποιημένων ομάδων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν για κάθε επέμβαση τρεις επαναλήψεις φυτών με 50 φυτά ανά επανάληψη (συνολικά 150 φυτά), τα οποία αναπτύσσονταν κατά μήκος των υδρορροών (Εικόνα 18). Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας γίνονταν

παρακολούθηση της εξέλιξης της ασθένειας με καταγραφή του αριθμού των φυτών που έφεραν συμπτώματα προσβολής από βοτρώτη στο λαιμό σε κάθε επέμβαση. Κατά τη διάρκεια του 1<sup>ου</sup> έτους πειραματισμού έγιναν συσχετίσεις της έναρξης της προσβολής με το στάδιο ανάπτυξης των φυτών και την εξέλιξη της ασθένειας προκειμένου να αναπτυχθεί μια γενική κλίμακα αξιολόγησης του ποσού της ασθένειας (ένταση της προσβολής).

Η ένταση της προσβολής Ε προσδιορίστηκε από το δείκτη του McKinney με βάση την κλίμακα 1 έως 5:

$$E = \frac{v_1M_1 + v_2M_2 + v_3M_3 + v_4M_4 + v_5M_5}{XN}$$

Ε η Ένταση της προσβολής

**v<sub>1</sub>, v<sub>2</sub>, v<sub>3</sub>, v<sub>4</sub>, v<sub>5</sub>: Αριθμός φυτών** που ανήκουν σε κάθε βαθμό της κλίμακας 1 έως 5 αντίστοιχα

**M: ΒΑΘΜΟΙ** (μέσοι όροι) που αντιστοιχούν σε % προσβολής του φυτού

**M<sub>1</sub>=0**

Όχι συμπτώματα

**M<sub>2</sub>=0.5**

Βαθμός 0-1 που αντιστοιχεί σε 0-10 % προσβολή

[Κίτρινα κάτω φύλλα-αρχικά συμπτώματα στο λαιμό σαν καστανή χαραγή, χωρίς καρποφορίες]

**M<sub>3</sub>= 3**

Βαθμός 1-5 που αντιστοιχεί σε 10-50 % προσβολή

[Φυτό ανεπτυγμένο-πιθανές καρποφορίες στα κατώτερα φύλλα ή στον λαιμό-προσβολή έως 50 % του λαιμού-κανονική συγκομιδή]

**M<sub>4</sub>=7**

Βαθμός 5-9 που αντιστοιχεί σε 50-90 % προσβολή

[Φυτό ανεπτυγμένο-εμφανείς ή όχι καρποφορίες στα κατώτερα φύλλα και στον λαιμό-προσβολή από 51 έως 90 % του λαιμού-το φυτό θα συμπεριληφθεί στη συγκομιδή]

**M<sub>5</sub>=9.5**

Βαθμός 9-10 που αντιστοιχεί σε 90-100 % προσβολή

[Φυτό κατεστραμμένο που δεν μπορεί να συγκομιστεί]

**N=v<sub>1</sub>+v<sub>2</sub>+v<sub>3</sub>+ v<sub>4</sub>+v<sub>5</sub>: Συνολικός αριθμός φυτών**

**X=10.** Υψηλότερη τιμή της κλίμακας

Στην αξιολόγηση της έντασης προσβολής δεν συμπεριλαμβάνονταν υγιή φυτά τα οποία δεν είχαν το κατάλληλο βάρος των 170 g και δεν συγκομίζονταν.

Η ένταση της προσβολής καταγράφονταν σε εβδομαδιαία διαστήματα μετά τη μεταφύτευση κατά τη διάρκεια του 2<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> έτους πειραματισμού. Ο τελικός προσδιορισμός του αριθμού των φυτών που εμφάνιζαν συμπτώματα προσβολής (συχνότητα προσβολής), της σοβαρότητας της προσβολής (ένταση) και της απόδοσης (βάρος/φυτό) των εμπορεύσιμων και μη εμπορεύσιμων φυτών γινόταν κατά τη συγκομιδή. Εμπορεύσιμα φυτά θεωρήθηκαν εκείνα τα οποία είχαν ως ελάχιστο βάρος 170 g σύμφωνα με τις απαιτήσεις της αγοράς.

Κατά τη συγκομιδή, γινόταν έλεγχος των υπολειμμάτων μυκητοκτόνων σε κάθε μεταχείριση. Για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων μυκητοκτόνων συλλέγονταν τυχαίο δείγμα 3 φυτών από κάθε χημική επέμβαση. Ο έλεγχος των υπολειμμάτων έλαβε χώρα στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο και στο διαπιστευμένο Εργαστήριο Cadmion<sup>1</sup>.

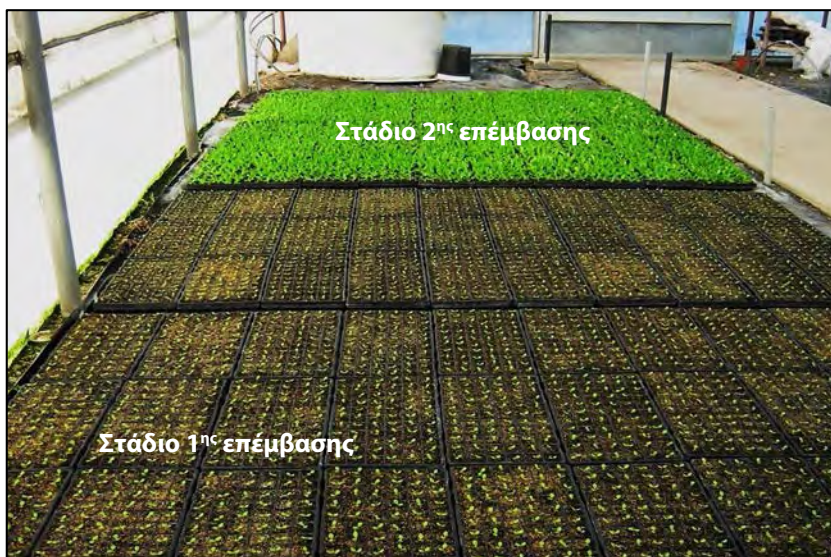
Μεταχειρίσεις καλλιεργητικής περιόδου 2009-2010 (Προκαταρκτικά πειράματα)

Κατά τη διάρκεια του 1<sup>ου</sup> έτους πειραματισμού ελήφθησαν παρατηρήσεις για την εξέλιξη της ασθένειας με καταγραφή του αριθμού των φυτών δέκα διαφορετικών ποικιλιών μαρουλιού με συμπτώματα προσβολής από βοτρυτή στο λαιμό (Διάγραμμα 3 - Αποτελέσματα). Οι ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: Alexandria, Arcadia, Cambria, Flandria, Leandra, Lobi, Mistaka, Penelope, Rosetta και Zendria. Για την αντιμετώπιση της ασθένειας έγιναν ψεκασμοί σε 150 φυτά μαρουλιού (50 φυτά \* 3 επαναλήψεις) από κάθε ποικιλία με το μυκητοκτόνο chlorothalonil (Daconil 500 SC, Syngenta) στη συγκέντρωση 2.5 ml L<sup>-1</sup> (δόση συνιστώμενη από τον παρασκευαστή). Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των χημικών επεμβάσεων έγινε συνολικά για όλες τις ποικιλίες μαρουλιού.

Στο διάστημα από 24/10/2009 έως 17/02/2010 εφαρμόζονταν τρία διαφορετικά προγράμματα επεμβάσεων: α) Δύο ψεκασμοί στα στάδια του ενός και των τεσσάρων πραγματικών φύλλων (BBCH-11 και BBCH-14) στο σπορείο (Εικόνα 17), β) Δύο ψεκασμοί στο σπορείο (στάδια BBCH-11 και BBCH-14) και ένας αμέσως μετά τη μεταφύτευση στο σύστημα NFT στο στάδιο των επτά πραγματικών φύλλων (BBCH-17), γ) δύο ψεκασμοί στο σπορείο (στάδια BBCH-11 και BBCH-14) και δύο μετά τη μεταφύτευση στα στάδια των επτά και των εννέα πραγματικών φύλλων (BBCH-17 και BBCH-19, Εικόνα 18).

---

<sup>1</sup> Εθνικής Αντιστάσεως 153, TK 202 00, Κιάτο Κορινθίας



**Εικόνα 17.** Επεμβάσεις στο στάδιο ανάπτυξης των φυτών στο σπορείο. Σε όλες τις περιπτώσεις οι ψεκασμοί με μυκητοκτόνα έγιναν στα στάδια του ενός και των τεσσάρων πραγματικών φύλλων (BBCH-11 και BBCH-14).



**Εικόνα 18.** Διάταξη φυτών με αριθμημένες θέσεις του πειραματικού 'αγρού' στο υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας. Κάθε υδρορροή αφορά και μια διαφορετική επέμβαση. Σε κάθε επέμβαση έγιναν 3 επαναλήψεις με 50 φυτά/επανάληψη. Ο 3<sup>ος</sup> ή/και ο 4<sup>ος</sup> ψεκασμός διεξήχθησαν στα στάδια των επτά και εννέα πραγματικών φύλλων (BBCH-17 και BBCH-19).

Τα διαστήματα μεταξύ των επεμβάσεων ήταν 10 έως 20 μέρες και η τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή ήταν 39 μέχρι 55 μέρες (εφαρμογή των προγραμμάτων  $\gamma$  ή  $\beta$  αντίστοιχα). Οι ψεκασμοί διεξήχθησαν με χειροκίνητους ψεκαστήρες όγκου 1.5 L. Για να αποφευχθεί η επιμόλυνση των γειτονικών πειραματικών τεμαχίων κατά τους ψεκασμούς, χρησιμοποιούνταν προστατευτικό πλαστικό πλαίσιο (100 x 50 cm). Αψέκαστα με μυκητοκτόνο φυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Στο πλαίσιο των εβδομαδιαίων αξιολογήσεων εξέλιξης της ασθένειας κάθε φυτό ελέγχονταν περιμετρικά στη βάση του λαιμού. Η επιβεβαίωση της προσβολής από το *B. cinerea* στις περιπτώσεις όπου δεν εμφανιζόταν η τυπική επάνθηση, γινόταν με απομόνωση του παθογόνου όπως περιγράφηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο.

Μεταχειρίσεις καλλιεργητικής περιόδου 2010-2011 (2<sup>ο</sup> έτος πειραματισμού)

Τα προγράμματα επεμβάσεων της 2<sup>ης</sup> καλλιεργητικής περιόδου διεξήχθησαν σε κεφαλωτό μαρούλι (butterhead) ποικιλίας Penelope (Rijk Zwaan, De Lier) το οποίο εμφάνισε την λιγότερο συχνή προσβολή από βοτρυτή κατά το 1<sup>ο</sup> έτος πειραματισμού. Η σπορά έγινε στις 8 Νοεμβρίου 2010 και η μεταφύτευση στο υδροπονικό σύστημα στις 7 Δεκεμβρίου 2010 στο στάδιο των πέντε πραγματικών φύλλων (BBCH-15). Η συγκομιδή των φυτών έγινε στις 24 Ιανουαρίου 2011.

Για την αντιμετώπιση της ασθένειας χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικού τρόπου δράσης μυκητοκτόνα με τη μορφή των εμπορικών σκευασμάτων ήτοι: fenhexamid ως Teldor 50 WG (Bayer CropScience), chlorothalonil ως Daconil 500 SC (Syngenta Ltd.), boscalid+pyraclostrobin ως Signum 26,7/6,7 WG (BASF SE), fludioxonil+cyprodinil ως Switch 25/37,5 WG (Syngenta Crop Protection AG) και fluazinam ως Ohayo 50 SC (ISK Biosciences Europe S.A). Οι ψεκασμοί διεξάγονταν με κάθε σκεύασμα ξεχωριστά σε κάθε πειραματικό τεμάχιο των δύο, τριών ή τεσσάρων επεμβάσεων (Εικόνες 17 & 18). Οι δοσολογίες που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον Πίνακα 7. Το fluazinam στη δοσολογία του 1.5 ml L<sup>-1</sup> κατά το στάδιο του ενός πραγματικού φύλλου (BBCH-11) στο σπορείο προκάλεσε συμπτώματα φυτοτοξικότητας στα φυτά.

Μεταχειρίσεις καλλιεργητικής περιόδου 2011-2012 (3<sup>ο</sup> έτος πειραματισμού)

Σύμφωνα με το πρότυπο των μεταχειρίσεων που περιγράφηκε προηγουμένως (2<sup>ο</sup> έτος πειραματισμού), η σπορά διεξήχθη στις 17 Οκτωβρίου 2011 και η μεταφύτευση έγινε στις 23 Νοεμβρίου 2011. Στο στάδιο του σπορείου στα φυτά

εφαρμόστηκαν 2 ψεκασμοί στις 27 Οκτωβρίου και στις 17 Νοεμβρίου 2011 είτε με το μίγμα azoxystrobin+chlorothalonil είτε με το fludioxonil+cyprodinil, αντίστοιχα. Μετά τη μεταφύτευση (23 Νοεμβρίου 2011) το μυκητοκτόνο fenhexamid καθώς και τα μίγματα μυκητοκτόνων azoxystrobin+chlorothalonil, boscalid+pyraclostrobin και fludioxonil+cyprodinil εφαρμόστηκαν μία (6 Δεκεμβρίου 2011) ή δυο φορές (6 και 30 Δεκεμβρίου 2011) με εναλλαγή. Η συγκομιδή έγινε στις 27 Ιανουαρίου 2012. Στο 3<sup>ο</sup> έτος πειραματισμού αντί του chlorothalonil (Daconil 500SC) χρησιμοποιήθηκε το μίγμα chlorothalonil+azoxystrobin (Ortiva opti 8/40SC, Syngenta Ltd.) εξαιτίας της απόσυρσης του πρώτου σκευάσματος. Επίσης το fludioxonil+cyprodinil χρησιμοποιήθηκε στη μισή δοσολογία το έτος αυτό μετά από προβλήματα ορμονικής διαταραχής που παρατηρήθηκαν στην ανάπτυξη των φυτών κατά την προηγούμενη καλλιεργητική περίοδο (2010-2011). Για την αποφυγή αλλοίωσης των αποτελεσμάτων του πειράματος λόγω της εμφάνισης προσβολής από θρίπα (*Frankliniella occidentalis*), έγινε γενικός ψεκασμός των φυτών του πειραματικού αγρού με dimethoate (1 ml L<sup>-1</sup> Dimethoate, ΑΛΦΑ Γεωργικά Εφόδια ΑΕΒΕ) στο στάδιο της μεταφύτευσης.

---

Κατά τη συγκομιδή των δύο τελευταίων ετών πειραματισμού, φυτά τα οποία εμφάνιζαν συμπτώματα προσβολής από βοτρώτη μεταφέρθηκαν σε χωριστές πλαστικές σακούλες πολυαιθυλενίου στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας. Το παθογόνο απομονώθηκε απευθείας από τα προσβεβλημένα φυτά κατά τρόπο που περιγράφηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο. Με εφαρμογή της μεθόδου της σημειακής εναπόθεσης σπορίων καθορίστηκε ο φαινότυπος κάθε απομόνωσης με βάση την ευαισθησία (συγκέντρωση διαχωρισμού) στα παρακάτω μυκητοκτόνα: fenhexamid, azoxystrobin, pyraclostrobin, boscalid, cyprodinil, fludioxonil, fluazinam, chlorothalonil, carbendazim και iprodione<sup>2</sup>.

Καταγραφή δεδομένων μικροκλίματος

Για την καταγραφή των συνθηκών θερμοκρασίας, υγρασίας καθώς και της διύγρυνσης στη φυλλική επιφάνεια χρησιμοποιήθηκε ο αισθητήρας επιφανειακής υγρασίας SKLW 1900 (Skye Instruments Ltd). Η συσκευή (Εικόνα 19) τοποθετήθηκε στη μέση του πειραματικού αγρού και ρυθμίστηκε έτσι ώστε να καταγράφει τις ενδείξεις κάθε μια ώρα. Ο αισθητήρας ήταν συνδεδεμένος με την συσκευή

---

<sup>2</sup> Για τον καθορισμό των επιπέδων ευαισθησίας στο carbendazim και στο iprodione χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 1 και 100 mg L<sup>-1</sup> και 3 και 10 mg L<sup>-1</sup> αντίστοιχα, σύμφωνα με τον Pappas (1997)

καταγραφής ενδείξεων SDL 2500 DataHog data logger η οποία συνδεόταν απευθείας με ηλεκτρονικό υπολογιστή για την τελική μεταφορά των δεδομένων. Το σύστημα καταγραφής μικροκλίματος τοποθετήθηκε στο υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας την ημέρα της μεταφύτευσης και κατέγραφε δεδομένα μέχρι τη συγκομιδή, κατά τις καλλιεργητικές περιόδους 2010-2011 και 2011-2012.



**Εικόνα 19.** Ο αισθητήρας επιφανειακής υγρασίας SKLW 1900 (Skye Instruments Ltd.) χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή των κλιματικών παραμέτρων στο χώρο του θερμοκηπίου.

Έλεγχος εναερίου μολύσματος και καταγραφή ανθεκτικού πληθυσμού

Για να διαπιστωθεί η ποσότητα του εναερίου μολύσματος και η επίδραση αυτής στην εξέλιξη της ασθένειας γινόταν καταγραφή της συγκέντρωσης των κονιδίων του *B. cinerea* στην ατμόσφαιρα του θερμοκηπίου κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Για τη μέτρηση του εναερίου μολύσματος χρησιμοποιήθηκαν ογκομετρικοί δειγματολήπτες αέρα και κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για την παγίδευση του παθογόνου. Κατά τη διάρκεια του 1<sup>ου</sup> έτους πειραματισμού, όταν διεξάγονταν τα προκαταρκτικά πειράματα στο θερμοκήπιο, έγιναν δοκιμές για την επιλογή ενός εκλεκτικού υποστρώματος, κατάλληλου για την αρίθμηση των μολυσματικών μονάδων του παθογόνου. Αυτό που τελικά επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ήταν το θρεπτικό υπόστρωμα των Edwards & Seddon (2001), ελαφρώς τροποποιημένο (Πίνακας 5).

**Πίνακας 5.** Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για την παγίδευση και καταγραφή του εναερίου μολύσματος του *B. cinerea*

<b>Συστατικά σε 1 L απιονισμένο – απεσταγμένο H<sub>2</sub>O</b>			
<b>Άλατα</b>		<b>Δραστικές ουσίες</b>	
NaNO <sub>3</sub>	0.10g	pentachloronitrobenzene (PCNB, Sigma-Aldrich)	0.020g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.13g	mancozeb (Mancoplus 80 WP, Dow Agrosiences LLC)	0.020g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.20g	fenarimol (Rimidin 6WP, Dow Elanco)	0.020g
KCl	0.10g	chloramphenicol (Serva)	0.020g
Μέσο οξειδωσης : ταννικό οξύ (tannic acid, Applichem)			5g
Πηγή ενέργειας : σακχαρόζη (sucrose, Sigma-Aldrich)			2g
Στερεοποιητής : άγαρ (agar for Microbiology, Sigma-Aldrich)			20g
Ρυθμιστικό διάλυμα : NaOH			1mol
<b>Παρασκευή</b>			
Σε κωνική φιάλη τύπου Erlenmeyer χωρητικότητας 2 L προστίθεται 1 L απιονισμένου-απεσταγμένου H <sub>2</sub> O και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Προηγουμένως αφαιρείται μια μικρή ποσότητα από το H <sub>2</sub> O για τη διάλυση όλων των αλάτων σε ένα μικρό ποτήρι ζέσεως και στη συνέχεια το σχηματιζόμενο διάλυμα επανατοποθετείται στην κωνική φιάλη για τη συμπλήρωση του τελικού όγκου του 1 L.			
Κατά τον ίδιο τρόπο διαλύονται στη συνέχεια οι δραστικές ουσίες (όλες μαζί) και μετέπειτα η σακχαρόζη και το ταννικό οξύ. Η οξείδωση του ταννικού οξέος, κατά την ανάπτυξη του παθογόνου, παράγει μία καστανή άλω η οποία χρησιμεύει στον εντοπισμό των μολυσματικών μονάδων.			
Πριν την προσθήκη του άγαρ το pH ρυθμιζόταν στο 4.5 με ρυθμιστικό διάλυμα NaOH συγκέντρωσης 1 mol L <sup>-1</sup> . Η μέτρηση του pH γινόταν με pH-μετρο ή με pH-μετρικές ταινίες.			
Μόλις το μίγμα άρχιζε να βράζει απομακρύνεται από το μέσο θέρμανσης και αφήνεται να ψυχθεί μέχρι τους 45°C περίπου. Στην συνέχεια τοποθετείται σε κατάλληλα τριβλία Petri (Ø9cm).			
Το εκλεκτικό θρεπτικό μέσο δεν χρειάζεται αποστείρωση και μπορεί να διατηρηθεί στο ψυγείο μέχρι 2 εβδομάδες χωρίς να υποστεί αλλοίωση και απώλεια της εκλεκτικής του ιδιότητας.			



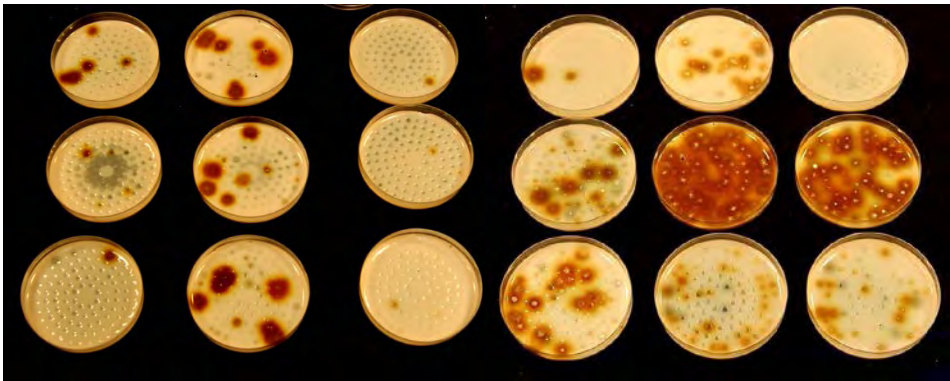
Τα τριβλία με το εκλεκτικό υπόστρωμα τοποθετούνταν σε κατάλληλους ογκομετρικούς δειγματολήπτες αέρα (Burkard Manufacturing Co. Ltd.) σχεδιασμένους για τριβλία Petri (Εικόνα 20). Οι δειγματολήπτες λειτουργούσαν με ρυθμό εισαγωγής αέρα  $0.02 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$  και τοποθετούνταν κατά τις μεσημεριανές ώρες, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η παγίδευση ικανοποιητικού αριθμού μολυσματικών μονάδων (Elad & Shtienberg, 1995). Οι παγίδες τοποθετούνταν σε εβδομαδιαία διαστήματα από τη μεταφύτευση έως τη συγκομιδή. Κάθε φορά χρησιμοποιούνταν συνολικά τρεις παγίδες: δύο στις άκρες και μία στο μέσο του πειραματικού αγρού με χρόνο έκθεσης 60 λεπτά. Με το πέρας της ώρας λειτουργίας τα τριβλία παγίδευσης τοποθετούνταν καλυμμένα σε επωαστικό θάλαμο  $20^\circ\text{C}$ . Μετά από επώαση έξι ημερών γινόταν καταγραφή του αριθμού των μολυσματικών μονάδων (Εικόνα 21).



**Εικόνα 20.** Ογκομετρικός δειγματολήπτης αέρα (Burkard Manufacturing Co. Ltd.) που στο επάνω πεπλατυσμένο μέρος εμπεριέχεται τριβλίο Petri με εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για παγίδευση μολυσματικών μονάδων του *B. cinerea*.

Την καλλιεργητική περίοδο πειρατισμού 2010-2011 οι παγίδες χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά για την ποσοτική καταγραφή του εναέριου πληθυσμού του παθογόνου. Την καλλιεργητική περίοδο πειρατισμού 2011-2012 έγινε πέραν της ποσοτικής και ποιοτική καταγραφή του εναέριου πληθυσμού του παθογόνου όσον αφορά την ανθεκτικότητα σε διάφορα μυκητοκτόνα. Για το σκοπό

αυτό χρησιμοποιήθηκε το ως άνω εκλεκτικό υλικό παγίδευσης εμπλουτισμένο για κάθε περίπτωση με την ενδεδειγμένη συγκέντρωση μυκητοκτόνου για τον εντοπισμό ανθεκτικών στελεχών (έγινε αναφορά σε προηγούμενο κεφάλαιο), ήτοι:  $1 \text{ mg L}^{-1}$  fenhexamid,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  pyraclostrobin +  $100 \text{ mg L}^{-1}$  SHAM,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  boscalid,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  cyprodinil,  $1 \text{ mg L}^{-1}$  fludioxonil<sup>3</sup> και  $3 \text{ mg L}^{-1}$  iprodione συμπεριλαμβάνονταν σε κάθε τριβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα για τον απευθείας έλεγχο του ανθεκτικού εναέριου πληθυσμού του παθογόνου. Στα εμπλουτισμένα με μυκητοκτόνα τριβλία αναπτύσσονταν οι ανθεκτικές μόνο μολυσματικές μονάδες, ενώ τριβλία χωρίς μυκητοκτόνο χρησίμευαν ως μάρτυρες (αναπτύσσονταν και τα ευαίσθητα και τα ανθεκτικά στελέχη).



**Εικόνα 21.** Καταγραφή των εναέριων μολυσματικών μονάδων του *B. cinerea* κατόπιν παγίδευσης σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα. Η αρίθμηση κατέστη δυνατή μακροσκοπικά λόγω της εμφάνισης καστανής άλω γύρο από κάθε μολυσματική μονάδα του παθογόνου.

Από κάθε αποικία που σχηματίζονταν στις παγίδες με το εκλεκτικό υπόστρωμα, γίνονταν απομόνωση του παθογόνου με απευθείας μεταφορά σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες με MEA και στη συνέχεια ακολουθούσε χαρακτηρισμός της ευαισθησίας σε όλα τα υπόλοιπα μυκητοκτόνα με τη μέθοδο της σημειακής εναπόθεσης σπορίων.

### Στατιστική ανάλυση

Για την εύρεση διαφορών μεταξύ των μέσων όρων των τιμών της έντασης και της συχνότητας προσβολής εφαρμόστηκε η παραμετρική δοκιμή ανάλυσης της

<sup>3</sup> Στα μυκητοκτόνα cyprodinil και fludioxonil χρησιμοποιήθηκαν οι 10πλάσιες συγκεντρώσεις από τις κανονικές δόσεις διαχωρισμού των επιπέδων ευαισθησίας εξαιτίας της αλληλεπίδρασης με το υλικό

διακύμανσης (one-way ANOVA) σε συνδυασμό με τη δοκιμή Duncan (Duncan's multiple range test). Η μεθοδολογία αυτή επιλέχθηκε αφότου διαπιστώθηκε: α) ότι τα δεδομένα ακολουθούσαν κανονική κατανομή (δοκιμή Kolmogorov-Smirnov) και β) ότι οι διακυμάνσεις ανάμεσα στις ομάδες των τιμών είναι ισοδύναμες (δοκιμή του Levene) σύμφωνα με τον Zar (2010). Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πακέτο SPSS (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0).

## Αποτελέσματα

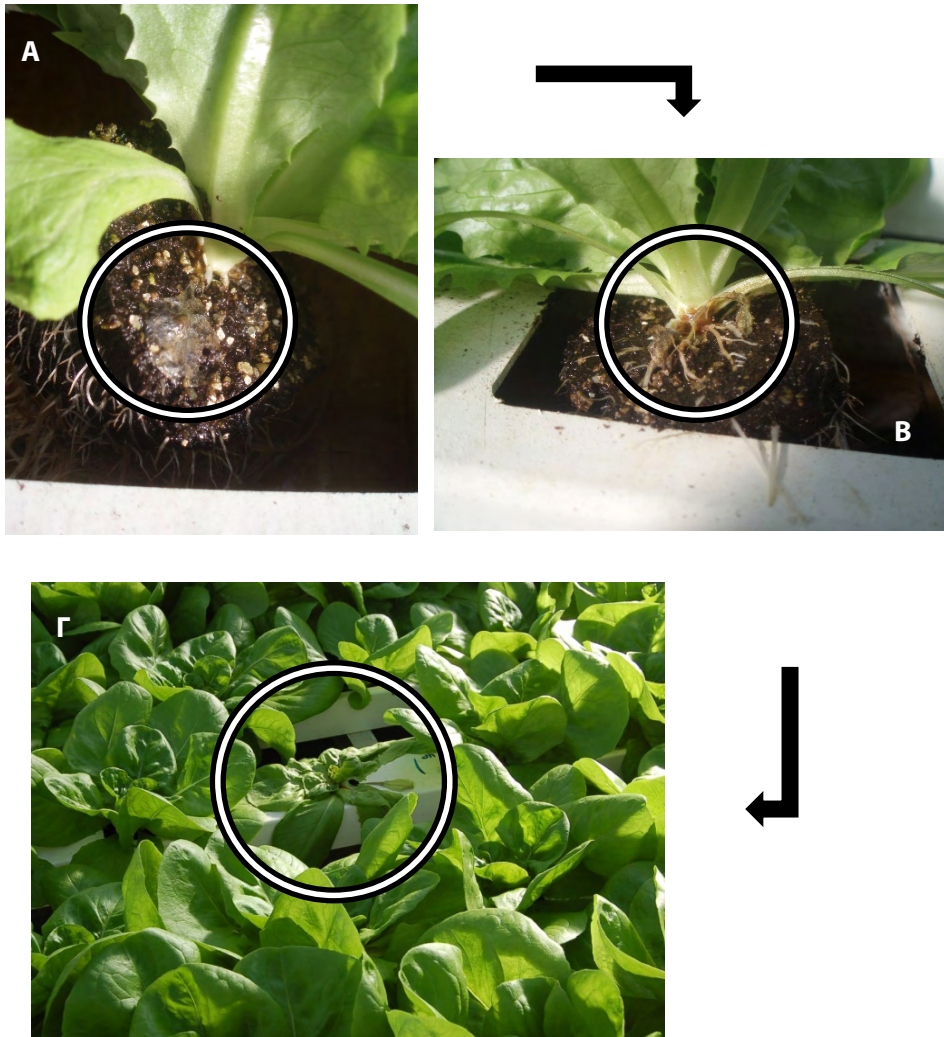
Καλλιεργητική περίοδος 2009-2010

### **Παθογένεση – Συμπτωματολογία – Αξιολόγηση ευπάθειας ποικιλιών**

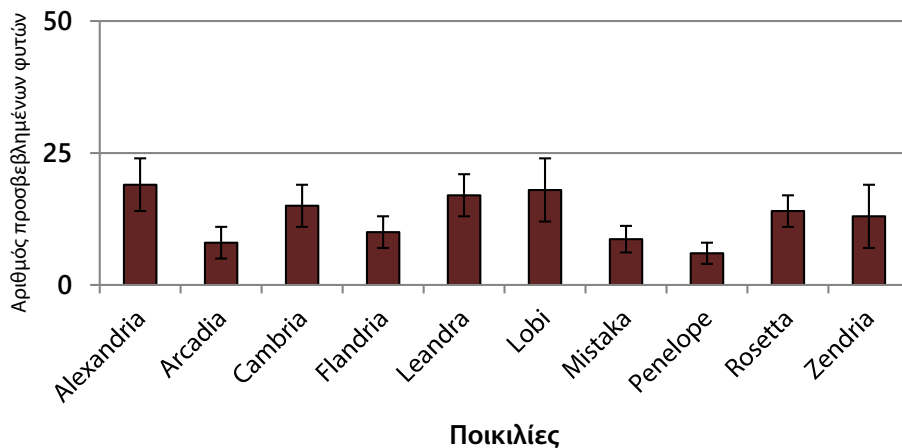
Στα φυτά του μάρτυρα σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι τα αρχικά συμπτώματα προσβολής εμφανίστηκαν περίπου τρεις εβδομάδες από τη μεταφύτευση στο στάδιο των 13 πραγματικών φύλλων (BBCH 19). Στις περισσότερες των περιπτώσεων το παθογόνο εισερχόταν στο εσωτερικό των φυτών για να προκαλέσει μόλυνση από τις γηρασμένες κοτυληδόνες ή τα φύλλα της βάσης (Εικόνα 22A). Επειδή σε κάθε πειραματικό τεμάχιο λαμβάνονταν όλα εκείνα τα καλλιεργητικά μέτρα που αποσκοπούσαν στην προστασία των φυτών από την ασθένεια, γενικά η προσβολή δεν ήταν σοβαρή. Από τη στιγμή που το παθογόνο εισέρχεται στο λαιμό του φυτού σε μικρό στάδιο ανάπτυξης (<BBCH-17), η προσβολή εξελίσσεται ταχύτατα και εντός 10 ημερών το αργότερο το φυτό καταστρέφεται ολοσχερώς (Εικόνες 22B & Γ). Οι τραυματισμοί των φυτών κατά τις μεταχειρίσεις της μεταφύτευσης επιτάχυναν τη διαδικασία της παθογένεσης. Όταν η μόλυνση των φυτών γινόταν σε μεγαλύτερο στάδιο ανάπτυξης (BBCH-19), η πάχυνση του λαιμού αποτελούσε εμπόδιο στη γρήγορη εξέλιξη της μόλυνσης.

Οι ποικιλίες μαρουλιού που χρησιμοποιήθηκαν εμφάνισαν διαφορετικά επίπεδα αντοχής στην ασθένεια. Όλες οι ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση ήταν κεφαλωτού τύπου 'butterhead' (γαλλικής σαλάτας) εκτός από τη Lobi η οποία ήταν τύπου 'looseleaf'. Η ποικιλία αυτή με κατσαρό, χαλαρό φύλλωμα εμφάνιζε εντονότερα συμπτώματα προσβολής. Ανάμεσα στις ποικιλίες οι οποίες εμφάνιζαν χαμηλότερη συχνότητα προσβολής ήταν η Penelope (12 %), η Arcadia (15 %) και η Mistaka (19 %). Οι ποικιλίες Alexandria, Cambria, Leandra, Lobi, Rosetta και Zendria εμφάνισαν συχνότητα προσβολής στα φυτά του μάρτυρα σε ποσοστά από 30 έως 40 % (Διάγραμμα 3). Γενικά όμως πρέπει να επισημανθεί ότι κατά τη συγκομιδή τα συμπτώματα προσβολής του λαιμού στα περισσότερα φυτά

βρισκόταν σε αρχικά στάδια χωρίς να επιφέρουν σημαντική μείωση της ποσότητας και της ποιότητας της παραγωγής.



**Εικόνα 22.** Έναρξη και εξέλιξη της ασθένειας **A.** Τα σπόρια του παθογόνου μόλυναν τα γηρασμένα κάτω φύλλα του φυτού και στη συνέχεια η προσβολή επεκτείνεται στο λαιμό από το σημείο πρόσφυσης του μίσχου. **B.** Αρχικά συμπτώματα σήψης του λαιμού. **Γ.** Ολοσχερής καταστροφή φυτού.



**Διάγραμμα 3.** Συχνότητα προσβολής από βοτρώτη 10 διαφορετικών ποικιλιών μαρουλιού στο διάστημα από 24/10 έως 17/02 της καλλιεργητικής περιόδου 2009-2010. Η ποικιλία μαρουλιού (τύπου γαλλικής σαλάτας) που εμφανίστηκε λιγότερο ευπαθής ήταν η Penelope και στο πλαίσιο της ολοκληρωμένης καταπολέμησης επιλέχτηκε για την περαιτέρω διεξαγωγή πειραμάτων αντιμετώπισης της ασθένειας.

### Χημική καταπολέμηση

Σε όλα τα προγράμματα επεμβάσεων το ποσοστό των προσβεβλημένων φυτών δεν ξεπερνούσε το 30 % των φυτών του αφέκαστου μάρτυρα. Λόγω της έλλειψης σημαντικών διαφορών μεταξύ των ποικιλιών η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των χημικών επεμβάσεων έγινε για το σύνολο των ποικιλιών (Πίνακας 6). Ο αριθμός των προσβεβλημένων φυτών και στα τρία προγράμματα επεμβάσεων κυμάνθηκε από ένα έως επτά επί συνόλου 50 φυτών σε κάθε μεταχείριση. Η συχνότητα της προσβολής ήταν ελαφρώς αυξημένη όταν εφαρμόστηκαν μόνο δυο επεμβάσεις με chlorothalonil στο σπορείο. Μεταξύ των τριών προγραμμάτων χημικών επεμβάσεων δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στο επίπεδο προσβολής. Αν και οι επεμβάσεις με chlorothalonil περιόρισαν σημαντικά την ασθένεια σε σχέση με το μάρτυρα, οι ψεκασμοί που έγιναν μετά τη μεταφύτευση, άφησαν υπολείμματα στα συγκομιζόμενα φυτά, που ξεπερνούσαν το ανώτατο επιτρεπτό όριο. Αντίθετα όταν έγιναν μόνο δύο ψεκασμοί στο σπορείο τα υπολείμματα ήταν κάτω από το όριο αναφοράς (RL)  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  (Πίνακας 6).

**Πίνακας 6.** Αποτελεσματικότητα επεμβάσεων με chlorothalonil (0.1%) εναντίον του βοτρώτη σε 10 διαφορετικές ποικιλίες μαρουλιού και υπολείμματα μυκητοκτόνου κατά την συγκομιδή.

Στάδιο επέμβασης	Αριθμός επεμβάσεων (Τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή <sup>1</sup> )	Προσβεβλημένα φυτά	Υπολείμματα μυκητοκτόνου (mg Kg <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>
Σπορείο	2 (55)	3.7±3.2a <sup>3</sup>	< RL
Σπορείο + Μεταφύτευση	2 + 1 (46)	3.1±1.9a	0.49±0.016
Σπορείο + Μεταφύτευση	2 + 2 (39)	2.8±2.1a	0.66±0.091
Μάρτυρας	0	14.7±4.2b	-

<sup>1</sup>Σε μέρες.

<sup>2</sup>Τα μέγιστα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων (MRLs) για το chlorothalonil όπως έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση με την οδηγία 396/2005 είναι 0.01 mg Kg<sup>-1</sup> (RL).

<sup>3</sup>Τιμές που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα στις στήλες διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο 0.05 % σύμφωνα με τη δοκιμή Duncan.

Καλλιεργητική περίοδος 2010-2011

### Παθογένεση – Συμπτωματολογία – Επιδημιολογία

Κατά τη 2<sup>η</sup> καλλιεργητική περίοδο τα αρχικά συμπτώματα προσβολής στα φυτά του μάρτυρα εμφανίστηκαν την 3<sup>η</sup> εβδομάδα από τη μεταφύτευση (30 Δεκεμβρίου 2010). Όμως από τη 2<sup>η</sup> εβδομάδα είχαν αρχίσει ήδη να εμφανίζονται μικρές δυσδιάκριτες καστανές κηλίδες στο σημείο πρόσφυσης του μίσχου των κοτυληδόνων στο λαιμό του φυτού (Διάγραμμα 4). Η ασθένεια δεν εμφανίστηκε ιδιαίτερα σοβαρή (ένταση προσβολής 0.157) όμως πάνω από το 50 % των φυτών εμφάνισαν συμπτώματα προσβολής. Σε κάθε επανάληψη 3 με 4 φυτά είχαν καταστραφεί ολοσχερώς πριν το στάδιο της συγκομιδής, ενώ 3 με 4 φυτά ήταν σοβαρά προσβεβλημένα κατά την τελική αξιολόγηση (βαθμός 5-9 της κλίμακας). Τα περισσότερα φυτά (14-17) αν και ήταν ελαφρώς προσβεβλημένα (βαθμός 1-5 της κλίμακας) πληρούσαν τις ποιοτικές και ποσοτικές απαιτήσεις κατά τη συγκομιδή.

Η πρώτη προσβολή παρατηρήθηκε μετά από μια εβδομάδα αυξημένης διύγρανσης της επιφάνειας των φύλλων. Την ίδια περίοδο η σχετική υγρασία της ατμόσφαιρας παρουσίασε τιμές >80 %. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρατηρούνταν ταυτόχρονες διακυμάνσεις των δύο αυτών μεταβλητών, δηλαδή της σχετικής υγρασίας και της διύγρανσης των φύλλων (Διάγραμμα 4). Οι αυξημένες τιμές σχετικής υγρασίας και διύγρανσης των φύλλων σημειώθηκαν για

παρατεταμένα χρονικά διαστήματα. Στις 14 και 30 Ιανουαρίου η αύξηση της σχετικής υγρασίας συνέπεσε και με τον υπερδιπλασιασμό της συγκέντρωσης των μολυσματικών μονάδων στην ατμόσφαιρα του θερμοκηπίου. Η μέση θερμοκρασία την περίοδο αυτή δεν παρουσίασε μεγάλες διακυμάνσεις (12-13 °C), εκτός από ελάχιστες περιπτώσεις, κυρίως πριν την 17<sup>η</sup> Δεκεμβρίου (Διάγραμμα 4).

### **Χημική καταπολέμηση**

Όλα τα προγράμματα επεμβάσεων έδωσαν ικανοποιητική καταπολέμηση της ασθένειας με σημαντική διαφορά από εκείνη του μάρτυρα. Το μίγμα fludioxonil+cyprodinil ήταν το πιο αποτελεσματικό, διατηρώντας τα επίπεδα της προσβολής σε μηδενικό επίπεδο, ακόμα και όταν εφαρμόστηκε μόνο δυο φορές στο σπορείο. Οι ψεκασμοί ωστόσο με το μίγμα αυτό στη δοσολογία του 1 g L<sup>-1</sup> παρουσίασαν ορμονική διαταραχή στην ανάπτυξη των φυτών και στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Γενικά σε όλα τα προγράμματα επεμβάσεων με fludioxonil+cyprodinil παρατηρήθηκε ο μικρότερος αριθμός εμπορεύσιμων φυτών. Ειδικά στο πρόγραμμα τεσσάρων ψεκασμών, 30 φυτά ήταν περιορισμένης ανάπτυξης, και χαρακτηρίστηκαν ως β' διαλογής αφού δεν συγκέντρωσαν το ελάχιστο βάρος των 170g (Πίνακας 7).

Εξ' ίσου αποτελεσματική ήταν η αντιμετώπιση της ασθένειας στα προγράμματα τριών ή τεσσάρων επεμβάσεων με το fenhexamid ή με το μίγμα boscalid+pyraclostrobin. Το σύνολο των προσβεβλημένων φυτών δεν ξεπερνούσε το 11 % με ελαφρά συμπτώματα προσβολής (βαθμός 1-3 της κλίμακας). Σε αντίθεση με το μίγμα fludioxonil+cyprodinil η ποσότητα και η ποιότητα των συγκομιζόμενων φυτών στις επεμβάσεις με αυτά τα μυκητοκτόνα ήταν πολύ υψηλή, με χαμηλό ποσοστό μη εμπορεύσιμων φυτών (Πίνακας 7). Ειδικά στις επεμβάσεις με το μίγμα boscalid+pyraclostrobin παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση των αποδόσεων με αύξηση των ψεκασμών από 2 σε 4 ενώ ο συνολικός αριθμός μη εμπορεύσιμων φυτών μειώθηκε από 13 σε 4, αντίστοιχα.

Λιγότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα έδωσαν οι δύο ή τρεις επεμβάσεις με chlorothalonil, χωρίς όμως σημαντική διαφορά στην ένταση της ασθένειας από αυτές με fenhexamid ή το μίγμα boscalid+pyraclostrobin (Πίνακας 7). Η συχνότητα των προσβεβλημένων φυτών εμφανίστηκε αυξημένη (25 %). Συγκεκριμένα, ένα φυτό κατά επανάληψη ήταν κατεστραμμένο (βαθμός 9-10 της κλίμακας), δύο ήταν σοβαρά προσβεβλημένα (βαθμός 5-9) και 5-6 φυτά βρίσκονταν κατά τη συγκομιδή στα αρχικά στάδια προσβολής (βαθμός 1-5). Σε όλα τα προγράμματα επεμβάσεων με chlorothalonil 10-12 φυτά από τα 50 σε κάθε επανάληψη είχαν μειωμένο βάρος και δεν ήταν κατάλληλα για εμπορία (Πίνακας 7).

Τα μυκητοκτόνα fenhexamid και chlorothalonil σε προγράμματα 2 μόνο επεμβάσεων στο σπορείο έδωσαν τα λιγότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση της ασθένειας (Πίνακας 7). Κατά μέσο όρο 2-3 φυτά κατά επανάληψη είχαν καταστραφεί πλήρως και στις δύο περιπτώσεις, ενώ καταγράφηκε και ένας αριθμός σοβαρά προσβεβλημένων φυτών (2 στην περίπτωση του fenhexamid και 4 στο chlorothalonil). Ειδικά στις επεμβάσεις με chlorothalonil ο αριθμός των προσβεβλημένων φυτών έφτασε στο 35 %. Το fluazinam εφαρμόστηκε μόνο μια φορά στο σπορείο καθώς παρουσιάστηκαν προβλήματα φυτοτοξικότητας στα νεαρά φυτά και δεν ξαναχρησιμοποιήθηκε. Θεωρήθηκε δε ότι η ανάπτυξη του βοτρώτη στα φυτά αυτά ευνοήθηκε εξαιτίας των κατεστραμμένων ιστών που δημιουργήθηκαν από το ψεκασμό.

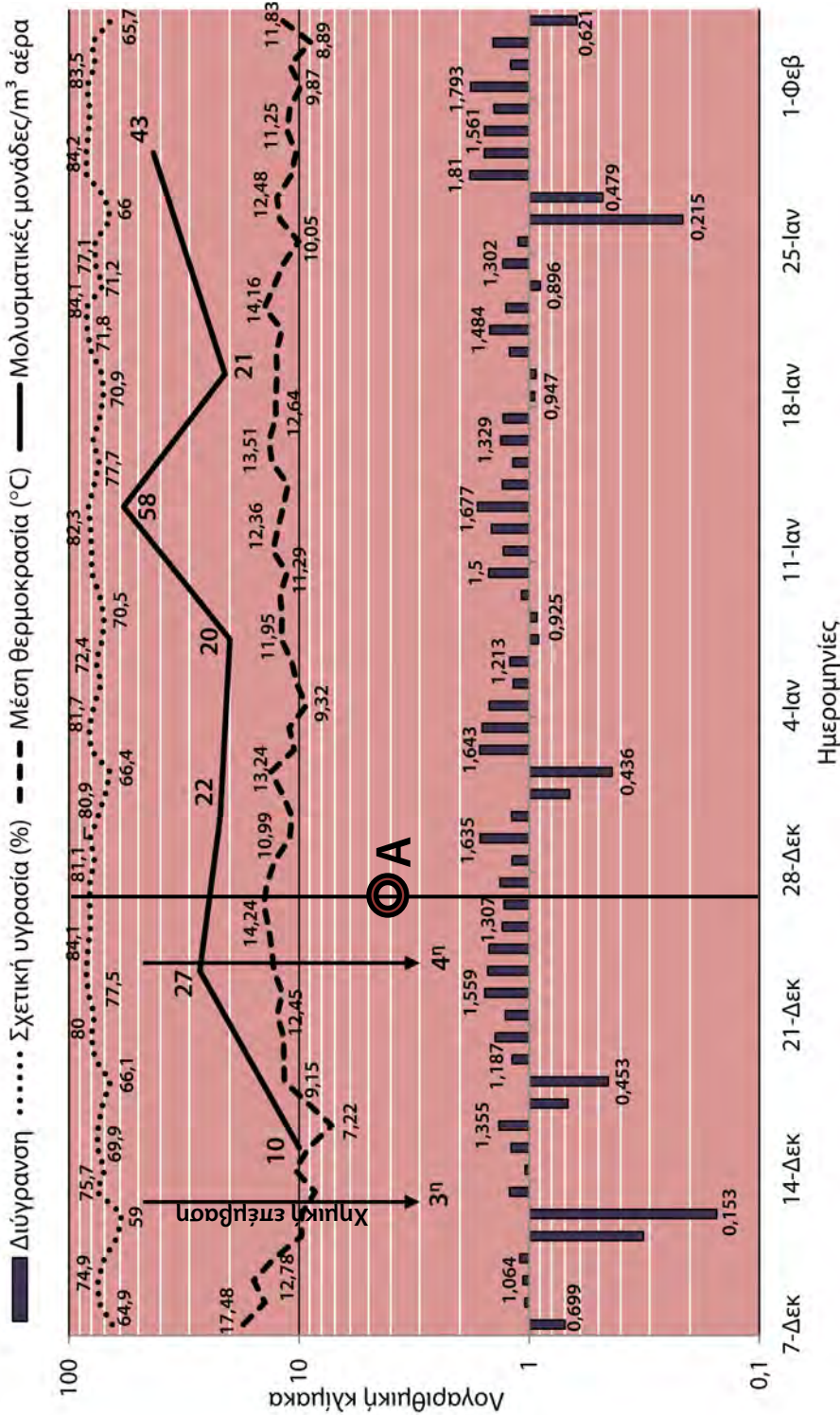
Καλλιεργητική περίοδος 2011-2012

### **Παθόγνεση – Συμπτωματολογία – Επιδημιολογία**

Κατά την 3<sup>η</sup> καλλιεργητική περίοδο η ασθένεια εμφανίστηκε πολύ πιο ήπια σε σχέση με την προηγούμενη χρονιά. Ενδεικτικό της ήπιας προσβολής είναι ότι στα συνολικά 150 φυτά του μάρτυρα (50 φυτά x 3 επαναλήψεις) μόνο ένα φυτό είχε καταστραφεί πλήρως (βαθμός 10). Τρία φυτά ανά επανάληψη ήταν σοβαρά προσβεβλημένα (βαθμός 7-9 της κλίμακας) ενώ τα υπόλοιπα 8 εμφάνιζαν ήπια συμπτώματα προσβολής (Πίνακας 8). Η ένταση της ασθένειας είχε τη μισή τιμή (0.082) της αντίστοιχης της προηγούμενης περιόδου (0.157) ενώ παρόμοια ήταν και η μείωση στο ποσοστό των προσβεβλημένων φυτών (25.33 % έναντι 52 %).

