

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
& ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Θέμα: «Έλεγχος ευαισθησίας στο metalaxyl απομονώσεων του μύκητα *Phytophthora* sp. από φυτά διεφθενμπάχιας»



ΜΑΤΘΑΙΑΔΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΒΟΛΟΣ 2002

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
& ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΘΕΜΑ: “Έλεγχος ευαισθησίας στο metalaxyl απομονώσεων
του μύκητα *Phytophthora* sp. από φυτά διεφφενμπάχιας”

Πτυχιακή διατριβή
της
ΓΕΩΡΓΙΑΣ Α. ΜΑΤΘΑΙΑΔΟΥ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Εισηγητής: Καθηγητής Α. Χ. Παππάς
Μέλη: Καθηγήτρια Σ. Γαλανοπούλου-Σεντούκα
Ε. Καθηγητής Γ. Νάνος



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

Αριθ. Εισ.: 61/1
Ημερ. Εισ.: 29-08-2003
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΦΠΑΠ
2002
MAT

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070119

ΣΤΕΦΑΝΟΣ ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ
ΤΟΥ
ΚΑΘΗΓΗΤΗ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΑΤΩΝ ΑΘΗΝΩΝ
ΚΑΙ
ΚΑΘΗΓΗΤΗ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ ΚΟΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥΠΟΛΕΩΣ
ΚΑΙ
ΚΑΘΗΓΗΤΗ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΑΙΡΩΝ

*Αφιερώνεται
στους γονείς μου*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4

Α΄ ΜΕΡΟΣ: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ	5
ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	22
ΑΝΑΠΤΥΞΗ	25
ΜΟΛΥΝΣΗ	36
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ	38
ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ	41
ΑΜΥΝΑ ΞΕΝΙΣΤΩΝ	45
ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (γενικά)	48
ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ METALAXYL	51
- Εμπειρία στον αγρό και στο εργαστήριο	52
- Τρόπος δράσης	55
- Επιδράσεις metalaxyl	56
- Γενετική της ανθεκτικότητας	59
- Αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα	60
- Προσαρμοστικότητα ανθεκτικών στελεχών	61
- Ανθεκτικότητα στο mefenoxam	60

Β΄ ΜΕΡΟΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	66
- Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων	66
- Απομόνωση μύκητα του γένους <i>Phytophthora</i>	68
- Προσδιορισμός άριστης-μέγιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης	69
- Ανάπτυξη μυκηλίου με προσθήκη metalaxyl	70
- Επίδραση του metalaxyl στον σχηματισμό σποριαγγείων και χλαμυδοσπορίων	72
- Προσδιορισμός συνθηκών για σχηματισμό σποριαγγείων	73

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	77
- Προσδιορισμός άριστης-μέγιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης	77
- Ανάπτυξη μυκηλίου με προσθήκη metalaxyl	85
- Επίδραση του metalaxyl στον σχηματισμό σποριαγγείων και χλαμυδοσπορίων	91
- Προσδιορισμός συνθηκών για σχηματισμό σποριαγγείων	93
- Μορφολογία μυκηλιακών κατασκευών, αναπαραγωγικών οργάνων και αποικίας	96
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	98

Γ' ΜΕΡΟΣ: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	105
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	106
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	117

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η προκείμενη μελέτη υποβλήθηκε ως πτυχιακή διατριβή στο τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φυτοπαθολογίας Δρ. Α. Χ. Παππά.

Για την επιλογή του θέματος ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Α. Χ. Παππά, στον οποίο οφείλω το μεγαλύτερο μέρος από τις γνώσεις μου στην Φυτοπαθολογία. Επίσης τον ευχαριστώ για την βοήθεια κατά την πειραματική εργασία, την διάθεση σχετικής βιβλιογραφίας, τη παροχή φωτογραφικού υλικού και τη καθοδήγηση στην παρουσίαση της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Ι. Ρούμπο Φυτοπαθολόγο και Διευθυντή του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Βόλου για την δυνατότητα πρόσβασης στη βιβλιοθήκη του Ινστιτούτου.

Την Καθηγήτρια κα Σ. Γαλανοπούλου - Σενδούκα και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γ. Νάνο μέλη της εξεταστικής επιτροπής, ευχαριστώ για την πολύπλευρη υποστήριξη τους τόσο κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου όσο και κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται επίσης στη Δρ. Κ. Ελένα του Μπενακίου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου για την καθοριστική συμβολή της στον προσδιορισμό του είδους του παθογόνου.

Τα δεδομένα της πειραματικής εργασίας παρουσιάστηκαν στο 11ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο που έγινε τον Οκτώβριο του 2002 στην Πρέβεζα με τίτλο "Προσδιορισμός είδους και ευαισθησία στο metalaxyl απομονώσεων του μύκητα *Phytophthora palmivora* από καλλιέργεια φυτών διεφφενμπάχιας".

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην εργασία αυτή έγινε προσδιορισμός είδους που ανήκε στο γένος *Phytophthora*, και μελετήθηκε η ευαισθησία του είδους αυτού στο metalaxyl.

Η παρούσα μελέτη αποτελείται από 3 μέρη: το αναλυτικό, το πειραματικό και τα συμπεράσματα.

Το **αναλυτικό μέρος** περιλαμβάνει μια ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας. Η βιβλιογραφία αυτή αναφέρεται στα κριτήρια στα οποία στηρίζεται η ταξινόμηση του γένους *Phytophthora*, στην βιολογία του παθογόνου καθώς και στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών των ειδών του γένους *Phytophthora* σε μυκητοκτόνα σκευάσματα της ομάδας των φαινυλαμιδίων και ιδιαίτερα στο metalaxyl.

Στο τμήμα αυτό της μελέτης δίνεται μία όσο το δυνατόν ακριβής περιγραφή των παραγόντων που επιδρούν στην παραγωγή των αναπαραγωγικών οργάνων του παθογόνου (όπως θερμοκρασία, υγρασία, φως κ.α.) καθώς και στον τρόπο με τον οποίο αυτά βλαστάνουν και μολύνουν τον ξενιστή.

Στην συνέχεια περιγράφονται τα συμπτώματα που εμφανίζονται στα διάφορα φυτικά όργανα μετά την εγκατάσταση του παθογόνου και δίνονται στοιχεία σχετικά με την άμυνα των ξενιστών. Τέλος αναφέρονται οι μηχανισμοί με τους οποίους αναπτύσσονται τα ανθεκτικά στελέχη παθογόνων στα μέσα χημικής καταπολέμησης και γίνεται αναφορά στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών στο metalaxyl καθώς και στις επιδράσεις που έχει το metalaxyl πάνω στα ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη.

Στο **πειραματικό μέρος** γίνεται περιγραφή της απομόνωσης του παθογόνου από προσβεβλημένα φυτά διεμφενημπάχιας. Ακολουθούν πειράματα για τον προσδιορισμό της μέγιστης θερμοκρασίας αναπτύξεως καθώς και για τον προσδιορισμό των άριστων συνθηκών σχηματισμού σποριαγγείων (σποριάγγεια, ανθηρίδια, ωοσπόρια). Σκοπός είναι να γίνει μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών των αναπαραγωγικών οργάνων του μύκητα καθώς και των χλαμυδοσπορίων του, ώστε να μπορέσει να προσδιοριστεί το είδος. Ακολουθούν πειράματα ελέγχου της ευαισθησίας απομονώσεων του μύκητα *Phytophthora* στο μυκητοκτόνο metalaxyl. Τα πειράματα αυτά

περιλαμβάνουν τον έλεγχο της ανάπτυξης του μυκηλίου και της παραγωγής σποριαγγείων και χλαμυδοσπορίων με προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων metalaxyl στο θρεπτικό τους υπόστρωμα.

Ακολουθεί συζήτηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την παρούσα εργασία, με τα στοιχεία που αναφέρονται στην διεθνή βιβλιογραφία ώστε να οδηγηθούμε στον προσδιορισμό του είδους. Επίσης αναφέρονται εργασίες ερευνητών πάνω στο είδος που προσδιορίστηκε και στην ευαισθησία του είδους αυτού στο metalaxyl.

Στα **συμπεράσματα** αναφέρονται συνοπτικά τα στοιχεία της παρούσης μελέτης, τελικός στόχος της οποίας ήταν ο έλεγχος της ευαισθησίας του μύκητα *Phytophthora palmivora* στο metalaxyl.

ΠΕΡΥΛΗΥΗ

Την άνοιξη του 2001 από φυτά διεφφενμπάχιας (*Dieffenbachia maculata*), που έφεραν συμπτώματα μαλακής σήψης στην βάση του στελέχους, απομονωνόταν σταθερά σε υλικό “Potato Dextrose Agar” μύκητας του γένους *Phytophthora*. Με βάση το μέγιστο επιτρεπτό όριο θερμοκρασίας και το ρυθμό ανάπτυξης του μυκηλίου, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της αποικίας, των χλαμυδοσπορίων και των οργάνων αναπαραγωγής (σποριάγγεια, ανθηρίδια, ωοσπόρια) σε διάφορα υποστρώματα, έγινε προσδιορισμός του είδους (ως κανόνας προσδιορισμού εφαρμόστηκε η κλείδα της G. Waterhouse) και βρέθηκε ότι οι απομονώσεις ανήκαν στο είδος *P. palmivora* Butler.

Δώδεκα τυχαίες απομονώσεις του παθογόνου εξετάστηκαν για την ευαισθησία τους στα φαινυλαμίδια. Οι απομονώσεις προέρχονταν όπως αναφέρθηκε από καλλιέργεια διεφφενμπάχιας από θερμοκήπιο, στο οποίο, την περίοδο 1989-2001 εφαρμόζονταν κατά τις μεταφυτεύσεις σε 3μηνα διαστήματα ριζοποτίσματα με το μίγμα metalaxyl 7,5% + mancozeb 56%, στη συγκέντρωση σκευάσματος 1 g/l. Μετά από έλεγχο της ανάπτυξης του μυκηλίου σε υπόστρωμα “Potato Dextrose Agar” που περιείχε διάφορες συγκεντρώσεις metalaxyl, διαπιστώθηκε ότι όλες οι απομονώσεις του παθογόνου ήταν ευαίσθητες. Συγκεντρώσεις metalaxyl 0,1 mg/l και 0,5 mg/l εμπόδισαν πλήρως την ανάπτυξη του μυκηλίου. Μετά από έλεγχο στην παραγωγή των χλαμυδοσπορίων σε υπόστρωμα “Soil Extract” που περιείχε τις ίδιες συγκεντρώσεις metalaxyl, διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή των χλαμυδοσπορίων παρουσίαζε μεγάλη ευαισθησία στο metalaxyl ακόμα και στην συγκέντρωση 0,01 mg/l. Για την παραγωγή σποριαγγείων όμως δεν συγκεντρώθηκαν στοιχεία γιατί κατά τη διεξαγωγή του πειράματος λόγω κάποιου παρεμποδιστικού παράγοντα δεν παρήχθησαν σποριάγγεια ακόμα και στον μάρτυρα. Ο παράγοντας αυτός παρατηρήθηκε ότι ήταν οι αναερόβιες συνθήκες που επικρατούσαν στην περιοχή του μυκηλίου.

Σύμφωνα με τα παραπάνω προκύπτει ότι έπειτα από 12 χρόνια συνεχούς εφαρμογής του μίγματος metalaxyl 7,5% + mancozeb 56%, η καταπολέμηση της ασθένειας εξακολουθεί να είναι ικανοποιητική χωρίς να έχουν αναπτυχθεί ανθεκτικά στελέχη στο είδος *P. palmivora*. Εξάλλου μπορεί να διαπιστωθεί και από την βιβλιογραφική ανασκόπηση ότι το είδος αυτό δεν φαίνεται να αναπτύσσει εύκολα ανθεκτικά στελέχη στον αγρό.

ΜΕΡΟΣ Α΄
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ (ιστορική αναδρομή)

ΓΕΝΙΚΑ

Το γένος *Phytophthora* είναι από τα πιο ενδιαφέροντα γένη φυτοπαθογόνων μυκήτων. Το όνομά του προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις “φυτό” και “φθορά” (Tucker, 1931). Αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1876 από τον γερμανό βοτανολόγο Andon de Bary ο οποίος περιέγραψε το παθογόνο που προξενούσε τον περονόσπορο της πατάτας στην Ιρλανδία και στο οποίο έδωσε το όνομα *Phytophthora infestans*. Με το όνομα του γένους ο de Bary έδινε την εικόνα της ζημίας που προξενούσε ο μύκητας στην πατάτα.

Αργότερα προσδιορίστηκαν και άλλα είδη του γένους *Phytophthora* που προκαλούν διαφορετικές ζημίες από αυτές του *P. infestans* και προσβάλλουν έναν ευρύτατο κύκλο ξενιστών, προξενώντας μεγάλη ποικιλία ασθενειών (Πίνακας 1).

Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί 67 είδη κατά τους Stamps *et al.* (1990) και πάνω από 80 είδη κατά τους Pan *et al.* (1994). Από τα είδη αυτά άλλα έχουν μικρό ενδιαφέρον, άλλα είναι σοβαρά παθογόνα των φυτών και μερικά είναι αίτια μεγάλων επιδημιών. Το κάθε είδος είναι περισσότερο ή λιγότερο πολυφάγο, με αποτέλεσμα περισσότερα από 1000 είδη φυτών, που ανήκουν σε περισσότερα από 100 γένη και ένα μεγάλο αριθμό οικογενειών να αναφέρονται σήμερα ως ξενιστές του γένους (Ελένα, 1999).

Πίνακας 1

Χρονολογίες περιγραφής ειδών του γένους *Phytophthora* (Ko and Chang, 1979)

Έτος	Είδος
1876	<i>P. infenstans</i> (Montange) de Bary
1886	<i>P. cactorum</i> (Lebert & Cohn) Schroeter
1889	<i>P. phaseoli</i> Thxter
1896	<i>P. nicotianae</i> van Breda de Haan
1900	<i>P. colocasiae</i> Raciborski
1909	<i>P. syringae</i> (Klebahn) Klebahn
1913	<i>P. arecae</i> (Coleman) Pethybridge <i>P. erythroseptica</i> Pethybridge
1918	<i>P. meadii</i> McRae
1919	<i>P. cryptogea</i> Pethybridge and Lafferty <i>P. lepironiae</i> Sawada <i>P. palmivora</i> (Butler) Butler
1922	<i>P. capsici</i> Leonian <i>P. cinnamomi</i> Rands
1923	<i>P. mexicana</i> Hotson & Hartge
1925	<i>P. citrophthora</i> (Smith & Smith) Leonian
1927	<i>P. boehmeriae</i> Sawada <i>P. cambivora</i> (Petri) Buisman <i>P. citricola</i> Sawada <i>P. gonapodyides</i> (Petersen) Buisman <i>P. richardiae</i> Buisman
1929	<i>P. heveae</i> Thompson
1931	<i>P. drechsleri</i> Tucker <i>P. megasperma</i> Drechsler <i>P. porri</i> Foister
1935	<i>P. cyperi</i> (Ideta) Ito
1940	<i>P. fragariae</i> Hickman <i>P. macrospora</i> (Saccardo) Ito & Tanaka <i>P. verrucosa</i> Alcock & Foister
1941	<i>P. lateralis</i> Tucker & Milbrath
1947	<i>P. quininea</i> Crandall
1949	<i>P. inflata</i> Caroselli & Tucker
1952	<i>P. primulae</i> Tomlinson
1953	<i>P. cyperi-bulbosi</i> Seethalakashmi & Ramakrishnan
1957	<i>P. ilicis</i> Buddenhagen <i>P. vignae</i> Purss
1969	<i>P. botryosa</i> Chee <i>P. vesicula</i> Anastasiou & Churchland
1971	<i>P. iranica</i> Ershad
1974	<i>P. japonica</i> Waterhouse
1976	<i>P. melonis</i> Katsoura
1979	<i>P. katsurae</i> Ko & Chang

Χαρακτηριστικά του γένους *Phytophthora*

Τα είδη του γένους *Phytophthora* έχουν έναν αριθμό ασυνήθιστων χαρακτηριστικών που τα διακρίνουν από πολλούς άλλους φυτοπαθογόνους μύκητες. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι τα εξής:

- α) Κινητά ζωοσπόρια που έχουν την ικανότητα να συνθέτουν ένα κύτταρο - κύστη μέσα σε μερικά λεπτά από την εγκύστωσή τους. Τα ζωοσπόρια διαφοροποιούνται μέσα στο ζωοσποριάγγειο πριν να απελευθερωθούν από την κορυφή του. Τα ζωοσπόρια διαθέτουν δύο λεπτά ανόμοια μαστίγια
- β) Όχι ένα αλλά πολλά σποριαγγεία επιτυχώς σχηματισμένα στο τέλος κάθε υφής του δενδροειδούς σποριαγγειοφόρου όπως ο de Bary παρατήρησε για να ξεχωρίσει το γένος *Phytophthora* από το γένος *Peronospora* (Tucker, 1931)
Ένα άλλο χαρακτηριστικό είναι η ικανότητα να κόβονται (caducity) ή να μην αποσπώνται (non caducity) τα σποριαγγεία από την υφή, ανάλογα με το είδος.
- γ) Τα συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων τους αποτελούνται πρωταρχικά από γλουκάνες (με β-1,3 και β-1,6 δεσμούς) ενώ ο χαρακτηριστικός πολυσακχαρίτης τους δεν είναι η χιτίνη αλλά η κυτταρίνη, οι δε μεμβρανώδεις σχηματισμοί τους δεν περιέχουν εργοστερόλη.
- δ) Ο ομοθαλλισμός ή ετεροθαλλισμός των ειδών, η δυνατότητά τους δηλαδή να σχηματίζουν ωοσπόρια ή να έχουν ανάγκη διασταύρωσης με διαφορετικού συζευκτικού τύπου απομόνωση του ίδιου ή άλλου είδους. Ένα ωοσπόριο σχηματίζεται κάτω από κανονικές συνθήκες μέσα σε κάθε ωογόνο. Τα ανθηρίδια μπορεί να είναι παράγυνα ή αμφίγυνα
- ε) Ένας διπλοειδής κύκλος ζωής με μείωση λαμβάνει χώρα στα γαμετάγγεια
- στ) Συγκεκριμένες μοναδικές φυσιολογικές αντιδράσεις. Είδη του γένους *Phytophthora* αντιδρούν κατά διαφορετικό τρόπο στις στερόλες από ό,τι οι περισσότεροι των ανωτέρω μυκήτων. Τα είδη του γένους *Phytophthora* δεν έχουν την ικανότητα να συνθέτουν στερόλες και παρόλο που δεν απαιτούν στερόλες για την βλαστική τους ανάπτυξη, πρέπει να χορηγηθούν σε αυτά στερόλες εξωγενώς για τον σχηματισμό σποριαγγείων. Επειδή η πα-

ρουσία των στερολών είναι απαραίτητη για την ευαισθησία των μυκήτων σε αντιβιοτικά με πολλούς διπλούς δεσμούς (polyene antibiotics), η ανθεκτικότητα των μυκήτων του γένους *Phytophthora* στα αντιβιοτικά αυτά προφανώς σχετίζεται με την έλλειψη στερολών.

Συστηματική κατάταξη

Η ταξινόμηση στο επίπεδο του γένους είναι σχετικά εύκολη προσέγγιση με βάση τα μορφολογικά και τα ειδικά χαρακτηριστικά του. Έτσι η ταξινομική θέση του γένους *Phytophthora* είναι η εξής:

Κλάση:	Φυκομύκητες
Υποκλάση:	Ωομύκητες
Τάξη:	<i>Peronosporales</i>
Οικογένεια:	<i>Pythiaceae</i>
Γένος:	<i>Phytophthora</i>

Τα τελευταία χρόνια αμφισβητείται η κατάταξη του γένους *Phytophthora* και άλλων ωομυκήτων στο βασίλειο των μυκήτων. Οι μύκητες αυτοί κατατάσσονται σε ένα νέο βασίλειο, που έχει περιγραφεί πρόσφατα και είναι το βασίλειο Chromista, όπου το γένος *Phytophthora* αναφέρεται ως παρόμοιο με μύκητα (pseudofungus, fungus-like). Ακόμη όμως στην διεθνή βιβλιογραφία το γένος *Phytophthora* εξακολουθεί να περιλαμβάνεται στους μύκητες.