Τα αρχικά συμπτώματα εμφανίστηκαν στις 13 Δεκεμβρίου 2011, ακριβώς 20 ημέρες μετά τη μεταφύτευση (23 Νοεμβρίου 2011). Η συγκέντρωση του μολύσματος στην ατμόσφαιρα ήταν σε υψηλά επίπεδα από την ημέρα της μεταφύτευσης (23 Νοεμβρίου) έως τις 7 Δεκεμβρίου, δηλαδή 7 ημέρες πριν εμφανιστούν τα πρώτα συμπτώματα της προσβολής (Διάγραμμα 5). Στη συνέχεια υπήρξε μια σημαντική πτώση του μολύσματος η οποία διατηρήθηκε μέχρι το πέρας της καλλιεργητικής περιόδου. Μέχρι την έναρξη των συμπτωμάτων η μέση θερμοκρασία στο χώρο του θερμοκηπίου ήταν σταθερή στους 15°C ενώ στη συνέχεια κυμάνθηκε σε πιο χαμηλά επίπεδα φτάνοντας κατά περιόδους και στους 7 με 8 °C.





**Διάγραμμα 4.** Απεικόνιση παραμέτρων μικροκλίματος του θερμοκηπίου, εναέριου μολύσματος του *B. cinerea* και χρόνου χημικών επεμβάσεων κατά την καλλιεργητική περίοδο 2010-2011. Η διύγρυνση είχε τιμές στην κλίμακα 0-2 Volt. Η τιμή 0 αντιστοιχούσε στην τιμή διύγρυνσης όπου δεν υπήρχε καθόλου υγρασία επάνω στο φύλλο και η 2 στην ύπαρξη ελεύθερης υγρασίας στην επιφάνεια του φύλλου. Το σημείο **A** προσδιορίζει την έναρξη των προσβολών στο μάρτυρα.

**Πίνακας 7.** Αξιολόγηση προγραμματίων επεμβάσεων με βοτρυδικτόνα κατά φυσικών προσβολών από *B. cinerea* σε υδροπονική καλλιέργεια μαρουλιού και ανάκτηση φαινοτύπων από προσβεβλημένα φυτά (2010-2011).

Επεμβάσεις (Δοσολογία)	Πρόγραμμα επεμβάσεων <sup>1</sup>		Ένταση προσβολής	Συχνότητα προσβολής (%)	Μέσος αριθμός εμπορεύσιμων φυτών (Μέσο βάρος σε g)	Μέσος αριθμός μη εμπορεύσιμων φυτών (Μέσο βάρος σε g)	Φαινότυποι <i>B. cinerea</i> ανά επέμβαση <sup>2</sup>		
	Σπορείο	Μετά τη μεταφύτευση					1	2	3
Fenhexamid <sup>2</sup> (1.5 g L <sup>-1</sup> )	2	-	0.101 e <sup>4</sup>	26.00 cd	35.67 bc (196.58)	9.67 abcd (138.96)	-	-(7)	-
	2	1	0.029 abc	11.33 ab	41.67 bc (199.36)	5.67 ab (142.58)	+(1)	+(4)	-
	2	2	0.019 ab	6.00 ab	38.33 bc (193.30)	11.00 abcd (144.08)	+(1)	-	-
Boscalid + Pyraclostrobin	2	-	0.043 abcd	15.33 bc	35.00 bc (187.31)	13.33 bcd (143.39)	-	+(3)	-
	2	1	0.017 ab	11.33 ab	42.00 bc (192.67)	8.00 abc (146.54)	+(1)	+(3)	-
	2	2	0.024 ab	12.00 ab	45.33 c (208.56)	4.33 a (154.36)	+(2)	+(2)	-
Fludioxonil + Cyprodinil	2	-	0.002 a	3.33 ab	33.00 b (188.56)	17.00 d (138.08)	-	-	-
	2	1	0.001 a	2.00 a	34.33 b (177.15)	15.67 cd (137.98)	-	-	-
	2	2	0.000 a	0.67 a	20.33 a (168.25)	29.67 e (130.26)	-	-	-
Fluazinam (1.5 ml L <sup>-1</sup> )	1	-	0.075 cdef	43.33 ef	18.67 a (160.48)	30.67 e (118.03)	-	-	-
	2	-	0.090 def	34.67 de	32.33 b (201.18)	10.67 abcd (138.43)	-	+(2)	+(4)
	2	1	0.052 bcde	24.67 cd	32.33 b (189.26)	11.67 abcd (146.02)	-	+(2)	+(2)
	2	2	0.056 bcde	24.00 cd	36.67 bc (203.41)	10.33 abcd (146.61)	-	+(3)	+(1)
<b>Μάρτυρας</b>	-	-	0.157 g	52.00 f	18.67 a (181.95)	25.33 e (128.08)	+(2)	+(8)	+(3)

<sup>1</sup> Οι επεμβάσεις στο σπορείο έγιναν στις 19 Νοεμβρίου και 1 Δεκεμβρίου 2010 ενώ μετά τη μεταφύτευση έγιναν 1 ή 2 συμπληρωματικοί ψεκασμοί στις 13 και 24 Δεκεμβρίου 2010.

<sup>2</sup> Τα σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: fenhexamid:Teldor 50 WG (Bayer CropScience), chlorothalonil:Daconil 500 SC (Syngenta Ltd.), boscalid+pyraclostrobin:Signum 26,7/6,7 WG (BASF SE), fludioxonil+cyprodinil:Switch 25/37,5 WG (Syngenta Crop Protection AG), fluazinam:Ohayo 50 SC (ISK Biosciences Europe S.A).

<sup>3</sup> Φαινότυποι *B. cinerea*: 1=Hyd<sup>R</sup>Qoi<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MIR</sup>Ben<sup>MIR</sup>Dic<sup>MIR</sup>, 2=Qoi<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>MIR</sup>Dic<sup>MIR</sup>, 3=Άγριου τύπου. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις υποδηλώνουν τον αριθμό των προσβεβλημένων φυτών.

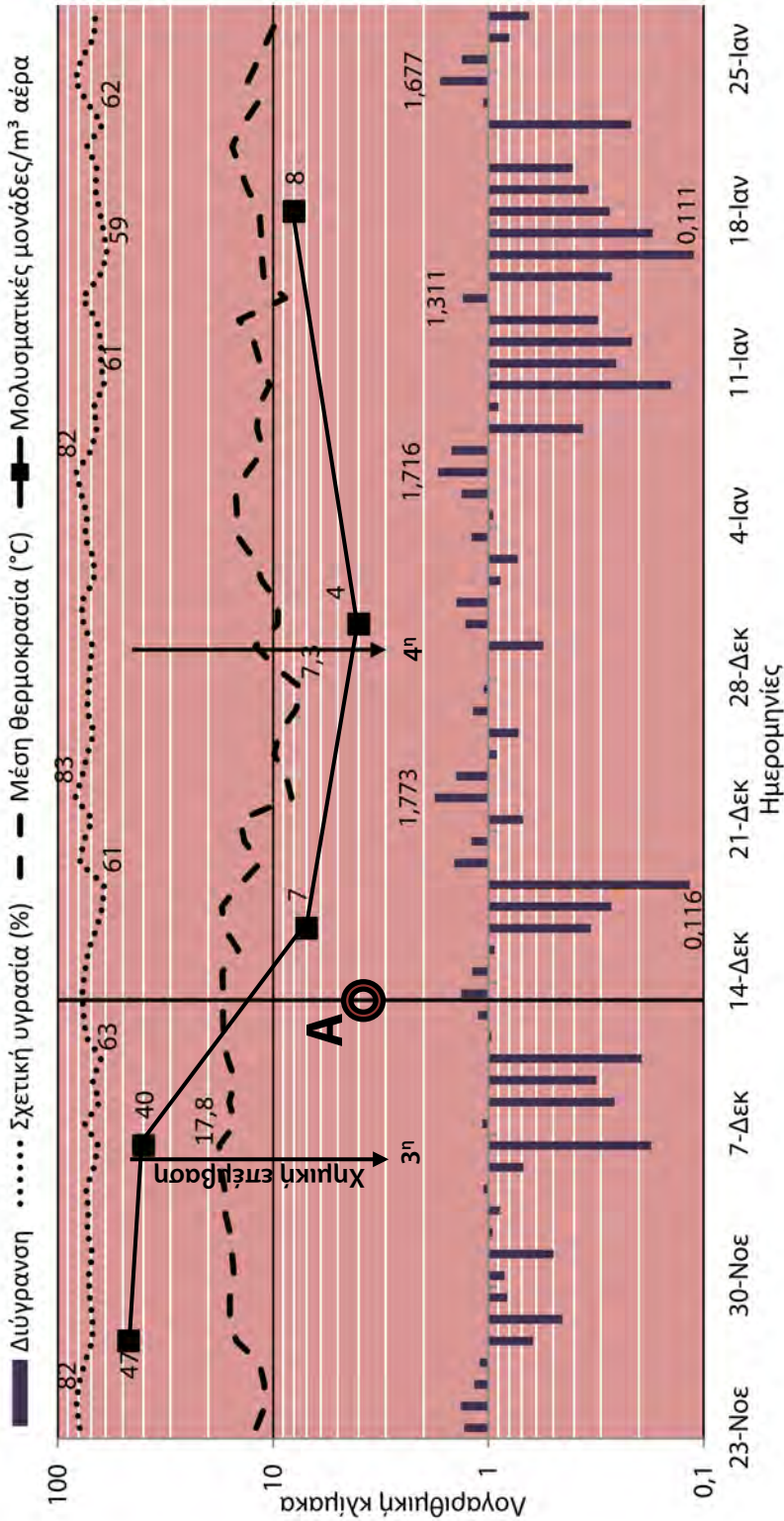
<sup>4</sup> Τιμές που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα στις στήλες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο 0.05 % σύμφωνα με τη δοκιμή Duncan.

Σε σχέση με την προηγούμενη καλλιεργητική περίοδο η σχετική υγρασία της ατμόσφαιρας ήταν εμφανώς μικρότερη για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα, ενώ ελάχιστες φορές ξεπέρασε το 80 %. Τα χαμηλά επίπεδα σχετικής υγρασίας και συχνότητας διύγρυνσης της φυλλικής επιφάνειας δεν ευνόησαν την εξέλιξη της ασθένειας. Συγκεκριμένα μόνο 4 φορές οι τιμές διύγρυνσης ανέβηκαν πάνω από την τιμή 1.5 σε όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (Διάγραμμα 5).

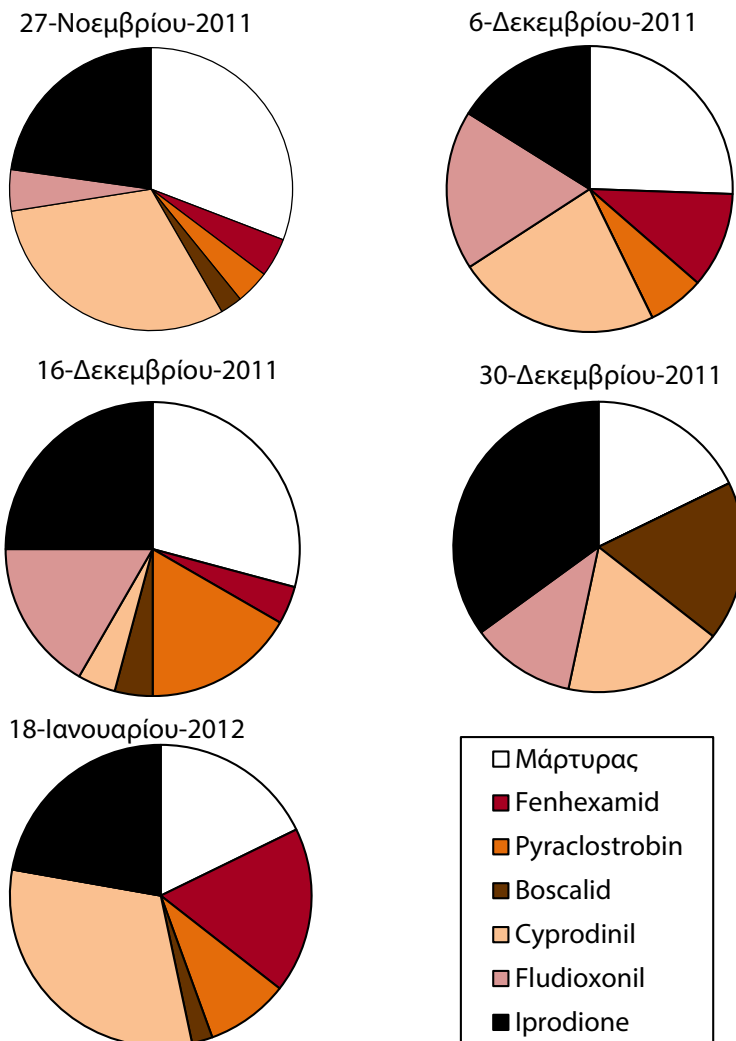
### **Καταγραφή ανθεκτικού εναερίου μολύσματος σε μυκητοκτόνα**

Κατά τη διάρκεια της 3<sup>ης</sup> καλλιεργητικής περιόδου υπήρξε η δυνατότητα παρακολούθησης της ανθεκτικότητας του πληθυσμού εναερίων μολυσμάτων στο χώρο του θερμοκηπίου πειραματισμού σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα. Σε συνολικά 5 δειγματοληψίες προσδιορίστηκε ποσοτικά και ποιοτικά η παρουσία ανθεκτικών μολυσματικών μονάδων. Στο Διάγραμμα 6 παρουσιάζονται τα ποσοστά ανθεκτικών στελεχών σχέση με το σύνολο των μολυσματικών μονάδων που παγιδεύτηκαν σε τριβλία χωρίς μυκητοκτόνο. Ο μέσος αριθμός των μολυσματικών μονάδων του μάρτυρα φαίνεται στο Διάγραμμα 5.

Με εξαίρεση την 30<sup>η</sup> Δεκεμβρίου 2011 σε όλες τις άλλες δειγματοληψίες παγιδεύτηκαν μολυσματικές μονάδες ανθεκτικές στο fenhexamid. Ο αριθμός συλλήψεων στο μάρτυρα την ημερομηνία αυτή ήταν μόλις τέσσερεις (Διάγραμμα 5). Ο ανθεκτικός στο fenhexamid πληθυσμός του παθογόνου παρουσίασε μεγάλη διακύμανση καθώς προσδιορίστηκε σε συχνότητες από 15 έως και 100 % σε σχέση με το μάρτυρα (Διάγραμμα 6). Ανθεκτικές στις QoIs μολυσματικές μονάδες καταγράφηκαν σε ποσοστά από 0-57 % και η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στις 16 Δεκεμβρίου 2011. Ο ανθεκτικός στο ryraclostrobin πληθυσμός καταγράφονταν σταθερά μέσα στο χώρο του θερμοκηπίου (εκτός της 30<sup>ης</sup> Δεκεμβρίου 2011) σε συχνότητες με μέσο όρο περίπου 30-35 % του συνολικού πληθυσμού (Διάγραμμα 6). Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με boscalid καταγράφηκαν και αυτές σε ποσοστό 30 % των αντίστοιχων μονάδων που συλλέχθηκαν σε τριβλία που περιείχαν μόνο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα. Γενικά διαπιστώθηκε σύγκλιση του αριθμού των μολυσματικών μονάδων που αναπτύχθηκαν στο ryraclostrobin και στο boscalid. Πάντως εκτός από μία περίπτωση όπου τα ποσοστά του ανθεκτικού στο boscalid πληθυσμού έφτασαν τα αντίστοιχα του μάρτυρα, ο ανθεκτικός αυτός πληθυσμός αποτελούσε το 12 % περίπου του συνολικού αριθμού μολυσματικών μονάδων (Διάγραμμα 6).



**Διάγραμμα 5.** Απεικόνιση παραμέτρων μικροκλίματος του θερμοκηπίου, εναέριου μολύσματος του *B. cinerea* και χρόνου εφαρμογής χημικών επεμβάσεων την καλλιεργητική περίοδο 2011-2012. Η διύγρανση είχε τιμές στην κλίμακα 0-2 Volt. Η τιμή 0 αντιστοιχούσε στην τιμή διύγρανσης όπου δεν υπάρχει καθόλου υγρασία επάνω στο φύλλο και η 2 στην ύπαρξη ελεύθερης υγρασίας στην επιφάνεια του φύλλου. Το σημείο **A** προσδιορίζει την έναρξη των προσβολών στο μάρτυρα. στο μάρτυρα.



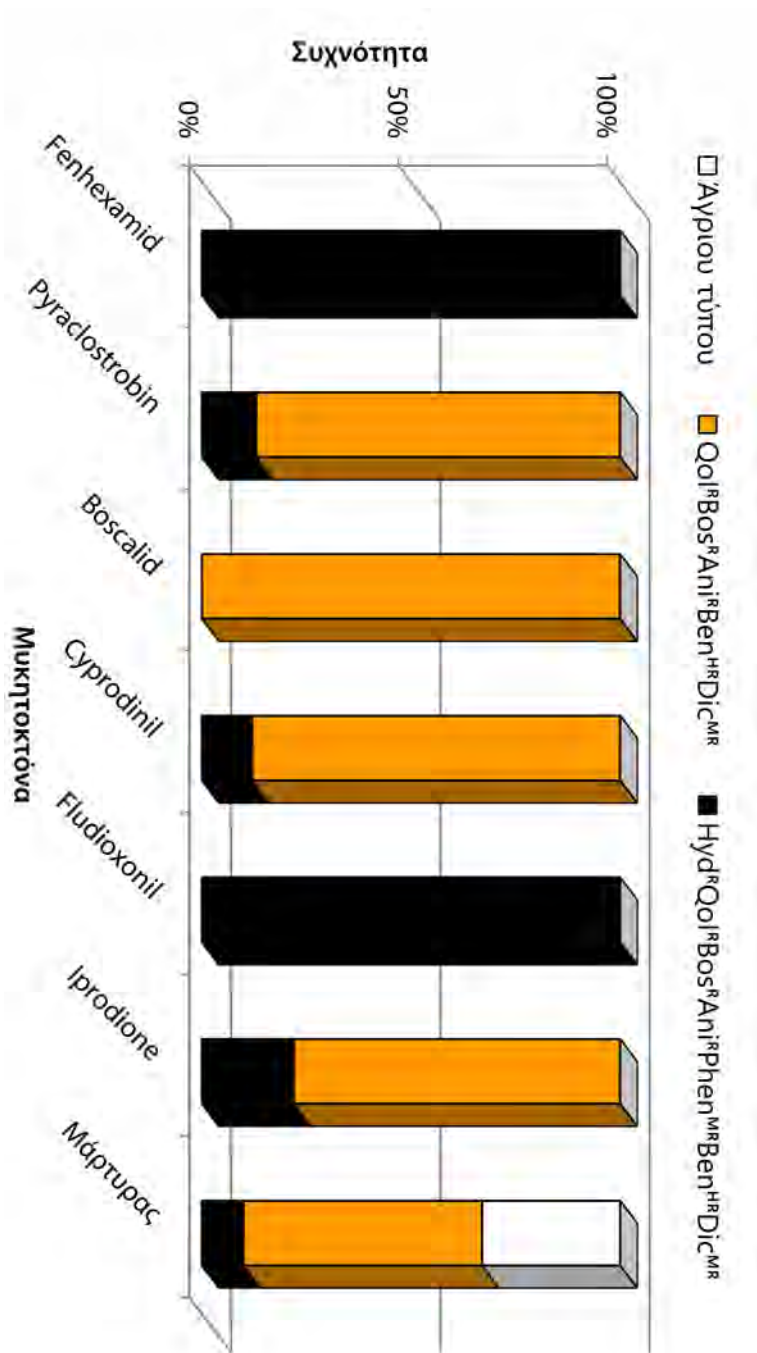
**Διάγραμμα 6.** Ποσοστιαία κατανομή του εναέριου πληθυσμού του *B. cinerea* κατά την καλλιεργητική περίοδο 2011-2012 με βάση την ευαισθησία σε έξι μυκητοκτόνα διαφορετικού τρόπου δράσης. Ο πληθυσμός προσδιοριζόταν με μέτρηση των μολυσματικών μονάδων σε θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμένο με τις συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων για το διαχωρισμό των επιπέδων ευαισθησίας: 1 mg L<sup>-1</sup> fenhexamid, 10 mg L<sup>-1</sup> boscalid, 10 mg L<sup>-1</sup> pyraclostrobin + 100 mg L<sup>-1</sup> SHAM, 10 mg L<sup>-1</sup> cyprodinil, 1 mg L<sup>-1</sup> fludioxonil και 3 mg L<sup>-1</sup> iprodione.

Οι μολυσματικές μονάδες σε παγίδες εμπλουτισμένες με cyprodinil ή iprodione ήταν αυτές που εμφανίστηκαν σε μεγαλύτερες σχετικά συχνότητες σε σχέση με τις υπόλοιπες. Ο ανθεκτικός στο cyprodinil πληθυσμός προσδιορίστηκε στο 95 % και στο iprodione στο 108 % των μολυσματικών μονάδων που παγιδεύτηκαν στο μάρτυρα (Διάγραμμα 6). Τα ανθεκτικά στο fludioxonil στελέχη βρέθηκαν στο 37 % του εναέριου πληθυσμού του *B. cinerea* στο μεγαλύτερο διάστημα της καλλιεργητικής περιόδου (Διάγραμμα 6). Μόνο προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου (18 Ιανουαρίου 2012) δεν καταγράφηκαν ανθεκτικά στο fludioxonil στελέχη. Γενικά όμως μετά τις 16 Δεκεμβρίου 2011 σημειώθηκε μία απότομη πτώση του μολύσματος στην ατμόσφαιρα του θερμοκηπίου.

### **Προσδιορισμός φαινοτύπων παθογόνου από εναέριο μόλυσμα**

Οι μολυσματικές μονάδες που παγιδεύτηκαν σε κάθε περίπτωση ελέγχθηκαν ως προς την ευαισθησία στα υπόλοιπα μυκητοκτόνα, για να διαπιστωθεί η τυχόν ύπαρξη διασταυρωτής ανθεκτικότητας. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε η μέθοδος της σημειακής εναπόθεσης σπορίων. Στις απομονώσεις από τις παγίδες του μάρτυρα εντοπίστηκαν τρεις φαινότυποι: οι Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> και άγριου τύπου σε ποσοστά 10, 57 και 33 % αντίστοιχα (Διάγραμμα 7).

Σε παγίδες εμπλουτισμένες με fenhexamid ή fludioxonil αναπτύχθηκε μόνο ο Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> φαινότυπος πολλαπλής ανθεκτικότητας (Διάγραμμα 7). Ο ίδιος φαινότυπος εντοπίστηκε και σε παγίδες εμπλουτισμένες με pyraclostrobin, cyprodinil και iprodione σε χαμηλότερη συχνότητα (13, 12 και 22 %, αντίστοιχα). Όμως στις παγίδες με pyraclostrobin, cyprodinil ή iprodione απομονώθηκε σε πολύ υψηλές συχνότητες (87, 88 και 78 %, αντίστοιχα), ο φαινότυπος Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>. Ο τελευταίος φαινότυπος σε παγίδες εμπλουτισμένες με boscalid βρέθηκε σε συχνότητα 100 % (Διάγραμμα 7). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κανένας άλλος φαινότυπος δεν απομονώθηκε από τον εναέριο πληθυσμό του παθογόνου. Η επικράτηση των δύο αυτών ανθεκτικών φαινοτύπων παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα για δύο συνεχείς καλλιεργητικές περιόδους στο θερμοκήπιο (περισσότερες πληροφορίες στο κεφάλαιο 'Ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών').



**Διάγραμμα 7.** Ποσοστιαία κατανομή φαντοτύπων που εντοπίστηκαν σε παγίδες εμψυγισμένες με 7 μυκητοκτόνα διαφορετικού τρόπου δράσης. Το παθολόγο απομονώθηκε από τις αποικίες που αναπτύσσονταν στις παγίδες με εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα και κατόπιν εφαρμογής της μεθόδου σημειακής επαπόθεσης σπορίων ελέγχθηκε η ευαισθησία σε όλα τα υπόλοιπα μυκητοκτόνα. Σε αντιστοιχία με τις απομονώσεις που παγιεύτηκαν από προσβεβλημένα φυτά, τρεις κυρίαρχοι φανότυποι ανιχνεύθηκαν.

### Χημική καταπολέμηση

Όλα τα προγράμματα επεμβάσεων που εφαρμόστηκαν κατά την 3<sup>η</sup> καλλιεργητική περίοδο ήταν υψηλής αποτελεσματικότητας. Αν και η εμφάνιση της ασθένειας δεν ήταν σοβαρή, εντούτοις υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των χημικών επεμβάσεων και του μάρτυρα. Εκτός των προγραμμάτων με αύξοντα αριθμό 3, 6 και 15 στα οποία ο μ.ό. προσβεβλημένων φυτών ήταν 1-2, σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις παρατηρήθηκε μόλις ένα προσβεβλημένο φυτό ανά επανάληψη (Πίνακας 8). Η υψηλή αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων fenhexamid και fludioxonil+cyprodinil στα προγράμματα τριών και τεσσάρων επεμβάσεων διατηρήθηκε ανεξαρτήτως σειράς εφαρμογών και ψεκασμών βάσης στο σπορείο. Παρόμοιας αποτελεσματικότητας ήταν και η επέμβαση με το μίγμα boscalid+pyraclostrobin όταν εφαρμόστηκε μία μόνο φορά μετά τη μεταφύτευση (Πίνακας 8). Φαίνεται ότι η εφαρμογή 2<sup>ου</sup> ψεκασμού μετά τη μεταφύτευση δεν είχε περαιτέρω επίδραση στη μείωση του ποσού της ασθένειας.

Σε σχέση με την προηγούμενη χρονιά το μίγμα fludioxonil+cyprodinil εφαρμόστηκε στη μισή δοσολογία ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ) χωρίς να εμφανιστούν προβλήματα παρενεργούς δράσης ή μείωση της αποτελεσματικότητας. Αντιστοίχως στην περίπτωση του fluazinam, για την αποφυγή πρόκλησης φυτοτοξικότητας, το μυκητοκτόνο εφαρμόστηκε σε μεγαλύτερο στάδιο ανάπτυξης της καλλιέργειας μετά τη μεταφύτευση (BBCH-17). Αν και το fluazinam αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματικό κατά της ασθένειας εντούτοις παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού μη εμπορεύσιμων φυτών ειδικά όταν στο σπορείο εφαρμόστηκε το μίγμα azoxystrobin+chlorothalonil (Πίνακας 8).

Η παραγωγή των εμπορεύσιμων φυτών γενικά ήταν υψηλή (ποσοτικά-ποιοτικά) ακόμα και στο μάρτυρα. Υψηλότερες αποδόσεις παρατηρήθηκαν όταν εφαρμόστηκε δύο φορές στο σπορείο το μίγμα fludioxonil+cyprodinil και μία φορά το azoxystrobin+chlorothalonil μετά τη μεταφύτευση (Πίνακας 8).

Προσδιορισμός φαινότυπων ανθεκτικότητας *B. cinerea* από προσβεβλημένα φυτά

Ο φαινότυπος που απομονώθηκε στη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνιζε ανθεκτικότητα σε πέντε μυκητοκτόνα διαφορετικών ομάδων ήτοι: στις στρομπιλουρίνες (QoIs), το boscalid (Bos), τις ανιλνοπυριμιδίνες (Ani), τα βενζιμιδαζολικά (Ben) και τα δικαρβοξιμιδικά (Dic) μυκητοκτόνα (φαινότυπος QoI<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>). Δεύτερος κατά σειρά συχνότητας φαινότυπος εμφανίστη-



**Πίνακας 8.** Αξιολόγηση προγραμμάτων επεμβάσεων με βοτρυδιοκτόνα κατά φυσικών προσβολών από *B. cinerea* σε υδροπονική καλλιέργεια μαρούλιου και ανάκτηση φαινότυπων από προσβεβλημένα φυτά.

α/α	Πρόγραμμα επεμβάσεων <sup>1</sup>			Ένταση προσβολής <sup>2</sup>	Συχνότητα προσβολής (%)	Μέσος αριθμός εμπορεύσιμων φυτών (Μέσο βόρος σε g)	Μέσος αριθμός μη εμπορεύσιμων φυτών (Μέσο βόρος σε g)	Φαινότυποι <i>B. cinerea</i> ανά επέμβαση <sup>3</sup>		
	Μετά τη μεταφύτευση		1					2	3	
	2	1 <sup>n</sup>								2 <sup>n</sup>
1	Fen	-	0.006 a	0.67 a	47.67 bc (208.35)	2.00 ab (94.11)	-	-	+(1)	
2	Bos+Pyr	-	0.006 a	2.00 a	48.33 bc (214.42)	1.33 ab (96.00)	-	-	-	
3	Fid+Cyp	-	0.009 a	5.33 ab	48.67 bc (233.91)	1.33 ab (98.33)	-	-	-	
4	Fid+Cyp <sup>2</sup>	Az+Chi	0.012 a	2.67 a	49.00 c (243.35)	0.67 a (111.00)	-	-	+(1)	
5	Fiz	-	0.014 a <sup>4</sup>	3.33 a	45.00 abc (208.14)	4.67 abc (141.73)	-	-	+(1)	
6	Fen	Fid+Cyp	0.020 a	9.70 b	47.00 bc (211.59)	3.00 abc (141.64)	+(1)	-	-	
7	Fid+Cyp	Fen	0.015 a	2.00 a	46.00 abc (218.52)	3.33 abc (102.04)	-	-	+(1)	
8	Fen	-	0.014 a	4.00 a	44.67 abc (201.62)	4.33 abc (91.21)	+(1)	+(3)	-	
9	Bos+Pyr	-	0.007 a	1.33 a	47.67 bc (197.66)	2.00 ab (91.33)	-	+(1)	-	
10	Fid+Cyp	-	0.011 a	1.33 a	46.67 abc (219.65)	3.00 abc (155.27)	+(1)	-	+(1)	
11	Az+Chi	-	0.005 a	0.67 a	48.33 bc (226.10)	1.33 ab (88.44)	-	-	-	
12	Az+Chi	Fiz	0.006 a	4.67 ab	39.67 a (190.24)	10.00 c (152.37)	-	-	+(2)	
13	Fen	Fid+Cyp	0.029 a	4.67 ab	44.67 abc (203.98)	5.33 abc (142.23)	-	-	-	
14	Fid+Cyp	Fen	0.014 a	3.33 a	46.00 abc (206.39)	3.33 abc (98.44)	-	+(1)	-	
15	-	Fiz <sup>5</sup>	0.015 a	5.33 ab	41.67 ab (212.86)	8.00 bc (141.69)	-	+(1)	-	
16	<b>Μάγνητας</b>	-	0.082 b	25.3 c	44.00 abc (213.59)	5.33 abc (150.43)	+(1)	+(3)	+(1)	

<sup>1</sup> Οι επεμβάσεις σπορείου διεξήχθησαν στις 27 Οκτωβρίου και 17 Νοεμβρίου 2011 ενώ μετά τη μεταφύτευση έγιναν 1 ή 2 συμπληρωματικοί ψεκασμοί στις 6 και 30 Δεκεμβρίου 2011, αντίστοιχα.

<sup>2</sup> Τα ακευδάσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: **Fid+Cyp**: fludioxonil+cyprodinil ως Switch 25/37,5 WG (Syngenta Crop Protection AG) σε δόση 0.5 g L<sup>-1</sup>, **Az+Chi**: azoxystrobin+chlorothalonil ως Ortiva opti 8/40 SC (Syngenta Ltd.) σε δόση 2.5 ml L<sup>-1</sup>, **Fiz**: fluzazinam ως Ohayo 50 SC (ISK Biosciences Europe S.A) σε δόση 1.5 ml L<sup>-1</sup>, **Bos+Pyr**: boscalid+pyraclostrobin ως Signum 26,7/6,7 WG (BASF SE) σε δόση 1.5 g L<sup>-1</sup>, **Fen**: fenhexamid ως Teldor 50 WG (Bayer CropScience) σε δόση 1.5 g L<sup>-1</sup>.

<sup>3</sup> Φαινότυποι *B. cinerea*: 1=Hyd<sup>R</sup>Qoi<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MH</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MH</sup>, 2=Qoi<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MH</sup>, 3=Άγριου τύπου. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις υποδηλώνουν τον αριθμό των προσβεβλημένων φυτών.

<sup>4</sup> Τιμές που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα στις στήλες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο 0.05 % σύμφωνα με τη δοκιμή Duncan

<sup>5</sup> Το fluzazinam εφαρμόστηκε στη δόση 0.4 ml L<sup>-1</sup>.

κε ο πολλαπλής ανθεκτικότητας σε επτά διαφορετικές ομάδες μυκητοκτόνων Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> [προστέθηκε η ανθεκτικότητα στις υδροξυανιλίδες (Hyd) και στις φαινυλοπυρρόλες (Phen)] και τρίτος ο ευαίσθητος (άγριου τύπου) σε όλες τις ομάδες μυκητοκτόνων. Σε χαμηλότερη συχνότητα (<8 %) απομονώθηκαν άλλοι ανθεκτικοί φαινότυποι. Οι απομονώσεις που έγιναν από προσβεβλημένα φυτά των πειραματικών τεμαχίων που δέχθηκαν επεμβάσεις με μυκητοκτόνα ανήκαν σε μία από τις τρεις ως άνω κυρίαρχες φαινοτυπικές ομάδες. Στα προσβεβλημένα φυτά του μάρτυρα ο κυρίαρχος φαινότυπος που απομονώθηκε ήταν ο Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> με δεύτερο και τρίτο κατά σειρά τους 'άγριου τύπου' και Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MR</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, αντίστοιχα (Πίνακες 7 & 8).

Στις επεμβάσεις με fenhexamid το παθογόνο απομονώθηκε από 13 διαφορετικά φυτά τα οποία έφεραν συμπτώματα προσβολής από βοτρώτη στο λαιμό και διαπιστώθηκε ότι ανήκαν σε δυο φαινότυπους. Στο φαινότυπο Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> διαπιστώθηκαν προσβολές σε 11 περιπτώσεις, ενώ στο Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> σε δύο (Πίνακας 7). Ωστόσο, ο φαινότυπος πολλαπλής ανθεκτικότητας σε επτά διαφορετικές ομάδες μυκητοκτόνων εμφανίστηκε μόνο σε φυτά που είχαν υποστεί 4 ψεκασμούς με fenhexamid. Ο κυρίαρχος φαινότυπος Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> αντίστοιχα, βρέθηκε στις περιπτώσεις όπου τα φυτά είχαν ψεκαστεί 2 ή 3 φορές με το μυκητοκτόνο αυτό.

Σε σύνολο 11 φυτών όπου είχαν γίνει επεμβάσεις με το μίγμα boscalid+pyraclostrobin και παρατηρήθηκαν συμπτώματα προσβολής, απομονώθηκαν μόνο δυο φαινότυποι. Ο φαινότυπος Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> απομονώθηκε από 8 φυτά ενώ ο Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> από 3 (Πίνακας 7). Από τα πειραματικά τεμάχια που έγιναν επεμβάσεις με boscalid+pyraclostrobin στο στάδιο του σπορείου μόνο, απομονώθηκε αποκλειστικά ο φαινότυπος πολλαπλής ανθεκτικότητας Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>. Ενώ στις άλλες περιπτώσεις πρόσθετων επεμβάσεων μετά τη μεταφύτευση παρατηρήθηκε και σταδιακή αύξηση της συχνότητας εμφάνισης του φαινοτύπου Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> (Πίνακας 7).

Στην περίπτωση των επεμβάσεων με chlorothalonil δεν απομονώθηκε ο φαινότυπος Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> από τα προσβεβλημένα φυτά. Οι προσβολές ανήκαν είτε σε στελέχη άγριου τύπου είτε σε στελέχη του φαινοτύπου Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> (Πίνακας 7). Αύξηση των ψεκασμών με chlorothalonil από 2 σε 4 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των προσβολών από στελέχη άγριου τύπου και σχετική αύξηση των προσβολών του φαινοτύπου Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>.

Οι ίδιοι ως άνω τρεις φαινότυποι απομονώθηκαν από προσβεβλημένα φυτά μαρουλιού και κατά το 3<sup>ο</sup> έτος πειραματισμού όπου εφαρμόστηκαν προγράμματα

επεμβάσεων με εναλλαγή μυκητοκτόνων. Ο φαινότυπος πολλαπλής ανθεκτικότητας σε επτά ομάδες Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, βρέθηκε τρεις φορές σε φυτά που είχαν ψεκαστεί τουλάχιστον μία φορά είτε με το μίγμα fludioxonil+cyprodinil είτε με το fenhexamid (Πίνακας 8). Ο φαινότυπος Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> βρέθηκε να είναι κυρίαρχος όχι μόνο στα φυτά του μάρτυρα (60 %) αλλά συνολικά στις απομονώσεις του *B. cinerea* που έγιναν από τον πειραματικό αγρό. Οι προσβολές από το φαινότυπο αυτό ήταν αυξημένες σε προγράμματα ψεκασμών που είχαν ως βάση το μίγμα azoxystrobin+chlorothalonil (σπορείο), ακολουθούμενο από επέμβαση με fluazinam ή fenhexamid μετά την μεταφύτευση (Πίνακας 8). Παρατηρήθηκε ότι η εμφάνιση του φαινότυπου αυτού ευνοούνταν από την παρουσία στρομπιλουρινών (azoxystrobin ή pyraclostrobin) στα μίγματα μυκητοκτόνων. Προσβολές από το φαινότυπο άγριου τύπου ανιχνεύθηκαν σε χαμηλά ποσοστά τόσο στο μάρτυρα (20 %) όσο και σε προγράμματα επεμβάσεων με fludioxonil+cyprodinil (Πίνακας 8).

#### Προσδιορισμός υπολειμμάτων μυκητοκτόνων

Η ανάλυση υπολειμμάτων στα συγκομιζόμενα μαρούλια παρείχε σημαντικά στοιχεία για την αποδόμηση των δραστικών ουσιών. Το fenhexamid ακόμη και όταν εφαρμόστηκε σε προγράμματα 4 επεμβάσεων άφησε υπολείμματα κατώτερα των ανωτάτων επιτρεπτών ορίων (MRLs) των 40 mg Kg<sup>-1</sup> που έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Όταν εφαρμόστηκε 1-2 φορές σε χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 50 ημερών πριν από τη συγκομιδή, τα υπολείμματα ήταν κάτω από το όριο αναφοράς των 0.02 mg Kg<sup>-1</sup>. Σε προγράμματα 3 επεμβάσεων τα υπολείμματα βρέθηκαν κοντά στο όριο αναφοράς. Όταν εφαρμόστηκε σε μία επέμβαση σε χρονικό διάστημα 27 ημερών από τη συγκομιδή ανιχνεύθηκε σε αρκετά υψηλότερη συγκέντρωση (5.95 mg Kg<sup>-1</sup>). Αρκετά κάτω από τα MRLs βρέθηκαν και τα υπολείμματα του fenhexamid σε προγράμματα 4 επεμβάσεων με τελευταία επέμβαση 41 μέρες πριν τη συγκομιδή (Πίνακας 9).

Τα υπολείμματα του chlorothalonil όταν εφαρμόστηκε μόνο του ήταν κατώτερα του ορίου ιχνηλασιμότητας 0.01 mg Kg<sup>-1</sup> μόνο στην περίπτωση όπου έγιναν δύο ψεκασμοί στο σπορείο 62 μέρες πριν τη συγκομιδή. Όταν έγιναν πρόσθετες επεμβάσεις (μία ή δύο) μετά τη μεταφύτευση τα υπολείμματα που βρέθηκαν στο συγκομιζόμενο προϊόν ξεπερνούσαν ελαφρά το όριο αναφοράς 0.01 mg Kg<sup>-1</sup> (Πίνακας 9). Αντίθετα, όταν εφαρμόστηκε σε μίγμα με azoxystrobin σε χαμηλότερη συγκέντρωση, τα υπολείμματα που ανευρέθηκαν κατά τη συγκομιδή

ήταν κατώτερα του ορίου ακόμα και στην περίπτωση τριών επεμβάσεων με την τελευταία επέμβαση 52 μέρες πριν τη συγκομιδή (Πίνακας 9).

Το μίγμα fludioxonil+cyprodinil σε όλα τα προγράμματα επεμβάσεων δεν άφησε υπολείμματα ανώτερα από τα επιτρεπτά όρια κατά τη συγκομιδή. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση υπολειμμάτων βρέθηκε σε μαρούλια που είχαν δεχθεί μία επέμβαση με το σκεύασμα στη δοσολογία των  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , 27 ημέρες πριν τη συγκομιδή. Όταν οι επεμβάσεις έγιναν σε χρονικό διάστημα άνω των 50 ημερών τα υπολείμματα είτε ήταν κάτω από τα MRLs είτε του ορίου  $0.01 \text{ g L}^{-1}$ . Ακόμα και στην περίπτωση όπου έγιναν 4 επεμβάσεις στη δοσολογία του  $1 \text{ g L}^{-1}$  με την τελευταία επέμβαση 41 ημέρες πριν τη συγκομιδή, τα υπολείμματα ήταν κάτω από τα ανώτερα επιτρεπτά όρια (Πίνακας 9).

Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα προσδιορισμού υπολειμμάτων στα προγράμματα επεμβάσεων με boscalid+pyraclostrobin. Σε προγράμματα 3 ή 4 επεμβάσεων, 55 ή 41 μέρες πριν τη συγκομιδή αντίστοιχα, τα υπολείμματα του boscalid ήταν πολύ πιο κάτω από τα MRLs, ενώ του pyraclostrobin ήταν πάντοτε κατώτερα και από το όριο αναφοράς του  $0.01 \text{ mg Kg}^{-1}$  (Πίνακας 9). Στην περίπτωση του fluazinam τα υπολείμματα που ανευρέθηκαν ήταν κάτω από το όριο αναφοράς ( $0.01 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) όταν εφαρμόστηκε 52 μέρες πριν τη συγκομιδή στο σπορείο στη δόση  $1.5 \text{ ml L}^{-1}$ . Όταν όμως εφαρμόστηκε μετά τη μεταφύτευση, 27 ημέρες πριν τη συγκομιδή, στη δόση  $0.4 \text{ ml L}^{-1}$  τα ανευρεθέντα υπολείμματα ήταν υπερδιπλάσια των ανωτάτων επιτρεπτών (Πίνακας 9).

## Συζήτηση

Από τα δεδομένα τριών καλλιεργητικών περιόδων η ασθένεια εμφανίστηκε πιο σοβαρή κατά τη δεύτερη χρονιά, όπου στα αψέκαστα φυτά του μάρτυρα η συχνότητα εμφάνισης προσβολής ξεπέρασε το 50 %. Η έναρξη των προσβολών σημειωνόταν σταθερά περίπου 20 ημέρες μετά τη μεταφύτευση στο σύστημα υδροπονίας. Όμως σημεία πολύ αρχικών σταδίων προσβολής ήταν ορατά και νωρίτερα, με την εμφάνιση συμπτωμάτων υπό μορφή πολύ λεπτής καστανής χαραγής στο σημείο της πρόσφυσης των κάτω φύλλων στο λαιμό των φυτών. Η κύρια πύλη εισόδου του παθογόνου στο λαιμό των φυτών ήταν δια μέσου του μίσχου των κατώτερων φύλλων, τα οποία ήταν χλωρωτικά, εξασθενημένα ή σε κατάσταση αποσύνθεσης.

**Πίνακας 9.** Υπολείμματα μυκητοκτόνων σε μαρούλια (τύπου γαλλικής σαλάτας) υδροπονικής καλλιέργειας κατά τη συγκομιδή<sup>1</sup>.

Μεταχειρίσεις	Δοσολογία	Αριθμός επεμβάσεων	Τηλευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή (μέρες)	Υπολείμματα (mg Kg <sup>-1</sup> )	MRLs <sup>1</sup> (mg Kg <sup>-1</sup> )	Όριο αναφοράς [RL] (mg Kg <sup>-1</sup> )
Fenhexamid (0.075 %)	1.5 g L <sup>-1</sup>	1	27	5.95		
		1	52	<RL		
		2	62	<RL	40	0.02
		3	55	0.035		
Chlorothalonil (0.15 %)	2.5 ml L <sup>-1</sup>	4	41	0.12		
		2	62	<RL		
		3	52	0.061	0.01	0.01
		4	41	0.073		
Azoxystrobin+ chlorothalonil (0.02+0.1 %)	2.5 ml L <sup>-1</sup>	2	73	<RL + <RL	15 + 0.01	0.02 + 0.01
		3	52	<RL + <RL		
		1	27	0.43 + 0.74		
Fludioxonil+ cyprodinil (0.025+0.038 %)	0.5 g L <sup>-1</sup>	1	52	<RL + 0.091		
		2	62	<RL + <RL	15 + 15	0.01+0.01
		3	55	<RL + 0.053		
		4	41	0.06 + 0.2		
Boscalid+ pyraclostrobin (0.04+0.01 %)	1.5 g L <sup>-1</sup>	2	62	<RL		
		3	55	0.017 + <RL	30 + 2	0.01+0.01
		4	41	0.042 + <RL		
Fluazinam (0.02 %)	0.4 ml L <sup>-1</sup>	1	27	0.77	0.05	0.01
		1	52	<RL		

<sup>1</sup> Ανώτατα επιτρεπτά υπολείμματα που έχουν θεσπιστεί για το 2014 από την Ευρωπαϊκή Ένωση για μαρούλια τύπου γαλλικής σαλάτας [EU pesticide database, τελευταία επίσκεψη στις 2.6.2014].