Παλαιότερα ήταν ευρέως αποδεκτό για το γένος *Phytophthora* ότι ο προσδιορισμός ενός αγνώστου είδους ήταν συχνά δύσκολος έως αδύνατος. Με την εξαίρεση ενός ή δύο ειδών με (έντονα) διακριτά χαρακτηριστικά στοιχεία, τα περισσότερα είδη μπορούν να προσδιοριστούν μόνο εάν έχουν αναπτυχθεί τα σποριάγγεια και τα όργανα εγγενούς αναπαραγωγής τους (ωογόνια και ανθηρίδια). Επίσης θεωρείται απαραίτητο να προκληθεί πρώτα η παραγωγή σποριαγγείων και ζωοσπορίων έτσι ώστε να καταστεί σίγουρο ότι αντιμετωπίζεται ένα είδος του γένους *Phytophthora* και όχι του γένους *Pythium*.

Για διευκόλυνση του προσδιορισμού των ειδών πρώτος ο Tucker το 1931 πρότεινε μια κλειδα προσδιορισμού. Μετά από μερικά χρόνια (1934) ο Leonian παρουσίασε κλειδα προσδιορισμού μιας σειράς ειδών, η άποψή του όμως ήταν ότι μόνον τρία διαφορετικά είδη διαχωρίζονταν σαφώς στο γένος, τα *P. infestans*, *P. cactorum* και *P. palmivora*. Και οι δύο έλαβαν υπόψη τους τη θερμοκρασία ανάπτυξης και βέβαια τους μορφολογικούς χαρακτήρες. Η Waterhouse το 1963 πρότεινε μια κλειδα προσδιορισμού των ειδών, βασιζόμενη σε

μορφολογικούς και φυσιολογικούς χαρακτήρες, χωρίζοντας το γένος σε έξι μεγάλες ομάδες (I-VI).

Η ομαδοποίηση αυτή βασίστηκε στα ακόλουθα κριτήρια:

- 1) Η κορυφή του σποριαγγείου (το μέγεθος της ακραίας διόγκωσης και το πλάτος του πόρους εξόδου)
- 2) Η αφθονία των σποριαγγείων σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα
- 3) Η αποπίπτουσα ή μη αποπίπτουσα φύση των σποριαγγείων
- 4) Η δευτερογενής σποριαγγειοπλασία
- 5) Το είδος των ανθηριδίων (αμφίγυνα, παράγυνα ή και τα δύο)
- 6) Η παρουσία ή απουσία των ωοσπορίων στο ξενιστή και στην καλλιέργεια
- 7) Οι διαστάσεις των σποριαγγείων, ιδιαίτερα το μέγιστο μήκος
- 8) Η αναλογία μήκους προς πλάτος
- 9) Οι σποριαγγειοφόροι
- 10) Οι μυκηλιακές διογκώσεις (hyphal swellings)
- 11) Η παρουσία ή απουσία χλαμυδοσπορίων
- 12) Το μέγεθος των ωογονίων
- 13) Το κυματοειδές τοίχωμα του ωογονίου
- 14) Η εξειδίκευση στο ξενιστή
- 15) Οι απόλυτες θερμοκρασίες (άριστο και μέγιστο)

Από την μία η κλείδα της Waterhouse ήταν υπερβολικά απλή. Έφερε στην επιφάνεια, χωρίς όμως να προτείνει λύσεις, τις περιπλοκές μερικών επονομαζόμενων ειδών, όπως την “ομάδα *palmivora*” και την “ομάδα *nicotianae-parasitica*”, όπως επίσης πολύ στενά συνδεδεμένων ειδών χωρίς θηλή. Από την άλλη η κλείδα αυτή ήταν πολύ δύσκολη, ειδικά για εκείνους που επιθυμούσαν να τακτοποιήσουν μια απομόνωση, ενώ δεν τους απασχολούσαν ταξινομικά προβλήματα ή ασήμαντες λεπτομέρειες.

Οι παραπάνω προβληματισμοί μαζί με το γεγονός ότι 6 νέα είδη είχαν περιγραφεί και το ότι η “ομάδα *palmivora*” μετατρέπονταν σε διακριτή ταξινομική κατηγορία, οδήγησαν σε έναν νέο τύπο κλείδας (Newhook et al, 1978). Αυτή η νέα κλείδα σχεδιάστηκε τόσο για να βοηθήσει τους φυτοπαθολόγους αλλά και όσους ενδιαφέρονταν να γνωρίσουν την ταυτότητα μιας συγκεκριμένης απομόνωσης, όσο και για τους ταξονόμους που επιδιώκουν να πετύχουν μια καλύτερη ταξινομική κατάταξη. Η κλείδα πήρε τη μορφή μιας πινακοποιημένης παρουσίασης των περισσότερων κλασικών χαρακτηριστικών που χρησιμοποιούνται στις περιγραφές και τακτοποιήσεις των ειδών. Δεν ήταν δυνατό να συμπερι-

ληφθούν στην κλείδα λεπτομέρειες χαρακτηριστικών που χρησιμοποιούνται στις περιγραφές και τακτοποιήσεις των ειδών. Δεν ήταν δυνατό να συμπεριληφθούν στην κλείδα λεπτομέρειες χαρακτηριστικών των καλλιεργειών ή θερμοκρασιακές σχέσεις παρόλο που αυτές οι πληροφορίες σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να είναι διαγνωστικώς σημαντικές. Η ομαδοποίηση του γένους *Phytophthora* σύμφωνα με τους Newhook *et al.*(1978) παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2

Ομαδοποίηση του γένους *Phytophthora* (Newhook et al, 1978)

Ομάδα	Είδη
I	<i>cactorum</i> (Lebert & Cohn) Schroeter <i>iranica</i> Ersland
II	<i>palmivora</i> (Butler) Butler MF 1 MF 2 MF 3 (P. Megakarya Brasier & Griffin) MF 4 <i>arecae</i> (Coleman) Pethybr. <i>boehmeriae</i> Saw. <i>botryosa</i> Chee <i>heveae</i> Thompson <i>meadii</i> McRae <i>nicotianae</i> B. De Haan var. <i>nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> (Dastur) Waterh. <i>capsici</i> Leonian <i>citrophthora</i> (Sm. & Sm.) Leonian <i>mexicana</i> Hotson & Harte <i>castaneae</i> Katsura & Uchida (now <i>katsurae</i>)
III	<i>citricola</i> Saw. <i>syringae</i> (Kleb.) Kleb. <i>porri</i> Foister <i>primulae</i> Tomlison <i>cyperi</i> (Ideta) Ito <i>cyperi-bulbosi</i> Seeth. & Ramakr. <i>inflata</i> Caroselli & Tucker <i>lepirooniae</i> Saw. <i>macrospora</i> (Sacc.) Ito & Tanaka <i>vesicula</i> Anastasiou & Churchland
IV	<i>colodasiae</i> Racib. <i>hibernalis</i> Carne <i>ilicis</i> Buddenhagen <i>infestans</i> (Mont.) de Bary <i>phaseoli</i> Thaxter <i>melonis</i> Katsura
V	<i>fragariae</i> Hickman <i>megasperma</i> Drechsler var. <i>megasperma</i> var. <i>sojae</i> Hildebrand <i>quininea</i> Crandall <i>verrucosa</i> Alcock & Foister
VI	<i>cambivora</i> (Petri) Buisman <i>cinnamomi</i> Rands <i>cryptogea</i> Pethybr. & Laff. <i>drechsleri</i> Tucker var. <i>drechsleri</i> var. <i>cajani</i> Pal, Grawal & Sardohoy <i>erythroseptica</i> Pethybr. var. <i>erythroseptica</i> var. <i>psi</i> Bywater & Hickman <i>richardiae</i> Buisman <i>vignae</i> Purss <i>lateralis</i> Tucker & Milbrath <i>gonapodyides</i> (Petersen) Buisman <i>japonica</i> Waterh.

Οι χαρακτήρες που χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση στο γένος *Phytophthora* διακρίνονται σε 6 κατηγορίες: στους χαρακτήρες που αναφέρονται στις κύριες ομάδες, σε αυτούς που αναφέρονται στο επίπεδο του είδους, στους χαρακτήρες που είναι χρήσιμοι μόνο για μερικά είδη, που είναι χρήσιμοι μόνο για 1 ή 2 είδη, στους ενδιάμεσους χαρακτήρες και στους βοηθητικούς χαρακτήρες.

1. Χαρακτήρες των κύριων ομάδων

Τα χαρακτηριστικά που χρησιμοποίησε η Waterhouse (1963), για να διαχωρίσει τα είδη σε 6 κύριες ομάδες, έχουν διατηρηθεί και από τους Newhook *et al.* (1978) και είναι τα εξής:

α) Το σχήμα της ακραίας διόγκωσης των σποριαγγείων και το πλάτος του πόρου εξόδου.

Η κατάσταση του άκρου του σποριαγγείου είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό για τα είδη του γένους *Phytophthora*. Υπάρχει πάντοτε μια ακραία διόγκωση η οποία μπορεί να είναι ημισφαιρική, αβαθής ή δυσδιάκριτη και η οποία είναι πάντοτε καλυμμένη από μια λεπτή συνέχεια του εξωτερικού τοιχώματος του σποριαγγείου. Επίσης υπάρχει πάντοτε μια άδεια περιοχή μεταξύ της βάσης της διόγκωσης και της επιφάνειας του πρωτοπλάσματος. Όταν τα ζωοσπόρια διαφοροποιηθούν και λίγο πριν να απελευθερωθούν, το λεπτό κάλυμμα του πόρου διαλύεται γρήγορα ή σπάει.

β) Η ιδιότητα να κόβονται τα σποριάγγεια και το μήκος του μίσχου τους.

Στον τύπο του είδους *P. infestans* και μερικών άλλων, τα περισσότερα ή αρκετά σποριάγγεια αποπίπτουν κατά την ωριμότητα. Στα είδη που δεν παρατηρείται αποκοπή σποριαγγείων, συμπεριλαμβάνονται όλα τα είδη χωρίς θηλή (Waterhouse, 1963).

Το σποριάγγειο κόβεται με ένα τμήμα μυκηλιακής υφής. Το τμήμα αυτό που είναι μεταξύ του σημείου κοπής και της βάσης του σποριαγγείου, καλείται “μίσχος”. Ο μίσχος είναι διαφόρου μήκους σε διαφορετικά είδη, επειδή το μήκος εξαρτάται ως ένα βαθμό από το πόσο αναπτύσσεται η υφή προτού η κορυφή αρχίσει να διογκώνεται, για να σχηματίσει το σποριάγγειο. Τα είδη που αποπίπτουν χωρίζονται σε 3 κατηγορίες με βάση το μήκος του μίσχου:

(i) κοντός μίσχος (<5 μm), (ii) ενδιάμεσος μίσχος (5-20 μm) και (iii) μακρύς μίσχος (> 20 μm).

γ) Ανθηρίδια αμφίγυνα, παράγυνα ή και τα δύο.

Οι ομάδες II, IV και VI χαρακτηρίζονται από αμφίγυνα ανθηρίδια. Στην ομάδα II δεν έχουν αναφερθεί παράγυνα ανθηρίδια, ενώ στις ομάδες IV και VI τα μόνα είδη που σποραδικά εμφανίζουν παράγυνα ανθηρίδια είναι τα *P. hibernalis* και *P. richardiae*. Συνεπώς η αμφιγυνία μπορεί να θεωρηθεί ως ένα χαρακτηριστικό που μεταβάλλεται ελάχιστα. Από την άλλη σε είδη με κυρίως παράγυνα ανθηρίδια υπάρχει συνήθως ένα μικρό ποσοστό (περίπου 1%) με αμφίγυνα. Στα υπόλοιπα είδη που έχουν μεγάλα ποσοστά ανθηριδίων και των δύο τύπων, τα ποσοστά αυτά ποικίλουν για άγνωστους λόγους. Ωστόσο αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει μόνο 5 περίπου είδη τα οποία καθορίζονται εύκολα από τα υπόλοιπα με άλλους χαρακτήρες.

2) Χαρακτήρες που αναφέρονται στο επίπεδο του είδους

i. Απόλυτες θερμοκρασίες

Από τον Tucker (1931) και μετά όλες οι κλείδες έχουν χρησιμοποιήσει την ανάπτυξη του μυκηλίου σε ελάχιστες, άριστες και μέγιστες θερμοκρασίες ως ένα χρήσιμο κριτήριο, παρόλο που υπάρχει συνήθως στις τιμές μια διακύμανση εύρους $\pm 1-2$ °C μεταξύ απομονώσεων του ίδιου είδους. Από τις 57 απομονώσεις του είδους *P. parasitica* που μελέτησε ο Tucker (1931), οι 50 αναπτύχθηκαν καλά στους 35 °C, ενώ οι υπόλοιπες 7 αναπτύχθηκαν περισσότερο από 0,5 cm σε 96 ώρες.

Μερικές φορές παρατηρείται το φαινόμενο μια απομόνωση να ταιριάζει σε μια συγκεκριμένη περιγραφή ή σε όλα εκτός από την ανάπτυξη στην μέγιστη θερμοκρασία που είναι υψηλότερη από την αναμενόμενη. Τέτοια απομόνωση θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως υψηλής θερμοκρασίας μορφή του είδους.

Το άριστο εύρος είναι περισσότερο μεταβλητό αλλά βρίσκεται μεταξύ συγκεκριμένων ορίων και είναι δυνατός ο διαχωρισμός ειδών με υψηλό, χαμηλό ή ενδιάμεσο εύρος (Πίνακας 3).

Πίνακας 3

Ομαδοποίηση των ειδών του γένους *Phytophthora* με βάση τις άριστες θερμοκρασίες ανάπτυξης (Waterhouse, 1963)

Άριστες

υψηλές		ενδιάμεσες		χαμηλές	
Είδη	Θερμοκρασία	Είδη	Θερμοκρασία	Είδη	Θερμοκρασία
<i>parasitica</i>	30-32	<i>oryzae</i>	26-28	<i>fragariae</i>	20-22
<i>melonis</i>	28-32	<i>citridola</i>	25-28	<i>phaseoli</i>	15-20
<i>palmivora</i> MF 1	27-32	<i>cinnamomi</i>	24-28	<i>primulae</i>	15-20
<i>capsici</i>	26-32	<i>citrophthora</i>	24-28	<i>syringae</i>	20
<i>drechsleri</i>	28-31	<i>macrospora</i>	28	<i>hebermalis</i>	20
<i>vignae</i>	28-30	<i>erythroseptica</i>	27.5	<i>infestans</i>	20
<i>palmivora</i> MF 4	27-30	<i>mexicana</i>	27.5	<i>lateralis</i>	20
<i>colosasiae</i>	27-30	<i>cactorum</i>	20-28	<i>ilicis</i>	20
<i>arecae</i>	27-30	<i>megasperma</i>	15-27.5		
<i>meadii</i>	25-30	<i>botryosa</i>	26		
<i>nicotianae</i>	25-30	<i>boemeriae</i>	25		
<i>inflata</i>	25-30	<i>heveae</i>	25		
		<i>quinenea</i>	25		
		<i>porri</i>	25		
		<i>cryptogea</i>	22-25		
		<i>megasperma</i> var. <i>sojae</i>	25		
		<i>cambivora</i>	22-24		
		<i>erythroseptica</i> var. <i>pisi</i>	24		

Η παραγωγή αναπαραγωγικών οργάνων στην καλλιέργεια σε σχέση με τη θερμοκρασία έχει αποδειχθεί χρήσιμη για τον διαχωρισμό μερικών ειδών (Bra-sier, 1969). Στο είδος *P. lateralis* η άριστη θερμοκρασία για παραγωγή χλαμυδο-σπορίων είναι 24-25 °C, που είναι συγχρόνως και η μέγιστη για ανάπτυξη μυ-κηλίου. Επίσης η άριστη θερμοκρασία για παραγωγή σποριαγγείων βρέθηκε ότι είναι 14-16 °C (Englander and Roth, 1980).

ii. Ρυθμοί ανάπτυξης

Παρόλο που οι ρυθμοί ανάπτυξης διαφέρουν ανάμεσα στις απομονώσεις του ίδιου είδους σε διαφορετικές συνθήκες, σε 5 είδη (*P. syringae*, *P. porri*, *P. prim-ulae*, *P. infestans* και *P. phaseoli*) η ανάπτυξη με πολύ αργό ρυθμό είναι πολύ χρήσιμος δείκτης.

iii. Χρωμοσώματα

Τα χρωμοσώματα στα περισσότερα είδη που έχουν μελετηθεί είναι μικρά και δύσκολο να μετρηθούν. Περίπου 9, 10 ή 12 χρωμοσώματα υπάρχουν σε πολλά είδη, αλλά το είδος *P. megasperma* var. *megasperma* έχει τον διπλάσιο αριθμό ενώ το είδος *P. megasperma* var. *sojae* έχει 10-15 (Sansome and Brasier, 1974). Βρετανικές τετραπλοειδείς απομονώσεις του είδους *P. infestans* έχουν διπλάσιο αριθμό χρωμοσώμων από ό,τι έχουν οι Μεξικάνικες διπλοειδείς απομονώσεις (Brasier and Sansome, 1975).

Η μορφή των χρωμοσωμάτων αποτελεί μερικές φορές διαγνωστικό χαρακτηριστικό. Για παράδειγμα, το είδος *P. megakarya* έχει μεγαλύτερα σε μέγεθος και λιγότερα χρωμοσώματα (5-6) από ό,τι τα περισσότερα είδη, ενώ το είδος *P. meadi* έχει πολύ μικρότερα χρωμοσώματα από ό,τι το είδος *P. palmivora*.

iv. Αφθονία ωσπορίων σε θρεπτικά υποστρώματα με άγαρ

Αυτό το χαρακτηριστικό έχει χρησιμοποιηθεί από τους Rosenbaum (1917), Tucker (1931), Leonian (1934), Frezzi (1950) και Waterhouse (1963) για αρκετά είδη, ένα από τα οποία είναι το είδος *P. cactorum*. Φαίνεται αρκετά σταθερό χαρακτηριστικό για τις περισσότερες απομονώσεις, για την καθιέρωση των κύριων ομάδων, με την προϋπόθεση ότι χρησιμοποιείται ο σωστός τύπος θρεπτικού υποστρώματος με άγαρ. Παρόλα αυτά, μερικές σπάνιες απομονώσεις μπορεί να χάσουν την ικανότητα παραγωγής ωογονίων μετά από παρατεταμένη καλλιέργεια.