Σε καμία περίπτωση η ασθένεια δεν έλαβε διαστάσεις επιδημίας. Η ένταση της προσβολής με τιμές 0.157 και 0.082 (δυναμικά μέγιστη τιμή 1.000) στα φυτά του μάρτυρα κατά τις δύο τελευταίες περιόδους αντίστοιχα, ήταν χαρακτηριστικές της σχετικά ήπιας εκδήλωσης της ασθένειας. Χαρακτηριστικό δε είναι ότι από τα συνολικά 300 φυτά του μάρτυρα στο 2<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> έτος πειραματισμού 20-25 φυτά ήταν σοβαρά προσβεβλημένα και μόνο 10-15 φυτά είχαν καταστραφεί ολοσχερώς. Ωστόσο πρέπει να επισημανθεί ότι το 2<sup>ο</sup> έτος πειραματισμού το 60 % των φυτών κρίθηκαν ακατάλληλα για εμπορία. Η ασθένεια μπορεί μεν να μην εκδηλώνεται πάντοτε με μεγάλη ένταση, ωστόσο διαφαίνεται ότι προκαλεί μείωση της ποσότητας και ποιότητας των συγκομιζόμενων προϊόντων.

Από τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων το 1<sup>ο</sup> έτος πειραματισμού βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των ποικιλιών όσον αφορά την ευπάθεια στις προσβολές από τον *B. cinerea*. Οι Matheron & Porchas (2008) σε παρόμοια πειράματα αξιολόγησης μυκητοκτόνων και ποικιλιών μαρουλιού κατά του βοτρώτη διαπίστωσαν επίσης διαφορές μεταξύ των ποικιλιών στην ένταση προσβολής ενώ μάλιστα μία ποικιλία τύπου κατσαρού κεφαλωτού (*crisphead*) βρέθηκε ανθεκτική στην ασθένεια. Πρόσφατα, σε προγράμματα βελτίωσης ποικιλιών τύπου γαλλικής σαλάτας, έχουν ανιχνευθεί γονίδια με αντοχή στην ασθένεια (QTL) που έχουν ως στόχο μεταξύ άλλων την δημιουργία ποικιλιών όπου εκφράζονται φυσιολογικά χαρακτηριστικά όπως παχύτερο έλασμα φύλλων κ.ά (Stotz *et al.*, 2007, Michelmore *et al.*, 2009). Πάντως ανεξαρτήτως ποικιλίας διαπιστώθηκε ότι η μόλυνση των φυτών κατά το τελευταίο στάδιο ανάπτυξης, όταν αρχίζει η πάχυνση του λαιμού, δεν επιφέρει σημαντικές δυσμενείς επιπτώσεις στην παραγωγή.

Η επιλογή θέσης δειγματοληψίας, η διάρκεια και η συχνότητα καταγραφής του εναέριου πληθυσμού του παθογόνου σε συσχέτιση με την έναρξη της προσβολής και την εξέλιξη της ασθένειας βασίστηκαν σε προηγούμενες μελέτες (Keressies, 1993). Το φορτίο του *B. cinerea* στην ατμόσφαιρα του θερμοκηπίου κυμάνθηκε γενικά σε χαμηλά επίπεδα. Οι Dik & Wubben (2007) συσχέτισαν χαμηλά επίπεδα σπορίων του παθογόνου στα θερμοκήπια με πρακτικές απομάκρυνσης των υπολειμμάτων των φυτών, καθώς παρατήρησαν ότι όταν αυτά αφήνονταν στο χώρο η συγκέντρωση των σπορίων στην ατμόσφαιρα τριπλασιάζετο. Σε αυτή την περίπτωση ο κίνδυνος για περαιτέρω αύξηση του μολύσματος προερχόταν από το χώρο εξωτερικά του θερμοκηπίου όπου η συγκέντρωση ήταν σημαντικά υψηλότερη (Elad & Shtienberg, 1995) και η μεταφορά γινόταν μέσω των συστημάτων αερισμού (Pappas, 2000).

Η διαφορά στην ένταση και τη συχνότητα της ασθένειας μεταξύ των δύο τελευταίων καλλιεργητικών περιόδων φαίνεται να συσχετίζεται άμεσα με την

υγρασία στο χώρο του θερμοκηπίου. Οι περισσότερες ημέρες με υψηλή σχετική υγρασία και διύγρυνση των φύλλων την 2<sup>η</sup> περίοδο αύξησαν τις προσβολές κατά 100 % σε σχέση με τις αντίστοιχες της 3<sup>ης</sup>. Χαρακτηριστικό είναι ότι η υψηλότερη σχετική υγρασία καταγράφηκε στις 8:00 το πρωί και ήταν 89.9 %, ενώ αυξημένες τιμές διύγρυνσης καταγράφονταν από τις 18:00 το απόγευμα έως τις 8:00 το πρωί. Οι μολύνσεις πιθανότατα να λαμβάνουν χώρα σε αυτό το χρονικό διάστημα, όπου παρουσία υψηλής διύγρυνσης το 50 % των σπορίων βλαστάνουν σε 7 ώρες (Yunis *et al.*, 1994). Επιπρόσθετα το παθογόνο χρειάζεται 2-3 ώρες για την είσοδο στους ιστούς του ξενιστή. Μόλις εισέλθει στο εσωτερικό των φυτών η υγρασία πλέον δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα (Elad & Shtienberg, 1995). Σε σχετική υγρασία <95 %, η βλάστηση των σπορίων γίνεται ύστερα από επώαση τουλάχιστον 52 ωρών. Αν σε οποιαδήποτε δε φάση της βλάστησης τα σπόρια παραμείνουν για μεγάλο διάστημα σε περιβάλλον χαμηλής σχετικής υγρασίας τότε η μόλυνση αποφεύγεται. Πάντως ειδικότερα για τη 3<sup>η</sup> περίοδο των πειραμάτων η χαμηλή σχετική υγρασία στο χώρο του πειραματισμού πιθανόν αποτέλεσε τον κύριο περιοριστικό παράγοντα ανάπτυξης της ασθένειας.

Όταν τα μυκητοκτόνα εφαρμόστηκαν ξεχωριστά σε προγράμματα δύο, τριών ή τεσσάρων επεμβάσεων έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση του βοτρυτή σε σχέση με το μάρτυρα. Τα μυκητοκτόνα fenhexamid και chlorothalonil έδωσαν τα λιγότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα σε προγράμματα δύο εφαρμογών στο σπορείο. Όταν το chlorothalonil εφαρμόστηκε ως μίγμα με azoxystrobin σε τρεις περιπτώσεις (δύο πριν και μία μετά τη μεταφύτευση) απαλείφθηκε το πρόβλημα ύπαρξης υπολειμμάτων. Η ύπαρξη υπολειμμάτων του fluazinam σε συνδυασμό με τα προβλήματα φυτοτοξικότητας που προκάλεσε όταν εφαρμόστηκε στο σπορείο καθιστούν τη χρήση του μη ενδεδειγμένη σε καλλιέργειες μαρουλιού. Για το μυκητοκτόνο αυτό, περαιτέρω έρευνα κρίνεται απαραίτητη όσον αφορά τη δόση και τον αριθμό επεμβάσεων, το στάδιο ανάπτυξης των φυτών και το χρόνο τελευταίας επέμβασης πριν τη συγκομιδή.

Το μίγμα fludioxonil+cyprodinil έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα στην καταπολέμηση της ασθένειας και τις δύο χρονιές πειραματισμού. Όμως όταν χρησιμοποιήθηκε στην υψηλή δοσολογία του 1 g L<sup>-1</sup> είχε δυσμενείς επιπτώσεις στην ποιότητα και ποσότητα του προϊόντος. Η καλή αποτελεσματικότητα του μίγματος αυτού σε πειράματα καλλιέργειας μαρουλιού διαπιστώθηκε και από τους Matheron & Porchas (2008). Τα μυκητοκτόνα fenhexamid και το μίγμα boscalid+pyraclostrobin

έδωσαν πολύ καλή καταπολέμηση είτε όταν εφαρμόστηκαν μόνα τους σε προγράμματα τριών και τεσσάρων επεμβάσεων είτε σε προγράμματα εναλλαγής μυκητοκτόνων. Εξάλλου, η σταδιακή αύξηση των εφαρμογών με boscalid+ pyraclostobin από δύο σε τέσσερις αύξησε και τη συνολική απόδοση του προϊόντος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η δράση των QoIs μυκητοκτόνων επηρεάζει τη φυσιολογία των φυτών προάγοντας την αύξηση (και εν τέλει την απόδοση των φυτών) και καθυστερώντας τη διαδικασία της γήρανσης (Vincelli, 2002). Ωστόσο εξαιτίας της ύπαρξης ανθεκτικού εναέριου πληθυσμού του παθογόνου η στρατηγική πολλών εφαρμογών με την ίδια ουσία δεν ενδείκνυται. Τα υπολείμματα των μυκητοκτόνων αυτών μόλις που ξεπερνούσαν τα όρια αναφοράς όταν εφαρμόστηκαν μια εβδομάδα μετά την μεταφύτευση. Ακόμη και όταν έγινε και δεύτερη επέμβαση μετά την μεταφύτευση 40 μέρες πριν τη συγκομιδή τα υπολείμματα ήταν πολύ κατώτερα από τα ανώτατα επιτρεπτά (MRLs). Η θετική συσχέτιση της εφαρμογής με την αύξηση του βάρους των φυτών σε συνδυασμό με τον γρήγορο ρυθμό αποδόμησης, καθιστά χρήσιμη την εφαρμογή των μυκητοκτόνων αυτών τουλάχιστον μία φορά ανά καλλιεργητική περίοδο σε προγράμματα αντιμετώπισης του *B. cinerea*.

Η σταθερή ύπαρξη στο θερμοκήπιο ανθεκτικού πληθυσμού του παθογόνου φαίνεται ότι δεν περιορίσε την αποτελεσματικότητα των βοτρυδιοκτόνων. Δύο κυρίαρχοι φαινότυποι ανθεκτικοί σε πέντε (QoI<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>) και επτά (Hyd<sup>R</sup>QoI<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>) διαφορετικού τρόπου δράσης ομάδες μυκητοκτόνων εντοπίστηκαν είτε στο εναέριο μόλυσμα, είτε απομονώθηκαν από φυτά του πειραματικού ή του ευρύτερου χώρου του θερμοκηπίου. Ανθεκτικότητα στις ανιλνοπυριμιδίνες, στα QoIs και στο boscalid διαπιστώθηκε και στους δύο φαινοτύπους. Αυτό εξηγεί και τον αυξημένο αριθμό των ανθεκτικών σε αυτά τα μυκητοκτόνα μολυσματικών μονάδων που αναπτύχθηκαν στις παγίδες με εκλεκτικό υπόστρωμα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η μέτρια ανθεκτικότητα στις φαινυλοπυρρόλες συνδυαζόταν πάντα με υψηλή ανθεκτικότητα στο fenhexamid. Από τις απομονώσεις του ανθεκτικού σε επτά ομάδες μυκητοκτόνων φαινοτύπου διαπιστώθηκε ότι σποριοποιούσε *in vitro* εμφανώς λιγότερο σε σχέση με τον άλλο ανθεκτικό φαινότυπο (αδημοσίευτα στοιχεία). Πρόσφατες έρευνες απέδειξαν απώλεια στην προσαρμοστικότητα (fitness) των ανθεκτικών στο fenhexamid στελεχών Billard *et al.* (2012). Αυτό ενδεχομένως να δικαιολογεί και την υψηλή αποτελεσματικότητα του fenhexamid στον αγρό παρά τη διαπίστωση της ύπαρξης στελεχών με υψηλή ανθεκτικότητα.

Οι επεμβάσεις με τα μίγματα fludioxonil+cyprodinil ή azoxystrobin+chlorothalonil στο σπορείο παρείχαν πλήρη προστασία στα φυτά



μέχρι τη μεταφύτευση. Από πρόσφατες μελέτες προέκυψε ότι η ανθεκτικότητα στις ανιλνοπυριμιδίνες και στις στρομπιλουρίνες δεν έχει αντίκτυπο στην προσαρμοστικότητα των στελεχών (Bardas *et al.*, 2008, Veloukas *et al.*, 2014). Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι στρατηγικές διαχείρισης ανθεκτικότητας που ακολουθούνται είναι εφαρμογές με μίγματα μυκητοκτόνων διαφορετικού τρόπου δράσης (όπως pyraclostrobin+boscalid) και μείωση του αριθμού των επεμβάσεων. Πολυετείς μελέτες έδειξαν την ύπαρξη μόνο μετρίως ανθεκτικών στελεχών στο fludioxonil αν και χρησιμοποιείται στην πράξη πάνω από δύο δεκαετίες (Baroffio *et al.*, 2003, Weber, 2011). Η δράση του boscalid, που εισήλθε την τελευταία δεκαετία σε εφαρμογή φαίνεται ότι είναι αποτελεσματική παρά τη διαπίστωση παρουσίας ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου στον αγρό (Sierotzki & Scalliet, 2013). Μάλιστα έχει καταγραφεί και περίπτωση υψηλής συχνότητας ανθεκτικού στα QoIs και SDHIs πληθυσμού του *B. cinerea* σε καλλιέργεια φράουλας, όπου το πρόγραμμα επεμβάσεων με το μίγμα pyraclostrobin+boscalid ήταν πολύ αποτελεσματικό (Fernández-Ortuño *et al.*, 2012b).

Συμπερασματικά, τα μίγματα των μυκητοκτόνων fludioxonil+cyprodinil και boscalid+pyraclostrobin έδωσαν την καλύτερη καταπολέμηση του βοτρώτη παρόλο που υπήρχε ανθεκτικός πληθυσμός του παθογόνου στο χώρο του θερμοκηπίου. Τα προγράμματα χημικών επεμβάσεων με εναλλαγή μυκητοκτόνων βρέθηκαν περισσότερο αποτελεσματικά. Δύο εφαρμογές στο σπορείο με τα μυκητοκτόνα fludioxonil+cyprodinil ή azoxystrobin+chlorothalonil μπορούν να προστατεύσουν τα φυτά μέχρι τη συγκομιδή σε περιπτώσεις χαμηλής πίεσης του μολύσματος. Ενδεχομένως σε συνθήκες ανάπτυξης επιδημίας να χρειαστούν 1 ή 2 εφαρμογές μετά τη μεταφύτευση με τα μυκητοκτόνα fenhexamid ή pyraclostrobin+boscalid για τη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας.

## ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

---

## Εισαγωγή

Με την εισαγωγή νέων μυκητοκτόνων στην πράξη με διαφορετικό τρόπο δράσης την τελευταία 20ετία, πολλά από τα προβλήματα ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε παλαιότερα μυκητοκτόνα αντιμετωπίστηκαν με επιτυχία. Τα σύγχρονα αυτά μυκητοκτόνα διακρίνονται για τον εξειδικευμένο τρόπο δράσης τους σε σημεία-στόχους των βιολογικών δραστηριοτήτων του παθογόνου (Leroux, 2007). Αν και είναι γνωστοί πολλοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας φαίνεται ότι ο πιο κοινός είναι η αλλαγή της ενζυμικής θέσης-στόχου. Αυτό μπορεί να εξηγήσει εν μέρει γιατί πολλά από τα παλαιότερα πολυθεσικά μυκητοκτόνα δεν αντιμετώπιζαν προβλήματα μείωσης αποτελεσματικότητας (Brent & Hollomon, 2007). Φαίνεται ωστόσο ότι πολύ σύντομα, μέσα σε 2-3 χρόνια, εμφανίζονται ανθεκτικά στελέχη του παθογόνου σε πολλά σύγχρονα βοτρυδιοκτόνα εξειδικευμένης δράσης. Η ανθεκτικότητα αυτή είναι απόρροια της πίεσης επιλογής που ασκείται από τα νέα μυκητοκτόνα και της εμφάνισης ενός νέου μηχανισμού ανθεκτικότητας που έχει σχέση με την υπερέκφραση των μεταφορέων εκροής των δραστικών ουσιών. Η αυξημένη λειτουργία των μεταφορέων αυτών μπορεί να επηρεάσει πολλές διαφορετικές ομάδες σύγχρονων μυκητοκτόνων και να αναπτυχθεί πολλαπλή ανθεκτικότητα. Η ανθεκτικότητα αυτή αν και ξεκίνησε ως μικρή μείωση στην ευαισθησία του παθογόνου, φαίνεται πλέον να συνδέεται με υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας, θέτοντας σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητα πολλών νέων μυκητοκτόνων (Leroch *et al.*, 2013).

Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως σε καλλιέργειες αμπέλου και μικρών φρούτων με αποτέλεσμα πολλές έρευνες για ανθεκτικούς πληθυσμούς του *B. cinerea* να επικεντρώνονται σ' αυτές, ενώ μελέτες σε καλλιέργειες κηπευτικών είναι σαφώς πιο περιορισμένες (Weber & Wichura, 2013). Η έρευνα που παρουσιάζεται σε αυτό το κεφάλαιο επικεντρώνεται στη διερεύνηση της εξάπλωσης και συχνότητας των ανθεκτικών στελεχών του *B. cinerea* σε καλλιέργειες μαρουλιού σε διάφορες περιοχές της χώρας. Επιπλέον έγινε σύγκριση της ευαισθησίας απομονώσεων που προήλθαν από φυτά μαρουλιού με απομονώσεις που περισυλλέχθηκαν από άλλες καλλιέργειες κηπευτικών πριν την εφαρμογή ορισμένων νέων μυκητοκτόνων στην Ελλάδα.

## Υλικά και μέθοδοι

Την περίοδο 2009-2012 έγινε συλλογή απομονώσεων του *B. cinerea* από μαρούλια από έξι διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Έγιναν συνολικά 755 απομονώσεις του παθογόνου από διαφορετικά φυτά κάθε φορά, όπως περιγράφηκε προηγουμένως

(περισσότερα στοιχεία στο κεφάλαιο 'Έλεγχος αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνων *in vitro*'). Οι δειγματοληψίες έγιναν τόσο σε υπαίθριες όσο και σε καλλιέργειες θερμοκηπίου (Πίνακας 10). Από τον ευρύτερο χώρο του θερμοκηπίου όπου έλαβαν χώρα τα πειράματα καταπολέμησης γινόταν απομονώσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν και 63 απομονώσεις από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, οι οποίες έγιναν την περίοδο 1993-1997 και προέρχονταν από θερμοκηπιακές καλλιέργειες κηπευτικών (κυρίως τομάτας), για σύγκριση.

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας χρησιμοποιήθηκε η δόση διαχωρισμού για κάθε μυκητοκτόνο σύμφωνα με τα ευρήματα που αναφέρονται στο κεφάλαιο 'Έλεγχος αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνων *in vitro*'. Σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα εμπλουτισμένα με τις διαχωριστικές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων έγινε ανίχνευση των ανθεκτικών φαινοτύπων με χρήση της μεθόδου σημειακής εναπόθεσης σπορίων όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Ήτοι για κάθε μυκητοκτόνο καθορίστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις: 1 mg L<sup>-1</sup> fenhexamid, 10 mg L<sup>-1</sup> pyraclostrobin με την προσθήκη 100 mg L<sup>-1</sup> SHAM, 10 mg L<sup>-1</sup> boscalid, 1 mg L<sup>-1</sup> cyprodinil, 0.1 mg L<sup>-1</sup> fludioxonil, 0.1 mg L<sup>-1</sup> fluazinam και 10 mg L<sup>-1</sup> chlorothalonil. Επιπλέον, έγινε έλεγχος ευαισθησίας στα βενζιμιδαζολικά και δικαρβοξιμιδικά στις ακόλουθες συγκεντρώσεις (Pappas, 1997): α) για τον προσδιορισμό των επιπέδων ευαισθησίας στα βενζιμιδαζολικά, χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 1 (μέτρια ανθεκτικότητα) και 100 mg L<sup>-1</sup> (υψηλή ανθεκτικότητα) carbendazim, β) για τα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 3 (μέτρια ανθεκτικότητα) και 10 mg L<sup>-1</sup> (υψηλή ανθεκτικότητα) iprodione, αντιστοίχως.

## Αποτελέσματα

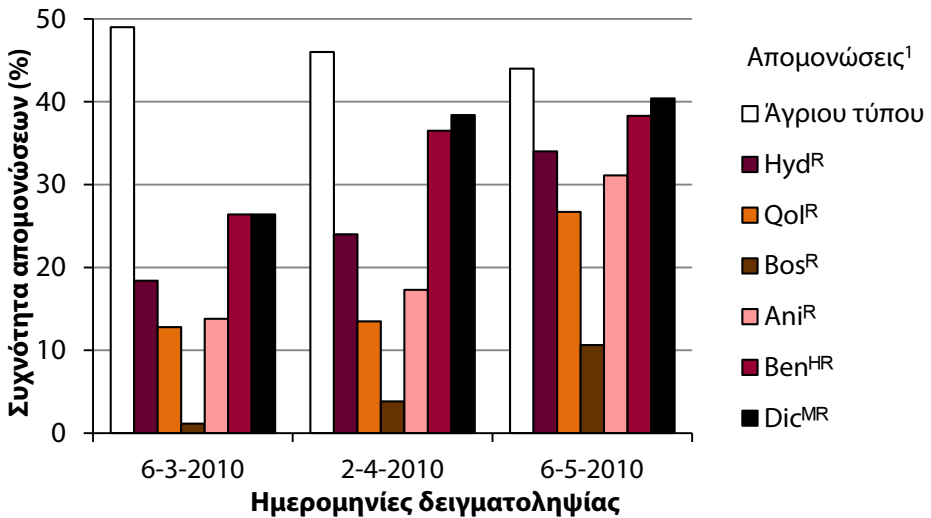
Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας της 1<sup>ης</sup> περιόδου (2010) στην πειραματική καλλιέργεια, η συχνότητα των ανθεκτικών απομονώσεων αυξήθηκε σημαντικά σε σύντομο χρονικό διάστημα ύστερα από εφαρμογή μυκητοκτόνων. Οι ανθεκτικές απομονώσεις στα fenhexamid, pyraclostrobin, boscalid και cyprodinil υπερδιπλασιάστηκαν σε χρονικό διάστημα 2 μηνών ύστερα από μία έως τρεις επεμβάσεις με κάθε μυκητοκτόνο (Διάγραμμα 8, Πίνακας 10). Αύξηση της τάξης του 15 % παρατηρήθηκε και για τις απομονώσεις που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στα παλαιότερα μυκητοκτόνα carbendazim και iprodione ενώ η συχνότητα απομονώσεων άγριου τύπου μειώθηκε ελαφρά (Διάγραμμα 8).

**Πίνακας 10.** Προέλευση των απομονώσεων *B. cinerea* που χρησιμοποιήθηκαν.

Περιοχές Δειγματοληψίας	Ημερομηνία Δειγματοληψίας	Αριθμός & κωδικός απομονώσεων	Εφαρμογές μυκητοκτόνων <sup>1</sup>
Πειραματικό θερμοκήπιο μαρουλιού <i>Μαγνησία (Κράκιο)</i>	6-3-2010	105 (A) <sup>2</sup>	Fenhexamid, boscalid + pyraclostrobin, iprodione, fenhexamid
	2-4-2010	60 (B) <sup>2</sup>	Iprodione, boscalid + pyraclostrobin
	6-5-2010	55 (C) <sup>2</sup>	Fenhexamid, fludioxonil + cyprodinil
Καλλιέργεια μαρουλιού υπό κάλυψη <i>Τρίκαλα (Κεφαλόβρυσο)</i>	12-4-2011	88 (K)	Fenhexamid, boscalid+pyraclostrobin, iprodione
	26-2-2012	108 (CR)	Boscalid+pyraclostrobin, fenhexamid
Καλλιέργεια μαρουλιού υπό κάλυψη <i>Μαγνησία (Αϊδίνι)</i>	31-3-2009	52 (TR) <sup>2</sup>	Δεν υπάρχουν πληροφορίες
Υπαίθρια καλλιέργεια μαρουλιού <i>Μαγνησία (Αϊδίνι)</i>	25-2-2009	28 (AID) <sup>2</sup>	"
Υπαίθρια καλλιέργεια μαρουλιού <i>Ημαθία (Άγιος Γεώργιος)</i>	24-2-2012	219 (AG)	"
Υπαίθρια καλλιέργεια μαρουλιού <i>Ηλεία (Λεγαινά)</i>	15-3-2012	21 (LE)	"
Υπαίθρια καλλιέργεια μαρουλιού <i>Μεσσηνία (Κυπαρισσία)</i>	15-3-2012	19 (ΚΥΡ)	"
Κηπευτικά υπό κάλυψη <i>(Κορήτη)</i>	1993-1997	63 (PPL)	"

<sup>1</sup> Οι εφαρμογές των μυκητοκτόνων γίνονταν σε διαστήματα 15 ημερών πριν από κάθε δειγματοληψία.

<sup>2</sup> Απομονώσεις από το πείραμα της μεταπτυχιακής διατριβής του Παπαευαγγέλου (2010).

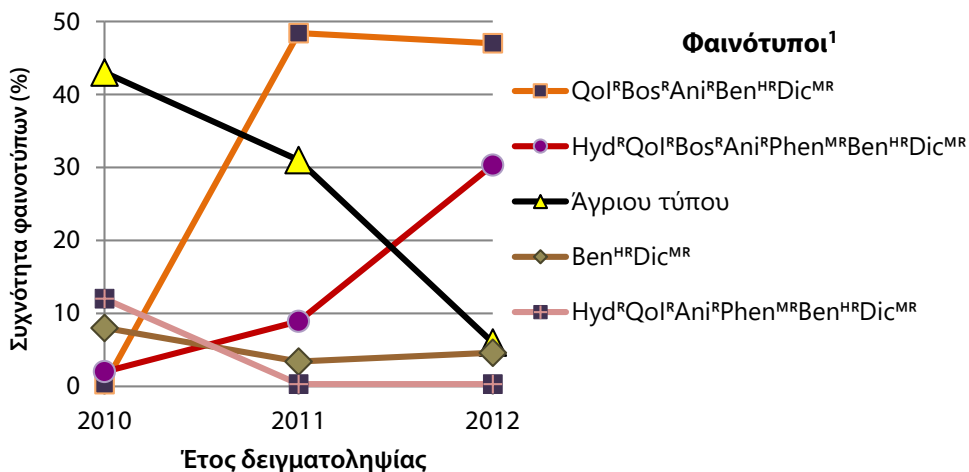


**Διάγραμμα 8.** Εξέλιξη της ανθεκτικότητας του *B. cinerea* σε έξι διαφορετικές ομάδες μυκητοκτόνων σε πειραματική καλλιέργεια θερμοκηπίου στην περιοχή Κρόκιο Αλμυρού κατά την καλλιεργητική περίοδο 2010. Η ανθεκτικότητα των απομονώσεων στα μυκητοκτόνα fenhexamid (Hyd), pyraclostrobin (QoI's), boscalid (Bos), cyprodinil (Ani), carbendazim (Ben) και iprodione (Dic) εξετάστηκε με τη μέθοδο της σημειακής εναπόθεσης σπορίων. Οι απομονώσεις που εξετάστηκαν εμφάνιζαν συνήθως πολλαπλή ανθεκτικότητα.

<sup>R</sup>: ανθεκτικό, <sup>MR</sup>: μέτριας ανθεκτικότητας, <sup>HR</sup>: υψηλής ανθεκτικότητας.

Ο αριθμός των προσβολών από ανθεκτικούς φαινότυπους αυξήθηκε περαιτέρω κατά τα επόμενα 2 έτη πειραματισμού αν και έγινε μόνο μία επέμβαση με κάθε μυκητοκτόνο κατ' έτος (Πίνακας 10). Ένα υψηλό ποσοστό φαινοτύπων ήταν ανθεκτικό στο carbendazim αν και αυτό το μυκητοκτόνο δεν είχε συμπεριληφθεί στα προγράμματα ψεκασμών (Διάγραμμα 9). Σχεδόν όλοι οι φαινότυποι οι οποίοι ήταν ανθεκτικοί στο fenhexamid παρουσίασαν ανθεκτικότητα και σε τουλάχιστον άλλες τρεις ομάδες μυκητοκτόνων με διαφορετικό τρόπο δράσης. Ανάμεσα στους τέσσερεις πιο συχνούς φαινότυπους που εντοπίστηκαν στο χώρο του θερμοκηπίου ήταν οι QoI<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> και Hyd<sup>R</sup>QoI<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MR</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>. Οι φαινότυποι αυτοί αυξήθηκαν ραγδαία μέσα σε χρονικό διάστημα τριών ετών από την πρώτη καταγραφή τους και τελικά επικράτησαν στον πληθυσμό του παθογόνου (Διάγραμμα 9). Αντίθετα το ποσοστό των φαινοτύπων 'άγριου τύπου' μειώθηκε από 43 σε 6 %.

Σε συχνότητες μικρότερες από 8 % ανιχνεύθηκαν διάφοροι φαινότυποι που εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε δύο έως τέσσερις διαφορετικές ομάδες μυκητοκτόνων (Hyd<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, Qol<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, Qol<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>, Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Ben<sup>MR</sup>Dic<sup>MR</sup>, Phen<sup>MR</sup>Dic<sup>MR</sup>, Hyd<sup>R</sup>Dic<sup>MR</sup>, Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>), ενώ σε συχνότητα <1 % βρέθηκαν 5 φαινότυποι ανθεκτικοί μόνο σε μία ομάδα μυκητοκτόνων (Hyd<sup>R</sup>, Ani<sup>R</sup>, Ben<sup>HR</sup>, Ben<sup>MR</sup>, Dic<sup>MR</sup>). Οι φαινότυποι που εμφάνιζαν και μέτρια ανθεκτικότητα στο fludioxonil (Phen<sup>MR</sup>) ήταν συνολικά τρεις: Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MR</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MR</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> και Phen<sup>MR</sup>Dic<sup>MR</sup>. Η ανθεκτικότητα αυτή συνυπήρχε πάντα με μέτρια ανθεκτικότητα στο iprodione (Dic<sup>MR</sup>) αλλά όχι και το αντίστροφο. Σε καμία απομόνωση δεν διαπιστώθηκε μείωση της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα fluazinam και chlorothalonil.



**Διάγραμμα 9.** Προσδιορισμός των πιο συχνά εμφανιζόμενων φαινοτύπων σε προσβεβλημένα μαρούλια πειραματικής υδροπονικής καλλιέργειας κατά τη διάρκεια τριών διαδοχικών ετών δειγματοληψίας. Ο έλεγχος ευαισθησίας διεξήχθη στα μυκητοκτόνα fenhexamid (Hyd), pyraclostrobin (Qol's), boscalid (Bos), cyprodinil (Ani), fludioxonil (Phen), carbendazim (Ben), iprodione (Dic), chlorothalonil (Chlo) και fluazinam (Flu). Δύο φαινότυποι πολλαπλής ανθεκτικότητας (Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MR</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>) τελικά επικράτησαν ενώ τα άγριου τύπου στελέχη μειώθηκαν σημαντικά.

<sup>R</sup>: ανθεκτικό, <sup>MR</sup>: μέτριας ανθεκτικότητας, <sup>HR</sup>: υψηλής ανθεκτικότητας.

Στον Άγιο Γεώργιο Ημαθίας οι περισσότερες απομονώσεις που εξετάστηκαν ήταν άγριου τύπου σε ποσοστό 69 % (Διάγραμμα 10Α). Τη δεύτερη θέση στην κατανομή του πληθυσμού κατείχε σε ποσοστό 19 % ο φαινότυπος με υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα (carbendazim) αν και τα

μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής δεν χρησιμοποιούνται σε καλλιέργειες μαρουλιού για την καταπολέμηση του βοτρυτή. Σε χαμηλότερα ποσοστά ωστόσο (<5.6 %) βρέθηκαν και τρεις φαινότυποι οι οποίοι εμφάνισαν ανθεκτικότητα στις ομάδες των QoIs και SDHIs μυκητοκτόνων ενώ μία απομόνωση βρέθηκε ανθεκτική στο fenhexamid (Διάγραμμα 10Α).

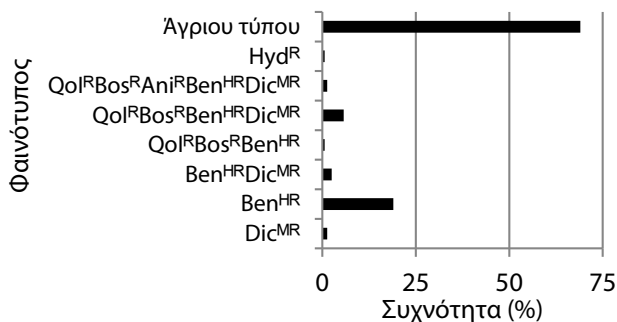
Στην περιοχή της Πελοποννήσου εξετάστηκαν δείγματα από δύο περιοχές. Από την περιοχή της Κυπαρισσίας όλες οι απομονώσεις βρέθηκαν να είναι άγριου τύπου (Διάγραμμα 10Β). Στα Λεχαινά οι ανθεκτικές απομονώσεις του παθογόνου ήταν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50 % του δείγματος. Συνολικά ανευρέθηκαν τρεις φαινότυποι που εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε 4 έως 6 διαφορετικές ομάδες μυκητοκτόνων (Διάγραμμα 10Β). Μεταξύ των φαινοτύπων πολλαπλής ανθεκτικότητας ανιχνεύθηκαν και απομονώσεις με υψηλή ανθεκτικότητα στο fenhexamid (Hvd<sup>R</sup>) και στα ανιλινοπυριμιδικά μυκητοκτόνα cyprodinil και pyrimethanil (Ani<sup>R</sup>).

Στις απομονώσεις που εξετάστηκαν από τις περιοχές του Αϊδινίου Μαγνησίας και Κεφαλόβρυσου Τρικάλων της περιφέρειας Θεσσαλίας διαπιστώθηκε ότι οι περισσότερες απομονώσεις ήταν άγριου τύπου (>75 %). Κυρίαρχοι ανθεκτικοί φαινότυποι ήταν αυτοί που εμφάνισαν υψηλή και μέτρια ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα και στις δυο περιοχές. Επιπλέον, στην περιοχή των Τρικάλων ανιχνεύθηκαν σε χαμηλές συχνότητες (3 %) φαινότυποι με διπλή ανθεκτικότητα στις στρομπιλουρίνες (QoIs) και στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα ή μόνο στις ανιλινοπυριμιδίνες (Διάγραμμα 10Γ).

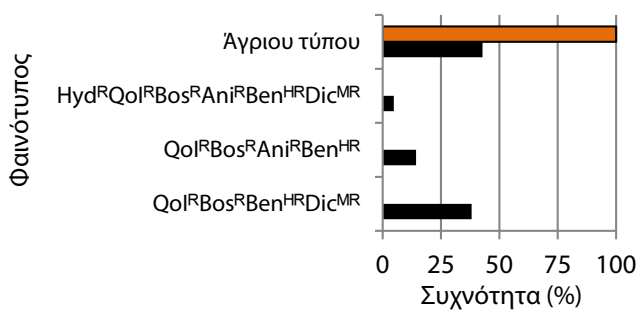
Όλες οι απομονώσεις οι οποίες ελήφθησαν κατά την περίοδο 1993-1997 από κηπευτικά υπό κάλυψη της ευρύτερης περιοχής της Κρήτης βρέθηκαν ευαίσθητες στα μυκητοκτόνα fenhexamid, pyraclostrobin, boscalid, fluazinam και chlorothalonil. Οι περισσότερες από αυτές τις απομονώσεις ωστόσο ήταν ανθεκτικές στο carbendazim (Ben<sup>HR</sup> ή Ben<sup>MR</sup>) και στο iprodione (Dic<sup>MR</sup>). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το 13 % αυτών των απομονώσεων βρέθηκε να είναι ανθεκτικό στο cyprodinil (Ani<sup>R</sup>) ενώ το 6 % βρέθηκε να είναι μετρίως ανθεκτικό στο fludioxonil (Phen<sup>MR</sup>). Δεν βρέθηκε καμία απομόνωση με διπλή ανθεκτικότητα στις ανιλινοπυριμιδίνες και στις φαινυλοπυρρόλες. Οι ανθεκτικές στο fludioxonil απομονώσεις παρουσίαζαν πάντοτε και ανθεκτικότητα στο iprodione (Διάγραμμα 10Δ).



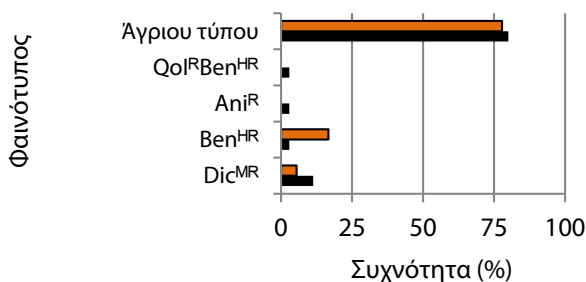
### Άγιος Γεώργιος (Ημαθία)



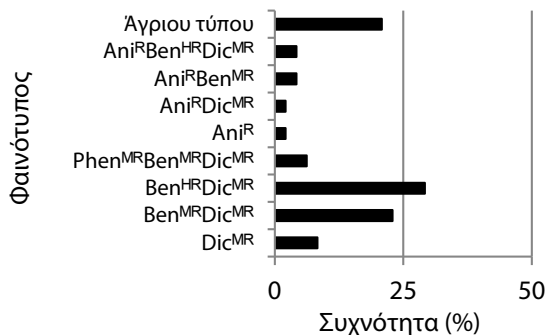
### Κυπαρισσία (Μεσσηνία) ■ Λεχαινά (Ηλεία)



### ■ Αϊδίνι (Μαγνησία) ■ Κεφαλόβρυσσο (Τρίκαλα)



### ■ Κρήτη



**Διάγραμμα 10.** Ποσοστιαία κατανομή φαινοτύπων *B. cinerea* σε έξι διαφορετικές θέσεις δειγματοληψίας:

**A** υπαίθρια καλλιέργεια μαρουλιού (έτος δειγματοληψίας 2012),

**B** υπαίθρια καλλιέργεια μαρουλιού (έτος δειγματοληψίας 2012),

**Γ** υπό κάλυψη και υπαίθρια καλλιέργεια μαρουλιού (έτος δειγματοληψίας 2009),

**Δ** καλλιέργειες κηπευτικών (περίοδος δειγματοληψίας 1993-1997).

Η ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα fenhexamid (Hyd), pyraclostrobin (Qol), boscalid (Bos), cyprodinil (Ani), fludioxonil (Phen), carbendazim (Ben) και iprodione (Dic) προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της σημειακής εναπόθεσης σποριών σε θρεπτικά υποστρώματα εμπλουτισμένα με μυκητοκτόνα στη συγκέντρωση διαχωρισμού για κάθε περίπτωση.

R: ανθεκτικό,

MR: μέτριας ανθεκτικότητας,

HR: υψηλής ανθεκτικότητας.

## Συζήτηση

Η έρευνα που έγινε σε καλλιέργειες μαρουλιού από 5 διαφορετικές θέσεις δειγματοληψίας κατέδειξε ένα μεγάλο αριθμό προσβολών να προκαλούνται από ανθεκτικά στελέχη του παθογόνου. Σε πειραματική καλλιέργεια σε συνθήκες θερμοκηπίου, όπου η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας ευνοήθηκε εξαιτίας της ισχυρής πίεσης μολύσματος και των εφαρμογών με μυκητοκτόνα, το 68 % των απομονώσεων βρέθηκε ανθεκτικό σε αρκετές ομάδες μυκητοκτόνων. Διαπιστώθηκε μια θετική συσχέτιση της συχνότητας ανίχνευσης φαινοτύπων πολλαπλής ανθεκτικότητας και του αριθμού των χημικών επεμβάσεων κατά την 3μηνη διάρκεια του πειράματος. Οι περισσότερες απομονώσεις εμφάνισαν ωστόσο διπλή ανθεκτικότητα: υψηλή στα βενζιμιδαζολικά και μέτρια στα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα. Φαίνεται ότι η ανθεκτικότητα αυτή που αναπτύχθηκε στη δεκαετία του 1970, εξακολουθεί να χαρακτηρίζει ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού του *B. cinerea*. Τέτοια στελέχη απαντούν με μεγάλη συχνότητα και σε καλλιέργειες κηπευτικών (Parras, 1997, Zhang *et al.*, 2010). Σε καλλιέργειες μαρουλιών στη Γερμανία διαπιστώθηκε σε υψηλή συχνότητα η ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών στα QoIs, SDHIs και δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα ενώ ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά διαπιστώθηκε σπανιότερα (Weber & Wichura, 2013).

Η ανθεκτικότητα του παθογόνου σε πολλές ομάδες μυκητοκτόνων με διαφορετικό τρόπο δράσης φαίνεται ότι είναι ένα φαινόμενο που εμφανίζει αύξηση τα τελευταία χρόνια (Myresiotis *et al.*, 2007, Weber, 2011, De Miccolis Angelini *et al.*, 2014). Η πλειονότητα των ανθεκτικών στο fenhexamid απομονώσεων βρέθηκαν επίσης ανθεκτικές στα QoIs, SDHIs, φαινυλοπυρρολικά, ανιλινοπυριμιδικά, βενζιμιδαζολικά και δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα. Η ετεροκαρυωτική σύνθεση των σποριών και των μυκηλιακών κυττάρων του *B. cinerea* πιθανότατα συνεισφέρει στον ανασυνδυασμό διαφορετικών γονιδίων που εμπλέκονται στην εμφάνιση ανθεκτικότητας. Φαίνεται ότι 1-2 ψεκασμοί είναι αρκετοί ώστε να επιλεχθούν φαινότυποι πολλαπλής ανθεκτικότητας που επιβιώνουν μέχρι την επόμενη καλλιεργητική περίοδο σε συνθήκες θερμοκηπίου. Κάτι ανάλογο αναφέρθηκε και στην περίπτωση ανθεκτικότητας στις ανιλινοπυριμιδίνες (Moyano *et al.*, 2004).

Σε αντίθεση με προηγούμενες έρευνες σε άλλες καλλιέργειες κηπευτικών στην Ελλάδα διαπιστώθηκε η ύπαρξη απομονώσεων *B. cinerea* με υψηλή ανθεκτικότητα στο fenhexamid (Myresiotis *et al.*, 2007). Οι φαινότυποι υψηλής ανθεκτικότητας στο fenhexamid (φαινότυπος Hyd<sup>R3+</sup>) θεωρούνται μεγάλης πρακτικής σημασίας στον αγρό καθώς αναστέλλουν τη δράση του μυκητοκτόνου με τροποποίηση της 3-κετορεδουκτάσης (Billard *et al.*, 2011). Τελευταία, η μεγάλη

εξάπλωση των στελεχών αυτών ύστερα από 3-6 εφαρμογές το έτος φαίνεται ότι αρχίζει να δημιουργεί πρόβλημα σε καλλιέργειες αμπέλου και μικρών φρούτων στη Γαλλία (Billard *et al.*, 2012), Γερμανία (Weber, 2010), Χιλή (Esterio *et al.*, 2011) και ΗΠΑ (Grabke *et al.*, 2013). Αντίθετα, έχει βρεθεί ότι το fenhexamid ήταν πολύ δραστικό κατά των χαμηλής ανθεκτικότητας φαινοτύπων Hyd<sup>R1</sup> και Hyd<sup>R2</sup> (Petit *et al.*, 2010). Έχει παρατηρηθεί ότι σε μία καλλιεργητική περίοδο οι συχνότητες των Hyd<sup>R3+</sup> στελεχών μπορούν να φτάσουν το 50 %. Εντούτοις, μακροπρόθεσμες μελέτες έδειξαν ότι τα πραγματικά ποσοστά κυμαίνονται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα (Billard *et al.*, 2011). Επιπλέον, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου, ποτέ δεν διαπιστώθηκε σημαντική μείωση στην αποτελεσματικότητα του fenhexamid στον αγρό. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε απώλεια της προσαρμοστικότητας των στελεχών αυτών, είτε στον περιορισμό των εφαρμογών σε 1-2 ανά καλλιεργητική περίοδο (Billard *et al.*, 2011, Billard *et al.*, 2012).

Απομονώσεις ανθεκτικές στα QoIs μυκητοκτόνα ανιχνεύθηκαν σχεδόν σε όλες τις υπαίθριες καλλιέργειες δειγματοληψίας σε χαμηλές συχνότητες. Η ανθεκτικότητα διαφόρων παθογόνων στα μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής αναπτύχθηκε δύο μόλις χρόνια από την εφαρμογή τους πράξη (Bartlett *et al.*, 2002). Η εφαρμογή των QoIs σε μίγματα με ουσίες διαφορετικού τρόπου δράσης (π.χ. boscalid) για τη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας, δεν είχε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Σε καλλιέργειες όπου εφαρμόστηκε το μίγμα boscalid+pyraclostrobin, σε σύντομο σχετικά χρονικό διάστημα, επιλέχθηκαν στελέχη που εμφάνιζαν διπλή ανθεκτικότητα στα δύο αυτά μυκητοκτόνα (Bardas *et al.*, 2010). Κατά τη διάρκεια του 3ετούς ελέγχου των προσβολών του παθογόνου στο θερμοκήπιο όπου διεξήχθη το πείραμα αγρού διαπιστώθηκε ότι ο κυρίαρχος φαινότυπος Hyd<sup>R</sup>QoI<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MR</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> που απομονώθηκε κατά το 1<sup>ο</sup> έτος αντικαταστάθηκε σταδιακά από τον Hyd<sup>R</sup>QoI<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MR</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> στις δύο επόμενες καλλιεργητικές περιόδους. Φαίνεται ότι η ανθεκτικότητα στο boscalid (Bos<sup>R</sup>) επιλέχθηκε πιθανότατα εξαιτίας των εφαρμογών με το αντίστοιχο μυκητοκτόνο. Η εκτεταμένη χρήση του fenhexamid και των μιγμάτων boscalid+pyraclostrobin και fludioxonil+cyprodinil σε καλλιέργειες 'μικρών φρούτων' οδήγησε στην επιλογή φαινοτύπων πολλαπλής ανθεκτικότητας σε αυτά τα μυκητοκτόνα πιθανότατα εξαιτίας του αυξημένου αριθμού επεμβάσεων. Η εμφάνιση υψηλής ανθεκτικότητας στα QoIs ήταν παρούσα σε όλους σχεδόν αυτούς τους φαινοτύπους (Weber, 2011, Veloukas *et al.*, 2011, Amiri *et al.*, 2013).

Οι Myresiotis *et al.* (2007) διαπίστωσαν την ύπαρξη ανθεκτικών στις ανιλνοπυριμιδίνες στελεχών (Ani<sup>R</sup>) του *B. cinerea* σε κηπευτικά υπό κάλυψη στην περιοχή της Κρήτης. Στην παρούσα έρευνα διαπιστώθηκε η ύπαρξη ανθεκτικότητας

ακόμα και σε απομονώσεις οι οποίες είχαν περισυλλεχθεί από περιοχές της Κρήτης πριν την κυκλοφορία των μυκητοκτόνων αυτών στην Ελλάδα. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η ανθεκτικότητα αναπτύχθηκε από επιλογή ανθεκτικού πληθυσμού ο οποίος προϋπήρχε σε χαμηλά ποσοστά. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τα ευρήματα των Moγano *et al.* (2004) οι οποίοι διαπίστωσαν την ύπαρξη ανθεκτικού πληθυσμού σε περιοχές όπου δεν είχαν γίνει ποτέ εφαρμογές με ανιλινοπυριμιδινικά μυκητοκτόνα. Τα Ani<sup>R</sup> στελέχη απομονώθηκαν σε χαμηλά ποσοστά από τις υπαίθριες καλλιέργειες μαρουλιού, αλλά έφτασαν το 80 % στο χώρο του θερμοκηπίου ύστερα από μία μόλις εφαρμογή με cyrodinil.

Το 15 % των απομονώσεων *B. cinerea* από μαρούλια του πειραματικού θερμοκηπίου εμφανίστηκε μετρίως ανθεκτικό στο φαινυλοπυρρολικό μυκητοκτόνο fludioxonil. Όπως και στην περίπτωση των ανιλινοπυριμιδινικών μυκητοκτόνων, στελέχη Phen<sup>MR</sup> ανιχνεύτηκαν σε απομονώσεις από καλλιέργειες κηπευτικών πριν την εμπορική χρήση του μυκητοκτόνου στην Ελλάδα. Σε όλες αυτές τις απομονώσεις η ανθεκτικότητα στο fludioxonil συνδυαζόταν με ανθεκτικότητα στο iprodione. Με την εξαίρεση μιας απομόνωσης, τα Phen<sup>MR</sup> στελέχη που ανιχνεύτηκαν σε προσβεβλημένα φυτά της πειραματικής καλλιέργειας μαρουλιού παρουσίαζαν και υψηλή ανθεκτικότητα στο fenhexamid. Η διπλή ανθεκτικότητα στο fludioxonil και στις ανιλινοπυριμιδίνες ως μέρος της πολλαπλής ανθεκτικότητας που χαρακτηρίζει αυτά τα στελέχη του *B. cinerea* αποτελεί ένδειξη της παρουσίας του μηχανισμού πολλαπλής ανθεκτικότητας MDR, παράλληλα με τους πολυμορφισμούς που προσδίδουν υψηλή ανθεκτικότητα σε κάθε ομάδα μυκητοκτόνων χωριστά (Leroch *et al.*, 2013). Τέτοιοι φαινότυποι ανιχνεύονται σπάνια στον αγρό (Billard *et al.*, 2011).

Στα μυκητοκτόνα fluazinam και chlorothalonil δεν ανιχνεύθηκαν ανθεκτικά στελέχη. Τα μυκητοκτόνα ήταν ιδιαίτερα δραστικά *in vitro* εναντίον όλων των απομονώσεων που αναλύθηκαν. Ανθεκτικότητα μετά από εκτεταμένη χρήση του fluazinam έχει παρατηρηθεί μόνο μία φορά σε καλλιέργεια φασολιού στην Ιαπωνία (Tamura, 2000), ενώ έχει καταγραφεί και μικρή μείωση ευαισθησίας σε αμπέλι στο Ισραήλ (Korolev *et al.*, 2011). Η μη ανίχνευση ανθεκτικών στο fluazinam στελεχών πιθανότατα να έχει σχέση με τον περιορισμό της χρήσης του σε καλλιέργειες αμπέλου και πατάτας στην Ελλάδα. Από την άλλη, η κύρια δράση του chlorothalonil στη βλάστηση των σπορίων παρεμπόδιζε εν συνεχεία οποιαδήποτε ανάπτυξη της αποικίας στις δοκιμές της σημειακής εναπόθεσης σπορίων. Η μειωμένη δράση του μυκητοκτόνου αυτού στο στάδιο ανάπτυξης του μυκηλίου φαίνεται ότι δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητά του κατά του βοτρώτη στον αγρό (Zhang *et al.*, 2009).

Συμπερασματικά, έχει γίνει αποδεκτό ότι τα πολυθεσικά μυκητοκτόνα όπως είναι το chlorothalonil έχουν διατηρήσει την αποτελεσματικότητά τους παρά την εκτεταμένη εφαρμογή τους στην πράξη εδώ και αρκετές δεκαετίες (Brent & Hollomon, 2007). Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας διαπιστώθηκε ότι απομονώσεις του *B. cinerea* με πολλαπλή ανθεκτικότητα σε αρκετές ομάδες μυκητοκτόνων υπάρχουν σε καλλιέργειες μαρουλιού διαφορετικών περιοχών της χώρας. Τέτοιες απομονώσεις ανιχνεύθηκαν εύκολα σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια μαρουλιού, ύστερα από 1-3 εφαρμογές με μυκητοκτόνα ανά καλλιεργητική περίοδο. Διαπιστώθηκε η ύπαρξη ανθεκτικότητας σε απομονώσεις αγρού στα ανιλνοπυριμιδινικά και φαινυλοπυρρολικά μυκητοκτόνα πριν από την εφαρμογή τους στην πράξη στην Ελλάδα. Η ανθεκτικότητα στο fludioxonil συνδεόταν πάντοτε με την ανθεκτικότητα στο iprodione, αλλά όχι το αντίθετο. Στελέχη ανθεκτικά σε επτά διαφορετικές ομάδες μυκητοκτόνων ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά σε καλλιέργειες κηπευτικών. Πάντως όλες οι απομονώσεις που αναλύθηκαν χαρακτηρίστηκαν ευαίσθητες στο fluazinam και στο chlorothalonil.

**ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ B.  
CINEREA ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ IN SITU**

---

## Εισαγωγή

Η απώλεια της δραστικότητας των μυκητοκτόνων στον αγρό οδήγησε στην ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων για τον έλεγχο της ευαισθησίας. Οι μέθοδοι αυτές διασφαλίζουν ότι οι δραστικές ουσίες θα είναι αποτελεσματικές για εύλογο χρονικό διάστημα χωρίς τον άμεσο κίνδυνο απόσυρσής τους από την εφαρμογή στην πράξη, γεγονός που θα αποτελούσε πλήγμα για τις επενδύσεις στο χώρο της φυτοπροστασίας. Αυτός ο κίνδυνος επισημάνθηκε νωρίς (δεκαετία του 1980) από τους Ευρωπαϊκούς ρυθμιστικούς οργανισμούς FRAC και EPPO, οι οποίοι μέσα από δοκιμές διασφαλίζουν ότι η εφαρμογή των νέων ουσιών στην πράξη γίνεται με στρατηγικές διαχείρισης της ανθεκτικότητας (Russell, 2004). Πολλές φορές οι δοκιμές ευαισθησίας διεξάγονται σε μεταλλαγμένα στελέχη των παθογόνων, ώστε να γίνει μια αρχική εκτίμηση για την ενδεχόμενη απώλεια της δραστικότητας των μυκητοκτόνων πριν από την εκτεταμένη, πρακτικής σημασίας εμφάνιση ανθεκτικότητας στον αγρό (Ziogas *et al.*, 2003, Ziogas *et al.*, 2005, Lalève *et al.*, 2014). Ανάλογα με τον τρόπο δράσης των μυκητοκτόνων έχουν αναπτυχθεί κατάλληλες μέθοδοι ελέγχου της ευαισθησίας. Για παράδειγμα η μικρή δραστικότητα του *terpaniryrim in vitro* οδήγησε στην ανάπτυξη μιας αξιόπιστης μεθόδου ελέγχου της ευαισθησίας του *in vivo*. Οι βιοδοκιμές *in vivo* εφαρμόζονται για την επαλήθευση των επιπέδων ευαισθησίας που βρέθηκαν *in vitro* και επιπλέον για τη διερεύνηση της ικανότητας του παθογόνου να προκαλέσει μόλυνση (Birchmore & Forster, 1996). Σκοπός αυτού του κεφαλαίου ήταν: α) η διερεύνηση της παθογόνου ικανότητας απομονώσεων πολλαπλής ανθεκτικότητας του *B. cinerea* και β) η αποτελεσματικότητα σύγχρονων μυκητοκτόνων στην ανάπτυξη της μόλυνσης. Τα πειράματα έγιναν σε φύλλα μαρουλιού *in situ*.

## Υλικά και μέθοδοι

Τον Οκτώβριο του 2011 πραγματοποιήθηκε σπορά και ανάπτυξη 66 φυτών μαρουλιού ποικιλίας Penelope RZ στο χώρο του θερμοκηπίου. Τα φυτά αναπτύχθηκαν μέχρι το στάδιο των επτά πραγματικών φύλλων στο σπορείο και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στο χώρο του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας όπου μεταφυτεύθηκαν σε μικρά γλαστράκια με υπόστρωμα τύρφης. Για ένα περίπου μήνα και μέχρι το στάδιο των 14 πραγματικών φύλλων τα φυτά αναπτύσσονταν σε θάλαμο ανάπτυξης (Sanyo MLR-350HT) με φωτοπερίοδο 10:14 και θερμοκρασία 18 °C. Τα φυτά αρδεύονταν όποτε κρίνονταν απαραίτητο ενώ έγινε και λίπανση με σύνθετο λίπασμα του τύπου 12-12-17.

Για το σκοπό του πειράματος αυτού χρησιμοποιήθηκαν φύλλα μέσης ηλικίας. Τα φύλλα απολυμάνθηκαν κατόπιν εμβάπτισης κατά σειρά: σε απόλυτο αιθυλική αλκοόλη (EtOH) για 5 sec, υποχλωριώδες νάτριο 0.5 % (NaClO) για 2 min και απιονισμένο-αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O για 5 min. Ακολούθησε στέγνωμα των φύλλων με αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί για 30 min και εμβάπτιση σε υδατικό αιώρημα μυκητοκτόνων για 5 sec. Αφού τα φύλλα αφέθηκαν να στεγνώσουν σε διηθητικό χαρτί μεταφέρθηκαν σε τριβλία Petri (ø 9cm) που περιείχαν WA<sup>4</sup> (water agar) με την κάτω επιφάνεια σε επαφή με το υλικό. Οι δόσεις των μυκητοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι συνιστώμενες από τους παρασκευαστές (Πίνακας 11). Τα μυκητοκτόνα fludioxonil και cyprodinil εφαρμόστηκαν και στη μισή της συνιστώμενης δοσολογίας. Φύλλα που εμβαπτιζόνταν μόνο σε αποστειρωμένο-απιονισμένο νερό χρησιμοποιούνταν ως μάρτυρες.

Ως μόλυσμα χρησιμοποιήθηκαν απομονώσεις του *B. cinerea* που εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα (Πίνακας 11). Η μόλυνση των φύλλων έγινε είτε με αιώρημα σπορίων συγκέντρωσης  $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  είτε με δίσκο μυκηλίου όπως περιγράφηκε προηγουμένως (κεφάλαιο 'Έλεγχος αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνων in vitro'). Η αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων αξιολογήθηκε με μέτρηση της διαμέτρου ανάπτυξης της κηλίδας προσβολής του παθογόνου μετά από 3 (μόλυσμα μυκηλίου) και 6 μέρες (μόλυσμα σπορίων) επώασης, αντίστοιχα, σε θερμοκρασία 18 °C και φωτισμό 10 h. Για κάθε περίπτωση έγιναν τρεις επαναλήψεις.

Για την εύρεση διαφορών μεταξύ των επεμβάσεων/απομονώσεων εφαρμόστηκε η παραμετρική δοκιμή ανάλυσης της διακύμανσης (one-way ANOVA) σε συνδυασμό με τη δοκιμή Tukey's (Tukey's Honestly Significant Difference test). Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πακέτο SPSS (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0).

## Αποτελέσματα

Η μόλυνση με σπόρια στις περισσότερες περιπτώσεις (55 %) δεν ήταν επιτυχής. Έπειτα από 8 μέρες επώασης εμφανιζόταν συνήθως ανοιχτόχρωμα καστανά στίγματα κάτω από τη σταγόνα μόλυνσης, ενώ σε μερικές περιπτώσεις παρατηρήθηκε κανονική ανάπτυξη της κηλίδας προσβολής. Σε καμία περίπτωση τα αποτελέσματα της μόλυνσης από αιώρημα σπορίων δεν ήταν αντιπροσωπευτικά των απομονώσεων/μυκητοκτόνων, καθώς οι διακυμάνσεις στην ανάπτυξη της κηλίδας προσβολής ήταν πολύ μεγάλες. Μεταξύ ιδίων μεταχειρίσεων οι διαφορές

<sup>4</sup> Η παρασκευή του WA έγινε με την προσθήκη 15 g άγαρ (agar for Microbiology, Sigma-Aldrich) σε 1 L H<sub>2</sub>O. Το υλικό αποστειρώθηκε και κατανεμήθηκε σε τριβλία Petri.



στη διάμετρο της κηλίδας κυμαινόταν από 0 έως 15 mm. Επομένως, πιο αξιόπιστη μέθοδος θεωρήθηκε η μόλυνση των φύλλων με μυκηλιακό δίσκο και στη συνέχεια η μέτρηση των διαστάσεων της αναπτυχθείσας κηλίδας προσβολής.

Τέσσερις απομονώσεις (CR-32, A-59, Leh-23, C-14) χαρακτηρισμένες ως ανθεκτικές στο fenhexamid *in vitro* σχημάτισαν κηλίδα προσβολής στα φύλλα μαρουλιού που είχαν δεχθεί επέμβαση με αυτό το μυκητοκτόνο παρόμοια με εκείνη του μάρτυρα (Εικόνα 23). Ακόμα και μεταξύ των απομονώσεων, που ανήκαν σε διαφορετικούς φαινοτύπους, η ανάπτυξη της κηλίδας προσβολής δεν διέφερε σημαντικά και κυμάνθηκε από 15.6 έως 21 mm (Πίνακας 11). Αντίθετα, όλες οι απομονώσεις που είχαν χαρακτηριστεί ως ευαίσθητες στο fenhexamid *in vitro* είτε απέτυχαν να προκαλέσουν μόλυνση, είτε δημιούργησαν περιορισμένης ανάπτυξης κηλίδα με σημαντική διαφορά από την αντίστοιχη του μάρτυρα (Πίνακας 11).

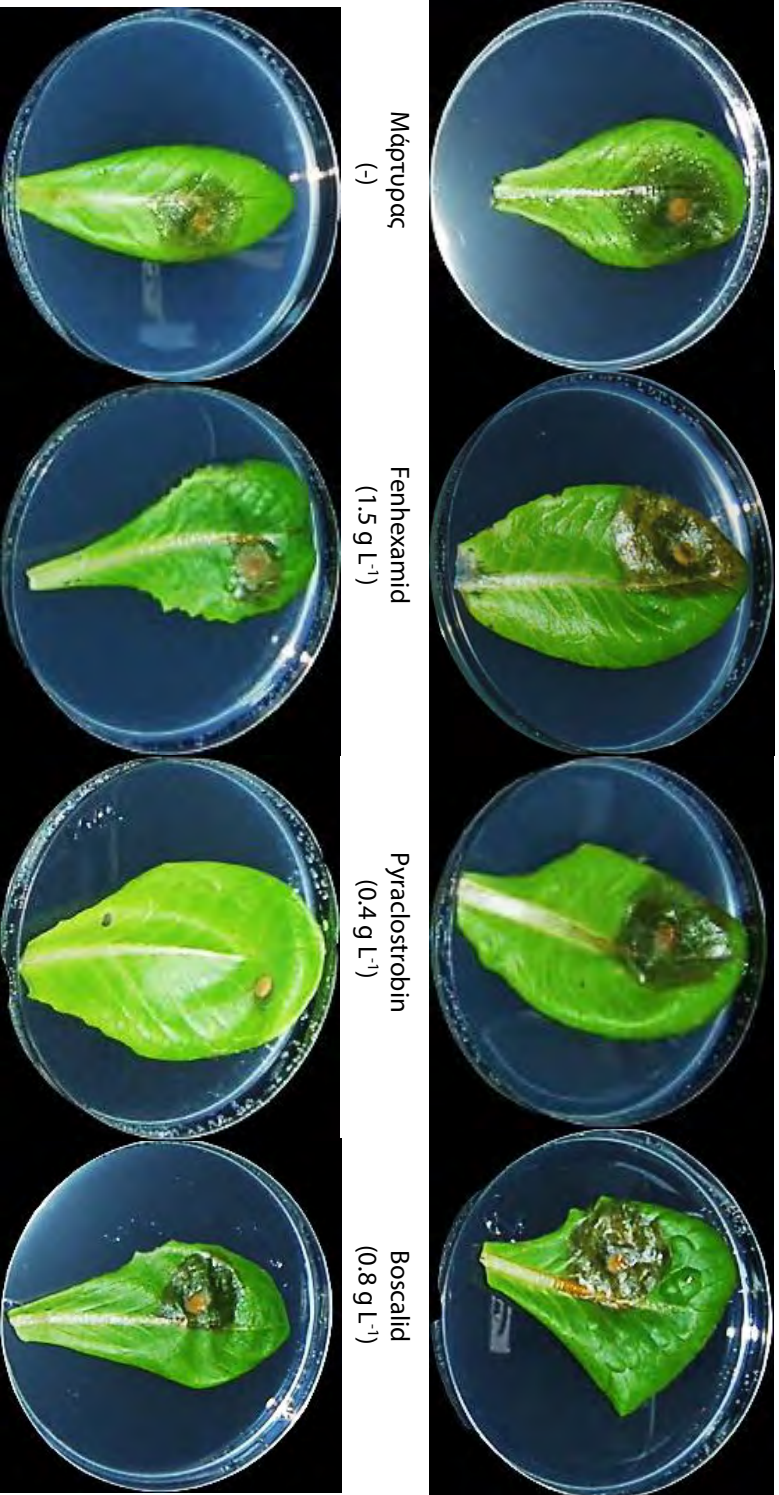
Το pyraclostrobin απέτυχε να παρεμποδίσει τη μόλυνση από τις απομονώσεις (CR-32, A-59, Leh-23, C-14, C-01, Leh-03, B-18) που είχαν χαρακτηριστεί ως ανθεκτικές στα QoIs μυκητοκτόνα (Εικόνα 23). Η ανάπτυξη της κηλίδας προσβολής ήταν παρόμοια με αυτή του μάρτυρα. Και σ' αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη κηλίδας προσβολής μεταξύ των φαινοτύπων (Πίνακας 11). Αντίθετα, το pyraclostrobin αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματικό κατά των ευαίσθητων στα QoIs απομονώσεων B-58 και A-56 περιορίζοντας κατά πολύ την κηλίδα προσβολής σε σχέση με το μάρτυρα (Πίνακας 11).

Το boscalid εμφανίστηκε τελείως αναποτελεσματικό κατά πέντε απομονώσεων (CR-32, Leh-23, C-01, Leh-03, B-18) οι οποίες προηγουμένως είχαν χαρακτηριστεί ως ανθεκτικές *in vitro* στο μυκητοκτόνο αυτό (Εικόνα 23). Στη συνιστώμενη από το παρασκευαστή δοσολογία του boscalid που περιέχεται στο μίγμα με το pyraclostrobin (Signum) η κηλίδα προσβολής ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις μεγαλύτερη από του μάρτυρα (Πίνακας 11). Δύο απομονώσεις (A-59, C-14) αν και είχαν χαρακτηριστεί ευαίσθητες *in vitro* στο boscalid, ανέπτυξαν κηλίδα προσβολής περίπου κατά το ήμισυ εκείνης του μάρτυρα. Κατά της άγριου τύπου A-56 και της ευαίσθητης B-58 απομόνωσης το μυκητοκτόνο ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικό αφού παρεμπόδισε πλήρως την ανάπτυξη κηλίδας προσβολής (Πίνακας 11).

**Πίνακας 11.** Έλεγχος παθογένειας απομονώσεων *B. cinerea* διαφορετικών φαινοτύπων και αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνων *in situ*<sup>1</sup>.

Απομ.	Διάμετρος κηλίδας προσβολής (mm)								Μάρτυρας						
	Fenhexamid 1.5 g <sup>2</sup>	Pyraclostrobin 0.4 g	Boscalid 0.8 g	Cyprodinil		Fludioxonil		Fluazinam 0.4 ml		Chlorothalonil 2.5 ml					
				0.375 g	0.75 g	0.25 g	0.5 g								
CR-32 <sup>3</sup>	21.0BCD <sup>b4</sup>	(R) <sup>5</sup>	19.8BC <sub>0</sub>	(R)	18.4Bc	20.2BCDd	(R)	17.4Bc	11.6AB <sub>0</sub>	(MR)	6.4Aa	(S)	18.2B <sub>0</sub>	(S)	23.8CDc
A-59	15.6Bb	(R)	10.6Bab	(S)	14.6B <sub>0</sub> b	13.4B <sub>0</sub> b	(R)	15.4Bc	10.4B <sub>0</sub>	(MR)	1.4Aa	(S)	2.6Aa	(S)	18.0Babc
Leh+23	16.0Bb	(R)	22.0B <sub>0</sub> bcd	(R)	16.6B <sub>0</sub> b	18.6B <sub>0</sub> cd	(R)	4.0A <sub>0</sub> ab	6.6A <sub>0</sub>	(S)	0.0Aa	(S)	2.0Aa	(S)	19.4Bbc
C-14	19.6Bb	(R)	9.4ABab	(S)	19.6Bc	20.0Bd	(R)	9.6AB <sub>0</sub> bc	4.6A <sub>0</sub>	(S)	2.6Aa	(S)	14.6B <sub>0</sub>	(S)	22.6Bc
C-01	0.0Aa	(S)	27.0Ed	(R)	9.4BCab	16.6CDEcd	(R)	4.6ABab	0.0Aa	(S)	2.6ABa	(S)	3.4ABa	(S)	20.0DEbc
Leh-03	0.0Aa	(S)	13.4Bb	(R)	2.9Aa	2.6Aa	(S)	0.0Aa	0.0Aa	(S)	0.0Aa	(S)	2.2Aa	(S)	14.6Bab
B-18	6.6ABCa	(S)	21.4Deb	(R)	22.6Ec	11.4BCbc	(R)	8.8Bbc	4.0A <sub>0</sub> α	(S)	2.6Aa	(S)	5.4ABa	(S)	19.4DEbc
B-58	2.0Aa	(S)	3.2Aa	(S)	4.8Aa	5.2A <sub>0</sub> ab	(S)	9.4Bbc	5.8ABa	(MR)	2.6Aa	(S)	3.6ABa	(S)	12.6Ba
A-56	3.0Aa	(S)	4.6Aa	(S)	5.4Aa	5.6A <sub>0</sub> ab	(S)	2.6Ab	2.0Aa	(S)	5.4Aa	(S)	2.6Aa	(S)	15.4Bab

<sup>1</sup> Μόλυση με δίσκο μικηλίου.<sup>2</sup> Δοσολογία εμφάνισης (σε L<sup>-1</sup>). Τα σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: fenhexamid ως Teldor 50 WG (Bayer CropScience), pyraclostrobin ως F500 25 EC (Syngenta Ltd.), boscalid ως 510F 50 WG (BASF SE), cyprodinil ως Chorus 50 WG (Syngenta Crop Protection AG), fludioxonil ως Geoxe 50 WG (Syngenta Crop Protection AG), fluazinam ως Ohayo 50 SC (ISK Biosciences Europe S.A), chlorothalonil ως Daconil 500 SC (Syngenta Ltd.).<sup>3</sup> Φαινότυποι: **CR-32**=Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>SP</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MR</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, **A-59**=Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MR</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, **Leh-23**=Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, **C-14**=Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, **C-01**=Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, **Leh-03**=Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, **B-18**=Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Dic<sup>MR</sup>, **B-58**=Phen<sup>MR</sup>Dic<sup>MR</sup>, **A-56**=άγριου τύπου.<sup>4</sup> Τιμές που ακολουθούνται από διαφορετικά έντονα κεφαλαία γράμματα στις σειρές και μικρά στις στήλες διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο 0.05 σύμφωνα με την δοκιμή Tukey's HSD.<sup>5</sup> Χαρακτηρισμός ευαισθησίας *in vitro*: R=ανθεκτική, MR=μετριαώς ανθεκτική, S=ευαίσθητη.



**Εικόνα 23.** Ανάπτυξη κηλίδας προσβολής του *B. cinerea* σε φύλλα μαρουλιού εμβλαπτιζόμενα σε μυκητοκτόνα, που μοιάθηκαν με την πολλαπλής ανθεκτικότητας απομόνωση CR-32.

Από τα ανιλνοπυριμιδινικά μυκητοκτόνα χρησιμοποιήθηκε το cyprodinil στις δυο δοσολογίες που εφαρμόστηκε και στα πειράματα καταπολέμησης. Επί συνόλου έξι χαρακτηρισμένων ως ανθεκτικών στις ανιλνοπυριμιδίνες απομονώσεων (CR-32, A-59, LeH-23, C-14, C-01, B-18), οι τέσσερις σχημάτισαν κηλίδα προσβολής η οποία ελάχιστα διέφερε από εκείνη του μάρτυρα και στις δύο δοσολογίες που δοκιμάστηκαν (Πίνακας 11, Εικόνα 23). Όμως μία απομόνωση (C-01) ενώ προκάλεσε ήπια συμπτώματα προσβολής στη μισή δοσολογία cyprodinil, η ανάπτυξη της κηλίδας προσβολής δεν διέφερε σημαντικά από εκείνη του μάρτυρα στην περίπτωση της μεταχείρισης των φύλλων με τη διπλάσια δοσολογία του μυκητοκτόνου. Αντίθετα η B-18 απομόνωση στη δοσολογία με  $0.375 \text{ g L}^{-1}$  cyprodinil απέτυχε να παρεμποδίσει την ανάπτυξη της κηλίδας αλλά περιόρισε κατά το ήμισυ την ανάπτυξη στη δοσολογία  $0.75 \text{ g L}^{-1}$  σε σχέση με το μάρτυρα. Οι ευαίσθητες στις ανιλνοπυριμιδίνες απομονώσεις (LeH-03, B-58, A-56) αν και προκάλεσαν μόλυνση στα φύλλα που εμβαπτίστηκαν σε cyprodinil εντούτοις η ανάπτυξη κηλίδας προσβολής ήταν σημαντικά μικρότερη από αυτή του μάρτυρα και στις δύο δόσεις μυκητοκτόνου (Πίνακας 11).

Η δράση του fludioxonil κατά απομονώσεων που εμφάνιζαν μέτρια ανθεκτικότητα στο μυκητοκτόνο αυτό (CR-32, A-59, B-58) δεν ήταν πολύ ικανοποιητική (Εικόνα 23). Σε όλες τις περιπτώσεις αναπτύχθηκε κηλίδα προσβολής, αλλά μικρότερων διαστάσεων από αυτά του μάρτυρα. Οι κηλίδες προσβολής και στις δύο δόσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 5.8 και 17.4 mm ενώ ήταν σταθερά μικρότερες στη μεγαλύτερη δόση ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ) του μυκητοκτόνου (Πίνακας 11). Κατά των ευαίσθητων απομονώσεων η δράση του fludioxonil ήταν αρκετά ικανοποιητική ωστόσο παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των διαφόρων φαινοτύπων. Σε δύο απομονώσεις (C-14 και B-18) αύξηση της συγκέντρωσης από 0.25 σε  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  με fludioxonil οδήγησε σε μείωση στο μισό της κηλίδας προσβολής (Πίνακας 11).

Το fluazinam στη δοσολογία  $0.4 \text{ ml L}^{-1}$  ήταν αποτελεσματικό κατά όλων των φαινοτύπων του *B. cinerea* περιορίζοντας σημαντικά την ανάπτυξη κηλίδας προσβολής ή παρεμποδίζοντας πλήρως οποιαδήποτε ανάπτυξη (Εικόνα 23). Στις περισσότερες των περιπτώσεων το ίδιο αποτελεσματικό εμφανίσθηκε και το chlorothalonil. Το μυκητοκτόνο αυτό περιόρισε σημαντικά την ανάπτυξη κηλίδας προσβολής σε επτά απομονώσεις (διάμετρος κηλίδας  $<5.2 \text{ mm}$ ). Ωστόσο σε δύο περιπτώσεις (απομονώσεις CR-32 και C-14) η δράση του μυκητοκτόνου αυτού δεν ήταν ικανοποιητική καθώς η ανάπτυξη κηλίδας προσβολής δεν διέφερε σημαντικά από αυτή του μάρτυρα (Πίνακας 11, Εικόνα 23).

## Συζήτηση

Η ενεργοποίηση του μηχανισμού άμυνας των φυτών μαρουλιού με παραγωγή της *lettucenin A*, της κύριας φυτοαλεξίνης (Bennett *et al.*, 1994), φαίνεται ότι σχετίζεται με παρεμπόδιση της προσβολής από το *B. cinerea*. Η παρουσία της *lettucenin A* είναι μεγαλύτερη στα νεότερα μέρη του φυτού και τα καθιστά ανθεκτικά στη μόλυνση. Για τους λόγους αυτούς υπήρξε μεγάλη παραλλακτικότητα στην επιτυχία των μολύνσεων και την ανάπτυξη της προσβολής όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα αιώρημα σπορίων. Αντίθετα, όταν οι μολύνσεις έγιναν με δίσκους μυκηλίου (μεγάλη πίεση μολύσματος) η παραλλακτικότητα που παρατηρήθηκε μεταξύ των επαναλήψεων σε κάθε μεταχείριση ήταν αμελητέα.

Από τις δοκιμές αποτελεσματικότητας *in situ* του *fenhexamid* κατά ανθεκτικών φαινοτύπων εξάλλου διαφάνηκε ότι αυτό αδυνατεί να εμποδίσει την προσβολή και εξέλιξη της ασθένειας. Τρεις μελέτες σε παρόμοια πειράματα παθογένεσης με μεταλλαγμένα στελέχη κατέδειξαν την αδυναμία περιορισμού της εξέλιξης της ασθένειας. Πάντως διατυπώθηκε η άποψη ότι τα μεταλλαγμένα ανθεκτικά στο *fenhexamid* στελέχη παρουσιάζουν μειωμένη προσαρμοστικότητα (Ziogas *et al.*, 2003, Saito *et al.*, 2010, Billard *et al.*, 2012). Από τα πειράματα καταπολέμησης της ασθένειας στον αγρό της παρούσας εργασίας διαπιστώθηκε ότι η παρουσία φαινοτύπων με ανθεκτικότητα στο *fenhexamid* δεν επηρέασε σημαντικά την αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου. Οι Billard *et al.* (2012) θεωρούν ότι μείωση ή παύση των επεμβάσεων με το μυκητοκτόνο αυτό για κάποιες χρονιές, θα επιφέρει μείωση του πληθυσμού των ανθεκτικών στελεχών.

Οι δοκιμές παθογένειας έδειξαν μία έλλειψη αποτελεσματικότητας του *pyraclostrobin* κατά των ανθεκτικών στα QoIs φαινοτύπων. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ανάλογες μελέτες παθογένειας (Ishii *et al.*, 2009, Veloukas *et al.*, 2014). Τα αποτελέσματα πολλών ερευνών έδειξαν ότι οι απομονώσεις *B. cinerea* που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο *boscalid* είναι ταυτόχρονα ανθεκτικές και στα QoIs μυκητοκτόνα (Weber, 2011, Fernández-Ortuño *et al.*, 2012b, Weber & Wichura, 2013, Veloukas *et al.*, 2014). Οι Kim & Xiao (2011) απέτυχαν να διαπιστώσουν μείωση της προσαρμοστικότητας απομονώσεων με διπλή ανθεκτικότητα στα QoIs και SDHIs μυκητοκτόνα. Πάντως εντόπισαν μείωση στην ικανότητα σποριοποίησης σε δύο απομονώσεις από μήλα, ανθεκτικές στο *boscalid*, που δεν εμφάνιζαν διπλή ανθεκτικότητα (Kim & Xiao, 2010). Οι Amiri *et al.* (2013) διαπίστωσαν ότι μεταξύ των *Bos<sup>R</sup>* στελεχών που απομονώθηκαν σε καλλιέργεια φράουλας, ένα πολύ μικρό μέρος εμφάνιζε ανθεκτικότητα μόνο σε αυτό το μυκητοκτόνο. Το μεγαλύτερο μέρος εμφάνιζε είτε διπλή, είτε πολλαπλή ανθεκτικότητα στα QoIs, στις ανιλινοπυριμιδίνες

και στις υδροξυανιλίδες. Σε πειράματα παθογένειας, τα μυκητοκτόνα αυτά ήταν τελείως αναποτελεσματικά εναντίον αυτών των φαινοτύπων. Επίσης, από το ιστορικό των χημικών επεμβάσεων στον αγρό προέκυψαν χρήσιμα συμπεράσματα για την προέλευση της διπλής ανθεκτικότητας στα QoIs και SDHIs: α) σε περιοχές όπου εφαρμόστηκαν πρώτα τα QoIs για την καταπολέμηση κυρίως άλλων ασθενειών, οι απομονώσεις αγρού με ανθεκτικότητα στο boscalid μπορεί να προήλθαν από QoI<sup>R</sup> πληθυσμό, β) σε περιοχές όπου έγιναν επεμβάσεις με το μίγμα boscalid+pyraclostrobin, τα ανθεκτικά στελέχη επιλέχθηκαν ταυτόχρονα (Fernández-Ortuño *et al.*, 2012b, Amiri *et al.*, 2013). Ενδεχομένως αυτό να οφείλεται στο ότι ο τρόπος δράσης των μυκητοκτόνων αυτών εντοπίζεται στα μιτοχονδριακά συμπλέγματα II και III της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, τα οποία διασυνδέονται δομικά.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Myresiotis *et al.* (2008) το cyprodinil δεν παρεμπόδιζε την ανάπτυξη της ασθένειας από Ani<sup>R</sup> φαινοτύπους *in situ*. Επιπλέον, οι Fernández-Ortuño *et al.* (2012a) δεν παρατήρησαν καμία απώλεια της προσαρμοστικότητας των στελεχών αυτών σε πειράματα παθογένειας *in vivo*. Όμως τα Ani<sup>R</sup> στελέχη διαπιστώθηκε ότι επιλέχθηκαν ύστερα από εφαρμογή του μίγματος fludioxonil+cyprodinil σε καλλιέργεια φράουλας, ενώ δεν βρέθηκαν στελέχη ανθεκτικά στο fludioxonil. Η απουσία ταυτόχρονης ανθεκτικότητας των Ani<sup>R</sup> στελεχών στα fludioxonil, iprodione, cycloheximide και tolnaftate αποτελεί ένδειξη ότι η ανθεκτικότητα είναι ποιοτική και δεν εμπλέκεται ο μηχανισμός ανθεκτικότητας MDR (Fernández-Ortuño *et al.*, 2012a). Κάτι τέτοιο διαφάνηκε να υφίσταται και από την παρούσα έρευνα καθώς χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο τύποι (Ani<sup>R</sup> και Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MR</sup>) ανθεκτικών στελεχών. Η ανθεκτικότητα στις ανιλνοπυριμιδίνες ως μέρος της πολλαπλής ανθεκτικότητας που χαρακτηρίζει τα περισσότερα στελέχη του *B. cinerea* θέτει σε κίνδυνο τη χρήση των μυκητοκτόνων αυτών. Τα ανιλνοπυριμιδινικά μυκητοκτόνα από μόνα τους εφαρμόζονταν αποτελεσματικά παλαιότερα σε προγράμματα διαχείρισης ανθεκτικών στελεχών σε άλλες ομάδες μυκητοκτόνων (Petsikos-Panayotaru *et al.*, 2003). Αν και δεν επιδρούν σε ζωτικής σημασίας συστατικά των κυττάρων του παθογόνου, εντούτοις η σταθερότητα και η ικανότητα προσαρμογής των Ani<sup>R</sup> στελεχών σηματοδοτεί την ανάγκη προσεκτικής στρατηγικής διαχείρισης της ανθεκτικότητας (Bardas *et al.*, 2008).

Η ανάπτυξη κηλίδας προσβολής από τις Phen<sup>MR</sup> απομονώσεις στις δοκιμές *in situ* ήταν σαφώς μικρότερη του μάρτυρα. Οι Ziogas *et al.* (2005) διεξάγοντας πειράματα *in vitro* με μεταλλαγμένα στελέχη *B. cinerea* υψηλής ανθεκτικότητας στο fludioxonil διαπίστωσαν ότι διατήρησαν τη μολυσματική ικανότητα, όχι όμως και την ικανότητα ανταγωνισμού των άγριων στελεχών. Η ανθεκτικότητα απωλέσθη σε

ποσοστό 80 % μετά από 7 μεταφορές σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς μυκητοκτόνο. Η μέτρια ανθεκτικότητα στο fludioxonil ως μέρους πολλαπλής ανθεκτικότητας πιθανότατα σχετίζεται με τους MDR1 φαινοτύπους (Kretschmer *et al.*, 2009, Leroch *et al.*, 2013). Ενώ παλαιότερα υπήρχε μικρή αναφορά στην ύπαρξη τέτοιων φαινοτύπων (Moyano *et al.*, 2004) τελευταία εντοπίζονται όλο και συχνότερα (Petit *et al.*, 2011, Weber, 2011, Korolev *et al.*, 2011, Fernández-Ortuño *et al.*, 2013). Η ύπαρξη κόστους στην προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών και η ανίχνευση μόνο μετρίως ανθεκτικών στελεχών στον αγρό ενδέχεται να μην επηρεάσει δυσμενώς την αποτελεσματικότητα του fludioxonil στην πράξη (Billard *et al.*, 2011).

Το fluazinam ήταν ιδιαίτερα δραστικό εναντίον όλων των απομονώσεων που αναλύθηκαν. Μία μικρής ανάπτυξης κηλίδα προσβολής παρατηρήθηκε στις περισσότερες των περιπτώσεων, πιθανότατα εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης μυκητοκτόνου που χρησιμοποιήθηκε ( $0.4 \text{ ml L}^{-1}$ ) για τη διεξαγωγή των δοκιμών. Φαίνεται ότι η αποτελεσματικότητα του fluazinam κατά ανθεκτικών σε άλλα μυκητοκτόνα φαινοτύπων του *B. cinerea* έχει διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα (Kalamarakis *et al.*, 2000). Από την άλλη το chlorothalonil περιόρισε την ανάπτυξη κηλίδας προσβολής *in situ* των φαινοτύπων *B. cinerea* αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις. Το chlorothalonil ήταν αποτελεσματικό κατά της βλάστησης των σποριών *in vitro*, ωστόσο παρουσιάστηκε παραλλακτικότητα στις δοκιμές ανάπτυξης αποικίας. Γενικά μία τέτοια συμπεριφορά από πολυθεσικά μυκητοκτόνα είναι αναμενόμενη (Leroux, 2007). Η αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων αυτών στον αγρό έχει διατηρηθεί για αρκετά χρόνια, παρόλο που έχει διαπιστωθεί μειωμένη ευαισθησία ορισμένων στελεχών στο στάδιο της μυκηλιακής ανάπτυξης (Pappas & Elena, 1992, Zhang *et al.*, 2009). Πιθανή μείωση της αποτελεσματικότητας αναμένεται σε περιπτώσεις όπου το κύριο μόλυσμα για την προσβολή των φυτών είναι το μυκήλιο του παθογόνου (Pollastro *et al.*, 1996).

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου διαφάνηκε η αδυναμία πρόσφατα εισαχθέντων μυκητοκτόνων να εμποδίσουν την εξέλιξη της προσβολής *in situ* όταν το στέλεχος του *B. cinerea* έχει χαρακτηριστεί ως ανθεκτικό *in vitro*. Εντούτοις, το μυκητοκτόνο fluazinam βρέθηκε να είναι αποτελεσματικό εναντίον όλων των απομονώσεων του παθογόνου.

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ Β.  
CINEREA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ**

---



## Εισαγωγή

Με την ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών κατά τα τελευταία χρόνια φαίνεται ότι η σύγχρονη επιδημιολογία των ασθενειών των φυτών άρχισε να μελετάται με μεθόδους γενετικής και μοριακής βιολογίας των πληθυσμών (Dewey & Yohalem, 2007). Διάφορες τεχνικές που έχουν ως βάση την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση και τη διάγνωση υποσυνόλων όπως είναι τα είδη (Rigotti *et al.*, 2002, Rigotti *et al.*, 2006), τα υποείδη (Giraud *et al.*, 1999, Fournier *et al.*, 2002) καθώς και μικρότεροι πληθυσμοί (Moyano *et al.*, 2003a, Karchani-Balma *et al.*, 2008) ή μεμονωμένες απομονώσεις (Kerssies *et al.*, 1997) του γένους *Botrytis*. Γενικά, οι ευρύτερες πληθυσμιακές ομάδες (π.χ. σε επίπεδο είδους) προσδιορίζονται με ζεύγη εκκινητών που σχεδιάζονται από τυχαίες περιοχές γνωστής αλληλουχίας ενώ η διάκριση πιο μικρών πληθυσμιακά ομάδων βασίζεται είτε σε γνωστές γονοτυπικές διαφορές (Giraud *et al.*, 1999), είτε σε τυχαία ενισχυόμενα τμήματα πολυμορφικού DNA (Paplomatas *et al.*, 2004).

Η βάση της ανάπτυξης μοριακών δεικτών είναι οι διαφορές στην αλληλουχία των βάσεων του DNA μεταξύ αλληλομόρφων γονιδίων. Στην περίπτωση όπου υπάρχει διαφοροποίηση ενός μόνο νουκλεοτιδίου σε μία θέση της αλληλουχίας τμήματος DNA, τότε γίνεται αναφορά για την κατηγορία των SNPs μοριακών δεικτών. Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) είναι πολύ συχνός στο γένωμα των μυκήτων και μάλιστα είναι άμεσα συνδεδεμένος με περιπτώσεις υψηλής ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα (Leroux, 2007). Για την ανίχνευση των SNPs που συνδέονται με ανθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα απομονώσεων του *B. cinerea* έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές. Οι πιο κοινές περιλαμβάνουν ενίσχυση τμήματος του γονιδίου-στόχου με PCR και πέψη με ένζυμα περιορισμού. Παραλλαγές της μεθόδου αυτής είναι οι μέθοδοι PIRA-PCR και ένθετη PCR-RFLPs που αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση ανθεκτικότητας στα καρβοξαμιδικά, βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμιδικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα (Saito *et al.*, 2009, Veloukas *et al.*, 2011). Επίσης μια διαφορετική μοριακή μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η allele-specific (AS) PCR, η οποία βασίζεται στην αρχή υβριδισμού εξειδικευμένων εκκινητών σε συγκεκριμένα νουκλεοτίδια της πολυμορφικής θέσης-στόχου. Τέτοια μεθοδολογία έχει αναπτυχθεί για την ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών του *B. cinerea* στα QoIs και SDHIs μυκητοκτόνα καθώς και στις υδροξυανιλίδες (Jiang *et al.*, 2009, Yin *et al.*, 2011, Grabke *et al.*, 2013). Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη μοριακών τεχνικών που βασίζονται στις αρχές της ποσοτικής PCR (qPCR) επέτρεψε στους Banno *et al.* (2008) την εφαρμογή ενός

πρωτοκόλλου για την ανίχνευση των ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά και δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα στελεχών του *B. cinerea*.

Θερμική αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης (High-resolution melting, HRM)

Η θερμική αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης (HRM) έχει εισαχθεί από το 2002 στη μοριακή έρευνα (Reed *et al.*, 2007). Με αυτήν επεκτάθηκαν οι δυνατότητες ανάλυσης των καμπυλών τήξης του DNA από ένα πρότυπο διαγνωστικό χαρακτηριστικό γνώρισμα της ποσοτικής PCR (qPCR) σε μια ευαίσθητη μέθοδο για την ανίχνευση μεταλλάξεων (Wilhelm & Pingoud, 2003). Η ανάλυση HRM είναι μια αναλυτική μοριακή μέθοδος η οποία προσδιορίζει το ρυθμό αποδιάταξης του δίκλωνου DNA (dsDNA) σε μονόκλωνο (ssDNA) με έκλυση της θερμοκρασίας (Reed & Wittwer, 2004). Για τη λειτουργία της μεθόδου απαιτείται μια φθορίζουσα χρωστική (π.χ. SYTO 9), η οποία παρεμβάλλεται ομοιογενώς μέσα στο δίκλωνο DNA και περιλαμβάνεται στο μίγμα της PCR. Η ανάλυση HRM εκτελείται με το πέρας της αντίδρασης PCR στον ίδιο μικροσωληνίσκο: το προϊόν της PCR θερμαίνεται σταδιακά με αύξηση της θερμοκρασίας και το δίκλωνο DNA ξεκινά να τήκεται απελευθερώνοντας τη φθορίζουσα χρωστική. Ο ρυθμός της αποδιάταξης και η τήξη του προϊόντος της PCR εξαρτώνται από τις θερμοδυναμικές του ιδιότητες όπως είναι το μήκος, ο αριθμός των βάσεων GC (επειδή συνδέονται με τριπλό δεσμό και εκλύεται μεγαλύτερη θερμότητα κατά την αποδιάταξη) και η αλληλουχία των βάσεων (Ririe *et al.*, 1997).

Το βασικό πεδίο εφαρμογής της μεθόδου είναι ο αξιόπιστος και γρήγορος προσδιορισμός των SNPs (Wu *et al.*, 2008) πάνω στα οποία η μέθοδος παρουσιάζει πολύ μεγάλη ευαισθησία (Reed & Wittwer, 2004). Οι χαρακτηριστικές καμπύλες της HRM μπορούν να αλλάξουν κλίση σε κάθε δείγμα αν υπάρξει μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός, οπότε διαφαίνονται άμεσα και οι γονοτυπικές διαφορές (Taylor, 2009). Τα SNPs μπορούν να ταξινομηθούν σε 4 κλάσεις (Venter *et al.*, 2001) από τις οποίες πιο δύσκολα ανιχνεύονται οι μεταλλάξεις A/T (Πίνακας 12). Άλλες εφαρμογές της μεθόδου είναι στην ανίχνευση: μεθυλιωμένου DNA (Wojdacz & Dobronic, 2007), εσωτερικών διαδοχικών διπλασιασμών 'internal tandem duplications-ITDs' (Vaughn & Elenitoba-Johnson, 2004), άγνωστων μεταλλάξεων σε περιοχές χαμηλής πολυπλοκότητας (Price *et al.*, 2007) και απλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών 'SSRs' (Mackay *et al.*, 2008, Ganopoulos *et al.*, 2011).

Η εφαρμογή της ανάλυσης HRM εστιάζεται κυρίως σε κλινικές μελέτες που σχετίζονται με αναγνώριση των παθογόνων που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Άλλες εφαρμογές της μεθόδου HRM έχουν γίνει για την ανίχνευση και γονοτύπηση ανθεκτικών στελεχών όπως είναι η ανθεκτικότητα του *Mycobacterium tuberculosis*

στα αντιβιοτικά rifampicin και isoniazid (Pietzka *et al.*, 2009, Ong *et al.*, 2010, Ramirez *et al.*, 2010) και του *Staphylococcus epidermidis* στο linezolid (Gabriel *et al.*, 2012). Οι εφαρμογές αυτής της μεθόδου στη γεωργία μέχρι τώρα είναι πολύ περιορισμένες και επικεντρώνονται κυρίως στην ταυτοποίηση ή την ανίχνευση παθογόνων των φυτών (Luchi *et al.*, 2011, Ganopoulos *et al.*, 2012, Khan *et al.*, 2013). Η πρόσφατη ανάπτυξη φθορίζουσών χρωστικών 3<sup>ης</sup> γενιάς συνέβαλε στην πολύ καλύτερη εκτέλεση της HRM. Επιπλέον η περαιτέρω τεχνική εξέλιξη των οργάνων επέφερε υψηλότερη ανάλυση και για την τεχνολογία της HRM η οποία χρησιμοποιείται για γονοτύπηση τα τελευταία χρόνια. Η ανάλυση HRM έχει πολλά πλεονεκτήματα: είναι απλή, ακριβής, χαμηλού κόστους, διεξάγεται σε απλό μικροσωληνίσκο της PCR, είναι υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης. Αυτά τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα μπορούν να την καθιερώσουν ως μέθοδο επιλογής στην ανίχνευση των πολυμορφισμών (Vossen *et al.*, 2009).

**Πίνακας 12.** Κλάσεις SNPs όπως έχουν καθοριστεί από τους Venter *et al.* (2001).

Κλάση SNP	Αλλαγή βάσεων	Μετατόπιση καμπύλης τήξης ( $T_m$ )
1	C/T και G/A	Μεγάλη (>0.5°C)
2	C/A και G/T	↓
3	C/G	
4	A/T	Πολύ μικρή (<0.2°C)

Η εξάπλωση και συνεχής προσαρμογή της ευαισθησίας του *B. cinerea* σε μυκητοκτόνα με βοτρυδιοκτόνο δράση απαιτεί διαρκή γονοτυπική καταγραφή των πληθυσμών του παθογόνου με γρήγορες και σύγχρονες μεθόδους. Ο σκοπός της έρευνας που περιγράφεται σε αυτό το κεφάλαιο έγινε: α) για να διαπιστωθεί ο κυρίαρχος πληθυσμός του παθογόνου που προσβάλει τα μαρούλια με βάση την ύπαρξη μεταθετών στοιχείων, β) για να γίνει συσχέτιση γονοτυπικής και φαινοτυπικής ανθεκτικότητας με βάση ορισμένους γνωστούς μοριακούς δείκτες για κάθε μυκητοκτόνο, γ) για να αναπτυχθεί μια καινοτόμος σε παθογόνα φυτών μέθοδος ανίχνευσης της ανθεκτικότητας, δ) για να διερευνηθεί αν η νέα μοριακή μέθοδος έχει την ικανότητα να ανιχνεύει πολλαπλές σημειακές μεταλλάξεις στο υπό εξέταση τμήμα DNA και τέλος ε) για να προσδιοριστεί η φύση των πολυμορφισμών σε διαφορετικής ανθεκτικότητας φαινοτύπους του παθογόνου.