3. Χαρακτήρες χρήσιμοι για μερικά μόνο είδη

i. Μέγεθος σποριαγγείου

Υπάρχουν προβλήματα στην τυποποίηση μεθόδων για παραγωγή σποριαγγείων, επειδή οι άριστες συνθήκες για ένα είδος μπορεί να είναι ακατάλληλες για ένα άλλο. Εάν οι μετρήσεις δεν γίνουν κατά την διάρκεια της πρώτης έναρξης της ανάπτυξης, η παρουσία πολλών μη τυπικών μικρών σποριαγγείων μπορεί να μεταβάλει το πραγματικό εύρος του μεγέθους σποριαγγείων μιας απομόνωσης. Παρόλα αυτά είναι δυνατός ο διαχωρισμός των ειδών σε ομάδα με μικρά σποριάγγεια (σπάνια πάνω από 45 μm μήκος) στην οποία ανήκουν και τα *P. cactorum*, *P. iranica*, και σε ομάδα με μεγάλα σποριάγγεια (συνήθως πάνω

από 75 μm) στην οποία περιλαμβάνονται τα είδη *P. palmivora*, *P. capsici*.

ii. Ο λόγος Μήκος/Πλάτος του σποριαγγείου

Η σχετική στενότητα ή πεπλάτυνση του σποριαγγείου εξαρτάται ως ένα βαθμό από εξωτερικούς παράγοντες και από το υπόστρωμα. Οι Brasier and Griffin (1979) βρήκαν για το είδος *P. palmivora* MF1 υψηλότερο λόγο μήκους/πλάτος όταν τα σποριάγγεια σχηματίστηκαν σε περικάρπιο κακάου από ό,τι σε τρυβλίο με άγαρ. Η παρουσία φωτός ή το σκοτάδι, το υπόστρωμα (ξενιστής, θρεπτικό υπόστρωμα με άγαρ), η ηλικία της καλλιέργειας και η παρουσία ελεύθερου νερού ίσως έχουν επίπτωση στις διαστάσεις του σποριαγγείου.

iii. Μέγεθος ωογονίων

Το εύρος του μεγέθους των ωογονίων παραμένει σταθερό μεταξύ των απομονώσεων ενός είδους. Τα μικρά μεγέθη είναι ιδιαίτερα σημαντικά για το διαχωρισμό του *P. nicotianae* var. *parasitica* από το *P. nicotianae* var. *nicotianae*.

iv. Τοιχώματα των ωογονίων

Ακόμη δεν είναι αρκετά γνωστές οι ιδιότητες του τοιχώματος του ωογονίου γενικά για το γένος αλλά υπάρχουν ενδείξεις για διαφορές σε αντιδράσεις χρώσεως μερικών ειδών. Είναι σημαντικό οι αντιδράσεις χρώσεως να εξετάζονται σε νεαρά τοιχώματα, επειδή η πάχυνση και η ωρίμανση αρχίζουν μόλις τα ωογόνια αποκτήσουν πλήρες μέγεθος.

v. Μυκηλιακές διογκώσεις σε νερό

Στρογγυλοποιημένες ή γωνιώδεις διογκώσεις σε αλυσίδες ή συμπλέγματα οι οποίες ποικίλουν σε συχνότητα μεταξύ των απομονώσεων, μπορούν να είναι χαρακτηριστικά πολλών ειδών. Η απουσία τέτοιων κατασκευών παρά η παρουσία τους χαρακτηρίζει κάποια είδη. Στην ομάδα III (Newhook *et al.*, 1978) τέτοιες διογκώσεις σχετίζονται με τα είδη: *P. syringae*, *P. porri* και *P. primulae* αλλά όχι με το είδος *P. citricola*.

vi. Χλαμυδοσπόρια

Τα χλαμυδοσπόρια είναι εντελώς διαχωρισμένα από το μυκήλιο με ένα διάφραγμα (septum) με εσωτερική πάχυνση του τοιχώματος στην βάση τους. Επειδή σε μερικά είδη χλαμυδοσπόρια σχηματίζονται μόνο σε συγκεκριμένες απομονώσεις, η σημασία των χλαμυδοσπορίων για την ταξινόμηση είναι περιορι-

σμένη. Για τον διαχωρισμό όμως μερικών ειδών, όπως είναι το *P. palmivora* MF1 από το *P. megakarya*, η παρουσία ή η απουσία αντίστοιχα, είναι σημαντικός δείκτης.

vii. Παθογένεια

Ο Tucker (1931) χρησιμοποίησε 18 διαφορετικούς ξενιστές, περιλαμβάνοντας καρπούς, κονδύλους, σπορόφυτα και στελέχη. Για τα είδη που έχουν λίγους εξειδικευμένους ξενιστές, όπως είναι τα *P. fragariae*, *P. infestans* και *P. ilicis*, η καταγραφή του ξενιστή συμβάλλει σημαντικά στην ταξινόμηση. Πρόσφατα έχει γίνει χρήση της ειδικής παθογένειας για την ταξινόμηση απομονώσεων ως “*formae speciales*” εντός του είδους, όπως το *P. megasperma* f. sp. *glycinea* στη σόγια (Kuan and Erwin, 1980).

viii. Μορφολογικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειας σε υποστρώματα με άγαρ

Η μορφολογία της αποικίας προσδιορίζεται από την ανάπτυξη και τη μορφή της διακλάδωσης των υφών. Ο Ho (1978) ανέφερε ότι τα χαρακτηριστικά της διακλάδωσης στην περιφέρεια μιας αποικίας μπορεί να είναι χρήσιμα στην απεικόνιση των ταξινομικών κατηγοριών. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειας εξαρτώνται εως ένα βαθμό από τα θρεπτικά υποστρώματα. Τα θρεπτικά υποστρώματα Potato Dextrose Agar (PDA), Cornmeal Agar και Carrot Agar δίνουν χαρακτηριστικά μορφολογικά γνωρίσματα στις καλλιέργειες. Οι κυριότεροι τύποι είναι: 1) ο ακτινόμορφος (ομοιόμορφα ακτινωτές υφές), π.χ. *P. citrophthora*, 2) ο τύπος Χρυσάνθεμου π.χ. *P. citricola*, 3) ο τύπος τριανταφύλλου ή καμέλιας π.χ. *P. cinnamomi*, 4) ο ανομοιόμορφος τύπος (χωρίς καμία εμφανή μορφή) π.χ. *P. capsici*, 5) ο αστεροειδής τύπος (μπορεί να είναι και ενδιάμεσος μεταξύ του ακτινωτού τύπου και του τύπου χρυσάνθεμου) π.χ. *P. palmivora* MF1.

4. Ενδιάμεσοι χαρακτήρες

Μερικοί χαρακτήρες είναι αισθητοί σε αρκετά είδη, αλλά έχουν ιδιαίτερη σημασία μόνο σε λίγα από αυτά. Οι χαρακτήρες αυτοί είναι:

i. Οξυκατάλληκτη βάση του σποριαγγείου

Το χαρακτηριστικό αυτό μπορεί να παρατηρηθεί σε πάνω από 15 είδη, έχει

όμως ιδιαίτερη σημασία για τα είδη *P. hibernalis* και *P. palmivora* MF4.

ii. Περισσότερες από μία κορυφές (με θηλή)

Το χαρακτηριστικό παρατηρείται σε 12 διαφορετικά είδη αλλά έχει ιδιαίτερη σημασία στα είδη *P. citrophthora* και *P. citricola*. Η διπλή κορυφή δεν παρατηρείται σε είδη που δεν έχουν θηλή.

iii. Σχέση μεγέθους ωοσπορίου και ωογονίου

Στα περισσότερα είδη τα ωοσπόρια γεμίζουν εσωτερικά όλο το ωογόνο, ενώ τα ωοσπόρια 15 περίπου ειδών αφήνουν αρκετό χώρο κενό μέχρι τα τοιχώματα του ωογονίου. Μεταξύ αυτών των ειδών, ο κενός χώρος μεταξύ των τοιχωμάτων του ωοσπορίου και των τοιχωμάτων του ωογονίου είναι αρκετά μεγάλος σε αρκετά αναπαραγωγικά όργανα στα είδη *P. heveae*, *P. rotii* και *P. vignae*.

iv. Ωογόνια με οξυκατάλληκτη βάση

Υπάρχουν 10 διαφορετικά είδη που παράγουν ωογόνια με οξυκατάλληλη βάση, από αυτά όμως μόνο τα είδη *P. heveae* και *P. megakarya* παράγουν τέτοια ωοσπόρια συχνά και σε υψηλά ποσοστά.

5. Σημαντικοί χαρακτήρες για ένα ή δύο είδη

1. Το σχήμα των σποριαγγείων συχνά παραμορφωμένο. Παρατηρείται κυρίως στα είδη *P. citrophthora*, *P. citricola* και *P. primulae*.
2. Σποριάγγεια που αποπίπτουν έπειτα από τη διάρρηξή τους. Παρατηρείται στα είδη *P. cinnamomi* και *P. drechsleri*.
3. Σποριαγγειοφόροι σε σύμπλεγμα. Στα είδη *P. infestans* και *P. phaseoli*.
4. Κυματοειδές τοίχωμα του ωογονίου. Στα είδη *P. cambinora*, *P. katsurae*.
5. Έκκεντρος (παράκεντρος) μίσχος του ωογονίου. Στο είδος *P. nicotianae* var. *nicotianae* χρειάζεται προσοχή στην παρατήρηση γιατί μπορεί να θεωρηθεί ότι πρόκειται για παράγυνο ανθηρίδιο σε στενή επαφή με τον μίσχο του ωογονίου.
6. Περιελίξεις των άκρων των μυκηλιακών υφών. Στο είδος *P. rotii*.
7. Μυκηλιακές διογκώσεις σε άγαρ. Το είδος *P. cinnamomi* έχει χαρακτηριστικές, μεγάλες και σφαιρικές μυκηλιακές διογκώσεις που ξεχωρίζουν από τα άλλα είδη.
8. Σφαιρικές μυκηλιακές διογκώσεις με ακτινόμορφες υφές. Είναι χαρακτηρι-

στικές για το είδος *P. nicotianae* var. *nicotianae*.

9. Σκληρότητα εναέριου μυκηλίου. Το είδος *P. cinnamomi* παρουσιάζει ασυνήθιστα σκληρό εναέριο μυκήλιο με την βοήθεια του οποίου διαχωρίζεται από το είδος *P. cambivora*.
10. Σποριάγγεια σε συστάδες. Χαρακτηριστικό για το είδος *P. botryosa*. Είναι ορατό ακόμη και με γυμνό οφθαλμό.
11. Ωογόνια σε συστάδες. Στο είδος *P. heveae*.
12. Απουσία ανθηριδίων.

Το είδος *P. insolita* που περιγράφηκε από τους Ann and Ko (1980) είναι το μοναδικό είδος που παράγει ωογόνια και ωοσπόρια χωρίς ανθηρίδια.

6. Βοηθητικοί χαρακτήρες

Οι βοηθητικοί χαρακτήρες δεν μπορούν από μόνοι τους να χρησιμοποιηθούν ως πρωταρχικά διαγνωστικά χαρακτηριστικά, αλλά βοηθούν στην επιβεβαίωση της αναγνώρισης συγκεκριμένων ειδών.

1. Η διάμετρος της μυκηλιακής υφής
2. Οι σποριαγγειοφόροι
3. Αφθονία σποριαγγείων σε στερεά υποστρώματα

Είδη με σποριάγγεια χωρίς θηλή συνήθως δεν σχηματίζουν σποριάγγεια σε στερεά υποστρώματα. Αντίθετα τα περισσότερα είδη που σχηματίζουν σποριάγγεια με θηλή, παράγουν άφθονα σε μια ποικιλία στερεών υποστρωμάτων (π.χ. *P. palmivora*). Υπάρχει βέβαια η περίπτωση μεμονωμένες απομονώσεις να διαφέρουν ως προς το δυναμικό τους να παράγουν σποριάγγεια.

4. Μέγεθος ανθηριδίων

Τα ανθηρίδια πολλών ειδών είναι παρόμοια σε μέγεθος και σχήμα, αλλά μερικά είδη έχουν χαρακτηριστικά μικρά (*P. heveae*, *P. syringae*) ή μεγάλα (*P. fragariae*, *P. cambivora*, *P. richardiae*).

5. Εξομάλυνση της κορυφής του σποριαγγείου

Όταν σποριάγγεια μερικών ειδών χωρίς θηλή τοποθετηθούν σε μπλε λακτοφαινόλη (lactophenol blue), η κορυφή τους διαπλατύνεται. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται μόνο σε μερικά είδη, ενώ σε άλλα όχι χωρίς να μπορεί να εξηγηθεί.

6. Παχύ τοίχωμα ωοσπορίου σε σχέση με τη διάμετρό του.

Το σχήμα του ωοσπορίου είναι σταθερό μέσα στο γένος, παρουσιάζοντας

όμως μικρές διαφορές ως προς το μέγεθος που εξαρτάται από το μέγεθος του ωογονίου, ως προς το χρώμα με μικρές αποκλίσεις που μερικές φορές προκαλούνται από το υπόστρωμα και ως προς το πάχος του τοιχώματος. Μερικά είδη μπορεί να έχουν μικρό ωοσπώριο με παχύ τοίχωμα, ενώ άλλα μεγάλο ωοσπώριο με σχετικά λεπτό τοίχωμα. Το είδος *P. cryptogea* έχει ωοσπώρια με διάμετρο 25 μm και πάχος τοιχώματος 3,5 μm, ενώ το είδος *P. cinnamomi* έχει ωοσπώρια με διάμετρο 38 μm και πάχος τοιχώματος 2-3 μm.

Σύγχρονοι τρόποι ταξινόμησης σε συνδυασμό με τους κλασσικούς τρόπους

Ο παραδοσιακός αυτός τρόπος ταξινόμησης δεν πρέπει να είναι και ο μοναδικός, διότι μερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά δεν είναι πολύ σαφή και δημιουργούν σύγχυση. Σήμερα μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά ορολογικές μέθοδοι ή μοντέλα πρωτεϊνών ή ισοενζύμων με ηλεκτροφόρηση (Gallegly, 1983). Ακόμη χρησιμοποιούνται μέθοδοι μοριακής βιολογίας που έχουν σχέση με τον πολυμορφισμό του DNA ως προς το μέγεθος ορισμένων τμημάτων περιορισμού (restriction fragments length polymorphism, RFLPs) που δίνουν εξηγήσεις για την σχέση κυρίως μεταξύ συγγενών ειδών. Χρησιμοποιείται επίσης η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Πρόσφατα βρέθηκε εξειδικευμένος εκκινητής (primer) ο PINF με την βοήθεια του οποίου ανιχνεύεται ο *Phytophthora infestans* στην πατάτα και στην τομάτα. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η ανίχνευση του μύκητα σε κονδύλους σποράς πατάτας ή φυτάρια τομάτας που προορίζονται για μεταφύτευση, οπότε είναι δυνατή η αποτροπή μετάδοσης της ασθένειας στην νέα καλλιέργεια. Επίσης με τον έγκαιρο εντοπισμό του μύκητα στους ιστούς των φυτών μπορούν να προληφθούν τυχόν επιδημίες. Οι μέθοδοι αυτοί πρέπει να συμπληρώνουν τις κλασσικές μεθόδους για να διευκολύνεται σε δύσκολες περιπτώσεις η ταξινόμηση του γένους.

Μετά την πρώτη αναθεώρηση της κλείδας προσδιορισμού της Waterhouse (1963) που έγινε το 1978 από τους Newhook *et al.* τα κριτήρια της οποίας περιγράφηκαν παραπάνω, έγινε μια δεύτερη αναθεώρηση το 1990 από τους Stamps *et al* βάσει της οποίας γίνεται αποδεκτή η ταξινόμηση σήμερα.

Μετά την δεύτερη αναθεώρηση, το γένος συνεχίζει να χωρίζεται σε 6 μεγάλες ομάδες η περιγραφή των οποίων, όπως ισχύουν σήμερα, είναι η εξής:

- Η πρώτη ομάδα σχηματίζει σποριάγγεια με θηλή, που εύκολα παράγονται στην καλλιέργεια σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα, συνήθως αποσπώνται από το σποριαγγειοφόρο, χωρίς αύξηση αυτού εσωτερικά και σχηματισμό σποριαγγείου (δευτερογενής σποραγγειοπλασία-proliferation). Τα ωσπόρια σχηματίζονται στον ξενιστή και στην καλλιέργεια με ανθηρίδια που είναι σχεδόν όλα παράγυνα. Στην ομάδα αυτή ανήκει το είδος *P. cactorum*.
- Η δεύτερη ομάδα σχηματίζει σποριάγγεια με παρόμοιους μορφολογικούς χαρακτήρες με την πρώτη, τα ωσπόρια όμως συνήθως δεν σχηματίζονται εύκολα, ενώ τα ανθηρίδια είναι αμφίγυνα. Εδώ ανήκουν μεταξύ άλλων και τα είδη *P. boehmeriae*, *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* και *P. palmivora*.
- Η τρίτη ομάδα σχηματίζει σποριάγγεια με θηλή μικρότερη από της δύο προηγούμενες ομάδες, τα οποία αποσπώνται ή όχι από το σποριαγγειοφόρο, ενώ δεν παρατηρείται το φαινόμενο της δευτερογενούς σποραγγειοπλασίας. Τα ωσπόρια σχηματίζονται στον ξενιστή και στην καλλιέργεια με ανθηρίδια σχεδόν πάντα παράγυνα. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τα είδη *P. citricola*, *P. porri* και *P. syringae*.
- Η τέταρτη ομάδα σχηματίζει σποριάγγεια όπως και η τρίτη, τα ωσπόρια όμως δεν σχηματίζονται πάντοτε εύκολα σε απλή καλλιέργεια και τα ανθηρίδια είναι ως επί το πλείστον αμφίγυνα. Εδώ ανήκουν τα είδη *P. infestans* και *P. hibernalis*.
- Η πέμπτη ομάδα σχηματίζει σποριάγγεια χωρίς θηλή, τα οποία δεν αποσπώνται από το σποριαγγειοφόρο, σχηματίζονται σπάνια σε στερεό θρεπτικό υλικό, ενώ σχηματίζονται ευκολότερα σε υγρές καλλιέργειες και ο σποριαγγειοφόρος αυξάνει εσωτερικά και σχηματίζει σποριάγγειο. Τα ωσπόρια σχηματίζονται πάνω στον ξενιστή και στην καλλιέργεια σε θρεπτικά υποστρώματα και τα ανθηρίδια είναι ως επί το πλείστον παράγυνα. Μεταξύ άλλων ειδών ανήκουν και τα *P. megasperma* και *P. fragariae*.
- Η έκτη ομάδα σχηματίζει σποριάγγεια όμοια με αυτά της πέμπτης ομάδας, τα ωσπόρια όμως δεν σχηματίζονται εύκολα σε απλή καλλιέργεια και τα ανθηρίδια είναι ως επί το πλείστον αμφίγυνα. Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα είδη *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. dreschleri*, *P. erythroseptica* και άλλα λιγότερο γνωστά.

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΤΟΜΙΑ

Μυκήλιο

Το γένος *Phytophthora* χαρακτηρίζεται από κοινοκύτταρο μυκήλιο, υαλώδες, με πολλές κάθετες διακλαδώσεις, συχνά με σύσφιξη στην βάση. Το πρωτόπλασμα είναι κοκκώδες και διαφράγματα (septa) σχηματίζονται μόνο όταν ο μύκητας παράγει τις καρποφορίες του ή χλαμυδοσπόρια ή όταν θέλει να διαχωρίσει ένα νεκρό τμήμα του μυκηλίου. Όταν αναπτύσσεται πλούσιο εναέριο μυκήλιο, η αποικία είναι λευκού χρώματος. Η διάμετρος του κυμαίνεται από 5-8 μm αλλά εξαρτάται και από το υλικό που αναπτύσσεται ο μύκητας, από το εάν είναι το μυκήλιο εναέριο ή όχι, και από τα κύτταρα του ξενιστή στον οποίο παρασιτεί.

Ορισμένα είδη, όπως ο *P. syringae*, σχηματίζουν χαρακτηριστικές μυκηλιακές διογκώσεις κυρίως σε υγρές καλλιέργειες, που έχουν σφαιρικό ή ελλειψοειδές σχήμα, μεμονωμένες ή πολλές μαζί (Ελένα, 1999).

Σποριάγγεια

Οι αγενείς καρποφορίες του μύκητα ονομάζονται σποριάγγεια, τα οποία σχηματίζονται σε ειδικούς σχηματισμούς του μυκηλίου, που ονομάζονται σποριαγγειοφόροι, οι οποίοι διαφέρουν ή όχι από το μυκήλιο, εμφανίζονται σε

απλούς σχηματισμούς ή συμπόδια και είναι επάκριοι ή μερικές φορές ενδιάμεσοι. Σχηματίζονται σε στερεές, αλλά ευκολότερα σε υγρές καλλιέργειες, όπως είναι το αποστειρωμένο νερό, το εκχύλισμα εδάφους (soil extract) κ.ά. Τα σποριαγγεία είναι άχρωμα, πλατιά ή μακριά ελλειψοειδή, ωοειδή, λεμονοειδή, μερικές φορές σφαιρικά ή ενδιάμεσων σχημάτων. Στην κορυφή τους σχηματίζουν θηλή ευδιάκριτη, λιγότερο ευδιάκριτη ή δεν σχηματίζουν καθόλου, ανάλογα με το είδος. Το περιεχόμενο των σποριαγγείων συνήθως διαφοροποιείται και σχηματίζει υαλώδη ζωοσπόρια, τα οποία φέρουν δύο μαστίγια. Τα ζωοσπόρια ελευθερώνονται από την κορυφή του σποριαγγείου και κινούνται μέσα στο νερό από μερικά λεπτά έως αρκετές ώρες ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος, σε μικρές αποστάσεις, μέχρις ότου να εγκυستωθούν και να βλαστήσουν για να κάνουν τις μολύνσεις στα φυτά. Κατά την βλάστηση τους τα ζωοσπόρια, υφίστανται μια αξιοσημείωτη αρχιτεκτονική αλλαγή που έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του μαστιγίου, την σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων (be בנו), και την εμφάνιση του βλαστικού σωλήνα. Τα σποριαγγεία όμως μπορούν να βλαστήσουν και απευθείας, δίνοντας έναν βλαστικό σωλήνα ή περισσότερους όπου σταδιακά μεγαλώνουν για να σχηματίσουν μυκήλιο. Αποσπώνται σε μικρό ή μεγάλο μίσχο ή δεν αποσπώνται καθόλου από το σποριαγγειοφόρο. Σε μερικά είδη μετά την απελευθέρωση των ζωοσπορίων από τα σποριαγγεία μπορεί να παρατηρηθεί το φαινόμενο της δευτερογενούς σποριαγγειοπλασίας (sporangium proliferation, με βάση τους Ζάχο και άλλους, 1984). Κατά το φαινόμενο αυτό ο σποριαγγειοφόρος μεγαλώνει μέσα από τη βάση του άδειου σποριαγγείου και το νέο σποριαγγείο σχηματίζεται μέσα από το τοίχωμα του πρωτογενούς άδειου σποριαγγείου ή ο σποριαγγειοφόρος μπορεί να επιμηκυνθεί και να εξέλθει από τον πόρο εξόδου του αρχικού σποριαγγείου και έξω πλέον να σχηματίσει νέο σποριαγγείο. Ο σχηματισμός αυτός είναι χαρακτηριστικός ορισμένων ειδών *Phytophthora*, των οποίων τα σποριαγγεία δεν έχουν θηλή(Ελένα, 1999 ; Γεωργόπουλος, 1984).

Χλαμυδοσπόρια

Άλλοι σχηματισμοί ορισμένων ειδών του γένους *Phytophthora* είναι τα χλαμυδοσπόρια, τα οποία είναι συνήθως σφαιρικά ή ωοειδή και το χρώμα τους ποικίλλει από υαλώδες έως καστανό. Είναι επάκρια ή ενδιάμεσα διαφέρουν δε από τις μυκηλιακές διογκώσεις, διότι διαχωρίζονται με διάφραγμα από το

μυκήλιο . Τα χλαμυδοσπόρια βλαστάνουν με βλαστικό σωλήνα που είτε συνεχίζει να μεγαλώνει σχηματίζοντας μυκήλιο, είτε καταλήγει σε σποριάγγειο(Ελένα, 1999).

Ωοσπόρια

Οι εγγενείς καρποφορίες ονομάζονται ωοσπόρια και προέρχονται από την ένωση δύο διαφοροποιημένων γαμετών, του ωογονίου και του ανθηριδίου. Τα ωογόνια είναι σφαιρικά ή παίρνουν τη μορφή κώνου, με την κορυφή προς το στέλεχος και σχηματίζονται επάκρια από μια πλάγια υφή ή μερικές φορές ενδιάμεσα. Το τοίχωμα είναι άχρωμο και λεπτό στην αρχή, ενώ γίνεται παχύτερο και κιτρινοκαστανού χρώματος όταν παλιώνει, με λεία επιφάνεια στα περισσότερα είδη. Τα ανθηρίδια είναι συνήθως μονά (ένα σε κάθε ωογόνιο), μονόκλινα, δηλαδή η υφή τους προέρχεται από το στέλεχος του ωογονίου ή δίκλινα, όταν προέρχεται από άλλη υφή κοντινή ή απομακρυσμένη, ενώ το σχήμα τους είναι σφαιρικό ή ελλειψοειδές. Τα ανθηρίδια χαρακτηρίζονται αμφίγυνα, όταν περιβάλλουν το στέλεχος του ωογονίου, ή παράγυνα όταν έρχονται σε επαφή σε άλλο σημείο του. Στην περίπτωση του γένους *Phytophthora* και τα παράγυνα ανθηρίδια συνήθως εφάπτονται του ωογονίου σε σημείο κοντά στο στέλεχος. Μερικά είδη παράγουν και τα δύο είδη των ανθηριδίων, αλλά το ένα είδος είναι συνήθως επικρατέστερο. Από το ανθηρίδιο αναπτύσσεται σωλήνας, ο οποίος διαπερνά το τοίχωμα του ωογονίου και εναποθέτει έναν πυρήνα σ' αυτό, ενώ δεν γίνεται ανταλλαγή πρωτοπλάσματος μεταξύ ανθηριδίου και ωογονίου. Οι πυρήνες του ωογονίου εκτός από έναν, μεταναστεύουν στην περιφέρεια και αποσυντίθενται. Μετά τη γονιμοποίηση σχηματίζεται το ωοσπόριο στο κέντρο του ωογονίου και γύρω του ένα παχύ τοίχωμα. Τα ωοσπόρια ως επί το πλείστον γεμίζουν το ωογόνιο (πληρωτικά-plerotic). Το ωοσπόριο βλαστάνει απ' ευθείας δίνοντας μυκήλιο ή στο βλαστικό του σωλήνα σχηματίζεται ένα σποριάγγειο το οποίο βλαστάνει με υφή ή παράγει ζωοσπόρια. Σε πολλά είδη του γένους *Phytophthora* τα ωοσπόρια σχηματίζονται εύκολα πάνω στον ξενιστή ή στα συνήθη θρεπτικά υποστρώματα (ομοθαλλισμός). Σε άλλα είδη για να σχηματιστούν είναι απαραίτητοι χειρισμοί με ειδικά θρεπτικά υποστρώματα και διασταύρωση με αντίθετου συζευκτικού τύπου στελέχη (τύποι A1, A2) από το ίδιο ή και άλλο είδος *Phytophthora* (ετεροθαλλισμός) π.χ. *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. infestans* κ.α. Τα ωοσπόρια μπορούν να επιβιώσουν πολλά χρόνια στο έδαφος και είναι ανθεκτικά σε χαμηλές θερμοκρασίες (Ελένα, 1999).

ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Στο κεφάλαιο αυτό εξετάζονται οι επιδράσεις περιβαλλοντικών και άλλων παραγόντων, στην ανάπτυξη του μυκηλίου, στον σχηματισμό και βλάστηση των σποριαγγείων, των χλαμυδοσπορίων και των ωοσπορίων.

Παραγωγή σποριαγγείων

Η παραγωγή σποριαγγείων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η σημαντικότητα του κάθε παράγοντα ποικίλει μεταξύ των ειδών, ακόμη και μεταξύ απομονώσεων του ίδιου είδους.

α) Επίδραση φωτός

Το φως παρεμποδίζει, βοηθάει ή δεν έχει καμία επίδραση στην παραγωγή σποριαγγείων, ανάλογα με το είδος. Μερικά είδη π.χ. το *P. syringae* παράγει περισσότερα σποριαγγεία στο σκοτάδι (Harnish, 1965).

Επίσης ρόλο παίζει και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Συνήθως ο αριθμός των σποριαγγείων αυξάνει με αναγωγή κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία και στην μπλε περιοχή του φάσματος.

Το φως ακόμα ασκεί πολύ μεγάλη επίδραση στην μορφολογία των σποριαγγείων. Ο Hendrix (1967) παρατήρησε ότι τα σποριαγγεία των *P. palmivora* και *P. capsici* που σχηματίζονταν στο φως ήταν διαφορετικά σε σχήμα και μέγεθος από αυτά που σχηματίζονταν στο σκοτάδι. Το σχήμα των σποριαγγείων του *P. palmivora* που σχηματίζονταν στο σκοτάδι ήταν τόσο διαφορετικά ώστε μπορούσε το είδος αυτό να μπερδευτεί με άλλα παρόμοια (σχετικά) είδη.

β) Επίδραση των θρεπτικών στοιχείων

Μερικά είδη του γένους *Phytophthora* σχηματίζουν σποριαγγεία εύκολα σε στερεό υπόστρωμα ενώ λίγα ή καθόλου σε υγρό υπόστρωμα. Τέτοιο είδος είναι το *P. heveae*. Κάποια άλλα είδη όπως το *P. palmivora* σχηματίζει άφθονα σποριαγγεία και σε στερεά και σε υγρά υποστρώματα.

Σε πολλά είδη, για παραγωγή σποριαγγείων χρησιμοποιείται υπόστρωμα που αποτελείται από 4 μέρη νερό και 1 μέρος χυμό V₈.

Η γλυκόζη είναι κατά κανόνα διεγερτική για τον σχηματισμό σποριαγγείων σε συγκέντρωση μέχρι 0,5 g/l ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις προκαλούν παρεμπόδιση (Ayers and Zentmyer, 1971).

Το αν μια πηγή αζώτου θα έχει θετική ή όχι επίδραση στον σχηματισμό σποριαγγείων εξαρτάται από το είδος. Στο είδος *P. palmivora* παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός σποριαγγείων με την προσθήκη στο υπόστρωμα ανάπτυξης των αμινοξέων ασπαραγίνη ή σερίνη μέχρι συγκεντρώσεως 2-3 g/l σερίνη ή 1 g/l ασπαραγίνη. Πάνω από αυτές τις συγκεντρώσεις η παραγωγή σποριαγγείων παρουσίαζε μια απότομη μείωση (Brasier, 1967).

Όπως είναι αναμενόμενο και η αναλογία C/N του υποστρώματος επιδρά σημαντικά στην σχηματισμό σποριαγγείων.

Έχει επίσης αποδειχθεί ότι τα θετικά ιόντα όπως είναι τα Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ και K⁺ επιδρούν θετικά στον σχηματισμό σποριαγγείων. Οι Halsall and Forrester (1977) ανέφεραν ότι τα Ca²⁺ και Fe³⁺ είχαν σημαντική επίδραση στα είδη *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea* και *P. drechsleri*. Βρήκαν ότι όσο η συγκέντρωση τους αυξανόταν, αυξανόταν και ο αριθμός των σποριαγγείων μέχρι ένα μέγιστο μετά το οποίο ο αριθμός των σποριαγγείων άρχισε να μειώνεται. Επίσης βρήκαν ότι το κάθε κατιόν είχε διαφορετική άριστη συγκέντρωση για σχηματισμό σποριαγγείων, ανάλογα με το είδος.

Ο Tucker (1931) αναφέρει ότι πολλά είδη παρουσιάζουν αυξημένη σποριοποίηση με την προσθήκη στο υπόστρωμα χαμηλών συγκεντρώσεων KNO₃ (0,01 M).

Παρόλο που η πλειοψηφία των ειδών αντιδρούν σε μία ή περισσότερες ανόργανες χημικές ουσίες, το είδος *P. cinnamomi* είναι το μόνο που απαιτεί μια ισορροπία μεταξύ των στοιχείων Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ για σποριοποίηση (Chen and Zentmyer, 1970).

Η παραγωγή σποριαγγείων παρεμποδίζεται από την ύπαρξη συγκεκριμένων ιόντων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Ως παράδειγμα οι Kennedy and Erwin

(1961) αναφέρουν ότι 0,2 mg/l Cu^{2+} παρεμποδίζουν τελείως τον σχηματισμό σποριαγγείων στο είδος *P. megasperma*.

γ) Επίδραση των στερολών

Οι στερόλες ασκούν μεγάλη επίδραση στον αναπαραγωγικό κύκλο της *Phytophthora*. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, επιταχύνουν τον ρυθμό αύξησης, διεγείρουν την αγενή αναπαραγωγή και επιδρούν θετικά στον σχηματισμό των ζωοσπορίων.

Ο Hendrix (1964) ήταν ο πρώτος που απέδειξε ότι οι στερόλες είναι απαραίτητες για την παραγωγή σποριαγγείων στα είδη *Phytophthora*. Ανέφερε ότι τα είδη *P. cinnamomi*, *P. lateralis*, *P. capsici*, *P. palmivora* και *P. parasitica* σχηματίζουν σποριάγγεια σε υπόστρωμα που περιείχε 20 mg/l χολιστερόλη ενώ σε υπόστρωμα χωρίς στερόλη, η καλλιέργεια ήταν κυρίως μυκήλιο με λίγα ή καθόλου σποριάγγεια.

Ο ίδιος (Hendrix, 1967) βρήκε ότι στο φως ακόμα και χωρίς στερόλες μπορούσαν να παραχθούν αρκετά σποριάγγεια στα είδη *P. palmivora* και *P. capsici* αλλά αυτά μέσα σε λίγες ημέρες εκφυλιζονταν. Με αυτό τον τρόπο έδειξε πόσο απαραίτητη είναι η ύπαρξη των στερολών για την λειτουργικότητα των σποριαγγείων. Στο σκοτάδι σχηματίστηκε ένας μικρός αριθμός σποριαγγείων με την ύπαρξη στερολών ενώ καθόλου χωρίς την ύπαρξή τους.

Οι στερόλες επηρεάζουν ακόμα και το μέγεθος των σποριαγγείων. Ο Brasier (1967) ανέφερε ότι το μέγεθος των σποριαγγείων της *P. palmivora* αυξανόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης της β-σιτοστερόλης μέχρι τα 20 mg/l.

δ) Επιδράσεις των ατμοσφαιρικών αερίων

Ο Leonian (1925) παρατήρησε ότι στα είδη που μελέτησε ένας απαγορευτικός παράγοντας για τον σχηματισμό σποριαγγείων ήταν η περιεκτικότητα της ατμόσφαιρας σε O_2 .

Οι Mitchell and Zentmyer (1971) παρατήρησαν ότι η σπορίωση μειωνόταν με την μείωση της συγκέντρωσης του O_2 ή την αύξηση του CO_2 σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ατμόσφαιρας. Ο βαθμός μείωσης διέφερε με το είδος. Σε 5% O_2 άφθονα σποριάγγεια σχηματίστηκαν από τα είδη *P. parasitica* και *P. capsici* (A_1), λιγότερα από τα είδη *P. palmivora* και *P. capsici* (A_2) ενώ το είδος *P. cactorum* είχε αρκετά μειωμένη παραγωγή σποριαγγείων.

ε) Επίδραση της ηλικίας

Τα νεαρά μυκήλια παράγουν περισσότερα σποριαγγεία από ότι τα μεγαλύτερα σε ηλικία μυκήλια. Μίας ημέρας μυκήλιο του *P. megasperma* παράγει 4 φορές περισσότερα σποριαγγεία από ότι το 5 ημερών μυκήλιο (Eye et al, 1978).

Οι Gooding and Lucas (1959) έχουν αναφέρει το αντίθετο φαινόμενο, της συνολικής αύξησης του αριθμού σποριαγγείων του είδους *P. parasitica var. nico-tianae* με την αύξηση της ηλικίας της καλλιέργειας.

στ. Επίδραση του pH

Σποριαγγεία μπορούν να σχηματιστούν μεταξύ pH 4 και 9. Το άριστο όμως διαφέρει από είδος σε είδος.

ζ. Επιδράσεις αλατότητας

Τα είδη του γένους *Phytophthora* έχουν διαφορετική αντοχή στα διάφορα επίπεδα αλατότητας, αλλά όλα τα είδη είναι ικανά να σχηματίζουν σποριαγγεία και ζωοσπόρια σε επίπεδα αλατότητας που είναι επιζήμια για τα περισσότερα είδη φυτών.

Βλάστηση σποριαγγείων

Όπως αναφέρθηκε, η βλάστηση των σποριαγγείων μπορεί να γίνει είτε με τον σχηματισμό ενός βλαστικού σωλήνα που θα δώσει μυκήλιο είτε με την διαφοροποίηση του κυτοπλάσματος σε ζωοσπόρια.

α) Βλάστηση με βλαστικό σωλήνα

Εξαρτάται από την θερμοκρασία και το θρεπτικό υπόστρωμα. Θερμοκρασία ίση ή μεγαλύτερη από την άριστη για την ανάπτυξη μυκηλίου ευνοεί την βλάστηση με βλαστικό σωλήνα.

Αμινοξέα όπως είναι η αργινίνη, η γλουταμίνη, η γλυκίνη, η λευκίνη, η τρυπτοφάνη και το ασπαρτικό οξύ ευνοούν την απ' ευθείας βλάστηση και παρεμποδίζουν τη διαφοροποίηση σε ζωοσπόρια (Clerk, 1972).

Συγκέντρωση 10 mM CaCl_2 ή 1-10 mM MgSO_4 επίσης ευνοεί την απ' ευθείας βλάστηση.

β) Βλάστηση με διαφοροποίηση σε ζωοσπόρια

Γενικά, τα σποριάγγεια διαφοροποιούνται και απελευθερώνουν ζωοσπόρια σε παρουσία νερού και σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από τις άριστες για ανάπτυξη μυκηλίου.

Η διαφοροποίηση και απελευθέρωση των ζωοσπορίων επίσης καθυστερεί με την αύξηση των επιπέδων του NaCl (Gisi *et al.*, 1977).

Το φως είναι ένας ακόμα παράγοντας που επιδρά στην διαφοροποίηση των σποριαγγείων. Παρόλο που η παραγωγή τους είναι ιδιαίτερα αυξημένη με ανάπτυξη σε συνθήκες υπεριώδους ακτινοβολίας, ο αριθμός των σποριαγγείων που απελευθερώνουν ζωοσπόρια είναι μικρότερος σε σχέση με αυτά που σχηματίζονται και απελευθερώνουν κάτω από το φως της ημέρας (Ribeiro *et al.*, 1976).

Ο Brasier (1967) βρήκε ότι τα σποριάγγεια της *P. palmivora* δεν σχηματίζουν ζωοσπόρια με απουσία της β-σιτοστερόλης αποδεικνύοντας έτσι ότι οι στερόλες είναι απαραίτητες για την ζωοσπορογένεση.

γ) Κινητικότητα ζωοσπορίων

Η διάρκεια της κινητικότητας των ζωοσπορίων επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες και κυρίως από τη θερμοκρασία. Γενικά όσο μειώνεται η θερμοκρασία τόσο αυξάνεται η διάρκεια της κινητικότητας τους.

Ενδογενή λιπίδια φαίνεται να είναι η κύρια πηγή ενέργειάς τους.

δ) Βλάστηση ζωοσπορίων

Μετά την περίοδο της κινητικότητας που διαρκεί από μερικά λεπτά μέχρι μερικές ημέρες, ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος, τα ζωοσπόρια χάνουν τα μαστίγια τους και εμφανίζουν τον βλαστικό σωλήνα.

Η διαδικασία βλάστησης πιστεύεται ότι εξαρτάται από εξωγενή θρεπτικά στοιχεία περισσότερο από ότι το κινητικό στάδιο.

Αφού ο βλαστικός σωλήνας εμφανιστεί από το εγκυστωμένο ζωοσπόριο είναι ευαίσθητος σε αντιβιοτικά που παρεμποδίζουν την αναπνοή και τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών (Ersek, 1975; Yoshikawa *et al.*, 1976).

Παραγωγή Χλαμυδοσπορίων

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή χλαμυδοσπορίων είναι οι εξής:

α) Επίδραση στερολών

Οι στερόλες αυξάνουν την παραγωγή χλαμυδοσπορίων σε πολλά είδη. Το είδος *P. cinnamomi* σχηματίζει 3 φορές περισσότερα χλαμυδοσπόρια σε V-8 άγαρ με την προσθήκη β-σιτοστερόλης (10-40 mg/l) (Englander and Turbitt, 1979).

β) Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος

Χλαμυδοσπόρια σχηματίζονται εύκολα σε πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα. Ο Huguenin (1974) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η αναλογία C/N στο θρεπτικό υπόστρωμα επηρεάζει ισχυρά τον σχηματισμό χλαμυδοσπορίων στο είδος *P. palmivora*. Η άριστη αναλογία βρήκε ότι ήταν μεταξύ 15/8 και 28/9. Επίσης βρήκε ότι πηγές N όπως τα KNO_3 , NH_4NO_3 , 1-ασπαραγίνη και ουρία διεγείρουν την παραγωγή χλαμυδοσπορίων στο *P. palmivora*, ενώ το $(NH_4)_2SO_4$ την παρεμποδίζουν.

γ) Επίδραση του οξυγόνου

Ο Tsao (1971) ανέφερε ότι το είδος *P. parasitica* σχημάτιζε άφθονα χλαμυδοσπόρια όταν η καλλιέργεια ήταν βυθισμένη σε βάθος περίπου 50 mm μέσα σε υγρό υπόστρωμα. Φτωχό υπόστρωμα και χαμηλή συγκέντρωση O_2 ήταν οι ιδανικές συνθήκες για τον σχηματισμό τους.

Παρόμοια αποτελέσματα βρήκε και ο Huguenin (1974) ο οποίος ανέφερε ότι η παραγωγή χλαμυδοσπορίων του είδους *P. palmivora* ευνοείται από την έλλειψη O_2 .

Σε αντίθεση ο Chee (1973) ανέφερε ότι άφθονα χλαμυδοσπόρια παράγονταν μόνον όταν οι μυκηλιακές πλάκες της *P. palmivora* ήταν λίγο βρεγμένες, λίγα χλαμυδοσπόρια όταν οι μυκηλιακές πλάκες επέπλεαν στην επιφάνεια του θρεπτικού διαλύματος και καθόλου όταν ήταν βυθισμένες.

Ο τύπος του θρεπτικού υποστρώματος και η συγκέντρωση του O_2 βρέθηκε να επηρεάζει και την μορφολογία των χλαμυδοσπορίων.