## Υλικά και μέθοδοι

Για τις μοριακές μελέτες έγιναν συνολικά 40 μονόσπορες καλλιέργειες σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Waller *et al.* (1997), από απομονώσεις που είχε προσδιοριστεί *in vitro* η ευαισθησία τους στα μυκητοκτόνα. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, πάνω σε αποστειρωμένες αντικειμενοφόρους τοποθετούνταν 5 σταγόνες αποστειρωμένου νερού και υπό ασηπτικές συνθήκες μεταφέρονταν σπόρια από κάθε καλλιέργεια. Στη συνέχεια, με τη χρήση αποστειρωμένου βακτηριολογικού κρίκου μεταφέρονταν από το αιώρημα μία ποσότητα σπορίων σε τριβλίο με water agar κατά μήκος μιας ευθείας γραμμής (streaking). Έπειτα γινόταν τρία ακόμα 'streaking' κάθετα από την πρώτη γραμμή, με τη μορφή κεφαλαίου E. Μετά την παρέλευση 15 h τα βλαστώνοντα μεμονωμένα σπόρια εντοπίζονταν συνήθως στο τέλος των κάθετων γραμμών και μεταφέρονταν ασηπτικά με αποκοπή τους (μαζί με το υλικό) σε γυάλινο σωλήνα με θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Οι απομονώσεις αυτές ήταν αντιπροσωπευτικές από κάθε περιοχή δειγματοληψίας (πληροφορίες στο κεφάλαιο 'Ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών') και ανήκαν σε 14 διαφορετικούς φαινοτύπους (Πίνακας 14). Η κάθε μονόσπορη απομόνωση ελεγχόταν για τη διατήρηση των επιπέδων ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα πριν τη διενέργεια των μοριακών δοκιμών.

### Εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων

Η εξαγωγή των νουκλεϊκών οξέων από το μυκήλιο του *B. cinerea* έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Lodhi *et al.* (1994) το οποίο είχε σαν βάση φαινόλη-χλωροφόρμιο. Τα στάδια της μεθόδου είχαν ως εξής:

#### **Στάδιο 0 – Ανάπτυξη καλλιέργειας *B. cinerea* (Διάρκεια: 72 h)**

Οι απομονώσεις αναπτύσσονταν ξεχωριστά σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer χωρητικότητας 100 mL που περιείχαν 50 mL potato dextrose broth (PDB). Ο εμβολιασμός γινόταν με 1 mL αιωρήματος σπορίων συγκέντρωσης  $10^6$  σπορίων  $\text{mL}^{-1}$  και ακολουθούσε επώαση για 72 h σε περιστροφικό αναδευτήρα στους 22 °C με 150 rpm.

#### **Στάδιο 1 – Λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων με υγρό άζωτο (Διάρκεια: 25 min)**

5-10 mL της υγρής καλλιέργειας μεταφέρονταν σε κωνική φιάλη τύπου Falcon χωρητικότητας 50 mL όπου γινόταν προσθήκη ίσου όγκου  $\text{H}_2\text{O}$ , για να ακολουθήσει φυγοκέντρηση στις 4.500 rpm για 15 min. Η υπερκείμενη φάση απομακρυνόταν και αφού γινόταν στράγγιση της μυκηλιακής μάζας σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί, στη συνέχεια κονιοποιούνταν σε γουδί με γουδοχέρι με την προσθήκη υγρού  $\text{N}_2$ .

Τελικά, 100 mg της λεπτής σκόνης μεταφερόταν σε μικροσωληνίσκο Eppendorf 2 mL.

### **Στάδιο 2 – Απομάκρυνση πολυσακχαριδίων και φαινολών (Διάρκεια: 25 min)**

Στο σωλήνα Eppendorf με τη λεπτή σκόνη γινόταν προσθήκη 400 µl CTAB και 50 mg PVP<sub>25</sub>. Αφού γινόταν ανάμιξη του μίγματος με συνεχείς αναστροφές μέχρι ομογενοποίησης, ακολουθούσε επώαση στους 60 °C για 25 min με ανάδευση κάθε 10 min.

### **Στάδιο 3 – Διαχωρισμός DNA-πρωτεϊνών με φαινόλη-χλωροφόρμιο (Διάρκεια: 10 min)**

Στο ίδιο μίγμα γινόταν προσθήκη φαινόλης-χλωροφορμίου (αναλογίας 1:1) ίσου όγκου με το διάλυμα (π.χ. για 400 µL δ/τος προσθήκη 200 µL φαινόλης + 200 µL χλωροφορμίου). Ακολουθούσε ελαφρά ανάδευση με αναστροφή αρκετές φορές ώστε να δημιουργηθεί γαλάκτωμα και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο μεταφέρονταν σε νέο μικροσωληνίσκο Eppendorf των 2 mL.

### **Στάδιο 4 – Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων (Διάρκεια: 1.5 h)**

Στο διάλυμα γινόταν προσθήκη 0.5x vol. 5M NaCl [π.χ. 200 µL αν το υπερκείμενο ήταν 400 µL] και πολύ καλή ανάδευση. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 2x vol. EtOH 95 % (-20 °C) [π.χ. 800 µL αν το υπερκείμενο ήταν 400 µL] με ελαφρά ανάδευση ώστε να κατακρημνισθούν τα νουκλεϊκά οξέα και στη συνέχεια το μίγμα τοποθετούνταν στους -20 °C. Μετά την παρέλευση τουλάχιστον 1 h γινόταν φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 13.000 rpm για 10 min. Η υδατική φάση απομακρύνονταν με προσοχή, ώστε να διατηρηθεί το στερεό ίζημα κολλημένο στη βάση του μικροσωληνίσκου.

### **Στάδιο 5 – Καθαρισμός στερεού ιζήματος (Διάρκεια: 30 min)**

Για τον καθαρισμό του στερεού ιζήματος στο οποίο περιέχονταν τα νουκλεϊκά οξέα έγινε προσθήκη 1 mL 70 % EtOH (-20°C) και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min. Η υδατική φάση απομακρυνόταν ξανά με προσοχή, ώστε να διατηρηθεί το 'pellet' κολλημένο τη βάση του μικροσωληνίσκου. Ο μικροσωληνίσκος Eppendorf τοποθετούνταν σε κατάλληλο μέρος με ανοιχτό το πώμα μέχρι πλήρους εξάτμισης της αλκοόλης-νερού και τελικά το 'pellet' διαλυόταν σε 100-200 µL καθαρού νερού απαλλαγμένου από RNάσες (DEPC), ανάλογα το μέγεθος.

Η εξαιρετικά υψηλή ποιότητα και ποσότητα του εξαγόμενου DNA δεν απαιτούσε επεξεργασία πέψης με RNάση. Η ποιότητα των νουκλεϊκών οξέων

εκτιμήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Η τελική συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων αντίστοιχα καθορίστηκε σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop (Thermo Scientific) με εφαρμογή του συνοδευόμενου λογισμικού (NanoDrop 1000 Operating Software, version 3.8.1, Released June 17, 2011).

### Εκκινητές

Για τη διεξαγωγή της ανάλυσης HRM απαιτήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε το τελικό προϊόν να είναι σχετικά μικρού μήκους (<90 bp) και να περιέχεται περίπου στο μέσο ο επιθυμητός προς ανάλυση πολυμορφισμός. Ο σχεδιασμός όλων των εκκινητών για την ανάλυση HRM έγινε με το λογισμικό Beacon Designer (Beacon Designer v7.90, Build 790002, Premier Biosoft International, Palo Alto, California, USA). Η πρόσφατη έκδοση του λογισμικού (2010) παρέιχε μεταξύ άλλων τη δυνατότητα σχεδιασμού εξειδικευμένων για την ανάλυση HRM εκκινητών (Παράρτημα II). Στις περιπτώσεις ανίχνευσης των πολυμορφισμών στα γονίδια που σχετίζονται με ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα pyraclostrobin, carbendazim και iprodione οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε τα στάδια του υβριδισμού και της επέκτασης της PCR να διεξάγονται στους 60 °C καθότι εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο HRM δύο σταδίων (2-step HRM). Αυτός ο περιορισμός δεν υπήρχε στον σχεδιασμό των εκκινητών για την ανίχνευση των SNPs που προσδίδουν ανθεκτικότητα στις υδροξυανιλίδες και στα SDHIs μυκητοκτόνα.

Με το ίδιο λογισμικό σχεδιάστηκαν και τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση μέρους των *erg27* και *sdhB* γονιδίων, ενώ όλοι οι υπόλοιποι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είτε για αλληλούχιση σε άλλα προς εξέταση γονίδια είτε για άλλες δοκιμές PCR εντοπίστηκαν στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Οι εκκινητές παρασκευάστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich και παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.

### Αλληλούχιση

Για την ανίχνευση των SNPs στη γενωματική περιοχή-στόχο κάθε απομόνωσης, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR πριν γίνει η αλληλούχιση. Τα ζεύγη εκκινητών Fn-2-F/R, Bs-F/R, TUB-HP-F/R και BcOS1-HP-F/R (Πίνακας 13) χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχύσουν περιοχές των γονιδίων *erg27* (υδροξυανιλίδες), *sdhB* (SDHIs), *BenA* (βενζιμιδαζολικά) και *bos1* (δικαρβοξιμιδικά).

**Πίνακας 13.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις μοριακές δοκιμές της παρούσας, διατρήτης.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'–3')	Θέση νουκλεοτιδίων (Αριθμός καταχώρησης <sup>1</sup> )	Προϊόν (bp)	Γονίδιο στόχος	Μοριακή μέθοδος <sup>2</sup>	Βιβλιογραφική αναφορά
EF412-F	CCCTTGAATTTTGTGGTATTTATC	1141-1167 (BC1G_00806)	67	<i>erg27</i>	HRM	Παρούσα διατρήτη
EF412-R	GGCTTCCCATCTTACCA	1188-1207 (BC1G_00806)		<i>erg27</i>	HRM	"
CG143-F	CCCTACGGGCAATGTCTACT	3816-3835 (AB262969)	73	<i>cytb</i>	HRM	"
CG143-R	GTCACATTCATGTACAGCACTCA	3855-3888 (AB262969)		<i>cytb</i>	HRM	"
CF129-F	AGAACATTAGTTTGAACAATAGGT	2375-2398 (AB262969)	89	<i>cytb</i>	HRM	"
CF129-R	AACCATTTGGGGCTATGT	2446-2463 (AB262969)		<i>cytb</i>	HRM	"
SH272-F	TGGATAACAGCATGAGTT	785-802 (BC1G_13286)	84	<i>sdhB</i>	HRM	"
SH272-R	CCAAACCAGGATTCATC	851-868 (BC1G_13286)		<i>sdhB</i>	HRM	"
BN198/200-F	AGCCATATAACGGCACTC	1852-1869 (Z69263)	87	<i>Bena</i>	HRM	"
BN198/200-R	TATCGTAAAGAGCCTCGT	1921-1938 (Z69263)		<i>Bena</i>	HRM	"
OS365/73-F	GTAGGAAGTGAAGGTATTC	2144-2163 (AF435964)	82	<i>bos1</i>	HRM	"
OS365/73-F	TGACGTTCACTATCAATGT	2207-2225 (AF435964)		<i>bos1</i>	HRM	"
BCAR-F	GGCAATGTCTACTGTGAGC	3823-3841 (AB262969)	260	<i>cytb</i>	AS-PCR	Jiang <i>et al.</i> (2009)
BCAR-R	ACCATCTCCATCCACCATACCT	4061-4082 (AB262969)		<i>cytb</i>	AS-PCR	"
Fn-2F	CTAAATCGGAGAAAGAAC	1055-1072 (BC1G_00806)	218	<i>erg27</i>	DS	Παρούσα διατρήτη
Fn-2R	GTCGGGAGATAATGCTAC	1255-1272 (BC1G_00806)		<i>erg27</i>	DS	"
Bs-F	CATATCTCAACACGACGCC	551-572 (BC1G_13286)	320	<i>sdhB</i>	DS	"
Bs-R	TGCCAAACCAAGGATTCATCC	849-870 (BC1G_13286)		<i>sdhB</i>	DS	"
TUB-HP-F	TGTGAGCCATATAAGCGAA	1847-1866 (Z69263)	224	<i>Bena</i>	DS	Banno <i>et al.</i> (2008)
TUB-HP-R	CCAACCTTCGGAGATCTGAG	2051-2070 (Z69263)		<i>Bena</i>	DS	"
BCOS1-HP-F	AGTGCATGAGAGTTCACAC	2011-2030 (AF435964)	229	<i>bos1</i>	DS	"
BCOS1-HP-R	ATTGGCCATAGCCTTGACGTT	2219-2239 (AF435964)		<i>bos1</i>	DS	"
Boy1-F	CTTTACCGGAACAAGCCCAT	23-43 (X81791)	383	<i>pol</i>	PCR	Kretschmer & Hahn (2008)
Boy2-R	GGCTTCCCATCTTCGGCTTC	385-405 (X81791)		<i>pol</i>	PCR	"
Fip1-F	GCACAAAACCTACAGAAAGA	299-317 (U74294)	484	<i>transposase</i>	PCR	"
Fip2-R	CCAAAAGTAAAAGTGCCT	764-782 (U74294)		<i>transposase</i>	PCR	"

<sup>1</sup> Ο αριθμός καταχώρησης γενbank ανακτήθηκε από τη βάση δεδομένων BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

<sup>2</sup> HRM=High-resolution melting, AS-PCR=Allele-specific PCR, DS=Direct sequencing (επεξηγήσεις και συντηρήσεις στη σελίδα xix).

Κάθε μίγμα της PCR ήταν όγκου 25  $\mu$ L και περιείχε: 100 ng νουκλεϊκών οξέων από κάθε δείγμα (απομόνωση), 12.5 pmol από κάθε εκκινητή, 5  $\mu$ L DEPC H<sub>2</sub>O και 12.5  $\mu$ L του μίγματος Kara 2G Fast hot-start ready-mix PCR kit (Kara Biosystems). Σε όλες τις αντιδράσεις της PCR, ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το μίγμα χωρίς την προσθήκη DNA. Οι αντιδράσεις διεξήχθησαν σε θερμικό κυκλοποιητή Mastercycler Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH) με τις εξής συνθήκες:

1. Αρχική αποδιάταξη του DNA στους 95 °C για 3 min ακολουθούμενη από
2. 35 κύκλους με
  - α)** αποδιάταξη του DNA στους 95 °C για 15 s,
  - β)** υβριδισμό των εκκινητών για 15 s στους: 50°C (εκκινητής Fn-2F/R), 61°C (εκκινητής Bs-F/R), 55 °C (εκκινητής TUB-HP-F/R) και 58 °C (εκκινητής BcOS1-HP-F/R),
  - γ)** αντιγραφή του DNA στους 72 °C για 10 s και
3. τελικό πολυμερισμό στους 72 °C για 10 min και ψύξη στους 8 °C για 10 s.

Η ηλεκτροφόρηση στα 130 V των προϊόντων της PCR, πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αгарόζης 1.5 % (σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X Tris-borate-EDTA, TBE) με την εφαρμογή 6  $\mu$ l δείγματος και 2  $\mu$ l χρωστικής Ficoll. Ακολούθησε χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και η απεικόνιση των προϊόντων έγινε κάτω από ακτινοβολία UV στα 312 nm. Τα προϊόντα καθαρίστηκαν (Nucleospin gel and PCR clean-up, Macherey-Nagel) και αλληλουχήθηκαν από διαπιστευμένο εργαστήριο (Biogenomica, Αθήνα). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν εκείνη του τερματισμού της αλυσίδας DNA, με τη χρήση τριφωσφορικών διδέοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) (Sanger *et al.*, 1977). Οι αλληλουχίες από κάθε περιοχή συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες των 'άγριου τύπου' απομονώσεων μέσω του λογισμικού Bioedit version 7.2.5 (Hall, 1999). Οι αλληλουχίες αναφοράς ανακτήθηκαν από τη διαδικτυακή εφαρμογή BLAST με βάση τον αριθμό καταχώρησης Genbank (Πίνακας 13). Η ποιότητα των χρωματογραφημάτων και οι διαφορές στην αλληλουχία μεταξύ αντιπροσωπευτικών δειγμάτων φαίνονται στο Παράρτημα III.

#### Ανάλυση HRM

Όλες οι αναλύσεις HRM πραγματοποιήθηκαν μαζί με την PCR σε θερμικό κυκλοποιητή Rotor-Gene 6000 real-time 5P HRM PCR (Corbett Research), ενώ τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το συνοδευτικό λογισμικό (Rotor Gene Q series software v.2.0.2). Η ανάλυση HRM εφαρμόστηκε αρχικά για να διερευνηθεί η



αποτελεσματικότητά της στην ανίχνευση πολυμορφισμών των γονιδίων *erg27* και *sdhB* (γι' αυτό έγινε αλληλούχιση προηγουμένως όλων των δειγμάτων), ενώ χρησιμοποιήθηκε ως διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση των πολυμορφισμών στα γονίδια *cytb*, *BenA* και *bos1* (η αλληλούχιση αντιπροσωπευτικών δειγμάτων κάθε καμπύλης έγινε ώστε να καθοριστούν οι καμπύλες αναφοράς). Στη δεύτερη περίπτωση εφαρμόστηκε ένα πιο προηγμένο πρωτόκολλο δύο σταδίων, το οποίο μείωσε περαιτέρω το χρόνο διεξαγωγής της εφαρμογής κατά 25 min (συνολικά 82 min).

Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών στις περιοχές των γονιδίων *erg27* και *sdhB* σχεδιάστηκαν οι εκκινητές EF412-F/R και SH272-F/R για να ενισχύσουν τμήματα 67 και 84 βάσεων (Πίνακας 13). Οι αντιδράσεις έγιναν σε συνολικό όγκο 15  $\mu$ L που περιείχε: 20 ng νουκλεϊκών οξέων, 1X ρυθμιστικό διάλυμα PCR, 2.5 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM από κάθε dNTP, 300 nM από κάθε εκκινητή, 1.5 mM χρωστική SYTO 9 (Life Technologies Corp.) και 1 U Kara Taq DNA πολυμεράση (Kara Biosystems). Το πρωτόκολλο περιλάμβανε:

1. Αρχική αποδιάταξη του DNA στους 95 °C για 3 min ακολουθούμενη από
2. 45 κύκλους με
  - α) αποδιάταξη του DNA στους 95 °C για 20 s,
  - β) υβριδισμό των εκκινητών για 20 s στους: 54 °C (εκκινητής EF412-F/R) και 52 °C (εκκινητής SH272-F/R),
  - γ) αντιγραφή του DNA στους 72 °C για 20 s και
3. τελικό πολυμερισμό στους 72 °C για 10 min.

Η ανάλυση HRM πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την PCR από τους 72 °C έως τους 78 °C για το ζεύγος εκκινητών EF412-F/R και από τους 77.5 °C έως τους 83.5 °C για το ζεύγος εκκινητών SH272-F/R αντίστοιχα. Η καταγραφή του φθορισμού γίνονταν κάθε 0.1 °C με χρονικό διάστημα 2 s μεταξύ των καταγραφών. Τα απόλυτα επίπεδα φθορισμού ομαλοποιήθηκαν (η ομαλοποίηση έγινε κατά μήκος του άξονα της μετατόπισης θερμοκρασίας για καλύτερο διαχωρισμό των καμπυλών) και σχηματίστηκαν οι χαρακτηριστικές καμπύλες τήξης της HRM. Στα γραφήματα διαχωρισμού των καμπυλών τήξης, οι καμπύλες από κάθε δείγμα συγκρίθηκαν με αυτή του γενοτύπου 'άγριου τύπου' η οποία μετασχηματίστηκε σε οριζόντια γραμμή (άξονας χ). Οι διακυμάνσεις των καμπυλών από τον οριζόντιο άξονα ήταν ενδεικτικές της αλλαγής στην αλληλουχία μεταξύ των δειγμάτων. Όσα δείγματα είχαν παρεκκλίνουσες καμπύλες τήξης καταγράφηκαν ως φέρουσες μεταλλάξεις. Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων σε κάθε ομάδα καμπυλών τήξης επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης.

## Two-step HRM

Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών στις περιοχές των γονιδίων *cytb*, *BenA* και *bos1* σχεδιάστηκαν τέσσερις εκκινητές. Δύο ξεχωριστοί εκκινητές (CG143-F/R και CF129-F) σχεδιάστηκαν για την ανίχνευση των πολυμορφισμών G143 και F129 εξαιτίας της ιδιομορφίας του *cytb* γονιδίου με την ύπαρξη έως τεσσάρων διαφορετικών εσονίων (Πίνακας 13). Η παρουσία των πολυμορφισμών σε κοντινές θέσεις στα γονίδια *BenA* και *bos1* από την άλλη, ευνόησε στον σχεδιασμό των εκκινητών BN198/200-F/R και OS365/73-F/R για την ανίχνευση όλων των περιπτώσεων μεταλλάξεων (Πίνακας 13).

Οι αντιδράσεις έγιναν σε συνολικό όγκο 20  $\mu$ L που περιείχε: 20 ng νουκλεϊκών οξέων από κάθε απομόνωση, 1X Kapa HRM Fast PCR kit (Kapa Biosystems, Cape Town, South Africa), 2.5 mM  $MgCl_2$  και 0.2  $\mu$ M από κάθε εκκινητή. Η PCR-HRM αναπτύχθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή Rotor-Gene 6000 με την εφαρμογή ενός γρήγορου πρωτοκόλλου 45 κύκλων δύο σταδίων:

1. Αποδιάταξη του DNA στους 95 °C για 5 s και
2. υβριδισμός των εκκινητών και αντιγραφή του DNA στους 60 °C για 30 s.

Ο σχηματισμός και η σύγκριση των καμπυλών τήξης για κάθε περίπτωση έγινε με τον τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως. Αντιπροσωπευτικά δείγματα από κάθε ομάδα καμπυλών τήξης αλληλουχήθηκαν για να γίνει η ταυτοποίηση, στις περιπτώσεις των *BenA* και *bos1* περιοχών. Στην περίπτωση ανίχνευσης της G143A μετάλλαξης, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα μιας επιπλέον απλής PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκε εξειδικευμένο της μετάλλαξης ζεύγος εκκινητών (BcAR-F/R, Πίνακας 13). Οι συνθήκες της AS (Allele specific)-PCR έγιναν σύμφωνα με τους Jiang *et al.* (2009), ενώ η απεικόνιση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η επιβεβαίωση της ύπαρξης εσονίου (μέγεθος προϊόντος) στην ίδια περιοχή, έγινε με απεικόνιση του προϊόντος της PCR-HRM σε πηκτή αγαρόζης κατά τον ίδιο τρόπο. Καμία παρέκκλιση δεν έλαβε χώρα για τις καμπύλες τήξης στην περιοχή του γονιδίου *cytb* για την ανίχνευση της F129 μετάλλαξης, καθώς δεν διαπιστώθηκε πολυμορφισμός.

## Ανίχνευση μεταθετών στοιχείων

Για την ανίχνευση των *boty* και *flipper* μεταθετών στοιχείων διεξήχθησαν δύο ξεχωριστές PCR με τα ζεύγη εκκινητών Boty1-F/R και Flp1-F/R (Πίνακας 13). Οι συνθήκες και τα μίγματα της PCR ήταν όμοια με αυτά που περιγράφηκαν

προηγουμένως στην αλληλούχιση εκτός βέβαια από τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών που ρυθμίστηκε στους 50 °C και για τις δύο περιπτώσεις. Τα προϊόντα της PCR για τα 40 δείγματα έγιναν ορατά κάτω από φωτισμό UV, μετά από ηλεκτροφόρηση στα 150 V για 1 h σε πηκτή αγαρόζης μεγάλου μεγέθους (40 θέσεων). Για το λόγο αυτό, καλύτερη χρώση της πηκτής έγινε όταν χρησιμοποιήθηκαν 16 μl βρωμιούχου αιθιδίου για 1 h.

## Αποτελέσματα

Αλληλούχιση προϊόντων PCR

Η αλληλούχιση του προϊόντος Fn-2F/R στο γονίδιο *erg27* των ανθεκτικών στο fenhexamid (Hvd<sup>R</sup>) απομονώσεων έδειξε δύο νουκλεοτιδικές αλλαγές από T σε G ή T σε C στις θέσεις 1180 και 1181, αντίστοιχα. Κατά συνέπεια, η σύνθεση των αμινοξέων άλλαξε από φαινυλαλανίνη σε βαλίνη σε 11 απομονώσεις ενώ αλλαγή σε σερίνη διαπιστώθηκε σε οκτώ από 19 Hvd<sup>R</sup> απομονώσεις στη θέση 412 αντίστοιχα (Πίνακας 14). Καμία μετάλλαξη της σύνθεσης των αμινοξέων δεν παρατηρήθηκε για τις ευαίσθητες στο fenhexamid απομονώσεις σ' αυτή τη θέση, αλλά παρατηρήθηκε φυσικός πολυμορφισμός σε διαφορετική θέση της αλληλουχίας σε τέσσερις απομονώσεις. Το γονίδιο αυτό εξάλλου είναι γνωστό για τον έντονο πολυμορφισμό του, ο οποίος σε κάποιες περιπτώσεις σχετίζεται και με μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας.

Η αλληλούχιση του προϊόντος Bs-F/R στο γονίδιο *sdhB* των ανθεκτικών στο boscalid (Bos<sup>R</sup>) απομονώσεων έδειξε μία αλλαγή του νουκλεοτιδίου A σε G στη θέση 815, με αποτέλεσμα την αλλαγή της ιστιδίνης σε αργινίνη στην πρωτεΐνη σε 14 απομονώσεις. Παρομοίως, η αλλαγή του νουκλεοτιδίου C σε T στη θέση 814 άλλαξε τη σύνθεση των αμινοξέων από ιστιδίνη σε τυροσίνη σε τέσσερις από τις συνολικά 18 απομονώσεις, αντίστοιχα (Πίνακας 14). Επιπλέον, εκτός από τις H272 μεταλλάξεις, η ανθεκτικότητα στο boscalid συνδέεται και με δύο άλλες μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή του γονιδίου: τις N230 και P225 (Stammli *et al.*, 2008, Leroux *et al.*, 2010). Καμία μετάλλαξη στις θέσεις αυτές ωστόσο δεν εντοπίστηκε στα εξεταζόμενα δείγματα.

Δύο νουκλεοτιδικές αλλαγές βρέθηκαν από την αλληλούχιση του TUB-HP-F/R προϊόντος των ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών, μετά από σύγκριση με το άγριου τύπου στέλεχος SAS56 (αριθμός καταχώρησης Genbank Z69263, πίνακας 13). Όλες οι υψηλής ανθεκτικότητας απομονώσεις στα βενζιμιδαζολικά (Ben<sup>HR</sup>) έφεραν τη μετάλλαξη από A σε C στη θέση 1903, η οποία επέφερε την αλλαγή του γλουταμικού οξέος σε αλανίνη (E198A) στην αντίστοιχη πρωτεΐνη (Πίνακας 14). Απομονώσεις μετρίως ανθεκτικές στα βενζιμιδαζολικά (Ben<sup>MR</sup>) έφεραν αλλαγή του

νουκλεοτιδίου T σε A στη θέση 1909, με αποτέλεσμα την μετάλλαξη της φαινυλαλανίνης σε τυροσίνη (F200Y) αντίστοιχα (Πίνακας 14).

Οι μετρίως ανθεκτικές στα δικαρβοξυμιδικά απομονώσεις εμφάνισαν τέσσερεις διαφορετικές περιπτώσεις μεταλλάξεων στην περιοχή του *bos1* γονιδίου σε σχέση με τον άγριου τύπου γενότυπο (αριθμός καταχώρησης Genbank AF435964, πίνακας 13): αλλαγή του νουκλεοτιδίου T σε A ή σε G επέφερε τη μετάλλαξη της ισολευκίνης σε α) ασπαραγίνη (I365N) ή β) σερίνη (I365S), γ) δύο ταυτόχρονες μεταλλάξεις των νουκλεοτιδίων A σε C και A σε G στις θέσεις 2193 και 2205 αντίστοιχα, άλλαξαν τη σύνθεση των αμινοξέων γλουταμίνης σε προλίνη (Q369P) και ασπαραγίνης σε σερίνη (N373S), και δ) δύο επίσης ταυτόχρονες αλλαγές των νουκλεοτιδίων G σε T και G σε C στις θέσεις 2189 και 2194 επέφεραν μετάλλαξη της βαλίνης σε φαινυλαλανίνη (V368F) και της γλουταμίνης σε ιστιδίνη (Q369H) αντίστοιχα (Πίνακας 14).

#### Ανάλυση HRM

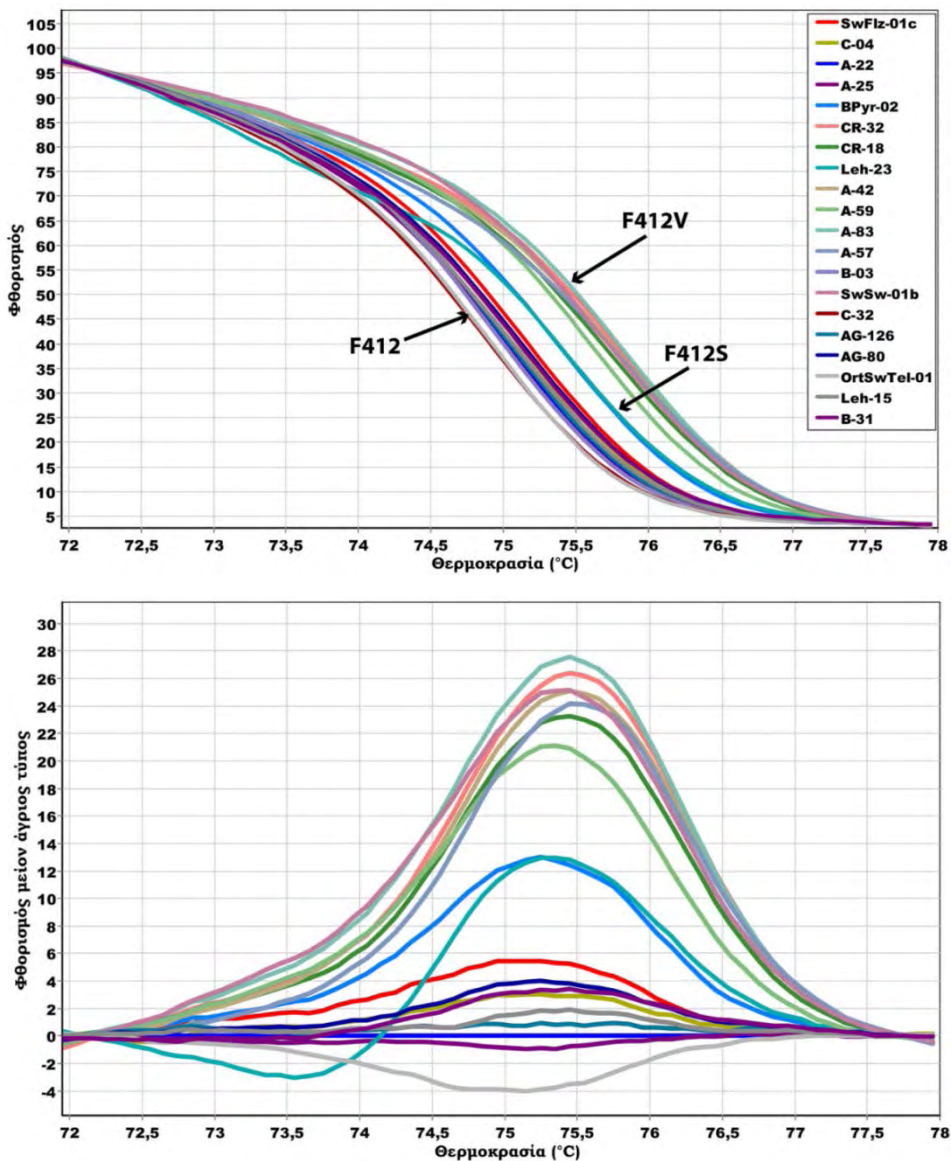
Η ανάλυση HRM εφαρμόστηκε για να ανιχνεύσει τους πολυμορφισμούς στο κωδικόνιο 412 του γονιδίου *erg27* που κωδικοποιούν τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη (F), σερίνη (S) και βαλίνη (V) και εντοπίστηκαν κατά την αλληλούχιση. Οι χαρακτηριστικές καμπύλες της HRM για τα διαγράμματα διαχωρισμού των γενοτύπων προέκυψαν ύστερα από τήξη των προϊόντων της PCR (Διάγραμμα 11). Στα διαγράμματα διαχωρισμού, οι καμπύλες σχηματίστηκαν με βάση μια καμπύλη αναφοράς η οποία ήταν χαρακτηριστική του γενότυπου 'άγριου τύπου'. Η άγριου τύπου απομόνωση A-22 η οποία έφερε φαινυλαλανίνη στο κωδικόνιο 412 (κατ' αντιστοιχία του άγριου-τύπου γενότυπου B05.10 με αριθμό καταχώρησης BC1G\_00806, Πίνακας 13), επιλέχθηκε για αυτή τη σύγκριση (Διάγραμμα 11B, οριζόντιος άξονας). Όλες οι ευαίσθητες στο fenhexamid απομονώσεις σχημάτισαν ένα σύμπλεγμα καμπυλών με τον 'άγριου τύπου' γενότυπο. Οι αλλαγές των αμινοξέων F412S και F412V ανιχνεύθηκαν με επιτυχία από την ανάλυση HRM. Οι παρεκκλίσεις των καμπυλών αυτών ήταν απόλυτα διακριτές από τους υπόλοιπους γενοτύπους. Επομένως, τα ανθεκτικά στελέχη διακρίθηκαν ξεκάθαρα από τα άγριου τύπου, μέσα από τα διαγράμματα διαχωρισμού των γενοτύπων.

**Πίνακας 14.** Γονιότητα διαφορετικής ευαισθησίας αμυγδαλών *B. cinerea* από διαφορετικές περιοχές Δειγματοληψίας.

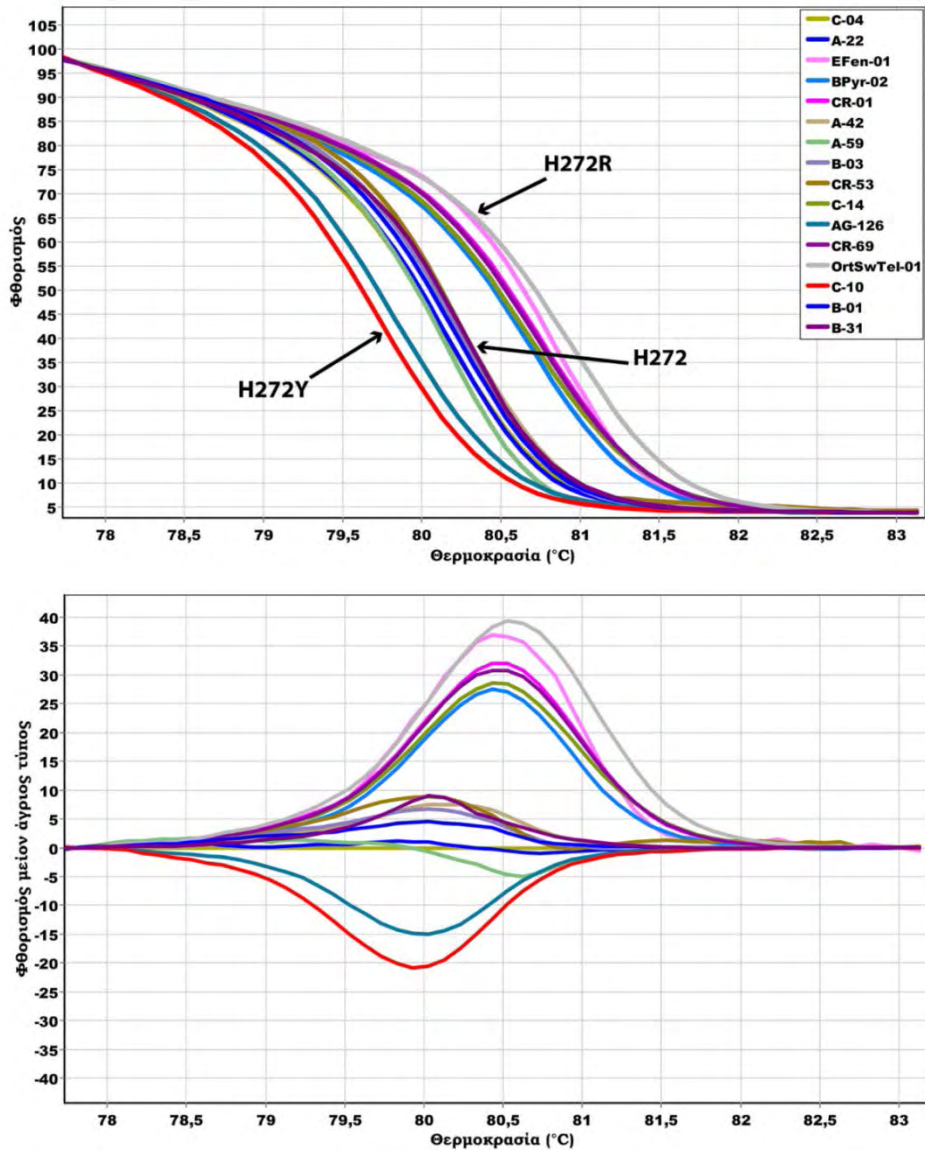
Αμυγδαλώσεις	Φαινότυπος	Fenhexamid (Hyd)		Pyraclostrobin (QoI)		Boscalid (Bos)		Carbendazim (Ben)		Iprodione (Dic)		
		FA12	G143	H272	E198	F200	1365	V368	Q369	N373		
E-Fen-01	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	S	A	R	A	-	N	-	-	-	-	
B-Pyr-02	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	S	A	R	A	-	N	-	F	H	-	
Ort-Sw-02b	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	V	-	R	A	-	-	-	-	P	S	
CR-32	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	V	A	R	A	-	N	-	-	-	-	
CR-18	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	S	-	R	A	-	N	-	-	-	-	
CR-01	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	S	A	R	A	-	N	-	-	-	-	
Bl-pr-01	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	S	A	R	A	-	N	-	-	-	-	
Leh-23	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	S	A	Y	A	-	A	-	-	-	-	
A-42	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	V	A	-	A	-	A	-	F	H	-	
A-59	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	V	A	-	A	-	A	-	F	H	-	
A-83	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	V	-	-	A	-	N	-	-	-	-	
A-57	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	V	-	-	A	-	A	-	F	H	-	
B-01	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	S	-	-	A	-	A	-	-	P	S	
C-03	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	V	A	-	A	-	A	-	-	-	-	
C-49	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	S	A	-	A	-	N	-	-	-	-	
Sw-Sw-01b	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Phen <sup>M</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	V	A	-	A	-	A	-	-	P	S	
CR-53	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Ben <sup>M</sup> Dic <sup>M</sup> R	V	A	-	-	-	-	Y	-	-	-	
C-14	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	S	A	-	A	-	A	-	A	N	-	
B-08	Hyd <sup>R</sup> QoI <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	V	A	-	A	-	A	-	-	F	H	
AG-126	QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	-	A	Y	-	-	-	-	-	P	S	
AG-80	QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	-	A	R	A	-	N	-	-	-	-	
CR-69	QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	-	A	R	A	-	N	-	-	-	-	
CR-51	QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	-	A	R	A	-	A	-	F	H	-	
Ort-Sw-Tel-01a	QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	-	A	R	A	-	N	-	-	-	-	
CR-08	QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	-	A	R	A	-	A	-	-	P	S	
Leh-15	QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ani <sup>R</sup> Ben <sup>H</sup> R	-	A	R	A	-	-	-	-	-	-	
Leh-06	QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	-	A	R	A	-	A	-	-	N	-	
C-07	QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ben <sup>M</sup> Dic <sup>M</sup> R	-	A	Y	-	-	Y	-	Y	S	-	
C-10	QoI <sup>R</sup> Bos <sup>R</sup> Ben <sup>M</sup> Dic <sup>M</sup> R	-	A	Y	-	-	Y	-	Y	S	-	
C-32	Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	-	-	-	A	-	A	-	A	-	-	
B-03	Ben <sup>H</sup> Dic <sup>M</sup> R	-	-	-	A	-	A	-	S	-	-	
B-31	Ben <sup>H</sup> R	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	
Sw-Fiz-01c	Ben <sup>M</sup> R	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	
C-04	Άγριου τύπου	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A-22	Άγριου τύπου	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A-25	Άγριου τύπου	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Επιπλέον, η μεθοδολογία αξιολογήθηκε περαιτέρω και από την ανίχνευση των πολυμορφισμών στο κωδικόνιο 272 του γονιδίου *sdhB*. Η αλληλούχιση είχε εμφανίσει προηγουμένως τρεις πολυμορφισμούς στη θέση αυτή, οι οποίες κωδικοποιούν τα αμινοξέα ιστιδίνη (H), αργινίνη (R) και τυροσίνη (Y). Όπως μπορεί να διακριθεί στο Διάγραμμα 12A οι αλλαγές των αμινοξέων H272R και H272Y ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς από την ανάλυση HRM. Οι απομονώσεις που έφεραν αυτές τις μεταλλάξεις στη σύνθεση αμινοξέων, σχημάτισαν δύο διακριτές ομάδες στα γραφήματα καμπυλών τήξης. Η άγριου τύπου απομόνωση C-04 επιλέχθηκε ως ο γενότυπος αναφοράς για τη δημιουργία των διαγραμμάτων διαχωρισμού (Διάγραμμα 12B-οριζόντιος άξονας). Οι φαινότυποι οι οποίοι είχαν χαρακτηριστεί ευαίσθητοι στο boscalid *in vitro* και είχαν ιστιδίνη (H) στη θέση 272 σχημάτισαν ένα σύμπλεγμα καμπυλών τήξης με την άγριου τύπου απομόνωση, ενώ ο γονότυπος των ανθεκτικών απομονώσεων διαφοροποιήθηκε ανάλογα με τη μετάλλαξη (H272R ή H272Y). Όλες οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν κατά την αλληλούχιση, ανιχνεύθηκαν και από την ανάλυση HRM, ενισχύοντας περαιτέρω την ευαισθησία της μεθόδου.

Στις περιπτώσεις των γονιδίων *cytb*, *BenA* και *bos1* η ανάλυση HRM εφαρμόστηκε εξ' αρχής για την ανίχνευση διαφορών στο γενότυπο ενώ η ταυτοποίηση των καμπυλών τήξης έγινε είτε με αλληλούχιση αντιπροσωπευτικών δειγμάτων από κάθε σύμπλεγμα είτε με διασταύρωση με άλλες μεθόδους (AS-PCR). Η υψηλή ανθεκτικότητα στα QoIs μυκητοκτόνα σχετίζεται με τη μετάλλαξη G143A στο γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνες του κυτοχρώματος *b*. Το ζεύγος εκκινητών CG143-F/R σχεδιάστηκε να εντοπίσει τον πολυμορφισμό μέσω της εφαρμογής HRM. Τρεις ξεχωριστές ομάδες σχηματίστηκαν στα διαγράμματα των καμπυλών τήξης της HRM. Το ένα από αυτά τα συμπλέγματα μάλιστα διέφερε κατά πολύ από τα υπόλοιπα δύο (διαφορά 4 °C). Η απεικόνιση του προϊόντος της HRM σε πηκτή αγαρόζης έδειξε ότι πρόκειται για ένα τμήμα του γονιδίου μήκους 1200-1300 βάσεων (bp). Κατά πάσα πιθανότητα πρόκειται για την παρουσία του εσονίου Bcbi-143/144 μήκους 1205 bp το οποίο σε συνδυασμό με τις 73 bp της περιοχής που σχεδιάστηκε να ενισχύσει ο εκκινητής, έδωσε ένα προϊόν 1278 bp (Διάγραμμα 13A). Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι και τα τρία αυτά δείγματα του διαγράμματος ήταν όλα άγριου τύπου.

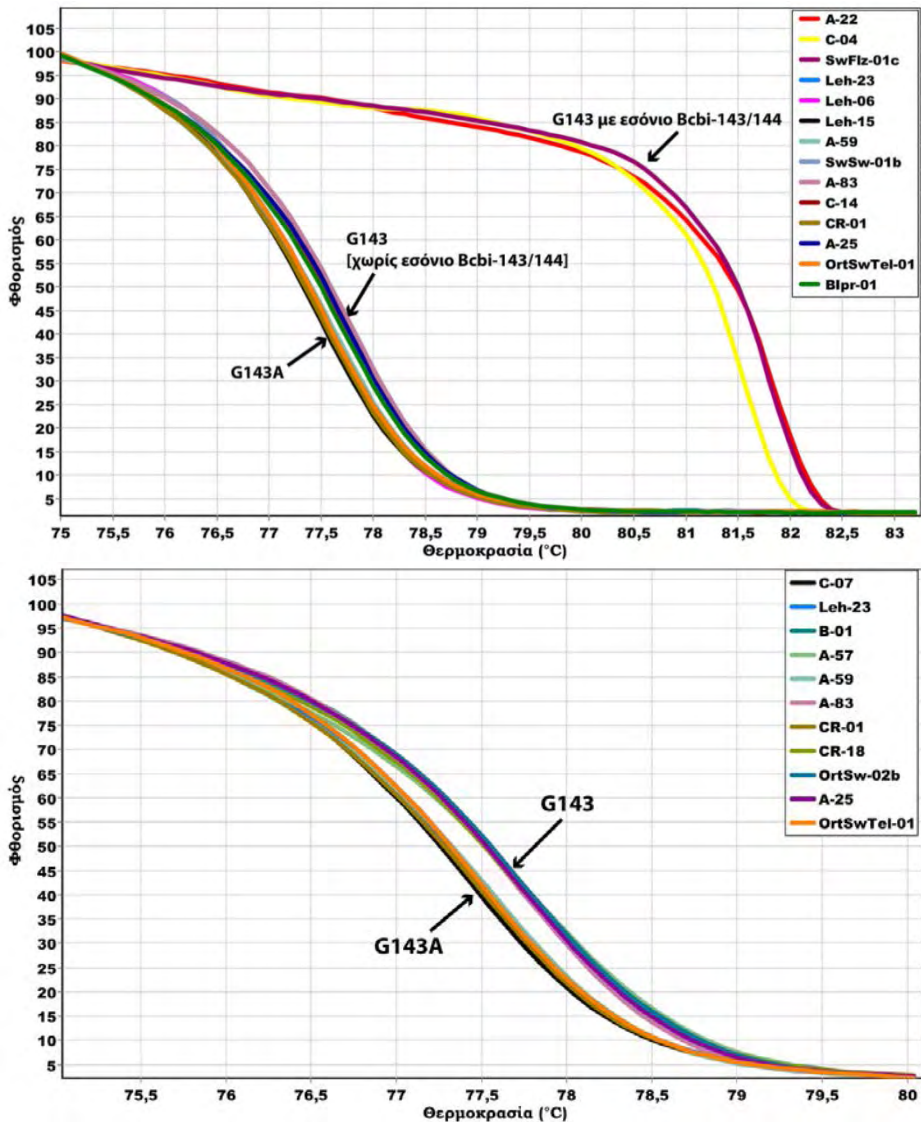


**Διάγραμμα 11.** Ανίχνευση πολυμορφισμών με θερμική αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης στη θέση 412 της πρωτεΐνης Erg27. **A** Ομαλοποιημένα δεδομένα. **B** Γράφημα διαχωρισμού το οποίο σχηματίστηκε με τη χρήση του γενοτύπου 'άγριου τύπου' A-22 ως άξονας χ. Οι ενδεικτικές καμπύλες τήξης σχηματίζουν τρεις διακριτές ομάδες που αντιστοιχούν στην κωδικοποίηση της φαινολαλανίνης (F), βαλίνης (V) ή σερίνης (S) στην αλληλουχία του προϊόντος. Οι F412S και F412V μεταλλάξεις σχετίζονται με ανθεκτικότητα στο fenhexamid.