δ) Επίδραση του φωτός

Γενικά η παραγωγή γλαυδοσπορίων είναι πιο άφθονη στο φως από ότι στο σκοτάδι.

Η ποιότητα του φωτός έχει διαφορετική επίδραση στο είδος *P. cinnamomi*. Ακτινοβολία με μήκος κύματος 470 με 725 nm προκαλεί τον σχηματισμό του ίδιου αριθμού γλαυδοσπορίων με το σκοτάδι ενώ στην υπεριώδη ακτινοβολία (310-420 nm) σχηματίζονται άφθονα γλαυδοσπόρια (Englander and Turbitt, 1979).

ε) Επίδραση του pH

Δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα για την επίδραση του pH στον σχηματισμό των γλαυδοσπορίων. Μόνο για το είδος *P. palmivora*, ο Chee (1973) ανέφερε ότι το άριστο pH για τον σχηματισμό γλαυδοσπορίων ήταν 5,8 με πολύ λίγα να σχηματίζονται σε pH=7.

Επιπλέον, ο Huguenin (1974) βρήκε άριστο pH 6,3 σε απομόνωση του *P. palmivora* από εσπεριδοειδή, ενώ κανένα δεν σχηματίστηκε σε pH 3,1 ή πάνω από 6,9.

Βλάστηση Χλαυδοσπορίων

Τα γλαυδοσπόρια βλαστάνουν με βλαστικό σωλήνα που είτε συνεχίζει να μεγαλώνει σχηματίζοντας μυκήλιο, είτε καταλήγει σε σποριάγγειο.

Ο συνεχόμενος βλαστικός σωλήνας (μυκήλιο) ευνοείται σε έδαφος με προσθήκη γλυκόζης ή ασπαραγίνης (Mircetich *et al.*, 1968) και επίσης σε θερμοκρασία μεταξύ 21 και 29°C (Chee, 1973).

Ο σχηματισμός βλαστικού σωλήνα που καταλήγει σε σποριάγγειο ευνοείται από φτωχά υποστρώματα, φυσικό χώμα (Mircetich *et al.*, 1968) και θερμοκρασία μεταξύ 32 και 35°C (Chee, 1973).

Παράγοντες που επηρεάζουν γενικώς την βλάστηση των γλαυδοσπορίων είναι οι εξής:

α) Επίδραση της αναλογίας C/N στο υπόστρωμα

Οι Mircetich *et al.* (1968) παρατήρησαν ότι ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις των 2,5 mM η γλυκόζη, φρουκτόζη και σουκρόζη δεν προκάλεσαν την

βλάστηση χλαμυδοσπορίων του είδους *P. cinnamomi*, ενώ σε απεσταγμένο νερό παρατηρήθηκε ένα μικρό ποσοστό βλάστησης 6%.

Παρόλα αυτά, παρουσιάζεται αύξηση της βλάστησης σε συνθετικά μείγματα που περιέχουν σουκρόζη, ασπαραγίνη και Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mo^{6+} , Mn^{2+} και Ca^{2+} . Το κίτρικό οξύ (0,025 M) επίσης διεγείρει την βλάστηση.

Η επίδραση της οργανικής ή ανόργανης πηγής N στην βλάστηση των χλαμυδοσπορίων του είδους *P. cinnamomi* έχει διερευνηθεί από τους Mircetich *et al.* (1968). Βρέθηκε ότι η ασπαραγίνη (0,125 M) προκαλεί 83% βλάστηση ενώ τα $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ και KNO_3 δεν έχουν καμία επίδραση. Ο συνδυασμός γλυκόζης και ασπαραγίνης επίσης αυξάνουν τα ποσοστά βλάστησης (85%). Εξωγενή θρεπτικά στοιχεία χρειάζονται για βλάστηση κάτω από ασηπτικές συνθήκες.

Για το είδος όμως *P. palmivora* έχει βρεθεί ότι δεν χρειάζεται εξωγενή στοιχεία. Επίσης για το ίδιο είδος, τα αμινοξέα παρεμπόδισαν την βλάστηση (Chee, 1973; Huguenin, 1974).

Στο είδος *P. cinnamomi* όταν τα χλαμυδοσπόρια βλάστησαν σε φυσικό χώμα χωρίς προσθήκες, τα περισσότερα από αυτά έδιναν βλαστικό σωλήνα που κατέληγε σε σποριάγγειο ενώ όταν η βλάστηση γινόταν σε χώμα που είχε προστεθεί γλυκόζη (ή ασπαραγίνη), τα χλαμυδοσπόρια ανέπτυξαν μέχρι και 16 βλαστικούς σωλήνες το κάθε ένα (Mircetich and Zentmyer, 1969).

6) Επίδραση της θερμοκρασίας

Τα χλαμυδοσπόρια βλαστάνουν μέσα σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών. Για την *P. cinnamomi* έχει αναφερθεί ότι το ελάχιστο είναι 9-12°C, το άριστο 20-30°C και το μέγιστο 33-36°C (Mircetich *et al.*, 1968).

γ) Επίδραση της ηλικίας της καλλιέργειας

Η ηλικία της καλλιέργειας βρέθηκε να μην επιδρά στα ποσοστά βλάστησης χλαμυδοσπορίων του είδους *P. cinnamomi* (Mircetich *et al.*, 1968).

Σε αντίθεση στο είδος *P. palmivora*, το υψηλότερο ποσοστό βλάστησης παρατηρήθηκε σε καλλιέργεια μίας εβδομάδος, ενώ καθόλου βλάστηση δεν παρατηρήθηκε σε 4 μηνών καλλιέργεια (Chee, 1973).

δ) Επίδραση του pH

Για το είδος *P. cinnamomi* έχει αναφερθεί ότι το άριστο pH βλάστησης είναι μεταξύ 5 και 7, παρόλο που παρουσιάζει ικανοποιητικό ποσοστό βλάστησης

(πάνω από 50%) σε pH 3 και 9. Κανένα χλαμυδοσπόριο δεν βλάστησε σε pH 2,5 (Mircetich *et al.*, 1968).

Ο Chee (1973) ανέφερε ότι το είδος *P. cinnamomi* σε pH 4 ή 8 δεν παρουσίαζε βλάστηση ενώ το άριστο του ήταν 5,8.

Από τις παραπάνω τιμές προκύπτει ότι το κάθε είδος έχει διαφορετικές απαιτήσεις όσον αφορά τις τιμές του pH.

Βλάστηση ωοσπορίων

Ο de Bary (1881) ήταν ο πρώτος που ανέφερε την βλάστηση ωοσπορίων στο γένος *Phytophthora*. Βρήκε ότι μερικά ωοσπόρια του είδους *P. cactorum* βλαστάνουν μετά από επώαση σε νερό για αρκετούς μήνες.

Διάφορες εργασίες από τότε έχουν δείξει ότι η βλάστηση συμβαίνει μόνο αφού τα ωοσπόρια υποβληθούν σε μια μακρά περίοδο ψύχους.

Ωοσπόρια των περισσοτέρων ειδών ήταν δύσκολο να βλαστήσουν σε επαρκή αριθμό (και έγκαιρα) ώστε να μπορέσουν να διεξαχθούν γενετικές ή φυσιολογικές μελέτες.

Αργότερα βρέθηκε ότι οι παράγοντες φως, θερμοκρασία, διατροφή, ένζυμα, υπόστρωμα ανάπτυξης και συγκεκριμένοι φυσικοί, χημικοί και γενετικοί παράγοντες επιδρούν στην βλάστηση των ωοσπορίων.

α) Επίδραση του φωτός

Ο Shaw (1967) ανέφερε ότι μόνο 3% των ωοσπορίων του είδους *P. cactorum* βλάστησαν στο σκοτάδι, ενώ ποσοστό 38% βλάστησε στο φως. Πολλοί ερευνητές έχουν επιβεβαιώσει, με παρόμοια αποτελέσματα την θετική επίδραση του φωτός στην βλάστηση.

Η διάρκεια έκθεσης στο φως έχει βρεθεί επίσης να επιδρά στην βλάστηση των ωοσπορίων. Οι Banihashemi and Mitchell (1976) ανέφεραν ότι έκθεση για 108 ώρες σε φως είχε ως αποτέλεσμα την βλάστηση 91,2% ωοσπορίων, ενώ έκθεση για 24 ώρες σε φως ίδιας εντάσεως και οι υπόλοιπες 84 ώρες σε σκοτάδι είχαν ως αποτέλεσμα την βλάστηση του 31% μόνο των ωοσπορίων.

Η ένταση της ακτινοβολίας εμφανίζει και αυτή μια επίδραση στην βλάστηση. Η βλάστηση σε πολλά είδη διεγείρεται με ακτινοβολία με μήκος κύματος μεταξύ 400-480 nm. Επίσης αύξηση του ποσοστού βλάστησης μπορεί να παρατηρηθεί και με χαμηλά επίπεδα ακτινοβολίας στην κόκκινη περιοχή του φάσματος (Ribeiro *et al.*, 1975b). Η αντίδραση στα διάφορα μήκη κύματος διαφέρει από είδος σε είδος.

β) Επίδραση της ωριμότητας των ωοσπορίων

Σε πολλά είδη τα ποσοστά βλάστησης αυξάνουν με την αύξηση της ηλικίας των ωοσπορίων, μέχρι ενός σημείου.

Ο Shaw (1967) δεν παρατήρησε βλάστηση σε 4 ημερών ωοσπόρια στο είδος *P. cactorum*, ενώ βλάστησε ποσοστό 67% όταν τα ωοσπόρια είχαν ηλικία 25 ημερών.

Ωοσπόρια μερικών ειδών βλαστάνουν γρήγορα μετά το σχηματισμό τους, κάτω από κατάλληλες συνθήκες φωτός, θερμοκρασίας και διατροφής. Παρόλα αυτά, υψηλά ποσοστά βλάστησης συνήθως συναντώνται σε καλλιέργειες με τουλάχιστον 30 ημερών ωοσπόρια.

γ) Επίδραση της θερμοκρασίας

Τα ωοσπόρια συχνά απαιτούν μια περίοδο προμεταχείρισης με υψηλότερη ή χαμηλότερη θερμοκρασία σε σχέση με την άριστη θερμοκρασία πριν την βλάστησή τους.

Προμεταχείριση των ωοσπορίων του είδους *P. drechsleri* στους 33°C για 2-8 ημέρες αυξάνει την βλάστηση τους ενώ προμεταχείριση στους 36°C την παρεμποδίζει (Klisiewicz, 1970).

Οι Kaosiri *et al.* (1980) ανέφεραν ότι προμεταχείριση του είδους *P. palmivora* στους 12°C και 30°C για 1 εβδομάδα προκάλεσε αύξηση του ποσοστού βλάστησης ενώ προμεταχείριση στους 33°C παρεμπόδισε την βλάστηση.

Οι Long *et al.* (1975) ανέφεραν ότι η βλάστηση ωοσπορίων του είδους *P. megasperma* f. sp. *glycinea* ήταν υψηλότερη (πάνω από 50%) όταν τα ωοσπόρια τοποθετούνταν για 48 ώρες στους 36°C πριν να τοποθετηθούν σε νερό με άγαρ.

Έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες έχει αναφερθεί ότι διεγείρει σε μερικά είδη την βλάστηση των ωοσπορίων.

Αντίθετα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για το είδος *P. drechsleri* όπου θερμοκρασία 3°C δεν βελτίωσε την βλάστηση (Klisiewicz, 1970). Επίσης στο είδος *P. palmivora* η βλάστηση των ωοσπορίων παρεμποδίστηκε μετά από έκθεση σε θερμοκρασία 5 ή 9°C (Kaosiri *et al.*, 1980).

Επίσης έχει αναφερθεί ότι η θερμοκρασία επώασης κατά τον σχηματισμό των ωοσπορίων είναι σημαντική για την μεταγενέστερη βλάστηση των ωοσπορίων αυτών.

δ) Επίδραση της διατροφής

Σάκχαρα όπως είναι η γλυκόζη, φρουκτόζη και σουκρόζη παρεμποδίζουν την βλάστηση των ωοσπορίων πολλών ειδών.

Η πηγή αζώτου (N) που χρησιμοποιείται έχει βρεθεί να επηρεάζει την βλάστηση. Όταν σαν πηγή N χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη και βαλίνη μαζί, τότε το ποσοστό βλάστησης ήταν 90%, ενώ όταν χρησιμοποιήθηκε κυστεΐνη το ποσοστό ήταν 70%.

Κατιόντα όπως το Ca^{2+} έχει βρεθεί ότι διεγείρουν την βλάστηση. Οι Banihashemi and Mitchell (1976) ανέφεραν ότι στο είδος *P. cactorum* η βλάστηση ήταν 3% σε απιονισμένο - απεσταγμένο νερό, ενώ ήταν 50% όταν στο νερό προστέθηκε 1 mg/l CaCl_2 .

ε) Επίδραση των ενζύμων

Τα ένζυμα πρωτεάσες, λιπάσες και κυτταρινάσες διεγείρουν την βλάστηση. Επίσης τα ένζυμα ελικάση και γλουσουλάση έχουν μια επίδραση στην βλάστηση. Τα διάφορα είδη αντιδρούν διαφορετικά στην ίδια ενζυμική μεταχείριση. Στην βιβλιογραφία υπάρχουν εργασίες με πολύ διαφορετικά αποτελέσματα ακόμα και για το ίδιο είδος.

στ) Θρεπτικό υπόστρωμα

Παρόλο που τα ωοσπόρια συχνά σχηματίζονται άφθονα σε φυσικά υποστρώματα, αυτό δεν σχετίζεται και με υψηλότερα ποσοστά βλάστησης αφού τα ωοσπόρια που σχηματίζονται σε καθορισμένα χημικά υποστρώματα βλαστάνουν καλύτερα από αυτά που σχηματίζονται σε χυμό V-8 άγαρ (Ribeiro *et al.*, 1975 α).

ζ) Επίδραση του pH

Δεν επηρεάζεται πολύ η βλάστηση των ωοσπορίων από το pH του υποστρώματος επώασης. Έχει αναφερθεί ότι στο είδος *P. capsici* τα ωοσπόρια βλαστάνουν σε pH από 4,5 μέχρι 7,8, στο είδος *P. drechsleri* μεταξύ pH 4,5 και 9,5 με άριστο το 7,5, ενώ το είδος *P. palmivora* έχει άριστο pH 5-6.

η) Επίδραση της σχετικής υγρασίας

Τα σποριαγγεια του μύκητα χρειάζονται υψηλά επίπεδα εδαφικής υγρασίας για να βλαστήσουν, διασπαρούν και μολύνουν. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία τόσο μειώνεται ο χρόνος που οι επιφάνειες πρέπει να παραμείνουν βρεγμένες για να πραγματοποιηθεί η μόλυνση.

ΜΟΛΥΝΣΗ

Τα σποριάγγεια, όπως αναφέρθηκε, είτε βλαστάνουν απ' ευθείας με βλαστικό σωλήνα και μολύνουν τα φυτά ή, συνηθέστερα, το περιεχόμενό τους διαφοροποιείται σε ζωοσπόρια, τα οποία ελευθερώνονται, εγκυστεύονται και βλαστάνουν για να κάνουν τη μόλυνση. Τα ζωοσπόρια είτε βλαστάνουν και μολύνουν απ' ευθείας είτε βλαστάνουν και δίνουν σποριάγγειο το οποίο βλαστάνει ή παράγει ζωοσπόρια. Αυτά με τα δύο μαστίγια (βλεφαρίδες) έχουν την ικανότητα να κινούνται μέσα στο νερό σε μικρές αποστάσεις πριν εγκυστευθούν. Τα ζωοσπόρια του γένους *Phytophthora* έχουν αρνητικό γεωτροπισμό και για το λόγο αυτό κολυμπούν ή μετακινούνται κυρίως κοντά στην επιφάνεια του εδάφους, όπου βρίσκονται πιο πολλά ριζίδια των φυτών απ' ό,τι σε μεγαλύτερα βάθη. Τα ζωοσπόρια προσελκύονται από αυτά, κινούνται προς αυτή την κατεύθυνση και βλαστάνουν πάνω στην επιφάνειά τους με βλαστικό σωλήνα ο οποίος εισέρχεται με απ' ευθείας διάτρηση της επιδερμίδας και προσβάλλει τους ιστούς του ξενιστή. Με αυτό τον τρόπο μολύνουν τα περισσότερα είδη του γένους που προξενούν ζημιές στις ρίζες (Ελένα, 1999).

Τα είδη που προσβάλλουν τα φύλλα, όπως είναι ο *P. infestans*, από το βλαστικό σωλήνα σχηματίζουν απρεσσόριο (*appressorium*), το οποίο διαπερνά τα επιδερμικά κύτταρα.

Ο μηχανισμός, που το γένος *Phytophthora* αποικίζει τους ξενιστές, δεν έχει τελείως ξεκαθαριστεί, πιστεύεται όμως ότι ο μύκητας διαπερνά μηχανικά τα κυτταρικά τοιχώματα και πιθανόν αυτό συνοδεύεται και από δράση διαλυτικών ενζύμων. Πειράματα με παρεμποδιστές των μηχανισμών άμυνας των ξενιστών δείχνουν ότι οι μηχανισμοί αποίκησης είναι παρόμοιοι σε όλα τα είδη *Phytophthora*.

Φυτοτοξικοί μεταβολίτες παράγονται από τα είδη *Phytophthora* αλλά δεν φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποίκιση του ξενιστή. Θα μπορούσαν όμως να συνεισφέρουν στα συμπτώματα της ασθένειας όπως είναι η έλλειψη νερού στα άρρωστα φυτά.

Μετά την είσοδο του παθογόνου αναπτύσσεται μυκήλιο στα επιδερμικά κύτταρα, στην αρχή μεσοκυττάριο και αργότερα ενδοκυττάριο για την πρόοδο δε των υφών μέσα στους ιστούς σημαντικός είναι ο ρόλος των πηκτινολυτικών ενζύμων. Εάν ο ξενιστής είναι ευπαθής, στο σημείο μόλυνσης σχηματίζεται κηλίδα, το κέντρο της οποίας αρχίζει να νεκρώνεται και να βυθίζεται στην επιφάνεια της ρίζας ή του στελέχους. Όταν ο ξενιστής δεν είναι ευπαθής, π.χ. μια ανθεκτική ποικιλία, η εξάπλωση της αρχικής μόλυνσης παρεμποδίζεται από μια υπερευπάθεια των προσβεβλημένων κυττάρων, τα οποία καταστρέφονται και η μόλυνση δεν προχωράει (αντίδραση υπερευαισθησίας).

Σε μια καλλιεργητική περίοδο παράγονται συνεχώς αγενείς καρποφορίες μόνο εάν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι ευνοϊκές, οπότε και η εξάπλωση της ασθένειας παίρνει τη μορφή επιδημίας(Ελένα,1999).

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Η εξάπλωση των ασθενειών που οφείλονται στο γένος *Phytophthora* όπως ισχύει και σε άλλα παθογόνα εξαρτάται από το δυναμικό του μολύσματος, τις συνθήκες του περιβάλλοντος και την ευπάθεια του ξενιστή. Οι κλιματικές συνθήκες έχουν καθοριστικό ρόλο για όλα τα είδη *Phytophthora* και την εξάπλωση της ασθένειας που προξενούν. Ο περιβαλλοντικός παράγοντας όμως που παίζει το σπουδαιότερο ρόλο είναι η υγρασία.

Για τα είδη που προσβάλλουν τα φύλλα, όπως ο *P. infestans*, οι βροχοπτώσεις, η περίοδος ύπαρξης δροσιάς, η σχετική υγρασία, η θερμοκρασία και η ηλιακή ακτινοβολία χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη, την αντιμετώπιση ή την εκτίμηση της εξέλιξης της ασθένειας. Η επιδημία περονοσπόρου της πατάτας στην Ιρλανδία τον περασμένο αιώνα, δεν οφείλονταν μόνο στην εμφάνιση ενός νέου παθογόνου σε έναν ευπαθή ξενιστή, αλλά και στις χαμηλές θερμοκρασίες και άφθονες βροχοπτώσεις που επικράτησαν εκείνη τη χρονιά (1845) και τις επόμενες.

Τα περισσότερα όμως είδη του γένους ζουν στο έδαφος, όπου οι αλλαγές των συνθηκών του περιβάλλοντος δεν είναι τόσο γρήγορες. Το ελεύθερο νερό εδώ, εκτός από το ότι ευνοεί την ασθένεια, διότι παράγονται τα μολύσματα του μύκητα (σποριάγγεια, ζωοσπόρια), τα μεταφέρει και σε μεγαλύτερες αποστάσεις και έτσι τη μεταδίδει. Εδώ ο ρόλος του επιπέδου της εδαφικής υγρασίας και της θερμοκρασίας και ο κατάλληλος συνδυασμός των δύο είναι καθοριστικός, με αποτέλεσμα επιδημίες από συγκεκριμένα είδη να περιορίζονται σε ορισμένα γεωγραφικά πλάτη (Ελένα, 1999). Ο *P. cinnamomi* για παράδειγμα είναι ένα σοβαρό παθογόνο για τα δάση της Αυστραλίας, όπου οι συνθήκες

θερμοκρασίας και υγρασίας τον ευνοούν. Ο μύκητας αυτός δεν μπορεί να επιβιώσει σε περιοχές όπου οι θερμοκρασίες εδάφους για μεγάλα χρονικά διαστήματα είναι ή επαναλαμβάνονται σε επίπεδα κάτω των 0°C. Για το λόγο αυτό υποθέτουν ότι δεν εξαπλώνεται στις Μεσογειακές χώρες, όπου άλλα είδη *Phytophthora* προξενούν σοβαρές ασθένειες. Στα περισσότερα μέρη του κόσμου πάντως οι κλιματικές συνθήκες είναι ευνοϊκές για τα περισσότερα είδη από αυτό το γένος. Επίσης υπάρχουν και είδη που προκαλούν ασθένειες στο ίδιο γεωγραφικό πλάτος αλλά σε διαφορετικούς χρόνους. Παράδειγμα τέτοιων ειδών είναι τα *P. citrophthora* και *P. syringae* που προκαλούν σήψεις στους καρπούς των εσπεριδοειδών. Το είδος *P. citrophthora* προσβάλλει τους καρπούς νωρίς κατά την περίοδο της συγκομιδής (Οκτώβρη-Νοέμβρη στην Ελλάδα) όταν οι θερμοκρασίες είναι ακόμα υψηλές (μέση ημερήσια θερμοκρασία 14-17°C) (είναι είδος θερμόφιλο όπως και το είδος *P. cactorum*), ενώ το είδος *P. syringae* εμφανίζεται από τον Νοέμβρη και μετά όταν οι θερμοκρασίες του περιβάλλοντος είναι χαμηλές (μέση ημερήσια 10-13°C), γιατί το είδος αυτό είναι ψυχρόφιλο (Παναγόπουλος, 1997).

Για την επιτυχία των μολύνσεων μεγάλη σημασία έχει ο χρόνος διατηρήσεως των επιφανειών υγρών. Η διάρκεια του χρόνου που πρέπει οι επιφάνειες να είναι βρεγμένες εξαρτάται από το είδος του μύκητα και την θερμοκρασία. Έτσι στις σήψεις των καρπών των εσπεριδοειδών για να είναι επιτυχείς οι 50% των μολύνσεων με το είδος *P. citrophthora* οι καρποί πρέπει να μείνουν βρεγμένοι επί 12 ώρες σε θερμοκρασία 8°C, επί 6 ώρες σε 12°C, επί 4 ώρες σε 16°C και επί 3 ώρες σε θερμοκρασία 20°C.

Ο χρόνος επώσεως της ασθένειας εξαρτάται επίσης από το είδος του μύκητα και την θερμοκρασία. Στην παραπάνω ασθένεια για τον *P. citrophthora* ο χρόνος επώσεως κυμαίνεται από 2,5 ημέρες σε θερμοκρασία 27°C μέχρι 13 ημέρες σε θερμοκρασία 8°C, ενώ ο χρόνος επώσεως για το είδος *P. syringae* είναι 9 ημέρες στους 12°C μέχρι 13 ημέρες σε θερμοκρασία 6°C (Παναγόπουλος, 1997).

Σε γενικές γραμμές οι υπερβολικές λιπάνσεις ευνοούν την εξάπλωση των ασθενειών, υπάρχουν όμως μεγάλες διαφορές μεταξύ των ειδών και μεταξύ του συνδυασμού του είδους *Phytophthora* και του ξενιστή που έχει προσβληθεί.

Η επιβίωση των παθογόνων, όπως είναι γνωστό, εξαρτάται όχι μόνο από την δυνατότητά τους να παρασιτούν έναν ξενιστή, αλλά και από την ικανότητά τους να επιβιώνουν κατά την απουσία του. Πολλά από αυτά επιβιώνουν σε κατάστα-

ση ληθάργου ή περνούν μια σαπροφυτική φάση σε νεκρούς ιστούς φυτών, στο έδαφος ή στο νερό. Τα διάφορα είδη διαφέρουν ως προς την ικανότητα τους να επιβιώνουν σ' αυτές τις καταστάσεις, μερικά όχι μόνο επιβιώνουν με σαπροφυτική φάση, αλλά πολλαπλασιάζονται και διασκορπίζονται, πολλές δε επιδημίες οφείλονται σε μολύσματα που προέρχονται από το έδαφος (εδαφογενή - soil borne). Η επιβίωση εξαρτάται βέβαια και από μια σειρά άλλων παραγόντων, μεταξύ των οποίων είναι και ο τύπος του εδάφους. Τα ζωοσπόρια, το μυκήλιο, και κατά δεύτερο λόγο, τα σποριάγγεια του γένους *Phytophthora* είναι πολύ ευαίσθητα μολύσματα. Ανθεκτικότερα είναι τα χλαμυδοσπόρια και κυρίως τα ωοσπόρια, τα οποία μπορούν να βρισκονται και σε κατάσταση ληθάργου. Είναι σχηματισμοί με παχιά τοιχώματα, που μπορούν να επιβιώσουν στο έδαφος μέχρι και 6 χρόνια και όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές για τη βλάστησή τους προξενούν ασθένεια στον ξενιστή. Όταν στο έδαφος δεν υπάρχει υψηλό ποσοστό υγρασίας, η διάρκεια επιβίωσης των μολυσμάτων είναι πολύ μικρότερη. Σε γενικές γραμμές η σαπροφυτική ικανότητα του γένους *Phytophthora* είναι μικρή. Συχνά παρατηρείται γρήγορη αποδιοργάνωση του μυκηλίου σε φυσικά εδάφη, η οποία οφείλεται σε αποίκησή του από βακτήρια(Ελένα, 1999).

ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Είδη του γένους *Phytophthora* προκαλούν προφυτρωτικές ή μεταφυτρωτικές σήψεις σε νεαρά φυτάρια στα σπορεία, καθώς και προσβολές λαιμού και ριζών πιο ώριμων φυτών ή και μεγάλων δένδρων. Σε πολλές περιπτώσεις προκαλούν και σήψεις καρπών. Γενικά πρόκειται για μύκητες που είναι προσαρμοσμένοι να ζουν στο νερό ή στο έδαφος και που ευνοούνται από υψηλή υγρασία εδάφους. Τα ζωοσπόρια τους μεταφέρονται και με το αρδευτικό νερό.

Σήψη λαιμού προκαλούν σε **μηλοειδή, πυρηνόκαρπα, εσπεριδοειδή** (κομμίωση), **φιστικιά, καστανιά, αμπέλι**, σε διάφορους θάμνους και σε πολλά ποώδη φυτά. Η προσβολή συνήθως αρχίζει από τον λαιμό ή τις κύριες ρίζες. Ο φλοιός εξωτερικά φαίνεται σκοτεινότερος, υδατώδης και συχνά ελαφρά βυθισμένος. Με την εξέλιξη της ασθένειας η αλλοίωση προχωράει προς τα πάνω αρκετά εκατοστά από το έδαφος και προς τα κάτω στις κεντρικές ρίζες. Η προσβολή είναι δυνατόν να περιβάλλει ολόκληρη την περιφέρεια του κορμού, οπότε το δένδρο ξηραίνεται. Εσωτερικά παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός του φλοιού και καμβίου που φτάνει μέχρι το ξύλο. Ο φλοιός τελικά νεκρώνεται και πολλές φορές αποκαλύπτεται το ξύλο (Παναγόπουλος, 1997).

Στα **πυρηνόκαρπα** παρατηρούνται 2 τύποι αποπληξίας:

- α) Ο ανοιξιάτικος τύπος ο οποίος εκδηλώνεται αργά τον χειμώνα. Στα νεαρά δένδρα τα μάτια δεν ανοίγουν την άνοιξη, ενώ στα μεγάλα δένδρα παράγονται μικροί καχεκτικοί βλαστοί που παραμένουν νάνοι και χλωρωτικοί. Τελικά τα δένδρα ξηραίνονται κατά την διάρκεια της πρώτης έντονης διαπνοής (Μάιο ή νωρίς τον Ιούνιο). Αυτός ο τύπος της προσβολής είναι ιδιαίτερα σοβαρός γιατί εμφανίζεται σε μεγάλη έκταση και συχνά αφορά ολόκληρο

το δενδροκομείο και μπορεί να συμβεί μετά από έντονες χειμερινές βροχοπτώσεις.

- β) Ο θερινός τύπος εκδηλώνεται κατά την διάρκεια της θερμής θερινής περιόδου με τη μορφή της αποπληξίας. Τα δένδρα συνήθως μετά από ελαφρά χλώρωση των φύλλων, εμφανίζουν έναν απότομο μαρασμό και ξηραίνονται. Τα προσβεβλημένα δένδρα εμφανίζονται μεμονωμένα μέσα στο δενδροκομείο (Παναγόπουλος, 1997).

Στα **εσπεριδοειδή** παρατηρείται και σήψη καρπών. Η προσβολή εκδηλώνεται με την εμφάνιση στην επιφάνεια του καρπού ενός ασαφούς ωχροόλευκου μέχρι ανοικτού καστανού μεταχρωματισμού. Η προσβεβλημένη περιοχή στην συνέχεια εξελίσσεται σε καστανή κηλίδα με ακανόνιστη και ασαφή περιφέρεια και δερματώδη σκληρή σύσταση. Η προσβολή επεκτείνεται σε όλο το βάθος του φλοιού και συχνά καλύπτει όλο τον καρπό. Οι προσβεβλημένοι ιστοί είναι δερματώδεις, δεν υποχωρούν στην πίεση των δακτύλων και αποδίδουν μια χαρακτηριστική έντονη οσμή “ταγκίλας”. Εάν η υγρασία είναι πολύ υψηλή εμφανίζεται μια λευκή εξάνθηση στην επιφάνεια των προσβεβλημένων ιστών. Οι εναέριες αυτές υφές του μύκητα προκαλούν μετασυλλεκτική επέκταση της ασθένειας σε υγιείς καρπούς που βρίσκονται σε επαφή με τους προσβεβλημένους. Σε προχωρημένα στάδια προσβολής αναπτύσσονται πολλές φορές διάφορα δευτερογενή παράσιτα οπότε η σήψη μεταβάλλεται σε υγρή.

Στα **πυρηνόκαρπα**, **εσπεριδοειδή** και **φιστικιά** παρατηρείται στην προσβεβλημένη περιοχή σχίσσιμο του φλοιού και έκκριση κόμμεος (Παναγόπουλος, 1997).

Στην **καστανιά** το γένος *Phytophthora* προκαλεί την ασθένεια μελάνωση. Παρατηρείται σήψη του φλοιού και του καμβίου στη βάση του κορμού και στις μεγάλες ρίζες. Πολλές φορές εκκρίνεται μελανώδες υγρό από τους προσβεβλημένους ιστούς της βάσης του δένδρου ενώ από προσβεβλημένες ρίζες εκκρίνεται σκουρόχρωμη ουσία με την οποία βάφεται το χώμα γύρω από αυτές (Ελένα, 1999).

Στο **βαμβάκι** εμφανίζονται στην αρχή σκουρόχρωμες νεκρωτικές κηλίδες πάνω στα καρύδια, οι οποίες στην συνέχεια καταλαμβάνουν ολόκληρη την επιφάνεια τους και πάνω αναπτύσσεται λευκή επάνθηση. Στην εξωτερική επιφάνεια των καρυδιών σχηματίζονται τα σποριάγγεια του μύκητα ενώ στην εσωτερική και στις ίνες του βαμβακιού σχηματίζονται τα ωοσπόρια. Η προσβολή παρατηρείται κυρίως στα καρύδια που σχηματίζονται στο κάτω μέρος του φυτού,

διότι τα μολύσματα φθάνουν εκεί με την εκτίναξη του χώματος από το νερό της βροχής ή του ποτίσματος(Ελένα, 1999).

Στην **ακτινιδιά** παρατηρούνται χλωρώσεις φύλλων, οι βλαστοί δεν μεγαλώνουν, τα φύλλα μαραίνονται, συστρέφονται και φαίνονται σαν καψαλισμένα. Τα συμπτώματα αυτά παρατηρούνται σε οπωρώνες που δεν στραγγίζουν καλά ή εκεί που το νερό του ποτίσματος παραμένει επι μακρόν σε άρδευση με κατάκλυση(Ελένα, 1999).

Στο **σμέουρο** οι πρώτες προσβολές αρχίζουν από τα χαμηλότερα μέρη του αγρού, όπου συνήθως το έδαφος είναι πιο υγρό. Στην αρχή παρατηρείται κιτρίνισμα και μάρανση των φύλλων, κυρίως στην κορυφή των βλαστών, στην συνέχεια όμως νεκρώνονται ολόκληροι οι βλαστοί. Εάν αφαιρεθεί ο φλοιός, οι ιστοί του ξύλου είναι μαυρισμένοι, ενώ παρατηρείται και σήψη των ριζών. Τα προσβεβλημένα φυτά παράγουν λίγους βλαστούς, αλλά και αυτά που εκπτύσσονται φέρουν σκουρόχρωμες κηλίδες στη βάση τους. Οι καρποφόροι βλαστοί έχουν ανώμαλη ανάπτυξη και συχνά μαραίνονται και ξηραίνονται πριν την πλήρη έκπτυξη των φύλλων.

Στα περισσότερα **κηπευτικά** (τομάτα, μελιτζάνα, πιπεριά, κολοκυνθοειδή σαυρανή, καρότο) προξενούνται 5 διαφορετικά είδη ζημιών:

- 1) Τήξεις φυταρίων ή τήξεις πριν την έξοδο των φυταρίων από το χώμα. Τα προσβεβλημένα φυτά παρουσιάζουν στην αρχή μια υδατώδη κηλίδα χρώματος ανοικτού καστανού και στην συνέχεια καταρρέουν.
- 2) Σήψη των ριζών, η οποία εμφανίζεται συνήθως αμέσως μετά τη μεταφύτευση νωρίτερα από άλλες σηψιριζίες.
- 3) Σήψη της βάσης του στελέχους. Τα φυτά μετά τη μεταφύτευση αρχίζουν να παίρνουν ένα βαθύ πράσινο χρώμα και μαραίνονται ιδιαίτερα όταν οι θερμοκρασίες είναι υψηλές μετά από υπερβολικό ή ελλιπές πότισμα. Στο ύψος της επιφάνειας του εδάφους ή λίγο πιο κάτω σχηματίζεται νεκρωτική κηλίδα η οποία εν μέρει ή ολοκληρωτικά περιβάλλει το στέλεχος.
- 4) Σήψεις καρπών. Τα συμπτώματα στους καρπούς, κυρίως αυτούς που ακουμπούν στο έδαφος, είναι καστανές υδατώδεις κηλίδες. Οι κηλίδες με υψηλές θερμοκρασίες εξαπλώνονται γρήγορα και εμφανίζονται καστανοί ομόκεντροι κύκλοι ανοικτού χρώματος. Ο μεταχρωματισμός φτάνει ως το κέντρο του καρπού, χωρίς να αποσυντίθεται η επιδερμίδα. Οι προσβε-

βλημένοι καρποί είτε σαπίζουν γρήγορα από δευτερογενείς προσβολές είτε μουμιοποιούνται.

- 5) Προσβολή των φύλλων των νεαρών φυτών, ενώ τα φύλλα των ενήλικων φυτών δεν προσβάλλονται. Εάν ο καιρός είναι υγρός, το μυκήλιο του μύκητα αναπτύσσεται στην επιφάνεια των προσβεβλημένων ιστών (Παναγόπουλος, 2000).

Στην **φράουλα** παρατηρούνται 3 είδη ζημιών που οφείλονται στο γένος *Phytophthora*:

- 1) Η σήψη του ριζώματος κατά την οποία τα φυτά παραμένουν μικρά στην ανάπτυξη. Σε τομή στο προσβεβλημένο ρίζωμα παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός των ιστών και ειδικότερα αποδιοργάνωση της περιοχής των αγγείων. Η σήψη των ριζών αρχίζει, όταν πλέον τα υπέργεια μέρη καταστρέφονται.
- 2) Δερματώδης σήψη των καρπών. Οι καρποί είναι ευπαθείς και προσβάλλονται σε όλα τα στάδια ανάπτυξής τους, από την άνθηση έως την ωρίμανση. Στους προσβεβλημένους πράσινους και ώριμους καρπούς σχηματίζονται σκουρόχρωμες κηλίδες που αργότερα γίνονται καστανές με ερυθρό περιθώριο. Οι προσβεβλημένοι μισοώριμοι καρποί, σπάνια ωριμάζουν τελείως, γίνονται σκληροί, εύθριπτοι και δερματώδεις στην υφή. Εξωτερικά και εσωτερικά οι ιστοί έχουν καστανό χρώμα, έχουν χαρακτηριστική πικρή γεύση και δυσάρεστη οσμή.
- 3) Κόκκινη καρδιά. Στα προσβεβλημένα φυτά τα νεαρά φύλλα γίνονται κυανοπράσινα με μικρούς μίσχους ενώ τα παλαιότερα γίνονται κόκκινα ή κίτρινα και στην συνέχεια ξηραίνονται. Τα φυτά αυτά παράγουν λιγότερους στόλωνες και μικρότερους καρπούς. Στις ρίζες πάνω από τη σήψη, η εντεριώνη έχει ερυθρό χρωματισμό ο οποίος όμως δεν παρατηρείται στις παλαιότερες ρίζες.

Σε πολλά **καλλωπιστικά** είδη η σήψη του ριζώματος και των ριζών μπορεί να προκαλέσει την μάρανση και καταστροφή των φυτών (Ελένα, 1999).

ΑΜΥΝΑ ΞΕΝΙΣΤΩΝ

Υπάρχουν μηχανισμοί αποφυγής της μόλυνσης όπως είναι η αποτυχία της έλξης των ζωοσπορίων και η εγκύστωση τους ώστε να επιτύχει ή αποτύχει ο μύκητας να διεισδύσει και να μολύνει τους ιστούς του φυτού. Οι επιδημιολογικοί παράγοντες και η προδιάθεση που έχουν τα φυτά είναι επίσης πολύ σημαντικοί στον καθορισμό της μόλυνσης των φυτών. Στο κεφάλαιο αυτό θα εξεταστούν οι μηχανισμοί αντίστασης των ξενιστών που δρουν μετά την επιτυχή πρωταρχική μόλυνση από τα είδη του γένους *Phytophthora*.

Οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να χωριστούν σε μηχανισμούς που αναφέρονται σε γενική αντίσταση δηλαδή σε αντίσταση ενός είδους φυτού σε ολόκληρο το γένος *Phytophthora*, και σε μηχανισμούς που αναφέρονται σε ειδική αντίσταση κατά την οποία η άμυνα ενός είδους φυτού είναι αποτελεσματική μόνο σε συγκεκριμένες φυλές ενός μόνο είδους και συνήθως ελέγχεται από ένα γονίδιο αντίστασης του ξενιστή (Keen and Yoshikawa, 1983).

Μηχανισμοί γενικής αντοχής

Οι μηχανισμοί της γενικής αντοχής σε είδη του γένους *Phytophthora* περιλαμβάνουν δομικά στοιχεία στους ξενιστές, προσχηματισμό χημικών παρεμποδιστών, πρόκληση δομικών εμποδίων (φραγμάτων), αντιδράσεις υπερευαισθησίας και παραγωγή φυτοαλεξινών.

Παρόλο που τα δομικά χαρακτηριστικά του ξενιστή λειτουργούν ως παράγοντες αντοχής σε πιθανά παθογόνα στα φυτά, λίγα στοιχεία δείχνουν ότι τέτοιοι

μηχανισμοί είναι σχετικοί με την αντοχή στα είδη του γένους *Phytophthora*.