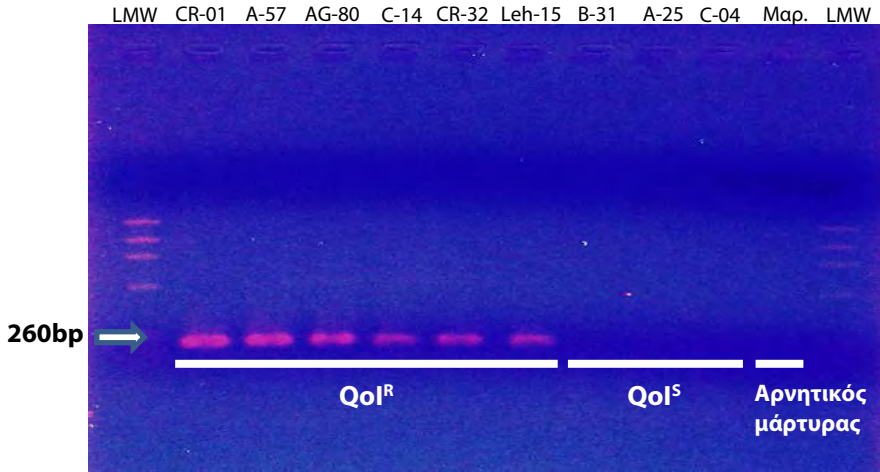
**Διάγραμμα 12.** Ανίχνευση πολυμορφισμών με θερμική αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης στη θέση 272 της πρωτεΐνης SdhB. **A** Ομαλοποιημένα δεδομένα. **B** Γράφημα διαχωρισμού το οποίο σχηματίστηκε με τη χρήση του γενοτύπου 'άγριου τύπου' C-04 ως άξονας χ. Οι ενδεικτικές καμπύλες τήξης σχηματίζουν τρεις διακριτές ομάδες που αντιστοιχούν στην κωδικοποίηση της ιστιδίνης (H), αργινίνης (R) ή τυροσίνης (Y) στην αλληλουχία του προϊόντος. Οι H272R και H272Y μεταλλάξεις σχετίζονται με ανθεκτικότητα στο boscalid.





**Διάγραμμα 13.** Ανίχνευση πολυμορφισμών με θερμική αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης στη θέση 143 του κυτοχρώματος b. **A** Μετά από ομαλοποίηση των δεδομένων σχηματίστηκαν τρεις διακριτές ομάδες καμπυλών τήξης εκ των οποίων η μία χαρακτηρίστηκε από την ύπαρξη του εσωνίου Bcbi-143/144 και διαφοροποιήθηκε από τις άλλες δύο κατά 4 °C. **B** Η διάκριση των δύο γενοτύπων που δεν φέρουν το εσόνιο στο προϊόν της PCR κωδικοποιούν είτε τη γλυκίνη (G) είτε την αλανίνη (A). Η G143A μετάλλαξη συνδέεται με υψηλή ανθεκτικότητα στα QoIs μυκητοκτόνα.

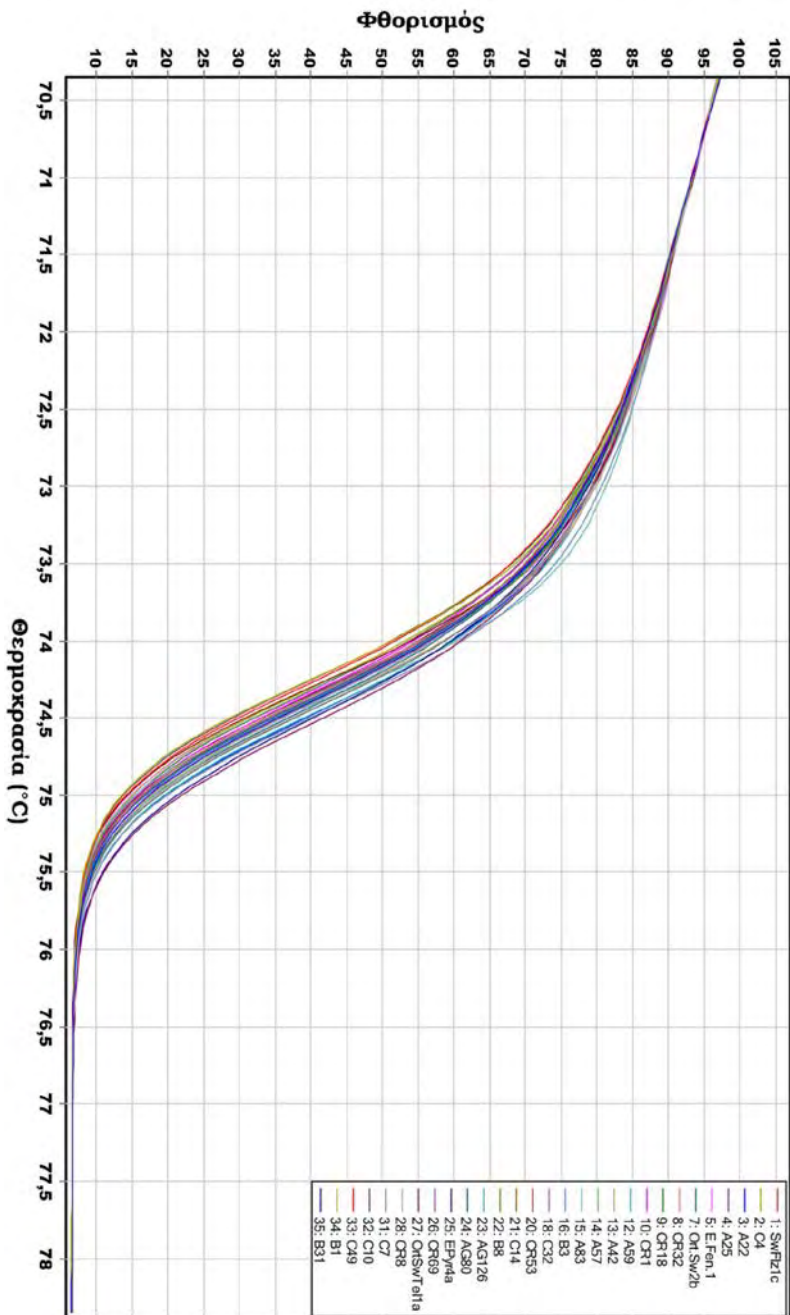
## Απομονώσεις



**Εικόνα 24.** Ανίχνευση ανθεκτικών στα QoIs απομονώσεων *B. cinerea* με εφαρμογή AS-PCR. R=ανθεκτική, S=ευαίσθητη.

Οι γενότυποι των απομονώσεων που δεν έφεραν το πρόσθετο εσόνιο σχημάτισαν διαφορετικά προφίλ καμπυλών τήξης (Διάγραμμα 13A). Όπως αναμενόταν, η αλλαγή του νουκλεοτιδίου από G σε C με αποτέλεσμα την αλλαγή του αμινοξέος γλυκίνη (GGT) σε αλανίνη (GCT) θα είχε διαφορά 0.3 °C (Πίνακας 12). Οι απομονώσεις που δεν έφεραν τη μετάλλαξη G143A σχημάτισαν ένα σύμπλεγμα καμπυλών με την άγριου τύπου απομόνωση A-25 (Διάγραμμα 13B). Οι απομονώσεις που έφεραν τη μετάλλαξη σχημάτισαν διαφορετικό προφίλ ενώ η παρουσία της επιβεβαιώθηκε και από τη διεξαγωγή AS-PCR (Εικόνα 24). Από τις 29 Qol<sup>R</sup> απομονώσεις, πέντε δεν φαίνεται να είχαν τη μετάλλαξη σύμφωνα με την ανάλυση HRM. Όταν έγινε AS-PCR όμως ο αριθμός των Qol<sup>R</sup> απομονώσεων που δεν εμφάνισαν τη μετάλλαξη ανέβηκε στις έξι, καθιστώντας την HRM πολύ πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση των πολυμορφισμών. Οι ίδιες απομονώσεις υποβλήθηκαν και σε ανάλυση HRM για την ανίχνευση της μετάλλαξης F129L στο γονίδιο *cytB* που προσδίδει μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας στα QoIs μυκητοκτόνα. Ωστόσο, καμία διαφορά στο γενότυπο δεν ανιχνεύθηκε στην περιοχή αυτή (Διάγραμμα 14).

Η ανάλυση του προϊόντος BN198/200-F/R στο γονίδιο της β-τουμπουλίνης με την HRM, έδειξε την ύπαρξη τριών διαφορετικών γενοτύπων (Διάγραμμα 15A). Ο διαχωρισμός στην περίπτωση αυτή ήταν πιο εύκολος καθώς κάθε γενότυπος συνέπεσε και με την έκφραση διαφορετικών επιπέδων ευαισθησίας στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. Οι υψηλής ανθεκτικότητας απομονώσεις σχημάτισαν μία ομάδα καμπυλών τήξης η οποία ήταν σαφώς διαχωρισμένη από εκείνη του άγρι-



**Διάγραμμα 14.** Ανίχνευση πολλαμορφισμών με θερμοκή αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης στη θέση 129 του κυτοχρώματος b. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στο γενότυπο μεταξύ των δειγμάτων.

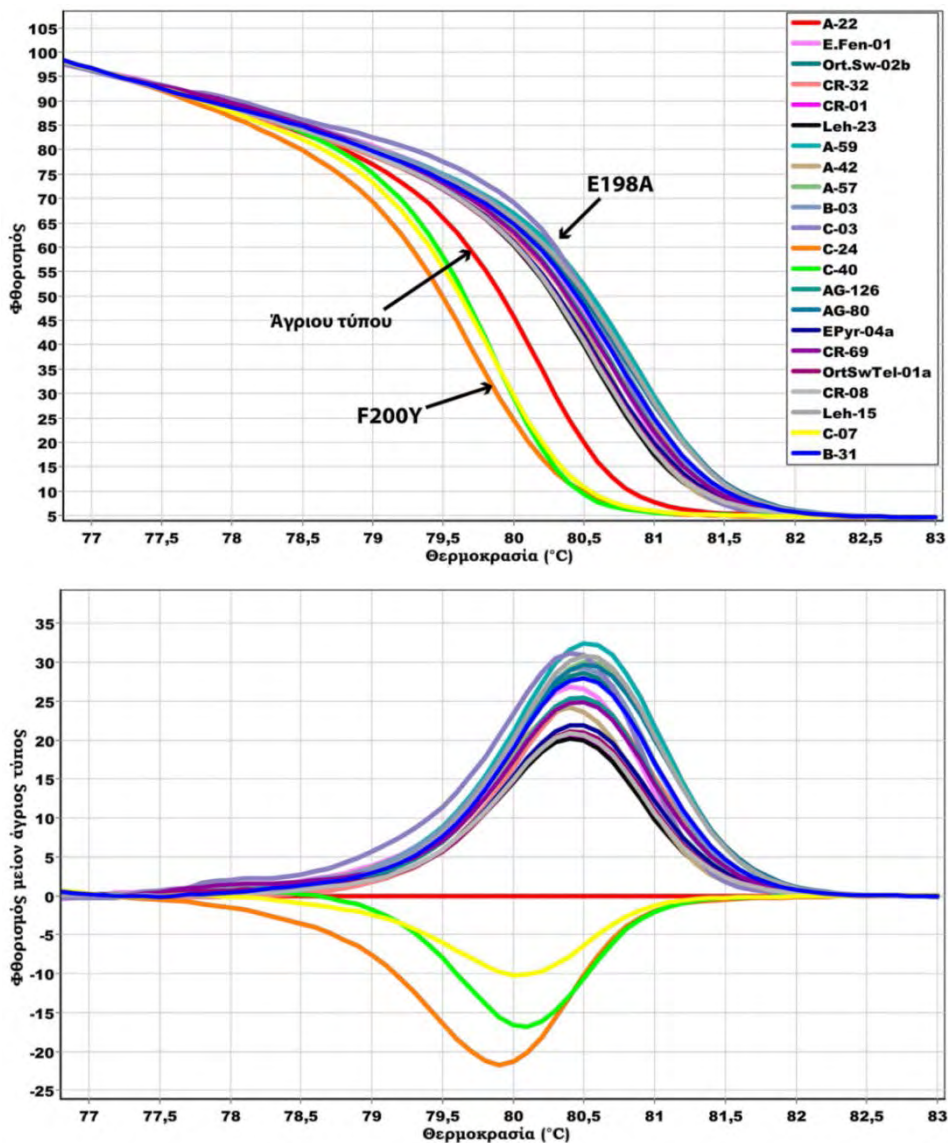
ου τύπου όπως επίσης και από τη γονοτυπική ομάδα που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση μετρίων επιπέδων ανθεκτικότητας (Διάγραμμα 15B). Αντιπροσωπευτικά δείγματα από κάθε σύμπλεγμα καμπυλών αλληλουχήθηκαν (Παράρτημα III) και διαπιστώθηκε ότι οι χαρακτηρισμένες ως υψηλής ανθεκτικότητας απομονώσεις *in vitro* στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα έφεραν τη μετάλλαξη E198A, ενώ οι μετρίου επιπέδου ανθεκτικές απομονώσεις την F200Y. Όπως και στην περίπτωση ανίχνευσης της H272 μετάλλαξης στα καρβοξαμιδικά, η εμφάνιση του 'άγριου τύπου' γενοτύπου στο μέσο των διαγραμμάτων διευκόλυε το διαχωρισμό (εκατέρωθεν) των ανθεκτικών γενοτύπων.

Στην περιοχή 82 bp OS365/73-F/R του γονιδίου *bos1* η ανάλυση με HRM έδειξε έντονο πολυμορφισμό. Ανιχνεύτηκαν έξι διαφορετικοί γενοίτιποι ανάλογα με τη σύνθεση των αμινοξέων (πέντε απεικονίζονται στο Διάγραμμα 16A). Ένας επιπρόσθετος φυσικός πολυμορφισμός ανιχνεύτηκε σε άγριου τύπου απομονώσεις και δε συμπεριλήφθηκε στο διάγραμμα. Όπως διαφαίνεται και στο Διάγραμμα 16B οι μετρίως ανθεκτικές στο iprodione απομονώσεις παρήγαγαν καμπύλες τήξης ανάλογα με τους επιμέρους πολυμορφισμούς. Η αλληλούχιση δειγμάτων από κάθε ομάδα καμπυλών κατέδειξε τέσσερις διαφορετικές γονοτυπικές ομάδες (Παράρτημα II) σε σχέση με τις άγριου τύπου απομονώσεις. Η αλλαγή στη σύνθεση των αμινοξέων που παρατηρήθηκε σε αυτές τις περιπτώσεις ήταν: I365N, I365S, Q369P και N373S, V368F και Q369H (Πίνακας 14). Όλες αυτές οι απομονώσεις σαφώς διαχωρίστηκαν από την άγριου τύπου απομόνωση C-04 καταδεικνύοντας την πολύ μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου, η οποία ανιχνεύει αλλαγές στο γονιδίωμα ακόμα και ενός νουκλεοτιδίου.

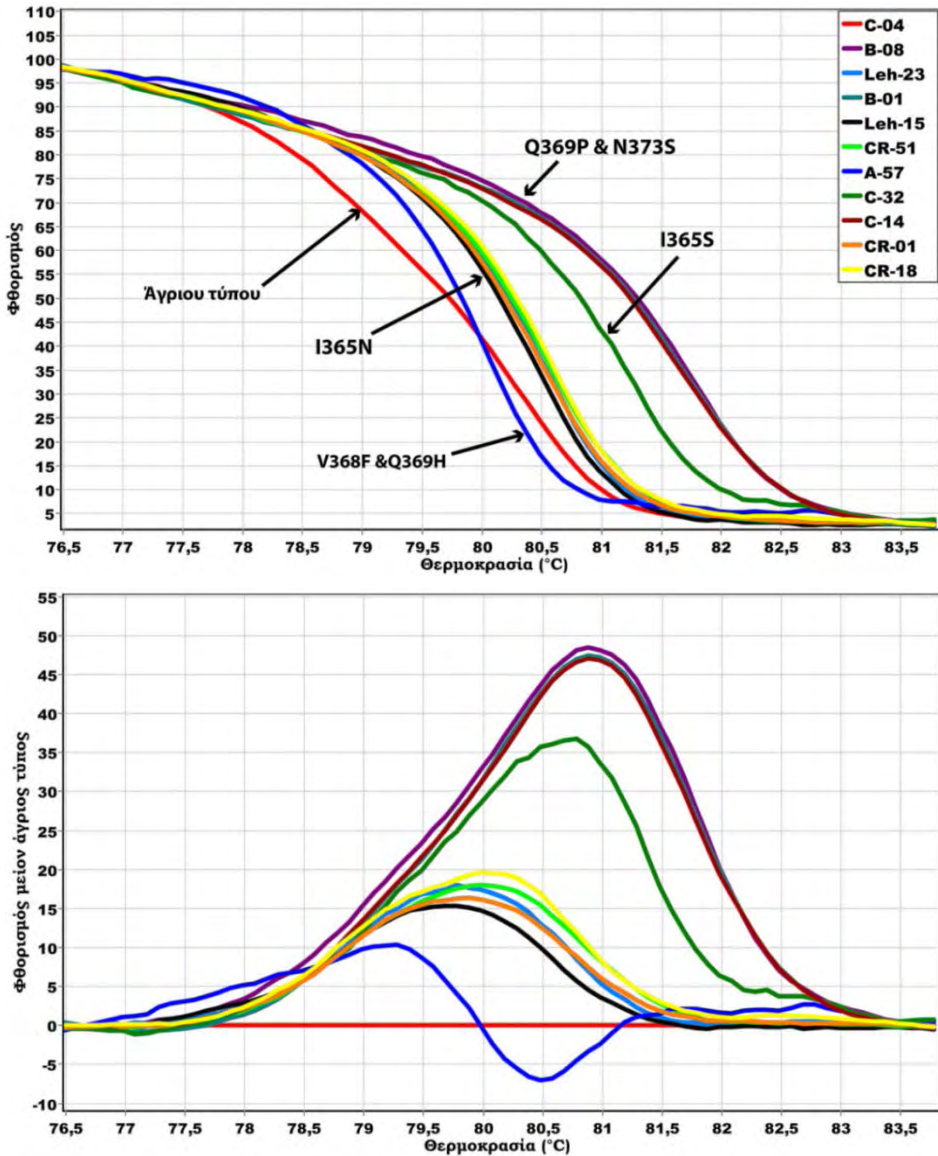
#### Μεταθετά στοιχεία

Στις συνολικά 40 απομονώσεις που εξετάστηκαν, τριάντα δύο χαρακτηρίστηκαν από την ύπαρξη και των δύο μεταθετών στοιχείων *boty* και *flipper* (τύπος *transposa*). Έξι απομονώσεις δεν έφεραν κανένα μεταθετό στοιχείο (τύπος *vacuma*) ενώ δύο χαρακτηρίστηκαν από την ύπαρξη μόνο του *boty* στοιχείου (τύπος *boty*). Οι συχνότητες των *boty* και *flipper* στελεχών ήταν ενδεικτική της συνολικότερης εικόνας του πληθυσμού του παθογόνου ανεξαρτήτως ποικιλίας και τοποθεσίας δειγματοληψίας. Ο τύπος *transposa* ήταν κυρίαρχος (συχνότητα 80 % του πληθυσμού), με μεγάλη διαφορά από τους υπόλοιπους (Εικόνα 25).

-



**Διάγραμμα 15.** Ανίχνευση πολυμορφισμών με θερμική αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης στις θέσεις 198 και 200 της πρωτεΐνης ΒεΝΑ. **A** Ομαλοποιημένα δεδομένα. **B** Γράφημα διαχωρισμού το οποίο σχηματίστηκε με τη χρήση του γενότυπου ‘άγριου τύπου’ A-22 ως άξονας χ. Οι ενδεικτικές καμπύλες τήξης σχηματίζουν τρεις διακριτές ομάδες. Σε σχέση με τον άγριο τύπου γενότυπο που κωδικοποιεί το γλουταμικό οξύ (E) στη θέση 198 και τη φαινυλαανίνη στη θέση 200, η κωδικοποίηση της αλανίνης στη θέση 198 (E198A) και της τυροσίνης στη θέση 200 (F200Y) προσδίδει υψηλή και μέτρια ανθεκτικότητα στο carbendazim, αντίστοιχα.

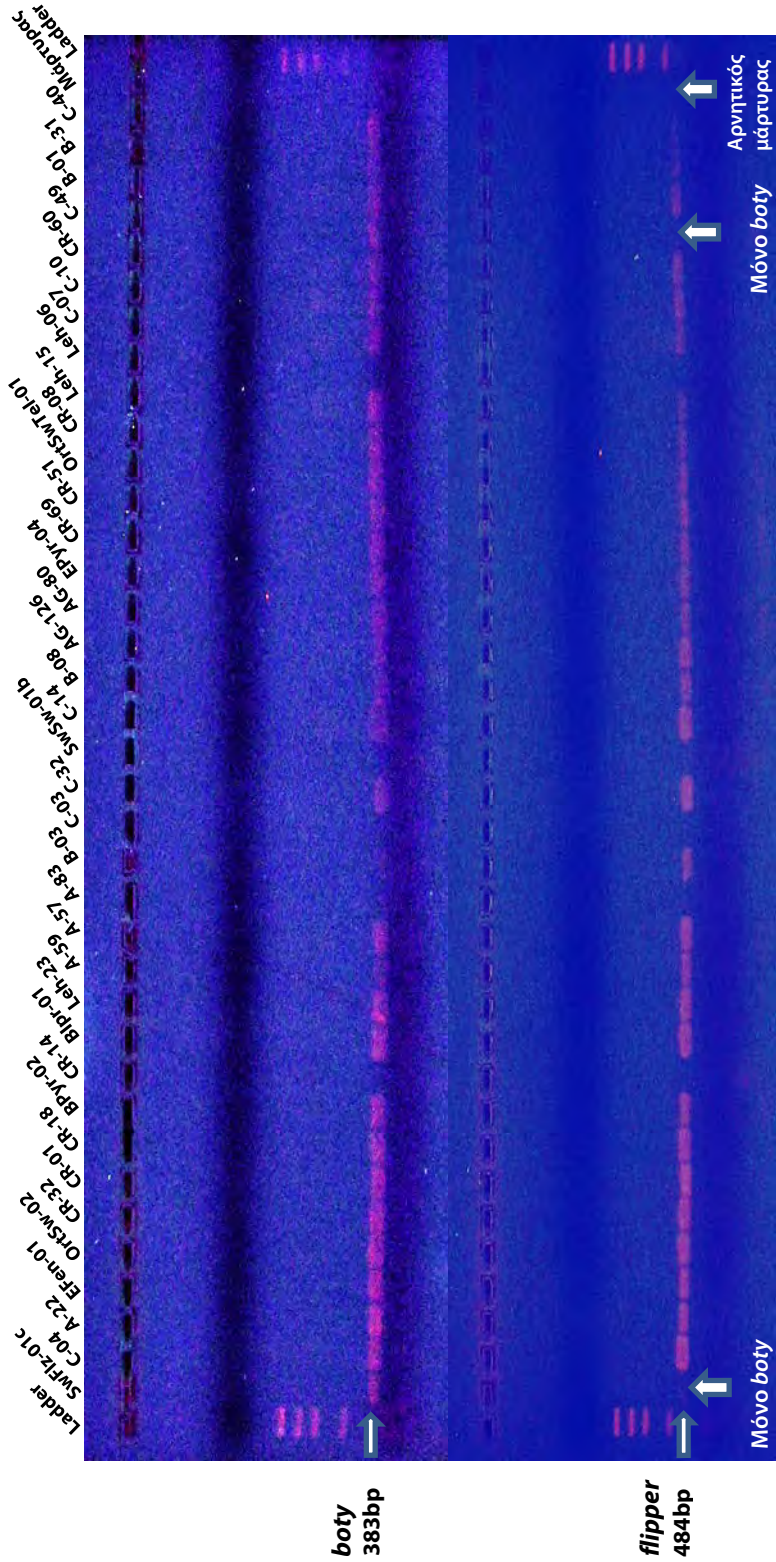


**Διάγραμμα 16.** Ανίχνευση πολυμορφισμών που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα δικαρβοξυμιδικά μυκητοκτόνα με θερμική αποδιάταξη υψηλής ανάλυσης σε τμήμα της πρωτεΐνης Bos1. **A** Ομαλοποιημένα δεδομένα. **B** Γράφημα διαχωρισμού το οποίο σχηματίστηκε με τη χρήση του γενότυπου 'άγριου τύπου' C-04 ως άξονα χ. Στις ενδεικτικές καμπύλες τήξης διακρίνονται πέντε διαφορετικές ομάδες. Σε σχέση με τον άγριο τύπου γενότυπο διακρίνονται οι μεταλλάξεις της ισολευκίνης σε ασπαραγίνη (I365N) ή σερίνη (I365S), οι ταυτόχρονες μεταλλάξεις της γλουταμίνης και ασπαραγίνης σε προλίνη και σερίνη (Q369P & N373S), και οι ταυτόχρονες μεταλλάξεις της βαλίνης και γλουταμίνης σε φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη (V368F & Q369H), αντίστοιχα.

## Συζήτηση

Στην ενότητα αυτή έγινε ο μοριακός χαρακτηρισμός ανθεκτικών απομονώσεων του *B. cinerea* οι οποίες συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές όπου καλλιεργούνται μαρούλια. Ο μοριακός χαρακτηρισμός ανθεκτικών στελεχών στα μυκητοκτόνα fenhexamid, pyraclostrobin, boscalid, iprodione και carbendazim και η κατάταξη του πληθυσμού με βάση τα μεταθετά στοιχεία *boty* και *flipper* έγινε με εφαρμογή μοριακών τεχνικών σε γνωστές πολυμορφικές περιοχές του γονιδιώματος. Η μέθοδος της HRM εφαρμόστηκε για πρώτη φορά ως διαγνωστικό εργαλείο ανίχνευσης της ανθεκτικότητας σε παθογόνα των φυτών παρουσιάζοντας σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων μοριακών τεχνικών.

Σε όλες σχεδόν τις απομονώσεις *B. cinerea* με υψηλή ανθεκτικότητα στο fenhexamid διαπιστώθηκε μετάλλαξη της φαινυλαλανίνης (F) στη θέση 412 του γονιδίου *erg27*. Οι F412 μεταλλάξεις εντοπίζονται στο καρβοξυλικό άκρο της διαμεμβρανικής περιοχής της 3-κετορεδουκτάσης μεταβάλλοντας τη δομή της πρωτεΐνης (Fillinger *et al.*, 2008). Στην παρούσα έρευνα, η F412S μετάλλαξη βρέθηκε σε όλες τις απομονώσεις του παθογόνου από υπαίθριες καλλιέργειες μαρουλιού ενώ η μετάλλαξη F412V εντοπίστηκε στο μεγαλύτερο μέρος του Hyd<sup>R</sup> πληθυσμού αντίστοιχης καλλιέργειας θερμοκηπίου. Η F412V μετάλλαξη έχει βρεθεί σε πολύ χαμηλά ποσοστά στη Χιλή, στη Γαλλία, στη Γερμανία και στις ΗΠΑ (Fillinger *et al.*, 2008, Esterio *et al.*, 2011, Grabke *et al.*, 2013). Πάντως, οι Fillinger *et al.* (2008) δεν διέκριναν διαφορές στις παραμέτρους προσαρμοστικότητας των Hyd<sup>R</sup> στελεχών που φέρουν τις μεταλλάξεις F412S, F412V και F412I. Η παθογένεια αυτών των στελεχών φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται άμεσα, ωστόσο επηρεάζονται ορισμένα στάδια του κύκλου της ασθένειας όπου δεν υπάρχει η πίεση από τις εφαρμογές με το fenhexamid. Για παράδειγμα κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού τα ανθεκτικά στελέχη που φέρουν τις F412 μεταλλάξεις παρουσιάζουν μειονεκτήματα στην προσαρμοστικότητα έναντι των υπολοίπων στελεχών και πιθανότατα να υπάρξει μια μείωση στον πληθυσμό τους. Από τα δείγματα που εξετάστηκαν μία ανθεκτική στο fenhexamid απομόνωση δεν έφερε μετάλλαξη στη θέση 412 του γονιδίου. Πιθανότατα να συνδέεται με μετάλλαξη σε άλλη θέση του γονιδίου, της οποίας η επίπτωση στη λειτουργία της πρωτεΐνης παραμένει άγνωστη (Saito *et al.*, 2010, Grabke *et al.*, 2013).



**Εικόνα 25.** Ανίχνευση των μεταθετών στοιχείων *boty* και *flipper* με εφαρμογή PCR. Διακρίνονται 2 απομονώσεις που φέρουν μόνο το *boty* μεταθετό στοιχείο (τύπος *boty*), 5 που δε φέρουν κανένα από τα δύο (τύπος *vascuima*) και 30 που έχουν και τα δύο (τύπος *transposa*).



Με εφαρμογή της ανάλυσης HRM, η αναμενόμενη μετάλλαξη στη θέση 143 του γονιδίου του κυτοχρώματος *b* ανιχνεύθηκε στα ανθεκτικά στα QoIs στελέχη, αλλά όχι πάντοτε. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από την AS-PCR. Οι Ishii *et al.* (2009) διέκριναν παρόμοια αποτελέσματα σε ανθεκτικές στα QoIs απομονώσεις του *B. cinerea* στην Ιαπωνία και τα απέδωσαν στο φαινόμενο της ετεροπλασμίας. Η ταυτόχρονη παρουσία σε ένα κύτταρο ανθεκτικών και ευαίσθητων στα QoIs μιτοχονδρίων έχει διαπιστωθεί και σε άλλα παθογόνα όπως στα *Venturia inaequalis* και *Podosphaera leucotricha* (Zheng *et al.*, 2000, Lesemann *et al.*, 2006). Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύονται από πρόσφατα δεδομένα απώλειας της ανθεκτικότητας *in vitro* ύστερα από υποκαλλιέργειες των απομονώσεων σε υποστρώματα χωρίς μυκητοκτόνο (Ishii, 2010). Δεδομένου ότι πριν την εξαγωγή του DNA οι απομονώσεις ελέγχθηκαν ως προς τα επίπεδα ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα, η αύξηση της συχνότητας των ευαίσθητων μιτοχονδρίων στα κύτταρα πρέπει να έγινε κατά το στάδιο ανάπτυξης της απομόνωσης σε PDB. Πάντως, οι De Miccolis Angelini *et al.* (2012) διαπίστωσαν απώλεια της ανθεκτικότητας κατόπιν μόνο μίας μεταφοράς απομονώσεων σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς μυκητοκτόνο. Αντίθετα, σε πολλές άλλες μελέτες δεν έχει διαπιστωθεί αυτή η αδυναμία συσχέτισης της υψηλής ανθεκτικότητας με την G143A μετάλλαξη (Bardas *et al.*, 2010, Leroux *et al.*, 2010, Fernández-Ortuño *et al.*, 2012b, De Miccolis Angelini *et al.*, 2012).

Από την ανάλυση HRM διαπιστώθηκε η παρουσία εσονίου 1205 bp σε ορισμένες ευαίσθητες στα QoIs απομονώσεις. Η ύπαρξη ενδεχόμενης μετάλλαξης (G143A) εμποδίζει την απομάκρυνση του εσονίου κατά τη διαδικασία ωρίμανσης του mRNA η οποία τελικά θα οδηγούσε στο σχηματισμό μη λειτουργικού κυτοχρώματος *b* (Grasso *et al.*, 2006). Πρόσφατες μελέτες έχουν επισημάνει την πολυμορφική αυτή δομή του κυτοχρώματος *b* σε διάφορες απομονώσεις *B. cinerea* (Banno *et al.*, 2009, Jiang *et al.*, 2009, Leroux *et al.*, 2010, Samuel *et al.*, 2011, De Miccolis Angelini *et al.*, 2012). Στην παρούσα μελέτη η ύπαρξη του εσονίου ανιχνεύθηκε σε 3 από τις 7 ευαίσθητες στα QoIs απομονώσεις. Αν και έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η ύπαρξη δύο τύπων κυτοχρώματος *b* μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα αυτά, εντούτοις χρειάζονται περαιτέρω έρευνες προς αυτή την κατεύθυνση (Banno *et al.*, 2009).

Όλες οι ανθεκτικές στο boscalid απομονώσεις έφεραν μεταλλάξεις (H272R και H272Y) στο γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνες για την υπομονάδα SdhB της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος. Η παρουσία της H272R μετάλλαξης ανιχνεύθηκε στο μεγαλύτερο μέρος του Bos<sup>R</sup> πληθυσμού που απομονώθηκε από μαρούλια (14 από τις 18 απομονώσεις). Η κυριαρχία του γενοτύπου αυτού διαπιστώθηκε και σε καλλιέργειες φράουλας και μήλων στην Ελλάδα και στις ΗΠΑ

(Veloukas *et al.*, 2011, Yin *et al.*, 2011, Fernández-Ortuño *et al.*, 2012b). Αντίθετα, σε καλλιέργειες αμπέλου στη Γαλλία και στη Γερμανία φαίνεται ότι επικρατεί ο H272Y γενότυπος (Leroux *et al.*, 2010). Στην παρούσα έρευνα η H272Y μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε όλες τις απομονώσεις των QoI<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ben<sup>MR</sup>Dic<sup>MR</sup> και Hyd<sup>R</sup>QoI<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> φαινοτύπων πολλαπλής ανθεκτικότητας. Ανιχνεύθηκαν απομονώσεις με ανθεκτικότητα μόνο στο pyraclostrobin ή στα pyraclostrobin+boscalid (διπλή ανθεκτικότητα) αλλά όχι μόνο στο boscalid. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την εφαρμογή στην πράξη πρώτα των στρομπιλουρινών και έπειτα των καρβοξαμιδικών μυκητοκτόνων υποδηλώνει ότι η ανθεκτικότητα στα QoIs μπορεί να επιλέχθηκε πριν την εμφάνιση της διπλής ανθεκτικότητας. Σύμφωνα με τους Fernández-Ortuño *et al.* (2012b) είναι πολύ πιο πιθανό η διπλή ανθεκτικότητα να προήλθε από ανθεκτικό στα QoIs παρά να προέκυψε από άγριου τύπου πληθυσμό. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων στον αγρό διαπιστώθηκε ότι ο φαινότυπος Hyd<sup>R</sup>QoI<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MR</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> αντικατέστησε τον Hyd<sup>R</sup>QoI<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MR</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup> φαινότυπο πολλαπλής ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα στο boscalid (Bos<sup>R</sup>) προστέθηκε ύστερα από εφαρμογή της δραστικής ουσίας κατά το 3<sup>ο</sup> έτος πειραματισμού στον αγρό.

Η επιλογή στον αγρό των στελεχών που φέρουν τη μετάλλαξη H272R φαίνεται ότι έχει μικρή επίδραση στην αποτελεσματικότητα του boscalid. Οι μεταλλάξεις H272R/Y έχει βρεθεί ότι συνδέονται με μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας στο boscalid αν και έχει βρεθεί πιο μεγάλη παραλλακτικότητα στις τιμές EC<sub>50</sub> στελεχών που φέρουν την H272R μετάλλαξη (Veloukas *et al.*, 2011, Yin *et al.*, 2011). Ο Βελούκας (2013) διαπίστωσε ότι μεταξύ μυκητοκτόνων της ομάδας των καρβοξαμιδικών υπάρχουν διαφορές στην ευαισθησία που συνδέονται με το είδος του πολυμορφισμού. Οι μεταλλάξεις P225F, N230I και H272L προσέδωσαν ανθεκτικότητα σε όλα τα καρβοξαμιδικά μυκητοκτόνα. Αντίθετα οι απομονώσεις που έφεραν τις μεταλλάξεις H272R/Y ήταν μετρίως ανθεκτικές σε όλα τα καρβοξαμιδικά εκτός του fluopyram, στο οποίο ήταν ευαίσθητες (Lalève *et al.*, 2014). Η χρήση του fluopyram για τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης των στελεχών αυτών χρειάζεται προσεκτική διαχείριση γιατί ίσως ευνοηθεί η επιλογή στελεχών υψηλής ανθεκτικότητας στο αγρό και τεθεί σε κίνδυνο η αποτελεσματικότητα όλων των SDHIs (Βελούκας, 2013).

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *bos1* βρέθηκαν σε όλα τα μετρίως ανθεκτικά στο iprodione στελέχη του *B. cinerea*. Από τις 30 συνολικά απομονώσεις, δεκαεννέα έφεραν μεταλλάξεις στη θέση 365. Οι περισσότερες από αυτές (74 %) χαρακτηρίστηκαν από την I365N μετάλλαξη η οποία φαίνεται να είναι πιο συχνή στην Ευρώπη, στη Νέα Ζηλανδία και στις ΗΠΑ (Leroux *et al.*, 2002, Cui *et al.*, 2004,

Grabke *et al.*, 2014). Στην Ιαπωνία αντίθετα έχει επικρατήσει η I365S (Ma *et al.*, 2007, Banno *et al.*, 2008). Στην παρούσα έρευνα οι I365S μεταλλάξεις βρέθηκαν μόνο σε στελέχη τα οποία ήταν είτε μετρίως ανθεκτικά στο carbendazim (έφεραν την F200Y μετάλλαξη στο γονίδιο *BenA*) είτε εμφάνιζαν διπλή ανθεκτικότητα με το carbendazim (φαινότυπος *Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>*). Οι Banno *et al.* (2008) είχαν βρει παρόμοια περίπτωση επαναληψιμότητας της μετάλλαξης F200Y/I365S σε απομονώσεις από περιοχή της Ιαπωνίας. Η διαπίστωση ότι τα περισσότερα *Dic<sup>MR</sup>* φέρουν και τη μετάλλαξη E198A που προσδίδει την υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά δίνει πληροφορίες για την επιλογή αυτών των στελεχών: Η ευρεία χρήση των βενζιμιδαζολικών κατά των 'άγριου τύπου' στελεχών του *B. cinerea* οδήγησε στην επιλογή των ανθεκτικών στελεχών που φέρουν τη μετάλλαξη E198A και όχι εκείνων με την F200Y-στη συνέχεια, η ευρεία χρήση των δικαρβοξιμιδικών μυκητοκτόνων οδήγησε στην επικράτηση των στελεχών που φέρουν συνήθως την I365S/N μετάλλαξη (Banno *et al.*, 2008). Η παρουσία του φαινοτύπου αυτού χαρακτηρίζεται από μια σταθερότητα εδώ και 3 δεκαετίες (Pappas, 1997, Yourman *et al.*, 2000).

Ο γενότυπος I365N μαζί με τους V368F-Q369H (τύπος II) και Q369P-N373S (τύπος III) ανιχνεύθηκε σε πολλαπλής ανθεκτικότητας απομονώσεις. Η ανίχνευση όλων των τύπων των μεταλλάξεων σε μετρίως ανθεκτικά στο iprodione στελέχη, σε γεωγραφικά απομακρυσμένες περιοχές καταδεικνύει την ευρεία εξάπλωση των γενότυπων αυτών (Banno *et al.*, 2008). Άλλες μελέτες που να αφορούν στη συσχέτιση αυτών των μεταλλάξεων ως μέρος των πολλαπλής ανθεκτικότητας στελεχών δυστυχώς δεν υπάρχουν και επομένως δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για το αν όλες αυτές οι μεταλλάξεις αποτελούν μέρος της εξέλιξης της πολλαπλής ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα των στελεχών αυτών στο fludioxonil (*Phen<sup>MR</sup>*) και στις ανιλινοπυριμιδίνες (*Ani<sup>R</sup>*) πιθανότατα να εμπλέκει στον μηχανισμό της ανθεκτικότητας και την αυξημένη λειτουργία των συμπλεγμάτων πρωτεϊνών ABC και MFS για την μείωση της τοξικότητας των δραστικών ουσιών, εκτός από τις σημειακές μεταλλάξεις (Leroch *et al.*, 2013). Όμως, η εμφάνιση υψηλής ανθεκτικότητας στις ανιλινοπυριμιδίνες σίγουρα δεν μπορεί να εξηγηθεί από τη δράση μόνο αυτών των μεταφορέων καθώς τα όλα τα δεδομένα δείχνουν την ύπαρξη ποιοτικής ανθεκτικότητας (Myresiotis *et al.*, 2007). Επιπλέον, η δράση των μυκητοκτόνων fludioxonil και iprodione στο ωσμωτικό δυναμικό των κυττάρων πιθανότατα εμπλέκει διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για τα διάφορα στάδια μεταγωγής των σημάτων. Επομένως στα *Phen<sup>MR</sup>* όπως και στα *Ani<sup>R</sup>* στελέχη υπάρχουν και άλλοι άγνωστοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας (Vignutelli *et al.*, 2002, Fillinger *et al.*, 2012). Η δράση του μηχανισμού MDR ωστόσο ίσως να εξηγήει την εμφάνιση της ανθεκτικότητας των απομονώσεων που περιουλλέχθηκαν την

περίοδο 1993-1997 στις δύο αυτές ομάδες μυκητοκτόνων πριν την εφαρμογή τους στην πράξη. Η πιθανότητα ύπαρξης αυτού του μηχανισμού ανθεκτικότητας σε αυτές τις απομονώσεις και ο ρόλος του στην προδιάθεση για την ανάπτυξη πολλαπλών σημειακών μεταλλάξεων μένει να διερευνηθεί.

Στην παρούσα έρευνα οι περισσότερες απομονώσεις (80 %) περιείχαν και τα δύο μεταθετά στοιχεία *boty* και *flipper* (τύπος *transposa*) ενώ οι υπόλοιπες περιείχαν είτε μόνο το *boty* (τύπος *boty*) είτε κανένα από τα δύο (τύπος *vacuma*). Η συχνότητα ανίχνευσης των μεταθετών στοιχείων δεν διέφερε μεταξύ των γεωγραφικά απομακρυσμένων απομονώσεων του *B. cinerea*. Φαίνεται ότι η ύπαρξη γεωγραφικών εμποδίων (όπως είναι η οροσειρά της Πίνδου) δεν επηρεάζει την ανταλλαγή του γενετικού υλικού μεταξύ απομονώσεων που προσβάλλουν τον ίδιο ξενιστή (Karchani-Balma *et al.*, 2008). Η εμφάνιση των *transposa* στελεχών σε υψηλή συχνότητα φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από το είδος του ξενιστή (Ma & Michailides, 2005a, Kretschmer & Hahn, 2008, Samuel *et al.*, 2012). Σε καλλιέργειες κηπευτικών τα *transposa* στελέχη κυριαρχούν. Πρόσφατα, οι Leyronas *et al.* (2015) σύγκριναν φαινοτυπικά και μοριακά απομονώσεις του παθογόνου από μαρούλι και τομάτα χωρίς να διαπιστώσουν κάποιο είδος εξειδίκευσης με το ξενιστή. Κοινό στοιχείο όμως σε όλες τις προηγούμενες μελέτες είναι η τεράστια γενετική παραλλακτικότητα. Επίσης υπάρχει μεγάλη συσχέτιση της ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα με την ύπαρξη και των δύο μεταθετών στοιχείων, απαραίτητα δε του *boty*. Πρόσφατα, διαπιστώθηκε η ύπαρξη και άλλων μεταθετών στοιχείων (*boty-2* και *boty-3*) που μαζί με το *boty* ανήκουν στην κατηγορία των ρετρομεταθετονίων. Η παρουσία του μεταθετού στοιχείου *boty-3* στην περιοχή του προαγωγέα *mfsm2* σχετίζεται με την εμφάνιση και εξάπλωση των MDR2 και MDR3 στελεχών πολλαπλής ανθεκτικότητας στη Γερμανία και στη Γαλλία (Zhao *et al.*, 2009, Mernke *et al.*, 2011).

Η ευαισθησία της ανάλυσης HRM ήταν τέτοια ώστε ανιχνεύθηκαν διαφορές στο επίπεδο του ενός νουκλεοτιδίου. Η παραλλακτικότητα η οποία παρατηρήθηκε ανάμεσα στις καμπύλες της τήξης πιθανότατα να προκλήθηκε από τη μεταβολή στη συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων και των υπολοίπων αντιδραστηρίων στο μίγμα της PCR. Αυτό ήταν εμφανές στις δοκιμές με το *erg27* γονίδιο. Μόλις χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των δύο σταδίων στο γονίδιο *bos1*, οι καμπύλες τήξης ομαδοποιήθηκαν έχοντας ελάχιστη απόκλιση. Η τήξη ενός προϊόντος PCR δεν επηρεάζεται μόνο από τις φυσικές του ιδιότητες (π.χ. περιεχόμενο GC), αλλά και από τη μετάπτωση της θερμοκρασίας (Ririe *et al.*, 1997). Επομένως, οι παράμετροι της ανάλυσης HRM θα πρέπει να παραμένουν σταθερές για την αναπαραγωγή του

πειράματος. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το σχήμα των καμπυλών τήξης είναι ενδεικτικό των διαφορετικών γενοτύπων στην υπό εξέταση περιοχή (Ganopoulos *et al.*, 2012). Στην παρούσα έρευνα η ανάλυση HRM ανίχνευσε όλους τους πολυμορφισμούς που συνδέονταν με ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα fenhexamid, boscalid, pyraclostrobin, carbendazim και iprodione.

Ο χρόνος που απαιτήθηκε για τη διεξαγωγή της ανάλυσης HRM κυμάνθηκε από 82 έως 107 min. Ο μικρός χρόνος διεξαγωγής σε συνδυασμό με την εξέταση μέχρι και 92 διαφορετικών δειγμάτων (στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιούνταν 36 κάθε φορά) διευκολύνει την παραγωγική διαδικασία. Η ανάλυση HRM ως απόγονος της qPCR διεξάγεται σε κλειστούς μικροσωληνίσκους της PCR με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ο κίνδυνος επιμόλυνσης με επικίνδυνα χημικά όπως είναι το βρωμιούχο αιθίδιο που χρησιμοποιείται σε πιο συμβατικές αναλυτικές μοριακές μεθόδους όπως είναι τα RFLPs (Madesis *et al.*, 2014). Ακόμα και σε σχέση με την ποσοτική 'qPCR' η ανάλυση HRM είναι υψηλότερης ευκρίνειας και πιο οικονομική. Σε αντίθεση με την qPCR όπου χρησιμοποιούνται ανιχνευτές ή πολλαπλοί allele specific εκκινητές για το σχηματισμό των καμπυλών τήξης, η ανάλυση HRM γίνεται με ένα μόνο ζεύγος εκκινητών. Ωστόσο, σε περιπτώσεις όπου χρειάζεται να γίνει ο συνδυασμός qPCR-HRM μπορεί να εφαρμοσθεί με σχετικά χαμηλό κόστος (Rouleau *et al.*, 2009).