Χημικοί παρεμποδιστές προσχηματισμού στους ιστούς του φυτού μπορεί να είναι ένας σημαντικός μηχανισμός αντοχής. Ο Schwinn (1965) ανέφερε ότι το σιναπέλαιο λειτουργεί με αυτόν τον τρόπο σε σταυρανθή. Τίποτα όμως ακόμα δεν έχει αποδειχθεί.

Παρόμοια, απλές φαινολικές ενώσεις και ένζυμα που τις μετατρέπουν σε περισσότερο τοξικά προϊόντα έχουν προταθεί (όχι αποδειχθεί) ότι παίζουν ρόλο ως παράγοντες αντοχής.

Αντιδράσεις υπερευαισθησίας φαίνεται να σχετίζονται με την γενική αντοχή αρκετών φυτών σε είδη του γένους *Phytophthora*. Παρόλο που το μεγαλύτερο αισθητό χαρακτηριστικό αυτού του τύπου της άμυνας είναι η νέκρωση των κυττάρων του ξενιστή στην περιοχή όπου βρίσκεται η μόλυνση από το παθογόνο, ο ρόλος της νέκρωσης των κυττάρων είναι αμφισβητήσιμος. Μια άποψη είναι ότι η παραγωγή φυτοαλεξινών είναι ένας σημαντικός παράγοντας της εξέλιξης του παθογόνου σε αντιδράσεις υπερευαισθησίας.

Οι φυτοαλεξίνες είναι αντιβιοτικά, μικρού μοριακού βάρους, που παράγονται από δευτερεύουσα βιοσύνθεση στα φυτά. Δεν υπάρχουν σε σημαντικά ποσά σε υγιείς φυτικούς ιστούς αλλά σχηματίζονται σαν αντίδραση στην μόλυνση από παθογόνα σεξουαλικά ασυμβίβαστα ή μετά από μεταχείριση των φυτικών ιστών με συγκεκριμένα χημικά που είναι διεγέρτες φυτοαλεξινών (elicitors), τα οποία προέρχονται από τα ίδια τα παθογόνα. Οι φυτοαλεξίνες μπορούν να προκληθούν από μη-παθογόνα, από ερεθιστικά χημικά όπως είναι τα άλατα των βαρέων μετάλλων, ή από φυσικούς τραυματισμούς όπως αυτοί που προκαλούνται από το υπεριώδες φως ή από ψύξη. Μερικές ουσίες που παράγονται από παθογόνα προκαλούν την παραγωγή φυτοαλεξινών μαζί με την παραγωγή σύνθετων υδατανθράκων από τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων, από λιπίδια, ένζυμα και πολυπεπτίδια (Keen and Yoshikawa, 1983 ; Keen, 1990).

Υπάρχει μια πρωτεΐνη στο μυκήλιο του είδους *P. cryptogea*, η οποία ονομάστηκε κρυπτογεΐνη (cryptogein) και η οποία θέτει σε λειτουργία τον αμυντικό μηχανισμό σε φυτά καπνού (Milat *et al.*, 1991). Επίσης η πρωτεΐνη αυτή προκαλεί την παραγωγή της φυτοαλεξίνης capsidiol στα φύλλα του καπνού η οποία προστατεύει το φυτό από την προσβολή από το είδος *P. nico-tianae*.

Μια άλλη πρωτεΐνη που παράγεται στο μυκήλιο του είδους *P. parasitica* ονο-

μάζεται parasiticein και προκαλεί αντίδραση ανθεκτικότητας σε φυτά καπνού προς το είδος *P. nicotianaе*. Η έλλειψη της παραγωγής της πρωτεΐνης αυτής σχετίζεται με την ειδική παθογόνο ικανότητα του είδους *P. nicotianaе* στον καπνό (Ricci *et al.*, 1992).

Μηχανισμοί ειδικής αντοχής

Οι μόνοι μηχανισμοί που αφορούν την ειδική αντοχή και που ενισχύονται από σημαντικές αποδείξεις είναι οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας και οι φυτοαλεξίνες.

Αρκετά φυτά περιέχουν γονίδια αντίστασης σε φυλές συγκεκριμένων ειδών με σεξουαλική ασυμβατότητα, και μερικά από αυτά τα φυτά υφίστανται αντιδράσεις υπερευαισθησίας με ταυτόχρονη συσσώρευση φυτοαλεξινών. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, η συσσώρευση φυτοαλεξινών σαν αντίδραση στην μόλυνση είναι μεγαλύτερη με φυλές του μύκητα με τις οποίες υπάρχει ασυμφωνία από ότι με τις φυλές που υπάρχει συμφωνία, πράγμα το οποίο αποδεικνύει ότι οι φυτοαλεξίνες σχετίζονται με την έκφραση της ανθεκτικότητας.

Η ειδική αντοχή σε φυλές των ειδών *P. infenstans* στην πατάτα και *P. sojae* στην σόγια έχει δημιουργηθεί και χρησιμοποιηθεί στον αγρό. Παρόλα αυτά είναι σήμερα γνωστό ότι παθολογικές φυλές έχουν την ικανότητα να υπερνικούν γονίδια ειδικής ανθεκτικότητας που έχουν εισαχθεί πρόσφατα στον ξενιστή (Keen and Yoshikawa, 1983).

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (γενικά)

Όπως όλες οι ιδιότητες των οργανισμών, έτσι και η ευαισθησία στις τοξικές ουσίες μπορεί να μεταβληθεί με μετάλλαξη. Αν με μία ή περισσότερες μεταλλάξεις μειωθεί σημαντικά η ευαισθησία σε μια ένωση, που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση ενός παθογόνου, θα προκύψει ένα ανθεκτικό στέλεχος που συνεχώς θα επιλέγεται από την εφαρμογή του φαρμάκου μέχρι που να επικρατήσει, οπότε θα έχουμε αποτυχία στην καταπολέμηση.

Στην φυτοπαθολογία αποτυχίες χημικής καταπολέμησης σαν αποτέλεσμα δημιουργίας ανθεκτικών στελεχών ήταν πολύ σπάνιες μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 1960. Αυτό συνέβει όχι γιατί τα παθογόνα των φυτών υστερούσαν σε ικανότητα να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα σε τοξικές ενώσεις, αλλά επειδή η φύση των μυκητοκτόνων που χρησιμοποιούνταν μέχρι τότε δεν ευνοούσε τη δημιουργία ανθεκτικότητας.

Με την εισαγωγή των διασυστηματικών μυκητοκτόνων και των αντιβιοτικών είχαμε μεγάλη αύξηση της σημασίας της ανθεκτικότητας για τη φυτοπαθολογία. Με τα φάρμακα αυτά η δημιουργία ανθεκτικότητας είναι ο κανόνας μάλλον παρά η εξαίρεση. Έτσι είχαμε πάρα πολλές αποτυχίες κυρίως με βενζιμιδαζολικά και με φαινυλαμίδια (Γεωργόπουλος, 1992).

Θεωρητικά η ευαισθησία μπορεί να μεταβληθεί με μεταλλαγή χρωματοσωματικού ή εξωχρωματοσωματικού γόνου. Παρόλο που και οι δύο πιθανότητες υπάρχουν, σε όλες τις περιπτώσεις ανάπτυξης ανθεκτικότητας μυκήτων σε μυκητοκτόνα, που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα, επρόκειτο για χρωματοσωματικές μεταλλαγές.

Η ανθεκτικότητα των παθογόνων στα μυκητοκτόνα περιγράφεται ως (1) ολιγογονική και (2) ως πολυγονική ανθεκτικότητα. Στην ολιγογονική επιτυχία-

νεται μεγάλο επίπεδο ανθεκτικότητας με μια μόνο μεταλλαγή. Στα απλοειδή κύτταρα, ο ανθεκτικός φαινότυπος εξαρτάται μόνο από τον μεταλλαγμένο γόνο. Το επίπεδο ανθεκτικότητας μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το ποιός γόνος έχει υποστεί μεταλλαγή, και στην περίπτωση που οι μεταλλαγμένοι γόνοι είναι περισσότεροι από έναν, δεν έχουν αθροιστική επίδραση. Στα διπλοειδή κύτταρα του μύκητα ο ανθεκτικός αλληλόμορφος μπορεί να συμπεριφέρεται σαν κυρίαρχος, ημικυρίαρχος ή υποτελής. Αυτό εξαρτάται από το γόνο που μελετάμε μάλλον παρά από το μυκητοκτόνο. Στην πολυγονική ανθεκτικότητα η επίδραση του κάθε γόνου στον φαινότυπο είναι πολύ μικρή. Όταν όμως στο ίδιο απλοειδές κύτταρο του μύκητα μεταλλάξουν περισσότεροι από ένας γόνοι για ανθεκτικότητα στο ίδιο μυκητοκτόνο, τότε το επίπεδο αντοχής μπορεί να ανέβει πολύ. Αυτό έχει και πρακτική σημασία, γιατί συνεχίζοντας τη χρήση του μυκητοκτόνου μπορεί να καταλήξουμε σε στελέχη με πολύ μικρή ευαισθησία. Αν η ανθεκτικότητα θα είναι ολιγογονική ή πολυγονική εξαρτάται πάντοτε από το μυκητοκτόνο και όχι από τον μύκητα που εκτίθεται σ' αυτό.

Ο πιο εύλογος τρόπος για την εμφάνιση ανθεκτικότητας σ' ένα φάρμακο και ίσως ο πιο αποτελεσματικός είναι η αλλαγή στην ευαίσθητη θέση, δηλαδή στο κυτταρικό συστατικό (ένζυμο ή άλλο) που αντιδρά με το φάρμακο. Με αυτό το μηχανισμό, αν το ευαίσθητο συστατικό είναι ένα, είναι φανερό ότι μπορεί να πάρουμε μεγάλη ανθεκτικότητα με μεταλλαγή ενός μόνο γόνου. Αν όμως το φάρμακο αντιδρά με πολλά διαφορετικά κυτταρικά συστατικά, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των μη εξειδικευμένων παρεμποδιστών, για να αλλάξουν όλες αυτές οι ευαίσθητες θέσεις πρέπει να έχουμε μεταλλαγές πολλών γόνων μέσα στον ίδιο πυρήνα. Αν δεχθούμε ότι κάθε μια από τις μεταλλαγές που μας ενδιαφέρουν συμβαίνει με συχνότητα 10^{-7} , τότε η πιθανότητα να έχουμε στον ίδιο πυρήνα 3 διαφορετικές μεταλλαγές είναι 10^{-21} (Γεωργόπουλος, 1992).

Βλέπουμε ότι είναι πολύ δύσκολο να αναπτυχθεί ανθεκτικότητα σε ένα προστατευτικό φάρμακο, που δρα σαν μη εξειδικευμένος παρεμποδιστής σε πολλά συστατικά του κυττάρου τουλάχιστον με αυτόν τον μηχανισμό της αλλαγής στις ευαίσθητες θέσεις.

Πρέπει όμως να τονισθεί ότι στην περίπτωση των τοξικών ενώσεων υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί δημιουργίας ανθεκτικότητας γι' αυτό και έχουμε περιπτώσεις αποτυχίας προστατευτικών (μη εξειδικευμένης δράσης) φαρμάκων έστω και αν οι περιπτώσεις αυτές είναι σχετικά σπάνιες.

Ένας από τους μηχανισμούς αυτούς είναι η μείωση της εισόδου του τοξικού

μορίου στο κύτταρο του παθογόνου. Επίσης αξίζει να αναφερθεί και ο μηχανισμός της αποτοξικοποίησης.

Είναι αποδεκτό ότι ανθεκτικά στελέχη σ' ένα μυκητοκτόνο υπάρχουν στη φύση πριν από την πρώτη εφαρμογή του. Η συχνότητα αυτή είναι πάρα πολύ μικρή στην αρχή της εφαρμογής αλλά μπορεί να αυξηθεί με την πίεση επιλογής από τη χρήση του μυκητοκτόνου.

Αυτό που πρέπει να επιδιώκουμε είναι η παράταση της “χρήσιμης ζωής” των φαρμάκων. Ο χρόνος από την εμφάνιση των πρώτων ανθεκτικών στελεχών μέχρι την δημιουργία πρακτικού προβλήματος, δηλαδή μέχρι την διαπίστωση μειωμένης αποτελεσματικότητας του φαρμάκου εξαρτάται από την διαφορά ευαισθησίας μεταξύ αρχικού πληθυσμού και ανθεκτικών στελεχών.

Η πίεση επιλογής εξαρτάται επίσης από την συχνότητα των επεμβάσεων με το ίδιο φάρμακο, την δόση που χρησιμοποιείται και την υπολειμματική του δράση.

Η προσαρμοστικότητα (fitness) των ανθεκτικών στελεχών είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την σταθερότητα της ανθεκτικότητας.

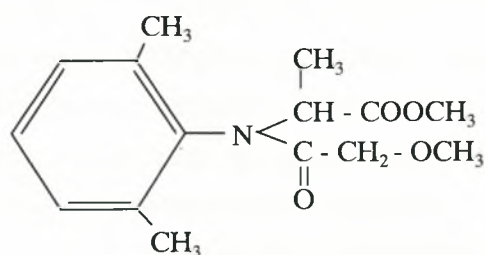
Η μειωμένη προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη παθογόνο δύναμη, μειωμένη παραγωγή σπορίων κ.λ.π. Μερικές μεταλλάξεις, που μειώνουν την ευαισθησία σε συγκεκριμένο τοξικό μόριο, μπορεί να επηρεάζουν τις ιδιότητες αυτές.

Σε πολλές όμως περιπτώσεις οι μεταλλάξεις ανθεκτικότητας δεν επηρεάζουν ή επηρεάζουν ελάχιστα την προσαρμοστικότητα και ο πληθυσμός του παθογόνου μπορεί να παραμείνει ανθεκτικός για πολλά χρόνια μετά τη διακοπή της χρήσης του φαρμάκου. Έχει αποδειχθεί ότι αυτό πράγματι συμβαίνει σε πολλές περιπτώσεις ανθεκτικότητας μυκήτων στα φαινυλαμίδια (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992 ; Παππάς και Ψαλίδας, 1998).

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ metalaxyl

Από το τέλος της δεκαετίας του 1970 αναγνωρίστηκαν ενδιαφέρουσες ενώσεις με εκλεκτική τοξικότητα εναντίων των Ωομυκήτων, αλλά το σπουδαιότερο, με ικανότητα εισόδου εντός του φυτού και μεγάλης ή μικρής αποπλαστικής κυρίως κίνησης. Η κυριότερη ομάδα αυτών των διασυστηματικών μυκητοκτόνων είναι τα φαινυλαμιδία τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη αποτελεσματικότητα εναντίον όλων των παθογόνων της τάξεως των *Peronosporales* (*Pythium*, *Phytophthora*, *Pseudoperonospora*, *Plasmopara*, *Bremia*). Έχουν πολύ καλή αποπλαστική κίνηση και είναι κατάλληλα για την καταπολέμηση παθογόνων φυλλώματος, ριζών, στελέχους και για μετασυλλεκτικές επεμβάσεις.

Η ομάδα των φαινυλαμιδίων υποδιαιρείται σε τρεις υποομάδες μία εκ των οποίων είναι η υποομάδα των Ακυλαλανινών. Οι ενώσεις που ανήκουν στην υποομάδα αυτή είναι τα metalaxyl, furalaxyl και benalaxyl. Το metalaxyl είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο και παρουσιάζει μεγαλύτερη κινητικότητα στα φυτά από ότι οι υπόλοιπες ενώσεις. Είναι διαλυτό στο νερό, σταθερό σε ουδέτερα και όξινα μέσα. Απορροφάται από το υπέργειο καθώς και από το υπόγειο μέρος του φυτού (ρίζες). Η χημική του δομή είναι η εξής:



metalaxyl

Οι ιδιότητες του metalaxyl πρώτη φορά αναφέρθηκαν από τους Urech *et al.* (1977) από την εταιρεία Ciba Geigy.

Εξαιτίας της μαρκάς ημιζωής του metalaxyl στο έδαφος (15-30 ημέρες) και της υψηλής του κινητικότητας, η δραστηριότητά του στο έδαφος θεωρείται εξαιρετική (Cohen and Coffey, 1986).

Εμπειρία στον αγρό και στο εργαστήριο

Πολλές έρευνες διεξήχθησαν για να καθορίσουν την παρουσία ανθεκτικών στελεχών στις ακυλαλανίνες και ιδιαίτερα στο metalaxyl που είναι το πιο αποτελεσματικό μυκητοκτόνο της ομάδας αυτής. Ανθεκτικά στελέχη έχουν βρεθεί στον αγρό και στο εργαστήριο από τα πρώτα χρόνια χρησιμοποίησης των μυκητοκτόνων αυτών.

Στο τέλος του 1979 παρατηρήθηκε η πρώτη αποτυχία καταπολεμήσεως στον αγρό της ασθένειας του περονοσπόρου σε φυτά αγγουριάς. Οι αναφορές απώλειας του ελέγχου της ασθένειας προέρχονταν από το Ισραήλ και την Κρήτη. Ανάλυση των απομονώσεων από τις περιοχές αυτές επιβεβαίωσε την ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *Pseudoperonospora cubensis* (Pappas, 1980; Malathrakis, 1980). Η ανθεκτικότητα αναπτύχθηκε πολύ γρήγορα. Η πρώτη αυτή εμφάνιση κάτω από πλαστικό τούνελ στην Κρήτη και στο Ισραήλ προκλήθηκε πιθανώς από το υψηλό ποσοστό μόλυνσης και την πίεση επιλογής, τα οποία παρείχαν ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών.

Η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών στους μύκητες εδάφους του γένους *Phytophthora* μετά από επανειλημμένη χρήση του metalaxyl με διαβροχή του εδάφους δεν φαινόταν να δημιουργεί τόσο μεγάλο κίνδυνο όσο η χρήση του metalaxyl με ψεκασμό φυλλώματος εναντίον του *P. infestans*. Παρόλα αυτά η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στους μύκητες εδάφους του γένους *Phytophthora* είναι σήμερα μια πραγματικότητα. Είναι όμως φανερό ότι οι πιθανότητες να αναπτυχθούν ανθεκτικά στελέχη στους μύκητες αυτούς είναι μικρότερες γιατί η διαβροχή του εδάφους με metalaxyl επηρεάζει ένα πολύ μικρότερο ποσοστό του συνολικού τους πληθυσμού σε σχέση με την επιρροή που έχει ο ψεκασμός του φυλλώματος στον πληθυσμό του *P. infestans*.

Έτσι το πρώτο είδος του γένους *Phytophthora* στο οποίο αναπτύχθηκαν ανθεκτικά στελέχη στον αγρό είναι το *P. infestans*. Το 1980 παρουσιάστηκε αν-

θεκτικότητα στις χώρες της Δυτικής Ευρώπης του μύκητα *P. infestans* σε φυτά πατάτας. Για το ίδιο είδος αναφέρθηκε από πολλούς ερευνητές ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών στον αγρό σε διάφορες χώρες. Στο Ισραήλ από τους Cohen and Reuveni το 1983, τους Cohen and Samoucha το 1984 και 1990, τους Kadish and Cohen το 1989, 1992. Στην Ελλάδα από τον Pappas το 1985 σε θερμοκήπια ντομάτας. Στην Αγγλία από τους Shattock το 1988, και Shattock *et al.* το 1990. Στον Καναδά από τον Gillis το 1993 και άλλους.

Το 1981 ο Davidse σε πειράματα στο εργαστήριο με πρόκληση μεταλλαγής με UV ακτινοβολία ή με χημικά μεταλλαξιγόνα βρήκε ανθεκτικά στελέχη στο είδος *P. megasperma* f. sp. *megasperma*. Μολύνοντας φυτά παρατήρησε ότι οι προσβολές που προέρχονταν από μολύνσεις με στελέχη του φυσικού πληθυσμού μπορούσαν να αποφευχθούν με 2,5 mg/l metalaxyl ενώ υπήρχαν ανθεκτικές απομονώσεις που ακόμη και με 20 mg/l metalaxyl δεν ήταν δυνατός ο έλεγχός τους. Από το 1981 και μετά και άλλοι ερευνητές βρήκαν ανθεκτικά στελέχη στο είδος *P. megasperma* (Hunger *et al.*, 1982; Stack and Millar, 1985).

Οι Coffey and Bower (1984) μελέτησαν την αντίδραση στο metalaxyl 6 ειδών του γένους *Phytophthora*. Βρήκαν ότι στο είδος *P. palmivora* ήταν πολύ πιο ευαίσθητο στο μυκητοκτόνο από ότι ήταν τα είδη *P. citrophthora* και *P. capsici*.