Αν και η ανάλυση HRM αναπτύχθηκε ως τεχνική γονοτύπησης, εντούτοις έχει περισσότερες εφαρμογές ως τεχνική ανίχνευσης μεταλλάξεων (Taylor, 2009). Τα άγνωστα δείγματα μπορούν να συγκριθούν με τις πρότυπες καμπύλες τήξης και να γίνει η ταυτοποίηση των γενοτύπων. Όταν η ανάλυση HRM εφαρμοσθεί σωστά, εξαλείφεται και η όποια ανάγκη για αλληλούχιση (Reed *et al.*, 2007). Σε περίπτωση που στο προϊόν της PCR-HRM υπάρξει φυσικός πολυμορφισμός τότε θα σχηματιστεί μία νέα ομάδα καμπυλών. Αφού γίνει η ταυτοποίηση του πολυμορφισμού τότε υπάρχει η δυνατότητα απομάκρυνσης της καμπύλης από το γράφημα ή επισήμανσής της ως φέρουσα διαφορετική μετάλλαξη. Για τη μείωση της πιθανότητας ύπαρξης φυσικών μεταλλάξεων σχεδιάζονται εκκινητές μικρού μήκους (<90 bp) όπου μεταξύ άλλων γίνεται καλύτερος διαχωρισμός των καμπυλών τήξης εξαιτίας της μεγαλύτερης διακύμανσης στη θερμοκρασία τήξης (Gundry *et al.*, 2003, Reed & Wittwer, 2004).

Η ανάλυση HRM μπορεί να αποτελέσει ένα γρήγορο και αξιόπιστο μοριακό εργαλείο για την ανίχνευση της δυναμικής των ανθεκτικών στελεχών του *B. cinerea* στον αγρό. Οι βιοδοκιμές *in vitro* παραμένουν ο ακρογωνιαίος λίθος στην ανίχνευση της πολλαπλής ανθεκτικότητας ώστε να είναι εφικτός ένας αρχικός έλεγχος στην ευαισθησία και να μπορούν να γίνονται περαιτέρω έρευνες για τυχόν νέες μεταλλάξεις στο γένωμα που προσδίδουν ανθεκτικότητα. Η ευρεία εξάπλωση των

φαινοτύπων πολλαπλής ανθεκτικότητας και τα ερωτηματικά που προκύπτουν σχετικά με την προέλευση της ανθεκτικότητας επιβάλουν την ανάπτυξη νέων και γρήγορων μοριακών τεχνικών ανίχνευσης της ανθεκτικότητας σε πολλά δείγματα ταυτόχρονα. Γι' αυτό και αναπτύχθηκε η ανάλυση HRM της οποίας η ακρίβεια αποτιμάται συνεχώς μέσα από διαρκείς εφαρμογές.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

### Διεθνείς

- Agrios GN, ed, 2005. *Plant Pathology*. Burlington, Massachusetts, USA: Elsevier Academic Press.
- Alastruey-Izquierdo A, Gómez-López A, Arendrup MC, *et al.*, 2012. Comparison of dimethyl sulfoxide and water as solvents for echinocandin susceptibility testing by the EUCAST methodology. *Journal of Clinical Microbiology* **50**, 2509-12.
- Albertini C, Thebaud G, Fournier E, Leroux P, 2002. Eburicol 14 alpha-demethylase gene (*CYP51*) polymorphism and speciation in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **106**, 1171-8.
- Amiri A, Heath SM, Peres NA, 2013. Phenotypic characterization of multifungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in Florida. *Plant Disease* **97**, 393-401.
- Amselem J, Cuomo CA, Van Kan JaL, *et al.*, 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Plos Genetics* **7**, e1002230.
- Anke T, Oberwinkler F, Steglich W, Schramm G, 1977. Strobilurins - new antifungal antibiotics from Basidiomycete *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Sing. *Journal of Antibiotics* **30**, 806-10.
- Arima K, Imanaka H, Kousaka M, Fukuta A, G. T, 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance produced by *Pseudomonas*. *Agricultural and Biological Chemistry* **28**, 575-6.
- Avenot HF, Michailides TJ, 2010. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* **29**, 643-51.
- Backhouse D, Willetts HJ, 1984. A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. *Canadian Journal of Microbiology* **30**, 171-8.
- Banno S, Fukumori F, Ichiishi A, *et al.*, 2008. Genotyping of benzimidazole-resistant and dicarboximide-resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. *Phytopathology* **98**, 397-404.
- Banno S, Yamashita K, Fukumori F, *et al.*, 2009. Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome *b* gene. *Plant Pathology* **58**, 120-9.



- Bardas GA, Myresiotis CK, Karaoglanidis GS, 2008. Stability and fitness of anilinopyrimidine-resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **98**, 443-50.
- Bardas GA, Veloukas T, Koutita O, Karaoglanidis GS, 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, Qols and fungicides of other chemical groups. *Pest Management Science* **66**, 967-73.
- Barkai-Golan R, Lavy-Meir G, Kopeliovitc E, 1988. Pectolytic and cellulolytic activity of *Botrytis cinerea* Pers. related to infection of non-ripening tomato mutants. *Phytopathologische Zeitschrift* **123**, 174-83.
- Baroffio CA, Siegfried W, Hilber UW, 2003. Long-term monitoring for resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, and hydroxylanilide fungicides in Switzerland. *Plant Disease* **87**, 662-6.
- Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M, Parr-Dobrzanski B, 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* **58**, 649-62.
- Beckerman JL, 2013. Detection of fungicide resistance. In: Nita M, ed. *Fungicides - Showcases of integrated plant disease management from around the world. InTech*, doi: 10.5772/55981.
- Beever RE, Weeds PL, 2007. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 29-52.
- Bennett MH, Gallagher MDS, Bestwick CS, Rossiter JT, Mansfield JW, 1994. The phytoalexin response of lettuce to challenge by *Botrytis cinerea*, *Bremia lactucae* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **44**, 321-33.
- Billard A, Fillinger S, Leroux P, et al., 2011. Fenhexamid resistance in the *Botrytis* species complex, responsible for grey mould disease. In: Thajuddin N, ed. *Fungicides - Beneficial and harmful aspects*, doi: 10.5772/27512.
- Billard A, Fillinger S, Leroux P, Lachaise H, Beffa R, Debieu D, 2012. Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. *Pest Management Science* **68**, 684-91.
- Birchmore RJ, Forster B, 1996. FRAC methods for monitoring the sensitivity of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides. *EPPO Bulletin* **26**, 181-97.
- Brent KJ, Hollomon DW, eds, 2007. *Fungicide resistance in crop protection: How can it be managed? FRAC monograph No 1*. Brussels, Belgium: Crop Life International.

- Brierley WB, 1921. On a form of *Botrytis cinerea*, with colourless sclerotia. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **210**, 83-114.
- Burgess DR, Bretag T, Keane PJ, 1997. Seed to seedling transmission of *Botrytis cinerea* in chickpea and disinfestation of seed with moist heat. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **37**, 223-9.
- Carre DD, Coyier DL, 1984. Influence of atmospheric humidity and free water on germ tube growth of *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathology* **74**, 1136.
- Cecchini G, 2003. Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annual Review of Biochemistry* **72**, 77-109.
- Chapeland F, Fritz R, Lanen C, Gredt M, Leroux P, 1999. Inheritance and mechanisms of resistance to anilinopyrimidine fungicides in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **64**, 85-100.
- Chiu WL, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J, 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* **6**, 325-30.
- Clark CA, Lorbeer JW, 1976. Comparative histopathology of *Botrytis squamosa* and *Botrytis cinerea* on onion leaves. *Phytopathology* **66**, 1279-89.
- Colmenares AJ, Aleu J, Duran-Patron R, Collado IG, Hernandez-Galan R, 2002. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology* **28**, 997-1005.
- Cools HJ, Mullins JGL, Fraaije BA, et al., 2011. Impact of recently emerged sterol 14 $\alpha$ -demethylase (*CYP51*) variants of *Mycosphaerella graminicola* on azole fungicide sensitivity. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 3830-7.
- Cui W, Beever RE, Parkes SL, Templeton MD, 2004. Evolution of an osmosensing histidine kinase in field strains of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) in response to dicarboximide fungicide usage. *Phytopathology* **94**, 1129-35.
- Cutler HG, Jacyno JM, Harwood JS, Dulik D, Goodrich PD, Roberts RG, 1993. Botcinolide: a biologically active natural product from *Botrytis cinerea*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **57**, 1980-2.
- Daniels A, Lucas JA, 1995. Mode of action of the anilino-pyrimidine fungicide pyrimethanil. 1. *In vivo* activity against *Botrytis fabae* on broad bean (*Vicia faba*) leaves. *Pesticide Science* **45**, 33-41.
- Davidse LC, 1986. Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and biological impact. *Annual Review of Phytopathology* **24**, 43-65.
- De Kock SL, Holz G, 1992. Blossom-end rot of pears: systemic infection of flowers and immature fruit by *Botrytis cinerea*. *Phytopathologische Zeitschrift* **135**, 317-27.

- De Miccolis Angelini RM, Rotolo C, Masiello M, Gerin D, Pollastro S, Faretra F, 2014. Occurrence of fungicide resistance in populations of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy. *Pest Management Science* **70**, 1785–96.
- De Miccolis Angelini RM, Rotolo C, Masiello M, Pollastro S, Ishii H, Faretra F, 2012. Genetic analysis and molecular characterisation of laboratory and field mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to QoI fungicides. *Pest Management Science* **68**, 1231-40.
- De Waard MA, 1996. Synergism and antagonism in fungicide mixtures containing sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology* **86**, 1280-3.
- Debieu D, Bach J, Hugon M, Malosse C, Leroux P, 2001. The hydroxylanilide fenhexamid, a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Management Science* **57**, 1060-7.
- Debieu D, Bach J, Montesinos E, Fillinger S, Leroux P, 2013. Role of sterol 3-ketoreductase sensitivity in susceptibility to the fungicide fenhexamid in *Botrytis cinerea* and other phytopathogenic fungi. *Pest Management Science* **69**, 642-51.
- Del Sorbo G, Andrade AC, Van Nistelrooy JGM, Van Kan JaL, Balzi E, De Waard MA, 1997. Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters. *Molecular & General Genetics* **254**, 417-26.
- Dewey FM, Yohalem D, 2007. Detection, quantification and immunolocalisation of *Botrytis* species. In: *Botrytis: Biology, pathology and control*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 181-94.
- Dik AJ, Wubben JP, 2007. Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 319-33.
- Diolez A, Marches F, Fortini D, Brygoo Y, 1995. Boty, a long-terminal repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 103-8.
- Edwards SG, Seddon B, 2001. Selective media for the specific isolation and enumeration of *Botrytis cinerea* conidia. *Letters in Applied Microbiology* **32**, 63-6.
- Elad Y, 2000. *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases - Control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Science and Technology* **10**, 499-507.

- Elad Y, Shtienberg D, 1995. *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integrated Pest Management Reviews* **1**, 15-29.
- Elad Y, Stewart A, 2007. Microbial control of *Botrytis* spp. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 223-41.
- Elmer PaG, Reglinski T, 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology* **55**, 155-77.
- Esterio M, Ramos C, Walker AS, Fillinger S, Leroux P, Auger J, 2011. Phenotypic and genetic characterization of Chilean isolates of *Botrytis cinerea* with different levels of sensitivity to fenhexamid. *Phytopathologia Mediterranea* **50**, 414-20.
- Faretra F, Antonacci E, 1987. Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. under controlled environmental conditions. *Phytopathologia Mediterranea* **26**, 29-35.
- Faretra F, Antonacci E, Pollastro S, 1988. Sexual behavior and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* **134**, 2543-50.
- Faretra F, Pollastro S, 1991. Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research* **95**, 943-51.
- Faretra F, Pollastro S, 1993a. Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) from 9 countries. *Plant Pathology* **42**, 48-57.
- Faretra F, Pollastro S, 1993b. Isolation, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* resistant to the phenylpyrrole fungicide CGA 173506. *Mycological Research* **97**, 620-4.
- Fernández-Ortuño D, Bryson PK, Grabke A, Schnabel G, 2013. First report of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* from a strawberry field in Virginia. *Plant Disease* **97**, 848-9.
- Fernández-Ortuño D, Chen F, Schnabel G, 2012a. Resistance to cyprodinil and lack of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry in North and South Carolina. *Plant Disease* **97**, 81-5.
- Fernández-Ortuño D, Chen F, Schnabel G, 2012b. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. *Plant Disease* **96**, 1198-203.

- Fernández-Ortuño D, Torés JA, De Vicente A, Pérez-García A, 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology* **11**, 1-9.
- Fillinger S, Ajouz S, Nicot PC, Leroux P, Bardin M, 2012. Functional and structural comparison of pyrrolnitrin- and iprodione-induced modifications in the class III histidine-kinase Bos1 of *Botrytis cinerea*. *Plos One* **7**, e42520.
- Fillinger S, Leroux P, Auclair C, Barreau C, Al Hajj C, Debieu D, 2008. Genetic analysis of fenhexamid-resistant field isolates of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**, 3933-40.
- Fournier E, Giraud T, Albertini C, Brygoo Y, 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* **97**, 1251-67.
- Fournier E, Giraud T, Loiseau A, et al., 2002. Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). *Molecular Ecology Notes* **2**, 253-5.
- Fournier E, Levis C, Fortini D, Leroux P, Giraud T, Brygoo Y, 2003. Characterization of Bc-hch, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* het-c vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. *Mycologia* **95**, 251-61.
- Fritz R, Lanen C, Chapeland-Leclerc F, Leroux P, 2003. Effect of the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil on the cystathionine  $\beta$ -lyase of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **77**, 54-65.
- Fritz R, Lanen C, Colas V, Leroux P, 1997. Inhibition of methionine biosynthesis in *Botrytis cinerea* by the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. *Pesticide Science* **49**, 40-6.
- Gabriel EM, Douarre PE, Fitzgibbon S, et al., 2012. High-resolution melting analysis for rapid detection of linezolid resistance (mediated by G2576T mutation) in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Microbiological Methods* **90**, 134-6.
- Ganopoulos I, Argiriou A, Tsaftaris A, 2011. Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products. *Food Control* **22**, 532-41.
- Ganopoulos I, Madesis P, Zambounis A, Tsaftaris A, 2012. High-resolution melting analysis allowed fast and accurate closed-tube genotyping of *Fusarium oxysporum* formae speciales complex. *FEMS Microbiology Letters* **334**, 16-21.
- Garcia-Arenal F, Sagasta EM, 1980. Scanning electron microscopy of *Botrytis cinerea* penetration of bean (*Phaseolus vulgaris*) hypocotyls. *Phytopathologische Zeitschrift* **99**, 37-42.

- Georgopoulos SG, 1977. Pathogens become resistant to chemicals. In: Horsfall JG, Cowling EB, eds. *Plant disease - An advanced treatise - How disease is managed, vol. 1*. New York: Academic Press, 327-45.
- Georgopoulos SG, Alexandri E, Chrysayi M, 1972. Genetic evidence for action of oxathiin and thiazole derivatives on succinic dehydrogenase system of *Ustilago maydis* mitochondria. *Journal of Bacteriology* **110**, 809-17.
- Georgopoulos SG, Skylakakis G, 1986. Genetic variability in the fungi and the problem of fungicide resistance. *Crop Protection* **5**, 299-305.
- Giraud T, Fortini D, Levis C, et al., 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuina*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* **89**, 967-73.
- Giraud T, Fortini D, Levis C, Leroux P, Brygoo Y, 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 1177-85.
- Gisi U, Sierotzki H, Cook A, Mcaffery A, 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* **58**, 859-67.
- Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R, 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **37**, 179-91.
- Govrin EM, Levine A, 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* **10**, 751-7.
- Grabke A, Fernández-Ortuño D, Amiri A, et al., 2014. Characterization of iprodione resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry and blackberry. *Phytopathology* **104**, 396-402.
- Grabke A, Fernandez-Ortuno D, Schnabel G, 2013. Fenhexamid resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry fields in the Carolinas is associated with four target gene mutations. *Plant Disease* **97**, 271-6.
- Grasso V, Palermo S, Sierotzki H, Garibaldi A, Gisi U, 2006. Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science* **62**, 465-72.
- Guimarães RL, Chetelat RT, Stotz HU, 2004. Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* is dominant in hybrids with tomato, and involves induced hyphal death. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 13-23.

- Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT, 2003. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical Chemistry* **49**, 396-406.
- Guo ZJ, Miyoshi H, Komyoji T, Haga T, Fujita T, 1991. Uncoupling activity of a newly developed fungicide, fluazinam [3-Chloro-N-(3-chloro-2,6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-trifluoromethyl-2-pyridinamine]. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1056**, 89-92.
- Hägerhäll C, 1997. Succinate: quinone oxidoreductases - Variations on a conserved theme. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1320**, 107-41.
- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-8.
- Hamamoto H, Hasegawa K, Nakaune R, *et al.*, 2000. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 alpha-demethylase gene (*CYP51*) in *Penicillium digitatum*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3421-6.
- Hänßler G, Pontzen R, 1999. Effect of fenhexamid on the development of *Botrytis cinerea*. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* **52**, 158-76.
- Harold JFS, Fitt BDL, Landau S, 1997. Temperature and effects of seed-borne *Botrytis cinerea* or *Alternaria linicola* on emergence of linseed (*Linum usitatissimum*) seedlings. *Journal of Phytopathology* **145**, 89-97.
- Harper AM, Strange RN, Langcake P, 1981. Characterization of the nutrients required by *Botrytis cinerea* to infect broad bean leaves. *Physiological Plant Pathology* **19**, 153-67.
- Hayashi K, Schoonbeek HJ, De Waard MA, 2002. Expression of the ABC transporter BcatrD from *Botrytis cinerea* reduces sensitivity to sterol demethylation inhibitor fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **73**, 110-21.
- Hilber UW, Schüepp H, Schwinn FJ, 1994. Resistance risk evaluation of fludioxonil, a new phenylpyrrole fungicide. In: Heaney S, Slawson D, Hollomon DW, Smith M, Russell PE, Parry DW, eds. *Fungicide resistance, BCPC Monograph No 60*. Surrey, England: British Crop Protection Council, 397-402.
- Holz G, Coertze S, Williamson B, 2007. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 9-27.

- Horsefield R, Yankovskaya V, Sexton G, *et al.*, 2006. Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) - a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 7309-16.
- Ingram DM, Meister CW, 2006. Managing *Botrytis* gray mold in greenhouse tomatoes using traditional and bio-fungicides. In. *Plant Health Progress*, doi: 10.1094/PHP-2006-0718-01-RS.
- Ishii H, 2010. QoI fungicide resistance: current status and the problems associated with DNA-based monitoring. In: Gisi U, Chet I, Gullino ML, eds. *Recent developments in management of plant diseases*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 37-45.
- Ishii H, Fountaine J, Chung WH, *et al.*, 2009. Characterisation of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest Management Science* **65**, 916-22.
- Jarvis WR, 1962a. The dispersal of spores of *Botrytis cinerea* Fr. in a raspberry plantation. *Transactions British Mycological Society* **45**, 549-59.
- Jarvis WR, 1962b. Splash dispersal of spores of *Botrytis cinerea* Pers. *Nature* **193**, 599.
- Jarvis WR, ed, 1977. *Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology and pathogenicity - a guide to the literature*. Ottawa: Hignell Printing Ltd.
- Jiang JH, Ding LS, Michailides TJ, Li HY, Ma ZH, 2009. Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **93**, 72-6.
- Johnston DJ, Williamson B, 1992. Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **96**, 343-9.
- Joseph-Horne T, Hollomon DW, 2000. Functional diversity within the mitochondrial electron transport chain of plant pathogenic fungi. *Pest Management Science* **56**, 24-30.
- Kalamarakis AE, Petsikos-Panagiotarou N, Mavroidis B, Ziogas BN, 2000. Activity of fluazinam against strains of *Botrytis cinerea* resistant to benzimidazoles and/or dicarboximides and to a benzimidazole-phenylcarbamate mixture. *Phytopathologische Zeitschrift* **148**, 449-55.
- Kanetis L, Forster H, Jones CA, Borkovich KA, Adaskaveg JE, 2008. Characterization of genetic and biochemical mechanisms of fludioxonil and pyrimethanil resistance in field isolates of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* **98**, 205-14.



- Karchani-Balma S, Gautier A, Raies A, Fournier E, 2008. Geography, plants, and growing systems shape the genetic structure of Tunisian *Botrytis cinerea* populations. *Phytopathology* **98**, 1271-9.
- Kars I, Van Kan JaL, 2007. Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of *Botrytis*. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 99-118.
- Katan T, Ovadia S, 1985. Effect of chlorothalonil on resistance of *Botrytis cinerea* to dicarboximides in cucumber glasshouses. *EPPO Bulletin* **15**, 365-9.
- Kato T, Suzuki K, Takahashi J, Kamoshita K, 1984. Negatively correlated cross-resistance between benzimidazole fungicides and methyl *N*-(3,5-dichlorophenyl)-carbamate. *Journal of Pesticide Science* **9**, 489-95.
- Kerssies A, 1993. Horizontal and vertical distribution of airborne conidia of *Botrytis cinerea* in a gerbera crop grown under glass. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **99**, 303-11.
- Kerssies A, Bosker-Van Zessen AI, Wagemakers CaM, Van Kan JaL, 1997. Variation in pathogenicity and DNA polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Disease* **81**, 781-6.
- Khan MI, Marroni V, Keenan S, Scott IW, Viljanen-Rollinson SH, Bulman S, 2013. Enhanced molecular identification of *Botrytis* spp. from New Zealand onions. *European Journal of Plant Pathology* **136**, 495-507.
- Kim YK, Xiao CL, 2010. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in populations of *Botrytis cinerea* from stored apples in Washington state. *Plant Disease* **94**, 604-12.
- Kim YK, Xiao CL, 2011. Stability and fitness of pyraclostrobin- and boscalid-resistant phenotypes in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* **101**, 1385-91.
- Koike ST, Gladders P, Paulus AO, eds, 2007. *Vegetable diseases: A colour handbook*. London: Manson Publishing Ltd.
- Konstantinidis G, 2005. Elsevier's dictionary of medicine and biology : in English, Greek, German, Italian, and Latin, part I - Basic table. In. Amsterdam: Elsevier, 1825.
- Korolev N, Mamiev M, Zahavi T, Elad Y, 2011. Screening of *Botrytis cinerea* isolates from vineyards in Israel for resistance to fungicides. *European Journal of Plant Pathology* **129**, 591-608.

- Kretschmer M, Hahn M, 2008. Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* **115**, 214-9.
- Kretschmer M, Leroch M, Mosbach A, *et al.*, 2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *Plos Pathogens* **5**, e1000696.
- Lalève A, Gamet S, Walker A-S, Debieu D, Toquin V, Fillinger S, 2014. Site-directed mutagenesis of the P225, N230 and H272 residues of succinate dehydrogenase subunit B from *Botrytis cinerea* highlights different roles in enzyme activity and inhibitor binding. *Environmental Microbiology* **16**, 2253–66.
- Legard DE, Mertely JC, Xiao CL, Chandler CK, Duval JR, Price JP, 2002. Cultural and chemical control of *Botrytis* fruit rot of strawberry in annual winter production system. *Acta Horticulturae* **567**, 651-4.
- Leroch M, Mernke D, Koppenhoefer D, *et al.*, 2011. Living colors in the gray mold pathogen *Botrytis cinerea*: Codon-optimized genes encoding green fluorescent protein and mCherry, which exhibit bright fluorescence. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 2887-97.
- Leroch M, Plesken C, Weber RWS, Kauff F, Scalliet G, Hahn M, 2013. Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 159-67.
- Leroux P, 2007. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 195-222. (doi)
- 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**, 687-97.
- Leroux P, Fritz R, Debieu D, *et al.*, 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* **58**, 876-88.
- Leroux P, Gredt M, Leroch M, Walker AS, 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 6615-30.
- Leroux P, Walker A-S, 2011. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* **67**, 44-59.

- Lesemann S, Schimpke S, Dunemann F, Deising H, 2006. Mitochondrial heteroplasmy for the cytochrome *b* gene controls the level of strobilurin resistance in the apple powdery mildew fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Ev.) E.S. Salmon. *Journal of Plant Diseases and Protection* **113**, 259-66.
- Levis C, Fortini D, Brygoo Y, 1997. Flipper, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Molecular & General Genetics* **254**, 674-80.
- Leyronas C, Bryone F, Duffaud M, Troulet C, Nicot PC, 2015. Assessing host specialization of *Botrytis cinerea* on lettuce and tomato by genotypic and phenotypic characterization. *Plant Pathology* **64**, 119–27.
- Li XZ, Zhou T, Yu H, 2006. Transformation of *Botrytis cinerea* with a green fluorescent protein (GFP) gene for the study of host-pathogen interactions. *Plant Pathology Journal* **6**, 134-40.
- Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF, Reisch BI, 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter* **12**, 6-13.
- Lorenz DH, Eichhorn KW, 1983. Investigations on *Botryotinia fuckeliana* Whetz, the perfect stage of *Botrytis cinerea* Pers. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* **90**, 1-11.
- Luchi N, Pratesi N, Simi L, *et al.*, 2011. High-resolution melting analysis: a new molecular approach for the early detection of *Diplodia pinea* in Austrian pine. *Fungal Biology* **115**, 715-23.
- Ma Z, Michailides TJ, 2005a. Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from different host plants in California. *Plant Disease* **89**, 1083-9.
- Ma Z, Yan L, Luo Y, Michailides TJ, 2007. Sequence variation in the two-component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **88**, 300-6.
- Ma ZH, Michailides TJ, 2005b. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* **24**, 853-63.
- Mackay JF, Wright CD, Bonfiglioli RG, 2008. A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars. *Plant Methods* **4**, e8.
- Madesis P, Ganopoulos I, Sakaridis I, Argiriou A, Tsaftaris A, 2014. Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International* **60**, 163-72.

- Malathrakis NE, 1989. Resistance of *Botrytis cinerea* to dichlofluanid in greenhouse vegetables. *Plant Disease* **73**, 138-41.
- Markoglou AN, Malandrakis AA, Vitoratos AG, Ziogas BN, 2006. Characterization of laboratory mutants of *Botrytis cinerea* resistant to QoI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* **115**, 149-62.
- Martinez F, Blancard D, Lecomte P, Levis C, Dubos B, Fermaud M, 2003. Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 479-88.
- Martinez F, Dubos B, Fermaud M, 2005. The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology* **95**, 692-700.
- Masner P, Muster P, Schmid J, 1994. Possible methionine biosynthesis inhibition by pyrimidinamine fungicides. *Pesticide Science* **42**, 163-6.
- Matheron ME, Porchas M, 2008. Effect of fungicides and lettuce cultivar on severity of *Botrytis* gray mold: 2007 Study. *Vegetable Report* **P-152**, 20-2.
- Mcnicol RJ, Williamson B, Dolan A, 1985. Infection of red raspberry styles and carpels by *Botrytis cinerea* and its possible role in post-harvest gray mold. *Annals of Applied Biology* **106**, 49-53.
- Meier U, 2001. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. In. *BBCB Monograph 2<sup>nd</sup> Edition*. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry.
- Mernke D, Dahm S, Walker AS, et al., 2011. Two promoter rearrangements in a drug efflux transporter gene are responsible for the appearance and spread of multidrug resistance phenotype MDR2 in *Botrytis cinerea* isolates in French and German vineyards. *Phytopathology* **101**, 1176-83.
- Micheli PA, 1729. *Nova plantarum genera: juxta tournefortii methodum disposita*. Florence: R.C. Magnae Principis.
- Michelmore RW, Truco MJ, Ochoa O, Mchale L, 2009. California lettuce research program. In. California, USA: The Genome Center and the Department of Plant Sciences, University of California, Davis.
- Millington RJ, Richardson CJ, 1995. Mode of action of the anilino-pyrimidine fungicide pyrimethanil. 2. Effects on enzyme-secretion in *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science* **45**, 43-8.
- Miura I, Kamakura T, Maeno S, Hayashi S, Yamaguchi I, 1994. Inhibition of enzyme secretion in plant pathogens by mepanipyrim, a novel fungicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **48**, 222-8.

- Moyano C, Alfonso C, Gallego J, Raposo R, Melgarejo P, 2003a. Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 515-22.
- Moyano C, Gomez V, Melgarejo P, 2004. Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. *Journal of Phytopathology* **152**, 484-90.
- Moyano C, Raposo R, Gomez V, Melgarejo P, 2003b. Integrated *Botrytis cinerea* management in southeastern spanish greenhouses. *Phytopathologische Zeitschrift* **151**, 80-5.
- Munoz G, Hinrichsen P, Brygoo Y, Giraud T, 2002. Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycological Research* **106**, 594-601.
- Myresiotis CK, Bardas GA, Karaoglanidis GS, 2008. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazole-resistant strains by these fungicides. *Plant Disease* **92**, 1427-31.
- Myresiotis CK, Karaoglanidis GS, Tzavella-Monari K, 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxylanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Disease* **91**, 407-13.
- Nakaune R, Adachi K, Nawata O, Tomiyama M, Akutsu K, Hibi T, 1998. A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3983-8.
- Nicot PC, Baille A, 1996. Integrated control of *Botrytis cinerea* on greenhouse tomatoes. In: Morris CE, Nicot PC, Nguyen-The C, eds. *Aerial Plant Surface Microbiology*. Springer US, 169-89.
- Noguchi R, Banno S, Ichikawa R, et al., 2007. Identification of OS-2 MAP kinase-dependent genes induced in response to osmotic stress, antifungal agent fludioxonil, and heat shock in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **44**, 208-18.
- Ong DCT, Yam WC, Siu GKH, Lee ASG, 2010. Rapid detection of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by high-resolution melting analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 1047-54.

- Oshima M, Banno S, Okada K, *et al.*, 2006. Survey of mutations of a histidine kinase gene BcOS1 in dicarboximide-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology* **72**, 65-73.
- Paplomatas EJ, Pappas AC, Antoniadis D, 2004. A relationship among fungicide-resistant phenotypes of *Botrytis cinerea* based on RAPD analysis. *Journal of Phytopathology* **152**, 503-8.
- Pappas AC, 1982. Inadequate control of grey mould on cyclamen by dicarboximide fungicides in Greece. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* **89**, 52-8.
- Pappas AC, 1997. Evolution of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in protected crops in Greece. *Crop Protection* **16**, 257-63.
- Pappas AC, 2000. Epidemiology and control of *Botrytis cinerea* in tomato crops grown under cover in Greece. *EPPO Bulletin* **30**, 269-74.
- Pappas AC, Elena K. Effect on grey mould of presence of *Botrytis cinerea* strains showing reduced sensitivity to dichlofluanid. In: Verhoeff K, Malathrakis NE, Williamson B, eds. *Proceedings of the 10th International Botrytis Symposium, 1992*. Heraklion, Crete, Greece: Pudoc Scientific Publishers, 252-6.
- Petit AN, Vaillant-Gaveau N, Walker AS, *et al.*, 2010. Determinants of fenhexamid effectiveness against grey mould on grapevine: Respective role of spray timing, fungicide resistance and plant defences. *Crop Protection* **29**, 1162-7.
- Petit AN, Vaillant-Gaveau N, Walker AS, *et al.*, 2011. Effects of fludioxonil on *Botrytis cinerea* and on grapevine defence response. *Phytopathologia Mediterranea* **50**, 130-8.
- Petsikos-Panayotarou N, Markellou E, Kalamarakis AE, Kyriakopoulou D, Malathrakis NE, 2003. *In vitro* and *in vivo* activity of cyprodinil and pyrimethanil on *Botrytis cinerea* isolates resistant to other botryticides and selection for resistance to pyrimethanil in a greenhouse population in Greece. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 173-82.
- Pietzka AT, Indra A, Stoger A, *et al.*, 2009. Rapid identification of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by rpoB gene scanning using high-resolution melting curve PCR analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **63**, 1121-7.
- Pillonel C, Meyer T, 1997. Effect of phenylpyrroles on glycerol accumulation and protein kinase activity of *Neurospora crassa*. *Pesticide Science* **49**, 229-36.
- Polach FJ, Abawi GS, 1975. Occurrence and biology of *Botryotinia fuckeliana* on beans in New York. *Phytopathology* **65**, 657-60.

- Pollastro S, Faretra F, Dicanio V, Deguido A, 1996. Characterization and genetic analysis of field isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to dichlofluanid. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 607-13.
- Price EP, Smith H, Huygens F, Giffard PM, 2007. High-resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 3431-6.
- Ramirez MV, Cowart KC, Campbell PJ, et al., 2010. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 4003-9.
- Raposo R, Gomez V, Urrutia T, Melgarejo P, 2001. Survival of *Botrytis cinerea* in southeastern Spanish greenhouses. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 229-36.
- Reed GH, Kent JO, Wittwer CT, 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* **8**, 597-608.
- Reed GH, Wittwer CT, 2004. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clinical Chemistry* **50**, 1748-54.
- Reglinski T, Elmer PaG, Taylor JT, Wood PN, Hoyte SM, 2010. Inhibition of *Botrytis cinerea* growth and suppression of botrytis bunch rot in grapes using chitosan. *Plant Pathology* **59**, 882-90.
- Reignault P, Mercier M, Bompeix G, Boccara M, 1994. Pectin methylesterase from *Botrytis cinerea* - Physiological, biochemical and immunochemical studies. *Microbiology-Uk* **140**, 3249-55.
- Resh HM, 2013. Hydroponic food production: A definitive guidebook for the advanced home gardener and the commercial hydroponic grower, 7th edition. In. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Rigotti S, Gindro K, Richter H, Viret O, 2002. Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) using PCR. *FEMS Microbiology Letters* **209**, 169-74.
- Rigotti S, Viret O, Gindro K, 2006. Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. *Phytopathologia Mediterranea* **45**, 253-60.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT, 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245**, 154-60.

- Romanazzi G, Nigro F, Ippolito A, Divenere D, Salerno M, 2002. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science* **67**, 1862-7.
- Rossall S, Mansfield JW, 1981. Nutrients and lesion formation by *Botrytis cinerea* on leaves of *Vicia faba*. *Transactions of the British Mycological Society* **76**, 172-5.
- Rosslensbroich HJ, Stuebler D, 2000. *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* **19**, 557-61.
- Rouleau E, Lefol C, Bourdon V, et al., 2009. Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to *MLH1* Germline mutations in Lynch syndrome. *Human Mutation* **30**, 867-75.
- Russell PE, 2004. *Sensitivity baselines in fungicide resistance: Research and management. FRAC monograph No. 3*. Brussels, Belgium: Crop Life International.
- Russell PE, 1995. Fungicide resistance: occurrence and management. *The Journal of Agricultural Science* **124**, 317-23.
- Saito S, Furuya S, Takayanagi T, Suzuki S, 2010. Phenotypic analyses of fenhexamid resistant *Botrytis cinerea* mutants. In: Carisse O, ed. *Fungicides. InTech*, 247-60.
- Saito S, Suzuki S, Takayanagi T, 2009. Nested PCR-RFLP is a high-speed method to detect fungicide-resistant *Botrytis cinerea* at an early growth stage of grapes. *Pest Management Science* **65**, 197-204.
- Salinas J, Glandorf DCM, Picavet FD, Verhoeff K, 1989. Effects of temperature, relative humidity and age of conidia on the incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **95**, 51-64.
- Samuel S, Papayiannis LC, Leroch M, Veloukas T, Hahn M, Karaoglanidis GS, 2011. Evaluation of the incidence of the G143A mutation and *cytb* intron presence in the cytochrome *bc-1* gene conferring QoI resistance in *Botrytis cinerea* populations from several hosts. *Pest Management Science* **67**, 1029-36.
- Samuel S, Veloukas T, Papavasileiou A, Karaoglanidis GS, 2012. Differences in frequency of transposable elements presence in *Botrytis cinerea* populations from several hosts in Greece. *Plant Disease* **96**, 1286-90.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-7.



- Shiraishi M, Fukutomi M, Akai S, 1970. Effect of temperature on the conidium germination and appressorium formation of *Botrytis cinerea*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **36**, 234-6.
- Shirane N, Masuko M, Hayashi Y, 1989. Light microscopic observation of nuclei and mitotic chromosomes of *Botrytis* species. *Phytopathology* **79**, 728-30.
- Shtienberg D, 2007. Rational management of *Botrytis*-incited diseases: Integration of control measures and use of warning systems. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 335-48.
- Shtienberg D, Elad Y, 1997. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **87**, 332-40.
- Sierotzki H, Frey R, Wullschlegel J, et al., 2007. Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for Qol resistance. *Pest Management Science* **63**, 225-33.
- Sierotzki H, Scalliet G, 2013. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology* **103**, 880-7.
- Slawecki RA, Ryan EP, Young DH, 2002. Novel fungitoxicity assays for inhibition of germination-associated adhesion of *Botrytis cinerea* and *Puccinia recondita* spores. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 597-601.
- Snow D, 1949. The germination of mould spores at controlled humidities. *Annals of Applied Biology* **36**, 1-13.
- Sowley ENK, Dewey FM, Shaw MW, 2010. Persistent, symptomless, systemic, and seed-borne infection of lettuce by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **126**, 61-71.
- Stammler G, Brix HD, Nave B, Gold R, Schoelf U, 2008. Studies on the biological performance of boscalid and its mode of action. In: Dehne HW, Deising HB, Gisi U, Kuck KH, Russell PE, Lyr H, eds. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds V*. Friedrichroda, Germany: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, 45-51.
- Stammler G, Speakman J, 2006. Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to boscalid. *Journal of Phytopathology* **154**, 508-10.
- Steinfeld U, Sierotzki H, Parisi S, Poirey S, Gisi U, 2001. Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*. *Pest Management Science* **57**, 787-96.

- Stotz HU, Elad Y, Powell ALT, Labavitch JM, 2007. Innovative biological approaches to *Botrytis* suppression. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 369-92.
- Suzuki K, Kato T, Takahashi J, Kamoshita K, 1984. Mode of action of methyl *N*-(3,5-dichlorophenyl)-carbamate in the benzimidazole-resistant isolate of *Botrytis cinerea*. *Journal of Pesticide Science* **9**, 497-501.
- Tamura O, 2000. Resistance development of grey mould on beans towards fluazinam and relevant counter-measures. *Proceedings of the 10th Symposium of Research Committee of Fungicides Resistance, 2000: The Phytopathological Society of Japan*, 7-16.
- Tan KK, Epton HaS, 1973. Effect of light on growth and sporulation of *Botrytis cinerea*. *Transactions of the British Mycological Society* **61**, 147-57.
- Taylor CF, 2009. Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochemical Society Transactions* **37**, 433-7.
- Terada H, 1990. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environmental Health Perspectives* **87**, 213-8.
- Topolovec-Pintarić S, 2011. Resistance to botryticides. In: Thajuddin N, ed. *Fungicides - Beneficial and harmful aspects*. 19-44.
- Van Beneden S, Pannecoucq J, Debode J, De Backer G, Höfte M, 2009. Characterisation of fungal pathogens causing basal rot of lettuce in Belgian greenhouses. *European Journal of Plant Pathology* **124**, 9-19.
- Van Den Heuvel J, Waterreus LP, 1983. Conidial concentration as an important factor determining the type of prepenetration structures formed by *Botrytis cinerea* on leaves of French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Pathology* **32**, 263-72.
- Vaughn CP, Elenitoba-Johnson KSJ, 2004. High-resolution melting analysis for detection of internal tandem duplications. *Journal of Molecular Diagnostics* **6**, 211-6.
- Veloukas T, Kalogeropoulou P, Markoglou AN, Karaoglanidis GS, 2014. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several *sdhB* and the *cytB* G143A mutations. *Phytopathology* **104**, 347-56.
- Veloukas T, Leroch M, Hahn M, Karaoglanidis GS, 2011. Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Disease* **95**, 1302-7.

- Veloukas T, Markoglou AN, Karaoglanidis GS, 2013. Differential effect of *SdhB* gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* **97**, 118-22.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, *et al.*, 2001. The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-51.
- Vermeulen T, Schoonbeek H, De Waard MA, 2001. The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* is a determinant of the activity of the phenylpyrrole fungicide fludioxonil. *Pest Management Science* **57**, 393-402.
- Vignutelli A, Hilber-Bodmer M, Hilber UW, 2002. Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research* **106**, 329-35.
- Vincelli P, 2002. QoI (Strobilurin) fungicides: benefits and risks. *The Plant Health Instructor*, doi: 10.1094/PHI-I-2002-0809-02.
- Viret O, Keller M, Jaudzems VG, Cole FM, 2004. *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. *Phytopathology* **94**, 850-7.
- Vossen RHaM, Aten E, Roos A, Den Dunnen JT, 2009. High-resolution melting analysis (HRMA)-More than just sequence variant screening. *Human Mutation* **30**, 860-6.
- Walker AS, Gautier A, Confais J, *et al.*, 2011. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **101**, 1433-45.
- Walker AS, Micoud A, Remuson F, Grosman J, Gredt M, Leroux P, 2013. French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Management Science* **69**, 667-78.
- Waller JM, Ritchie BJ, Holderness M, 1997. *Plant clinic handbook*. Wallingford, UK: CAB International.
- Weber RWS, 2010. Occurrence of Hyd R3 fenhexamid resistance among *Botrytis* isolates in Northern German soft fruit production. *Journal of Plant Diseases and Protection* **117**, 177-9.
- Weber RWS, 2011. Resistance of *Botrytis cinerea* to multiple fungicides in Northern German small-fruit production. *Plant Disease* **95**, 1263-9.
- Weber RWS, Hahn M, 2011. A rapid and simple method for determining fungicide resistance in *Botrytis*. *Journal of Plant Diseases and Protection* **118**, 17-25.

- Weber RWS, Wichura A, 2013. Fungicide resistance of *Botrytis cinerea* on lettuce in Northern Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* **120**, 115-21.
- Wilhelm J, Pingoud A, 2003. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem* **4**, 1120-8.
- Williamson B, Duncan GH, Harrison JG, Harding LA, Elad Y, Zimand G, 1995. Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **99**, 1303-10.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JaL, 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* **8**, 561-80.
- Wojdacz TK, Dobrovic A, 2007. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Research* **35**, e41.
- Wood PM, Hollomon DW, 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pest Management Science* **59**, 499-511.
- Wu SB, Wirthensohn M, Hunt P, Gibson J, Sedgley M, 2008. High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* **118**, 1-14.
- Xiao CL, Boal RJ, 2009. Preharvest application of a boscalid and pyraclostrobin mixture to control postharvest gray mold and blue mold in apples. *Plant Disease* **93**, 185-9.
- Yan H, Gaskins V, Luo Y, Kim Y-K, Jurick li WM, 2014. First report of pyrimethanil resistance in *Botrytis cinerea* from stored apples in Pennsylvania. *Plant Disease* **98**, 999.1.
- Yarden O, Katan T, 1993. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **83**, 1478-83.
- Yin YN, Kim YK, Xiao CL, 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* **101**, 986-95.
- Yoshimi A, Kojima K, Takano Y, Tanaka C, 2005. Group III histidine kinase is a positive regulator of Hog1-type mitogen-activated protein kinase in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell* **4**, 1820-8.
- Yourman LF, Jeffers SN, 1999. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* **83**, 569-75.

- Yourman LF, Jeffers SN, Dean RA, 2000. Genetic analysis of isolates of *Botrytis cinerea* sensitive and resistant to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology* **90**, 851-9.
- Yunis H, Elad Y, 1989. Survival of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* in plant debris during summer in Israel. *Phytoparasitica* **17**, 13-21.
- Yunis H, Elad Y, Mahrer Y, 1990. Effects of air temperature, relative humidity and canopy wetness on gray mold of cucumbers in unheated greenhouses. *Phytoparasitica* **18**, 203-15.
- Yunis H, Shtienberg D, Elad Y, Mahrer Y, 1994. Qualitative approach for modeling outbreaks of grey mould epidemics in non-heated cucumber greenhouses. *Crop Protection* **13**, 99-104.
- Zar JH, ed, 2010. *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River, New Jersey, USA: Pearson Prentice-Hall.
- Zhang CQ, Hu JL, Wei FL, Zhu GN, 2009. Evolution of resistance to different classes of fungicides in *Botrytis cinerea* from greenhouse vegetables in eastern China. *Phytoparasitica* **37**, 351-9.
- Zhang CQ, Liu YH, Zhu GN, 2010. Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables. *European Journal of Plant Pathology* **126**, 509-15.
- Zhang Y, Lamm R, Pillonel C, Lam S, Xu JR, 2002. Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa os-2* gene encodes a *HOG1* mitogen-activated protein kinase homologue. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 532-8.
- Zhao M, Zhou JY, Li ZD, Song WW, Tan YJ, Tan H, 2009. Boty-II, a novel LTR retrotransposon in *Botrytis cinerea* B05.10 revealed by genomic sequence. *Electronic Journal of Biotechnology* **12**, e5.
- Zheng D, Olaya G, Köller W, 2000. Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. *Current Genetics* **38**, 148-55.
- Ziogas BN, Markoglou AN, Malandrakis AA, 2003. Studies on the inherent resistance risk to fenhexamid in *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 311-7.
- Ziogas BN, Markoglou AN, Spyropoulou V, 2005. Effect of phenylpyrrole-resistance mutations on ecological fitness of *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*. *European Journal of Plant Pathology* **113**, 83-100.

## Ελληνικές

- Βελούκας Θ, 2013. Βιολογική δράση του καρβοξαμιδικού μυκητοκτόνου *fluorogran* και χαρακτηρισμός ανθεκτικών στελεχών του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea*. Θεσσαλονίκη: Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Διδακτορική Διατριβή, 206.
- Γεωργόπουλος ΣΓ, 1984. Βασικές γνώσεις φυτοπαθολογίας. Αθήνα: Σταμούλης.
- Ζάχος ΔΓ, Παναγόπουλος ΧΓ, Θανασουλόπουλος ΚΚ, Μπίρης ΔΑ, Κυριακοπούλου ΠΗ, 1984. Λεξικό φυτοπαθολογικών όρων. Αθήνα: Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία.
- Παναγόπουλος ΧΓ, 2000. Ασθένειες κηπευτικών καλλιέργειών. Αθήνα: Σταμούλης.
- Παναγόπουλος ΧΓ, 2007. Ασθένειες καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. Αθήνα: Σταμούλης.
- Παπαευαγγέλου ΔΒ, 2010. Έλεγχος ευαισθησίας σε ειδικά βοτρυδιοκτόνα απομονώσεων του *Botrytis cinerea* από καλλιέργεια μαρουλιού. Βόλος: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μεταπτυχιακή Διατριβή, 98.
- Παππάς ΑΧ, 1992. Ο βοτρυτής στα κηπευτικά και σε άλλες καλλιέργειες. Φυτοπαθολογικό φύλλο 4. Αθήνα: Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία.
- Παππάς ΑΧ, Jordan VWL, 1997. Φαινόλογια σταδίων άνθησης-αύξεσης καρπού και ευπάθεια στην προσβολή του βοτρυτή (*Botrytis cinerea*) σε φράουλα, σμέουρο και ριβήσιο. Χρονικά Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου **18**, 1-13.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

---

Περιγράφονται τα φαινολογικά στάδια ανάπτυξης του μαρουλιού σύμφωνα με την κλίμακα BBCH.



## Leaf vegetables (forming heads) Feller et al., 1995 a

### Phenological growth stages and BBCH-identification keys of leaf vegetables (forming heads)

(cabbage = *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *alba* and *rubra*, chinese cabbage = *Brassica chinensis* L., lettuce = *Lactuca sativa* L. var. *capitata*, endive = *Cichorium endivia* L.)

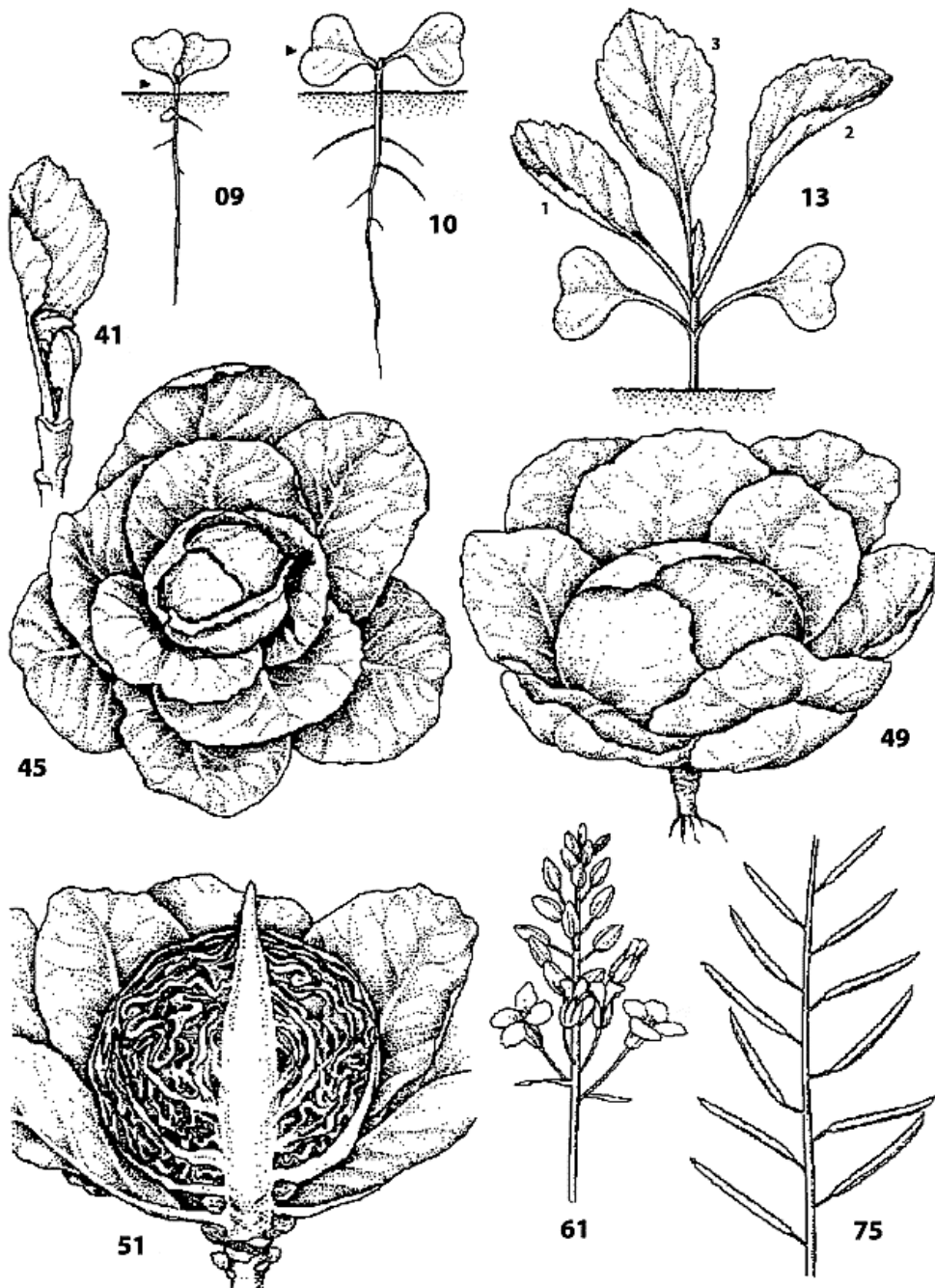
Code	Description
<b>Principal growth stage 0: Germination</b>	
00	Dry seed
01	Beginning of seed imbibition
03	Seed imbibition complete
05	Radicle emerged from seed
07	Hypocotyl with cotyledons breaking through seed coat
09	Emergence: cotyledons break through soil surface
<b>Principal growth stage 1: Leaf development (Main shoot)</b>	
10	Cotyledons completely unfolded; growing point or true leaf initial visible
11	First true leaf unfolded
12	2nd true leaf unfolded
13	3rd true leaf unfolded
1.	Stages continuous till . . .
19	9 or more true leaves unfolded
<b>Principal growth stage 4: Development of harvestable vegetative plant parts</b>	
41	Heads begin to form: the two youngest leaves do not unfold
42	20% of the expected head size reached
43	30% of the expected head size reached
44	40% of the expected head size reached
45	50% of the expected head size reached
46	60% of the expected head size reached
47	70% of the expected head size reached
48	80% of the expected head size reached
49	Typical size, form and firmness of heads reached
<b>Principal growth stage 5: Inflorescence emergence</b>	
51	Main shoot inside head begins to elongate
53	30% of the expected height of the main shoot reached
55	First individual flowers of main inflorescence visible (still closed)
57	First individual flowers of secondary inflorescences visible (still closed)
59	First flower petals visible; flowers still closed

## Leaf vegetables (forming heads) Feller et al., 1995 a

### Phenological growth stages and BBCH-identification keys of leaf vegetables (forming heads)

Code	Description
<b>Principal growth stage 6: Flowering</b>	
60	First flowers open (sporadically)
61	Beginning of flowering: 10% of flowers open
62	20% of flowers open
63	30% of flowers open
64	40% of flowers open
65	Full flowering: 50% of flowers open
67	Flowering finishing: majority of petals fallen or dry
69	End of flowering
<b>Principal growth stage 7: Development of fruit</b>	
71	First fruits formed
72	20% of fruits have reached typical size
73	30% of fruits have reached typical size
74	40% of fruits have reached typical size
75	50% of fruits have reached typical size
76	60% of fruits have reached typical size
77	70% of fruits have reached typical size
78	80% of fruits have reached typical size
79	Fruits have reached typical size
<b>Principal growth stage 8: Ripening of fruit and seed</b>	
81	Beginning of ripening: 10% of fruits ripe, or 10% of seeds of typical colour, dry and hard
82	20% of fruits ripe, or 20% of seeds of typical colour, dry and hard
83	30% of fruits ripe, or 30% of seeds of typical colour, dry and hard
84	40% of fruits ripe, or 40% of seeds of typical colour, dry and hard
85	50% of the fruits ripe, or 50% of seeds of typical colour, dry and hard
86	60% of fruits ripe, or 60% of seeds of typical colour, dry and hard
87	70% of fruits ripe, or 70% of seeds of typical colour, dry and hard
88	80% of fruits ripe, or 80% of seeds of typical colour, dry and hard
89	Fully ripe: seeds on the whole plant of typical colour and hard
<b>Principal growth stage 9: Senescence</b>	
92	Leaves and shoots beginning to discolour
95	50% of leaves yellow or dead
97	Plants dead
99	Harvested product (seeds)

## Leaf vegetables (forming heads)

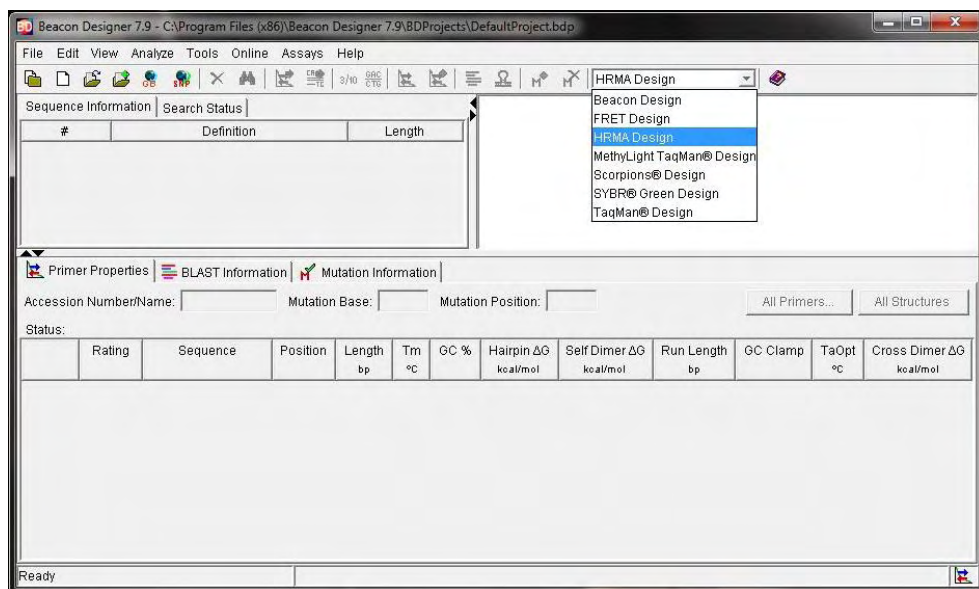


## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

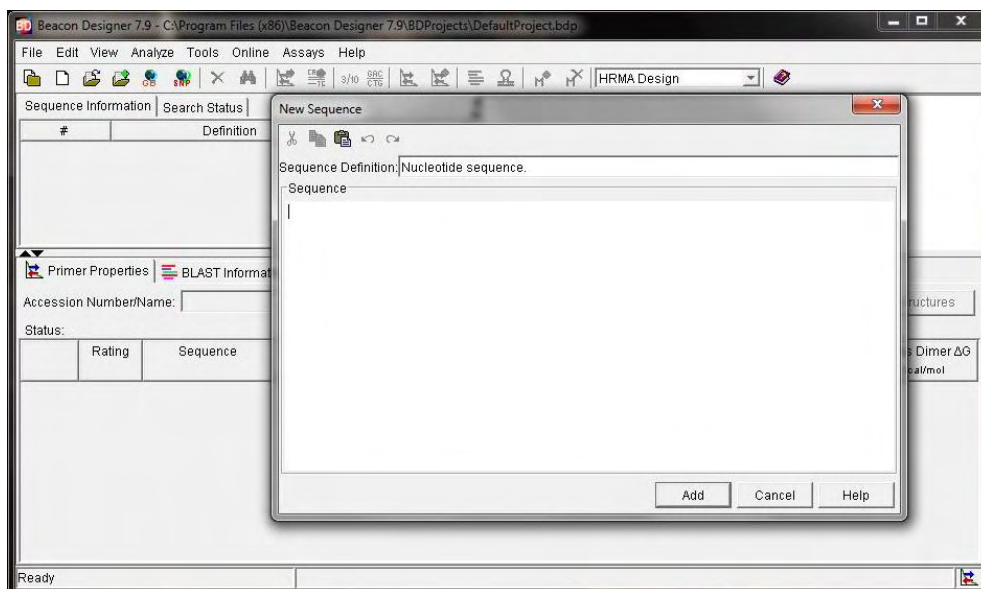
---

Περιγράφονται τα στάδια σχεδιασμού των εκκινητών με το λογισμικό Beacon Designer v7.90, Build 790002 (Premier Biosoft International, Palo Alto, California, USA). Στο παράδειγμα που ακολουθεί παρουσιάζεται ο σχεδιασμός του ζεύγους εκκινητών SH272F/R που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των μεταλλάξεων στη θέση 272 του γονιδίου *sdhB* (ανθεκτικότητα στο boscalid). Τα στάδια της εφαρμογής είναι: **1** Άνοιγμα λογισμικού. **2** Εισαγωγή αλληλουχίας από βάση δεδομένων. **3** Εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης στην αλληλουχία. **4** Ρύθμιση παραμέτρων των εκκινητών. Στο τέλος, η αναζήτηση κατάλληλων εκκινητών γίνεται αυτόματα.

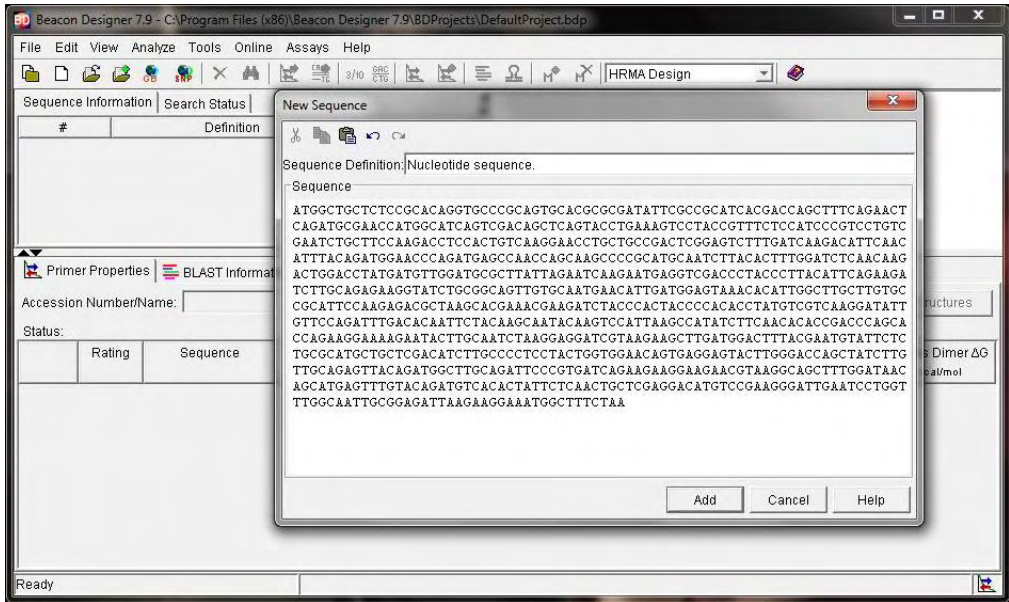
## 1. Άνοιγμα προγράμματος και επιλογή σχεδιασμού εκκινητών για ανάλυση HRM



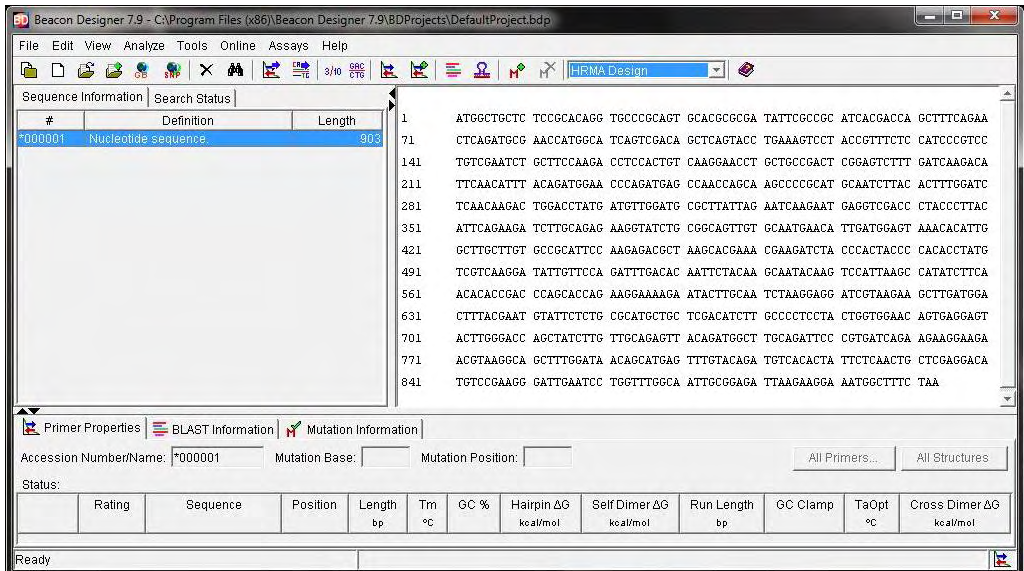
## 2. Εισαγωγή αλληλουχίας: File→New→Sequence



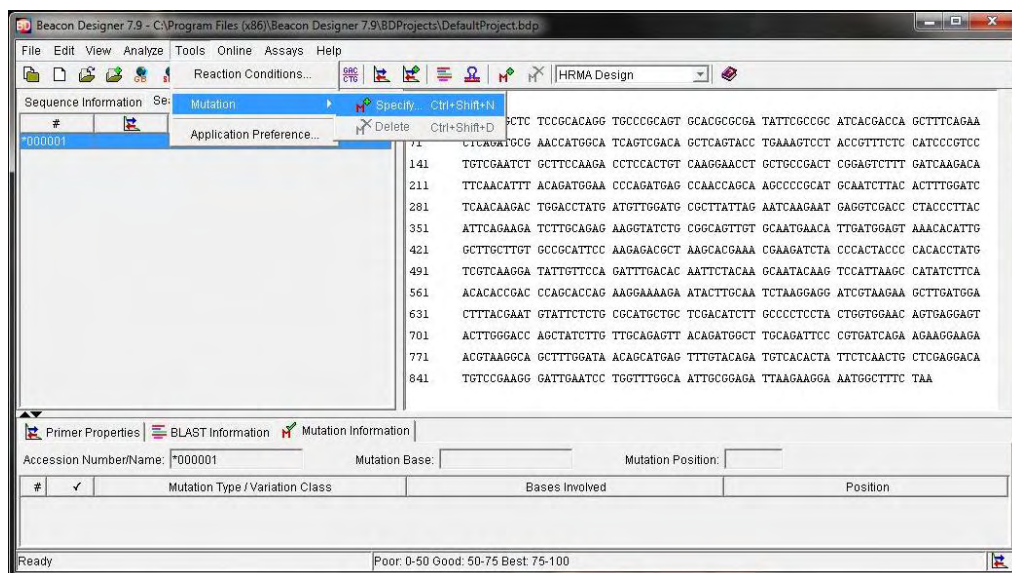
2α. Η αλληλουχία εισάγεται μέσω αντιγραφής της από τη διαδικτυακή βάση δεδομένων BLAST...



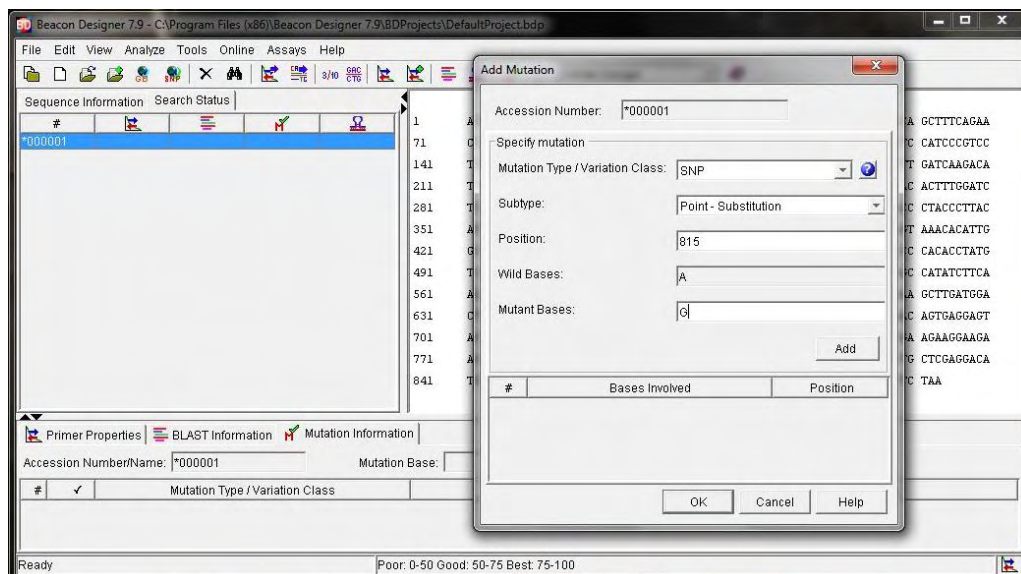
2β ... με την επιλογή Add



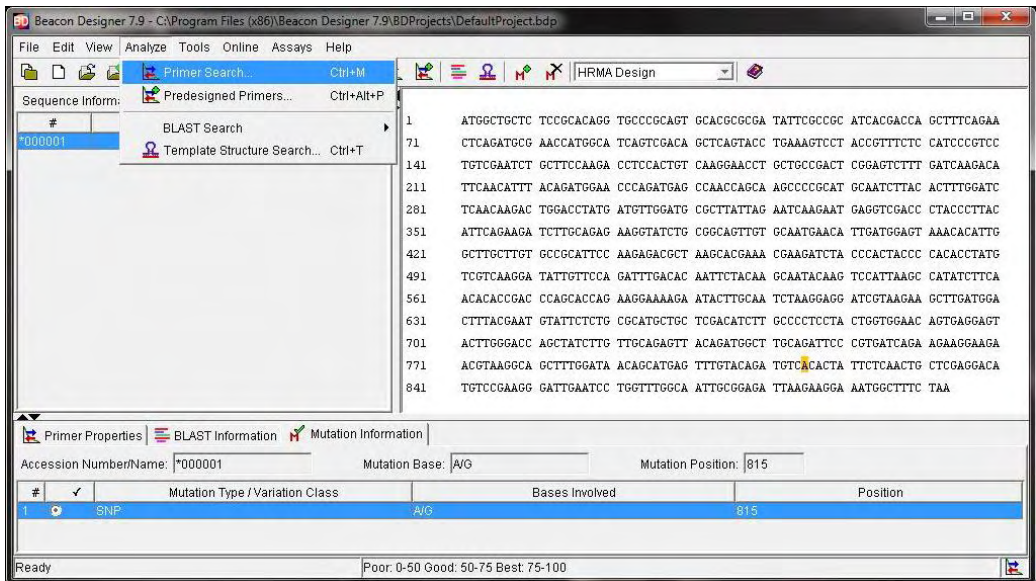
### 3. Οι μεταλλάξεις επισημαίνονται με επιλογή Tools→Mutation→Specify



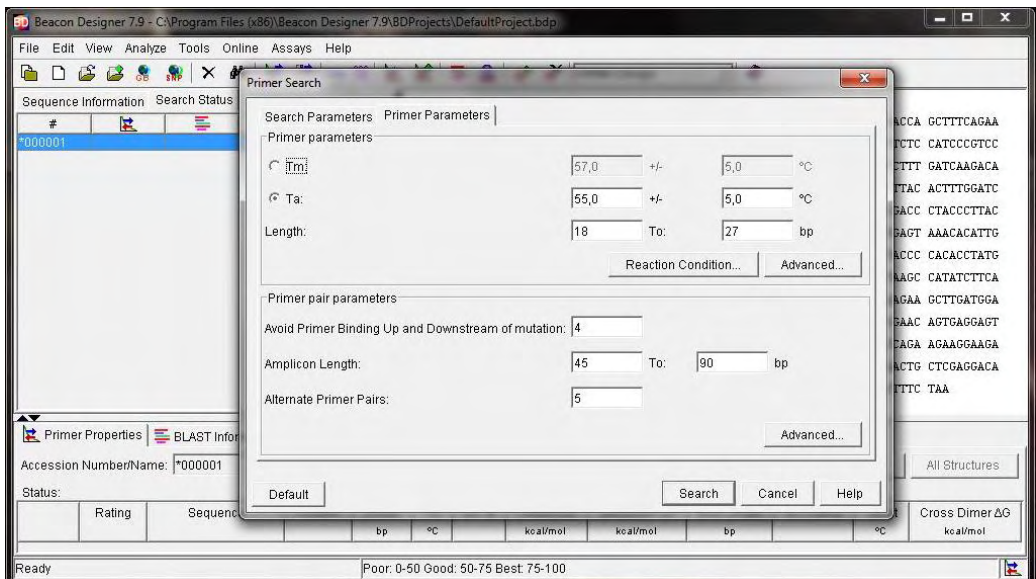
3α. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα η αλλαγή του νουκλεοτιδίου A σε G στη θέση 815 είναι υπεύθυνη για τη μετάλλαξη H272R που προσδίδει ανθεκτικότητα στο boscalid



#### 4. Σχεδιασμός εκκινήτων με επιλογή Analyze→Primer Search



4α. Ρύθμιση παραμέτρων (π.χ. προϊόν PCR 45-90 bp ή επιθυμητό  $T_m$  60 °C στην two-step HRM)





### 4β. Αυτόματη ανίχνευση των εκκινήτων (SH272F/R)

Beacon Designer 7.9 - C:\Program Files (x86)\Beacon Designer 7.9\BDProjects\DefaultProject.bdp

File Edit View Analyze Tools Online Assays Help

Sequence Information Search Status

# Best Selected

1 ATGGCTGCTC TCCGCACAGG TGCCCGCAGT GCACGCGCGA TATTGCGGC ATCACGACCA GCTTTCAGAA  
 71 CTCAGATGCG AACCATGGCA TCAGTCGACA GCTCAGTACC TGAAGTCTC ACCGTTTCTC CATCCCGTCC  
 141 TGTCGAATCT GCTTCCAAGA CCTCCACTGT CAAGGAACCT GCTGCCGACT CGGAGTCTTT GATCAAGACA  
 211 TTCACATTT ACAGATGGAA CCCAGATGAG CCAACCAGCA AGCCCCGCAT GCAATCTTAC ACTTTGGATC  
 281 TCAACAAGAC TGGACCTATG ATGTTGGATG CGCTTATTAG AATCAAGAAT GAGGTCGACC CTACCCCTAC  
 351 ATTCAGAAGA TCTTGCAGAG AAGGTATCTG CGGCAGTTGT GCAATGAACA TTGATGGAGT AAACACATTG  
 421 GCTTGCTTGT GCCGATTCC AAGAGACGCT AAGCACGAAA CGAAGATCTA CCCACTACCC CACACCTATG  
 491 TGCTCAAGGA TATTGTCCA GATTTGACAC AATTCTACAA GCAATACAAG TCCATTAAGC CATATCTTCA  
 561 ACACACCGAC CCAGCACCGA AAGGAAAAGA ATACTTGCAA TCTAAGGAGG ATCGTAAGAA GCTTGATGGA  
 631 CTTTACGAAT GTATTCTCTG CCGATGCTGC TCGACATCTT GCCCCTCCTA CTGGTGGAA CAGTGGAGGT  
 701 ACTTGGGACC AGCTATCTTG TTGCAGAGTT ACAGATGGCT TGCAGATTCC CGTGATCAGA AGAAGGAAGA  
 771 ACGTAAAGCA GCTTGGATA ACAGCATGAG TTGTACAGA TGTCACCTA TTCTCAACTG CTCGAGGACA  
 841 TGTCGAAGG GATTGAATCC TGGTTTGGCA ATTGCGGAGA TTAAGAAGGA AATGGCTTTC TAA

Primer Properties BLAST Information Mutation Information

Accession NumberName: #000001 Mutation Base: A/G Mutation Position: 815 All Primers... All Structures

Status:

	Rating	Sequence	Position	Length bp	Tm °C	GC %	Hairpin ΔG kcal/mol	Self Dimer ΔG kcal/mol	Run Length bp	GC Clamp	TaOpt °C	Cross Dimer ΔG kcal/mol
Sense	79,4	TGGATAACAGCATGAGTT	785	18	57,2	38,9	-0,7	-2,3	2	1		
AntiSense	77	CCAAAC CAGGATTCAATC	868	18	57,1	44,4	-0,4	-1,8	3	1		
Product	79,9			84	75,4						55	-1,5
Mutant-Product 1:(A/G)	79,8			84	75,9						55,4	-1,5

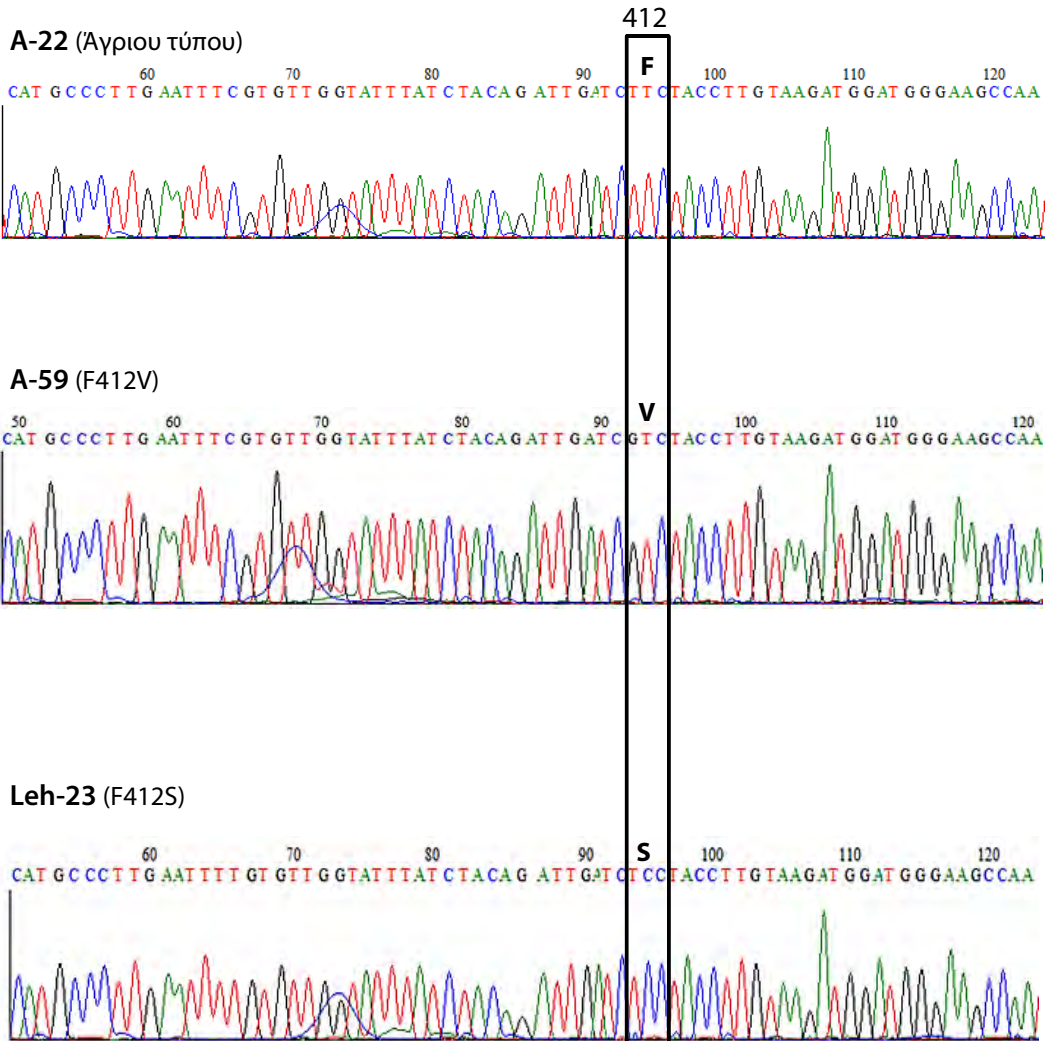
Ready Poor: 0-50 Good: 50-75 Best: 75-100

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

---

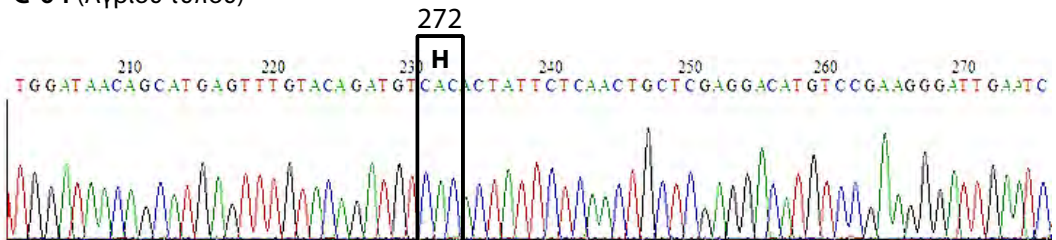
Παρουσιάζονται οι διαφορές στα χρωματογραφήματα της αλληλούχισης σε τμήματα των γονιδίων *erg27*, *sdhB*, *BenA* και *bos1* που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα *fenhexamid*, *boscalid*, *carbendazim* και *iprodione*, αντίστοιχα. Στις εικόνες δεν εμφανίζεται ολόκληρη η αλληλουχία 218-320 bp αλλά τμήμα αυτής που αντιστοιχεί στο αντίστοιχο μήκος των προϊόντων της ανάλυσης HRM για κάθε περίπτωση. Χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία αντιπροσωπευτικών για κάθε περίπτωση απομονώσεων.

## Fenhexamid

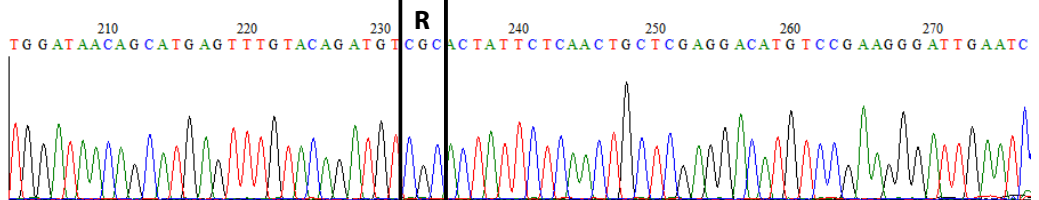


**Boscalid**

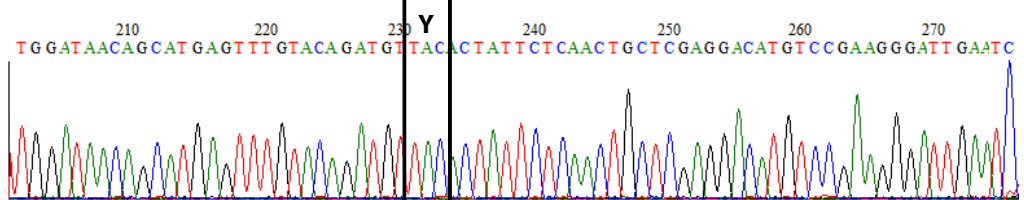
**C-04** (Άγριου τύπου)



**CR-32** (H272R)

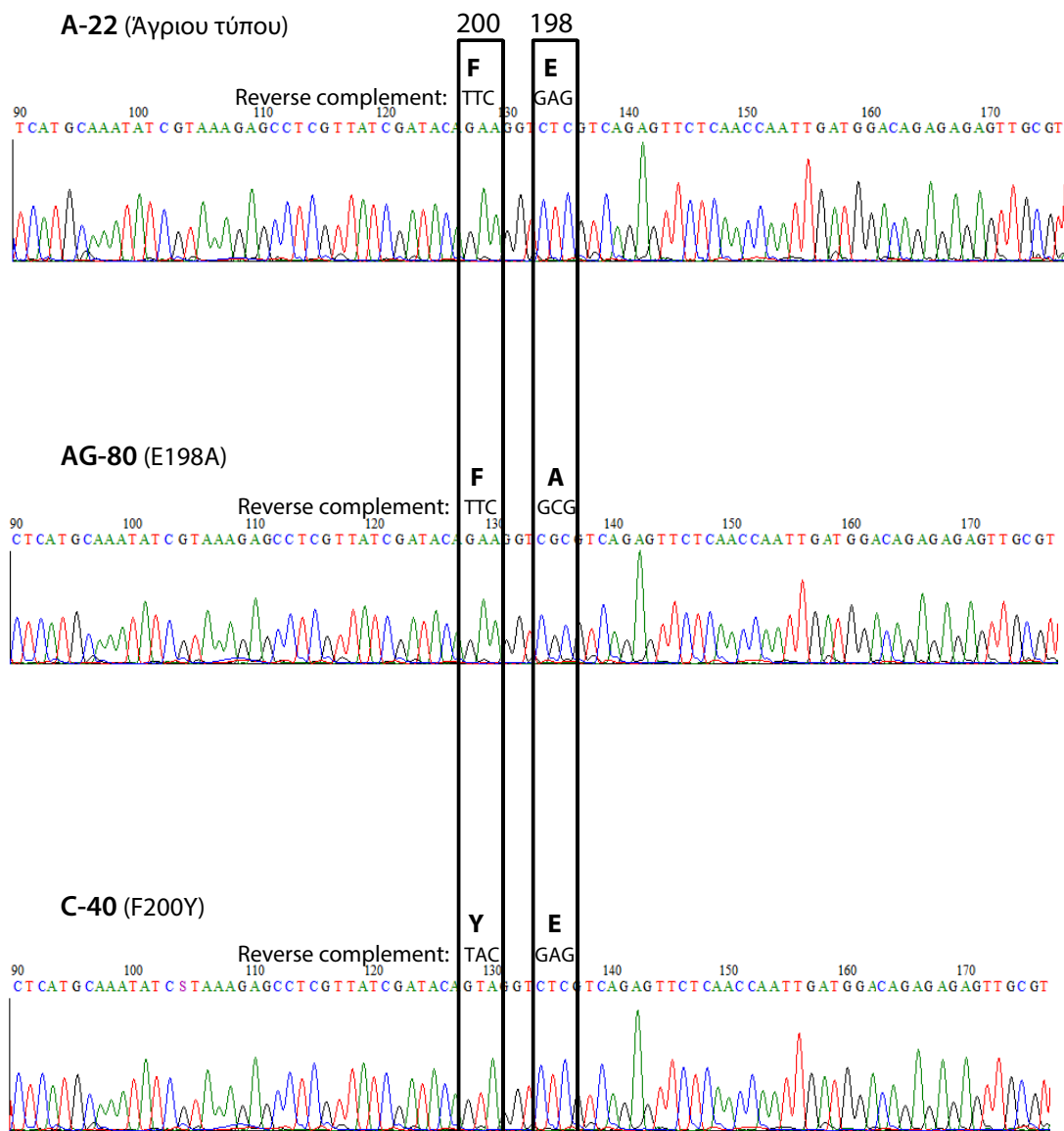


**Leh-23** (H272Y)

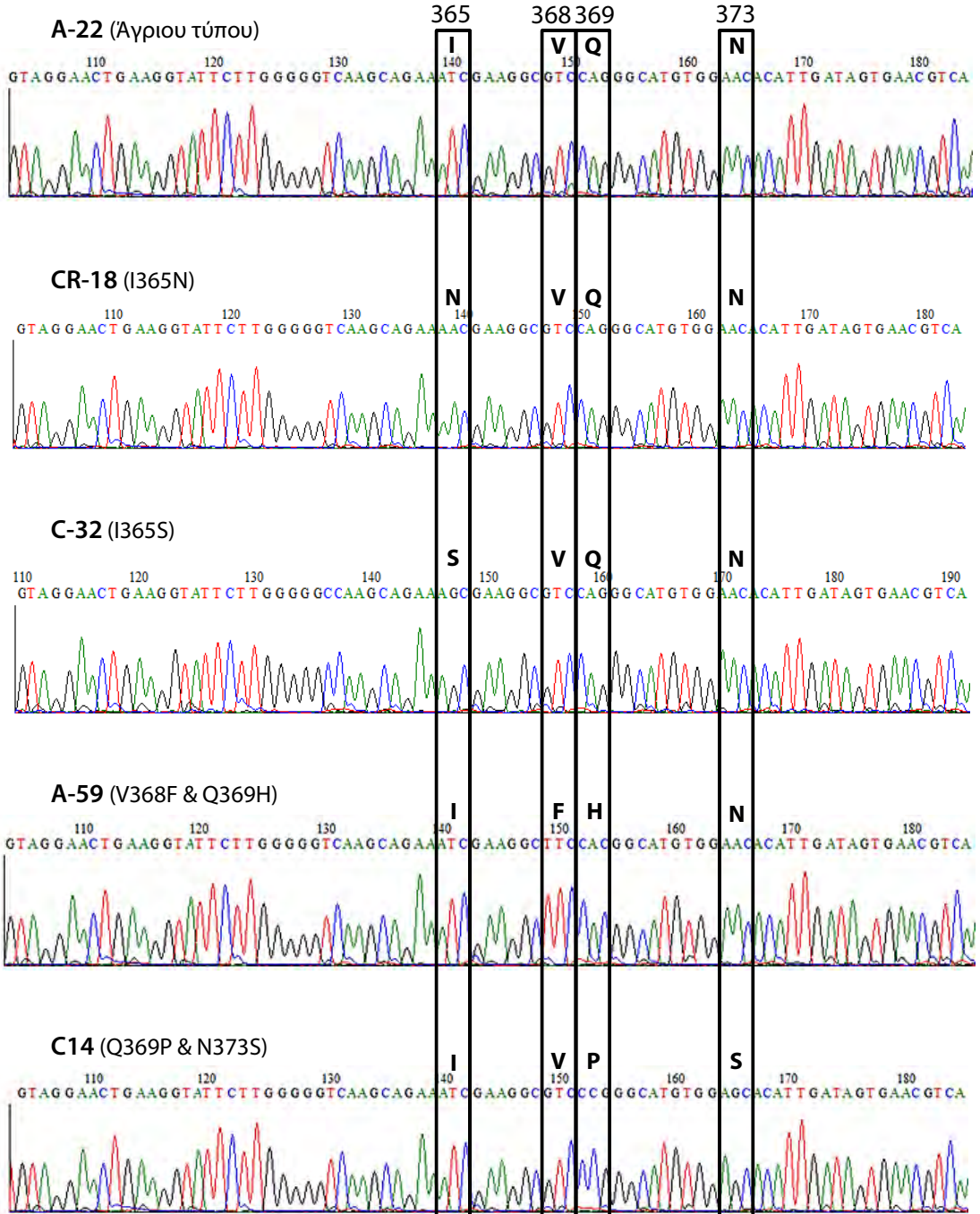


## Carbendazim

Οι διαφορές στις βάσεις μεταξύ των δειγμάτων του γονιδίου *BenA* γίνονται διακριτές με αντιστροφή της αλληλουχίας και αλλαγής της με τις συμπληρωματικές βάσεις (η αλληλούχηση έγινε με τον οπίσθιο εκκινητή TUB-HP-R).



Iprodione





## Περίληψη στα αγγλικά (Summary in English)

Grey mould, caused by *Botrytis cinerea*, is one of the major fungal diseases of vegetable crops growing under cover during the winter-early spring period, in Greece. On lettuce, the pathogen usually attacks the base of the plant and eventually leads on basal stem rot and death. For three consecutive years (2010, 2011, 2012) the epidemiological development of *B. cinerea* was studied on lettuce grown in hydroponics in relation to microclimate and the amount of airborne inoculum. Primary infections were observed 20 days after transplanting: the pathogen invaded the basal stem of the plants *via* the older, weakened leaves. Infections were increased when the moisture (relative humidity and/or leaf wetness) and airborne inoculum levels were increased for prolonged periods. Temperature was not the main determinant in the development of epidemics. In parallel, the effectiveness of various fungicide spray applications against grey mould was evaluated. Two standard applications were made at seedling stage followed up by one or two more sprays after transplanting, at 15-day intervals. The last application was made at least 4 weeks before harvest. Applications only at seedling stage with Daconil SC (chlorothalonil 50%) 3ml·L<sup>-1</sup>, Teldor WG (fenhexamid 50%) 1.5g·L<sup>-1</sup>, Signum WG (boscalid 26.7% + pyraclostrobin 6.7%) 1.5g·L<sup>-1</sup>, Switch WG (fludioxonil 25% + cyprodinil 37.5%) 0.5g·L<sup>-1</sup> and Ortiva Opti SC (azoxystrobin 8% + chlorothalonil 40%) 2.5ml·L<sup>-1</sup>, reduced significantly the disease incidence and severity, compared to untreated control. The fungicides Switch WG and Signum WG provided the best control, whereas Teldor WG and Daconil SC were less effective. The level of the disease was further reduced with one or two more fungicide applications after transplanting. Fungicides programs were effective despite the predominance of *B. cinerea* resistant phenotypes in five (Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>) and seven (Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>) different classes of fungicides, isolated from diseased plants and the glasshouse air. For avoiding the development of resistance, alternative fungicide applications were found necessary. With the exception of applications after transplanting with Daconil SC (chlorothalonil 50%) in all other treatments, no fungicide residues were detected or these were under the European acceptable MRLs, at harvest.

The minimum inhibitory concentration (MIC) for spore germination and mycelial growth to nine fungicides of different chemical groups in 100 *B. cinerea* isolates, was determined *in vitro*. These concentrations were selected to assess fungicide sensitivity in 818 isolates from lettuce and other vegetable crops, by the use of the point inoculation method. Three phenotypes with multiple resistance to stobilurins (Qol), carboximides (Bos), hydroxyanilides (Hyd), anilinopyrimidines (Ani), phenylpyrroles (Phen), dicarboximides (Dic) and benzimidazoles (Ben), [Hyd<sup>R</sup>Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Phen<sup>MR</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ani<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>, Qol<sup>R</sup>Bos<sup>R</sup>Ben<sup>HR</sup>Dic<sup>MR</sup>] were detected at frequency 7%, 12% and 6%, respectively. These phenotypes were mainly isolated from a glasshouse lettuce crop located in Thessaly. Isolates with single high resistance to benzimidazoles counted 11% in total, and mainly originated from open field lettuce grown in Macedonian or Peloponnesian district. Phenotypes with various resistance combinations (1 to 5 chemical groups) were found in



## Summary

less frequency (<5%). No resistant phenotypes to fluazinam (dinitroanilides) and chlorothalonil (phthalonitriles) were detected. *B. cinerea* phenotypes exhibiting multiple resistance against seven groups of fungicides, high resistance to fenhexamid (Hyd) and moderate resistance to fludioxonil (Phen), were recorded for the first time in Greece. For reducing grey mould losses the application of anti-resistant strategies is considered necessary.

The efficacy of seven fungicides with different mode of action against nine multiple resistant isolates of *B. cinerea* was tested *in situ*. The fungicides used were: pyraclostrobin (strobilurins), boscalid (carboxamides), fenhexamid (hydroxyanilides), cyprodinil (anilinopyrimidines), fludioxonil (phenylpyrroles), fluazinam (dinitroanilines) and chlorothalonil (phthalonitriles). Young lettuce leaves (cv. Penelope RZ) immersed in aqueous fungicide suspensions at the recommended spraying concentrations (a.i. %). When the leaves got dried they were placed in Petri dishes with sterilized water agar. Then, inoculations taken place by transferring upside down a 5 mm mycelial disc or a drop of a spore suspension ( $5 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup>) on the adaxial leaf surface. Fungicide efficacy was evaluated by measuring the size of infection lesion after 3 (mycelium) or 6 (spores) day incubation, respectively, in a growth chamber of 18°C and 10 h lighting. The fungicides pyraclostrobin (0.4 g·L<sup>-1</sup>) and fenhexamid (1.5 g·L<sup>-1</sup>) failed to inhibit the development of *Botrytis* lesion by the resistant isolates, in all tests. Similar results were provided by boscalid (0.8 g·L<sup>-1</sup>), cyprodinil (0.375 and 0.75 g·L<sup>-1</sup>) and fludioxonil (0.25 and 0.5 g·L<sup>-1</sup>) when mycelial discs were used as inoculum. With the exception of one case the fungicides fluazinam (0.4 g·L<sup>-1</sup>) and chlorothalonil (2.5 g·L<sup>-1</sup>) were effective against all isolates tested. These results showed the inability of recently introduced fungicides to inhibit the infection by *B. cinerea* resistant phenotypes obtained from lettuce crops.

A novel, high-resolution melting (HRM) analysis was developed to detect single nucleotide polymorphisms associated with resistance to fenhexamid (hydroxyanilides), pyraclostrobin (QoIs), boscalid (SDHIs), carbendazim (benzimidazoles and iprodione (dicarboximides), in *B. cinerea* isolates. HRM analysis is a PCR based closed-tube method for the detection of DNA sequence variation by demonstrating fluorescence changes in the melting profile of the amplified double stranded DNA amplicon. The identification of the melting curves showed that resistance to fenhexamid was due to a nucleotide change in the *erg27* gene, resulting in an amino acid replacement of phenylalanine with valine (58% of the isolates) or serine (42%) at position 412 of the protein. Likewise, in isolates resistant to boscalid, a nucleotide change in the *sdhB* gene resulted in the replacement of histidine with arginine (78%) or tyrosine (22%) at position 272 of the respective protein. A replacement of glycine with alanine at position 143 of cytochrome *b* was detected in highly resistant to the QoIs isolates, but not in all cases. In the same amplicon the presence of an extra 1205bp intron was detected in the 43% of the sensitive isolates. Amino acid substitutions E198A and F200Y in *BenA* gene were associated with high and moderate resistance to carbendazim, respectively. Polymorphism was much stronger in moderately resistant to iprodione

isolates where 4 different genotypes were detected in the amplicon: a) I365N (46%), b) I365S (17%), c) Q369P & N373S (17%), d) V368F & Q369H (20%). Additionally, further discrimination of the isolates based on the presence of transposable elements *boty* and *flipper* in the genome revealed that 80% of the isolates carried both elements, 15% none and 5% only the *boty*. Overall, genotyping showed that most multiple resistant phenotypes were characterized by random mutations. However, in some cases there was a significant correlation of some mutations with specific phenotypes. HRM's comparative advantages over traditional molecular techniques revealed the great potential of this assay in tracking resistance.