Μια παρόμοια εργασία, με βάση την ανάπτυξη του μυκηλίου σε διάφορες δόσεις metalaxyl σε cornmeal agar, έδειξε ότι το είδος *P. cactorum* ήταν πιο ευαίσθητο από τα είδη *P. cryptogea*, *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. megasperma* var. *sojae*, *P. citricola* και *P. cinnamomi* (Zaviezo *et al.*, 1993).

Ο Shew (1984) απομόνωσε από 6 διαφορετικούς αγρούς με καπνό το είδος *P. nicotianae* και βρήκε ότι η αντίδραση στο metalaxyl ήταν διαφορετική ανάλογα με τον αγρό από τον οποίο έγινε η απομόνωση του μύκητα.

Το ίδιο έτος (1984) αναφέρθηκαν ανθεκτικά στελέχη του είδους *P. citricola* μετά από εφαρμογή UV ακτινοβολίας στα ζωοσπόρια του. Επίσης μετά από πρόκληση μετάλλαξης με UV ακτινοβολία σε μυκήλιο του είδους *P. capsici*, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο metalaxyl.

Ο Shew (1985) απομόνωσε από 7 διαφορετικούς αγρούς με καπνό το είδος *P. nicotianae* πριν να χρησιμοποιηθεί metalaxyl, μετά την πρώτη χρησιμοποίησή του το ίδιο έτος και μετά από 1, 2, 3 χρόνια συνεχούς εφαρμογής του metalaxyl. Παρατήρησε ότι με την προσθήκη των συγκεντρώσεων 0,1, 1, 10 ή 100 mg/l metalaxyl σε χυμό V-8 άγαρ, παρεμποδιζόταν η ανάπτυξη του μυκηλίου με την αύξηση της συγκέντρωσης. Σε χαμηλές όμως συγκεντρώσεις, η παρεμπό-

διση ήταν μικρότερη στις καλλιέργειες που απομονώθηκαν μετά από την έκθεσή τους στο μυκητοκτόνο. Η παρεμπόδιση έβαινε διαρκώς μειούμενη κάθε φορά που εφαρμοζόταν στον αγρό metalaxyl. Έτσι αποδεικνύεται ότι συνεχόμενη χρήση του metalaxyl στο έδαφος αυξάνει την επιλογή πληθυσμών λιγότερο ευαίσθητων στο metalaxyl.

Οι Ramachandran *et al.* (1988) αφού απομόνωσαν διάφορα είδη *Phytophthora* από διαφορετικούς ξενιστές, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι απομονώσεις του ίδιου είδους που προέρχονταν από διαφορετικούς ξενιστές, παρουσίαζαν διαφορετική ευαισθησία στο metalaxyl. Το ίδιο συνέβαινε και στις απομονώσεις που προέρχονταν από τον ίδιο ξενιστή. Σχεδόν όμως όλες οι απομονώσεις ήταν ευαίσθητες στο metalaxyl.

Οι Chauhan and Singh (1987) ανέφεραν την ύπαρξη μιας ειδικής μορφής (“*formae specialis*”) του είδους *P. drechsleri* που παρουσιάζει εκ φύσεως ανθεκτικότητα στο metalaxyl, το *P. drechsleri* f. sp. *cajani*.

Η αποτελεσματικότητα του metalaxyl (και oxadixyl) εναντίον του *P. cactorum* μειώθηκε ξαφνικά το 1985 σε αγρούς με φράουλες στο Βέλγιο. Εργαστηριακές μελέτες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών (Bal *et al.*, 1987).

Στην Γερμανία σε 2 αγρούς με φράουλες όπου χρησιμοποιήθηκε το μυκητοκτόνο metalaxyl τακτικά παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα στην ασθένεια “κόκκινη καρδιά” που προκαλούσε το είδος *P. fragariae*. Η ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών επιβεβαιώθηκε *in vitro* και με πειράματα εφαρμογής μολύσματος σε φυτά ξενιστές (φράουλες) (*in vivo*) (Seemuller and Sun, 1989).

Πειράματα με τα είδη *P. capsici* και *P. palmivora* έδειξαν ότι κάτω από εργαστηριακές συνθήκες μπορούν να επιλεγούν ισχυρά παθογόνα στελέχη με σταθερή συγχρόνως ανθεκτικότητα στο metalaxyl (Lucas *et al.*, 1990).

Οι Ferrin and Kabashima (1991) μελέτησαν την ευαισθησία 13 απομονώσεων του είδους *P. citricola* και 26 απομονώσεων του είδους *P. parasitica* που προέρχονταν από καλλωπιστικά φυτά στην Νότια Καλιφόρνια. Βρήκαν ότι 1 απομόνωση του *P. citricola* από φυτό αζαλέας και 2 απομονώσεις του *P. parasitica* από φυτό *catharantus*, ήταν ανθεκτικές στο metalaxyl. Τις ευαίσθητες απομονώσεις στο metalaxyl με βάση την μέση θανατηφόρο δόση (EC₅₀) στο είδος *P. citricola* τις διεχώρησαν σε 3 διακριτές ομάδες, ενώ στο είδος *P. parasitica* σε μία μόνο ανομοιογενή ομάδα.

Οι Ferrin and Rohde (1992), μετά από εφαρμογή metalaxyl κάθε 2 εβδομάδες για 10 συνολικά εβδομάδες σε μικρά φυτά *Catharantus roseus*,

μέτρησαν το πληθυσμό του είδους *P. parasitica* που αναπτυσσόταν στις ρίζες του φυτού. Βρήκαν ότι με αυτόν τον τρόπο αναπτύχθηκαν ανθεκτικά στελέχη στο είδος *P. parasitica*.

Οι Muino *et al.* (1990) μετά από *in vitro* δοκιμές σε RDA επιβεβαίωσαν την ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών του είδους *P. nicotianae* σε αγρούς καπνού στους οποίους είχε εφαρμοστεί metalaxyl κατά την διάρκεια των ετών 1983-84 σε επαρχία της Κούβας. Το διάστημα 1990-1992 έγινε απομόνωση και πάλι του μύκητα *P. nicotianae* από καπνοχώραφα στην περιοχή της Georgia και μετά από έρευνα βρέθηκαν στελέχη με διάφορα επίπεδα ανθεκτικότητας (είτε χαμηλά είτε υψηλά) (Csinos and Bertrand, 1994).

Τον Οκτώβρη του 1993 αναφέρθηκαν για πρώτη φορά ανθεκτικά στελέχη στο είδος *P. erythroseptica* που απομονώθηκαν από φυτά πατάτας στους Maine των Ηνωμένων Πολιτειών (Lambert and Salas, 1994). Στην συνέχεια αναφέρθηκαν στελέχη ανθεκτικά στο metalaxyl του ίδιου είδους στην Νέα Υόρκη (Goodwin and McGrath, 1995).

Οι Zhimou *et al.* (1997) ανέφεραν ότι το είδος *P. boehmeriae* αναπτύσσει πολύ εύκολα στελέχη ανθεκτικά στο metalaxyl. Παρατήρησαν ότι το επίπεδο ανθεκτικότητας ήταν 1800 φορές υψηλότερο σε σχέση με το επίπεδο των ευαίσθητων στελεχών. Παρόλα αυτά η ανθεκτικότητα του είδους αυτού στο metalaxyl δεν ήταν σταθερά κληρονομήσιμη.

Στην Αγγλία το 1997 αναφέρθηκαν στελέχη ανθεκτικά στο metalaxyl στο είδος *P. porri* (Locke *et al.*, 1997).

Σε θερμοκήπια πιπεριάς στην Νότια Ιταλία αναφέρθηκε ανθεκτικότητα στο metalaxyl απομονώσεων του είδους *P. capsici* (Pennisi *et al.*, 1998).

Τρόπος δράσης

Ο βιοχημικός τρόπος δράσης των φαινυλαμιδίων είναι σήμερα γνωστός σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό χάρη στις εργασίες του Davidse και των συνεργατών του. Γρήγορα διαπιστώθηκε ότι το metalaxyl παρεμποδίζει την ενσωμάτωση ραδιενεργού ουριδίνης σε RNA, ενώ η ενσωμάτωση προδρομών σε DNA, πρωτεΐνες και λίπη επηρεάζεται πολύ λιγότερο. Οποσδήποτε όμως το ποσοστό παρεμπόδισης της βιοσύνθεσης RNA κυμαίνεται από 40-80% που φανερώνει ότι μέρος μόνο της βιοσύνθεσης του RNA είναι ευαίσθητο στο μυκητοκτόνο. Πρά-

γματι, στα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουμε τρεις διαφορετικές RNA-πολυμεράσες: Την RNA-πολυμεράση I, που είναι υπεύθυνη για την βιοσύνθεση του ριβοσωμικού RNA (rRNA), την RNA-πολυμεράση II, που καταλύει τη βιοσύνθεση του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) και την RNA πολυμεράση III, που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του μεταφορέα RNA (tRNA). Μελετήθηκε η επίδραση του metalaxyl στην βιοσύνθεση των τριών μορφών RNA και διαπιστώθηκε ότι το μυκητοκτόνο παρεμποδίζει εκλεκτικά μόνο την βιοσύνθεση του rRNA, γεγονός, που εξηγεί το λόγο της μερικής παρεμπόδισης της ενσωμάτωσης της ραδιενεργού ουριδίνης σε RNA.

Τα προστατευτικά μυκητοκτόνα, όπως είναι το maneb, καταστρέφουν τα σπόρια που έχουν βλαστήσει, μέσα σε λίγες ώρες από την εφαρμογή τους, αλλά δεν έχουν καμία επίδραση πάνω στο μυκήλιο αφού αυτό εισχωρήσει στο φύλλο.

Το metalaxyl δεν παρεμποδίζει την βλάστηση σποριαγγείων ή την εγκύστωση των ζωοσπορίων τόσο αποτελεσματικά όσο παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μυκηλίου επειδή τα σπόρια από μόνα τους έχουν αρκετό ριβόσωμα για τον σχηματισμό του βλαστικού σωλήνα. Παρόλα αυτά όταν ο βλαστικός σωλήνας εισχωρήσει στα φύλλα τότε το metalaxyl απορροφάται από το μυκήλιο και προκαλεί δυσμορφία και παύση της αύξησης του μυκηλίου αυτού.



Επιδράσεις metalaxyl

Μορφολογικές επιδράσεις

Οι Chang and Ko (1992) (δουλεύοντας με τις 2 απομονώσεις P991 και P731) προκάλεσαν την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών στο metalaxyl στο είδος *P. parasitica*, με την προσθήκη στο θρεπτικό τους υπόστρωμα 25 mg/l metalaxyl για 6 εβδομάδες. Παρατήρησαν ότι κάθε απομόνωση παρήγαγε 6 διαφορετικούς τύπους αποικίας, συμπεριλαμβανομένου και του πατρικού τύπου, σε υπόστρωμα χωρίς metalaxyl. Ο ρυθμός ανάπτυξης και η μορφολογία της αποικίας των 6 μονοζωοσποριακών καλλιέργειών, που η κάθε μία αντιπροσώπευε έναν διαφορετικό τύπο αποικίας, δεν άλλαζε μορφή ακόμα και μετά από 5 συνεχόμενες υποκαλλιέργειες. Οι καλλιέργειες αυτές διέφεραν από τον πατρικό τύπο και στον ρυθμό ανάπτυξής τους.

Οι Ersek *et al.* (1994) προκάλεσαν με χημικά μεταλλαξιγόνα ανθεκτικά στο metalaxyl στελέχη στα είδη *P. capsici*, *P. parasitica* και *P. citrophthora*. Τα στε-

λέχη αυτά χαρακτηρίζονταν φαινοτυπικά από την μορφολογία της αποικίας, την παραγωγή ζωοσπορίων και την παθογόνο ικανότητα. Η μορφολογία της αποικίας και η παθογόνος δύναμη διέφεραν σημαντικά από τις ευαίσθητες απομονώσεις.

Άλλες επιδράσεις του metalaxyl, πάνω στην μορφολογία του μυκηλίου ή στο τρόπο βλάστησης των σποριαγγείων ή ζωοσπορίων, δεν έχουν αναφερθεί.

Μεταβολικές επιδράσεις

Πριν να γίνει γνωστός ο τρόπος δράσης του metalaxyl πολλοί ερευνητές είχαν παρατηρήσει την επίδραση του στην παραγωγή του RNA και DNA.

Οι Fisher and Hayes (1979, 1982) ανέφεραν ότι το metalaxyl είχε μικρή επίδραση στην αναπνοή, στην διαπερατότητα της μεμβράνης ή στον σχηματισμό των κυτταρικών τοιχωμάτων, ενώ το DNA, η σύνθεση πρωτίνων και περισσότερο από όλα το RNA, μειώθηκαν, οι ίδιοι ερευνητές σε άλλη εργασία τους (1984) παρατήρησαν ότι η ενσωμάτωση ραδιενεργού ουριδίνης και θυμιδίνης στο RNA και DNA μειώθηκε με την προσθήκη ημιθανατηφόρου δόσης metalaxyl. Δεν υπήρχαν αποδείξεις ότι το metalaxyl προκαλεί την δημιουργία νουκλεοτιδίων ή το μπλοκάρισμα της αντιγραφής του DNA.

Οι Coghe *et al.* (1984) ανέφεραν ότι με την έκθεση της καλλιέργειας σε ημιθανατηφόρα δόση metalaxyl, μαζί με την μείωση της ανάπτυξης του μυκηλίου, υπήρξε συγχρόνως αύξηση της περιεκτικότητας του μυκηλίου σε DNA και RNA. Παρόλα αυτά όταν το ποσό του DNA και RNA εκφράστηκε σε μg/συνολικό ξηρό μυκήλιο, η περιεκτικότητα σε DNA και RNA ήταν αρκετά μειωμένη σε σχέση με τις καλλιέργειες που δεν είχε προστεθεί μυκητοκτόνο.

Ο Davidse με την εργασία του το 1981 κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ίσως η ανάμιξη της σύνθεσης RNA να είναι ο τρόπος δράσης του metalaxyl. Αυτό το επιβεβαίωσε αργότερα (Davidse *et al.*, 1988) όταν βρήκε ότι η σύνθεση του RNA σε ευαίσθητες σειρές παρεμποδιζόταν κατά 80% στο είδος *P. megasperma* και κατά 40% στο είδος *P. infestans*. Η σύνθεση του RNA μετρήθηκε ως ενσωμάτωση ραδιενεργού ουριδίνης ($[^3\text{H}]$ uridine). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις η παρεμπόδιση παρέμενε στα ίδια επίπεδα υπονοώντας ότι μόνο μέρος της σύνθεσης του RNA παρεμποδιζόταν. Οι ανθεκτικές σειρές παρουσίαζαν κανονική σύνθεση του RNA. Μετά από αυτήν την εργασία έγινε γνωστός και ο τρόπος δράσης του metalaxyl.

Οι Oros and Komives (1991) ανέφεραν ότι τα είδη του γένους *Phytophthora*

περιέχουν GSH (γλουταθειόνη) σύστημα σύζευξης όπως φαίνεται από την ύπαρξη του ενεργού ενζύμου GST (γλουταθειόνη-s-τρανσφεράση) επιπλέον από το GSH. Τα βασικά επίπεδα του GSH και GST στο μυκήλιο των σειρών που μελετήθηκαν, δεν σχετίστηκαν ούτε με την ευαισθησία των μυκήτων στα φαινυλαμίδια, ούτε με την επίκτητη ανθεκτικότητα τους στο metalaxyl. Μυκήλιο σειράς που προερχόταν από καθαρή καλλιέργεια και εκτέθηκε σε ημιθανατηφόρα δόση metalaxyl, περιείχε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα GSH και GST σε σχέση με τις αμεταχειρίστες σειρές. Αυτή η αντίδραση ήταν ανεξάρτητη από το αν η σειρά ήταν ανθεκτική ή ευαίσθητη στο metalaxyl. Μετά από πειράματα κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ευαισθησία ή η ανθεκτικότητα των ειδών του γένους *Phytophthora* στα φαινυλαμίδια δεν ρυθμίζεται από την ικανότητα του συστήματος σύζευξης GSH.

Άλλες επιδράσεις

Η επίδραση του metalaxyl μπορεί να είναι άμεση, με διέγερση των μηχανισμών ανθεκτικότητας ή έμμεση, μειώνοντας την ανάπτυξη του μύκητα τόσο ώστε να επιτρέψει την λειτουργία των φυσικών αμυντικών μηχανισμών των φυτών ακόμη και σε ευαίσθητους ξενιστές (Crute, 1979; Cohen *et al.*, 1979).

Το metalaxyl αυξάνει αρκετά την περιεκτικότητα σε φυτοαλεξίνες των ποικιλιών των ξενιστών που βρίσκονται σε συμφωνία (Ward *et al.*, 1980).

Με διαβροχή του εδάφους με metalaxyl σε φυτά πιπεριάς, που είχαν μολυνθεί από το είδος *P. capsici*, άρχισε ο έλεγχος της ασθένειας με ταυτόχρονη αύξηση της φυτοαλεξίνης capsidial στα φυτά αυτά (Hwang and Sung, 1989)

Οι Hwang *et al.* (1990), μετά από εφαρμογή 5 mg/l metalaxyl σε φυτά πιπεριάς για αντιμετώπιση του είδους *P. capsici*, παρατήρησαν ότι το metalaxyl προκαλούσε συρρίκνωση των κυττάρων του μύκητα που βρίσκονταν μέσα σε μολυσμένους ιστούς του φυτού, τον διαχωρισμό της μεμβράνης του πρωτοπλάσματος από τα τοιχώματα της (μυκηλιακής) υφής, την καταστροφή της μεμβράνης του πρωτοπλάσματος και τον σχηματισμό μιας κύστης. Υπήρχε επίσης υλικό με πυκνή παρουσία ηλεκτρονίων μέσα στους ιστούς του φυτού, απέναντι από την πλευρά στην οποία τα κυτταρικά τοιχώματα του μύκητα ήταν σε στενή επαφή με τα κύτταρα του ξενιστή. Πρότειναν ότι αυτή η απόθεση πυκνότητας ηλεκτρονίων θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως ένας αμυντικός μηχανισμός των φυτών αφού αυτή η απόθεση δεν παρατηρήθηκε σε φυτά μολυσμένα στα οποία όμως δεν είχε εφαρμοστεί metalaxyl.

Η παραγωγή επίσης της φυτοαλεξίνης glyceollin αυξανόταν σε φυτά σόγιας στα οποία είχε εφαρμοστεί, με διαβροχή του εδάφους, metalaxyl (Lazarovits *et al.*, 1980; Borner *et al.*, 1983).

Η σημασία της διέγερσης φυτοαλεξινών από το metalaxyl είναι ενδιαφέρουσα αλλά δεν έχει ακόμα κατανοηθεί, και παρόλο που ένα τέτοιο έμμεσο φαινόμενο μπορεί να αυξήσει τον έλεγχο των ασθενειών, θα μπορούσε να είναι συμπτωματικό. Οι Grohmann and Hoffman (1989) δεν βρήκαν διαφορές σε ιστούς από φύλλα πατάτας μετά την εφαρμογή 10, 100 και 200 $\mu\text{g/ml}$ metalaxyl. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο αμυντικός μηχανισμός ήταν δευτερεύων. Τέτοιες εργασίες δείχνουν ότι ιστοί ζωντανών φυτών βρίσκονται σε συμφωνία με το metalaxyl παρά την μυκητοτοξικότητά του.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Οι Bruin and Edgington (1983) τόνισαν ότι το στοιχείο της διπλοειδίας που έχει το γένος *Phytophthora*, κάνει αυτούς τους ωομύκητες εξαιρετικά πολύπλευρους και με μεγάλη προσαρμοστικότητα. Αυτή η ικανότητα έχει αποδειχθεί από πολλούς ότι προκαλεί την ανάπτυξη ανθεκτικότητας πληθυσμών του γένους *Phytophthora* σε μυκητοκτόνα με ειδικό τρόπο δράσης, όπως το metalaxyl, και επίσης προκαλεί την ανάπτυξη νέων φυλών που να μπορούν να μολύνουν ξενιστές με ειδική ανθεκτικότητα στους συγκεκριμένους μύκητες (Davidse *et al.*, 1981).

Οι Chang and Ko (1990) μετά από πειράματα κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ανθεκτικότητα στο metalaxyl παρέχεται από ένα κυρίαρχο γονίδιο σε ετεροζύγωτη κατάσταση. Αυτό που έκαναν ήταν να διασταυρώσουν ένα στέλεχος που μετέφερε σε ομοζύγωτη κατάσταση το κυρίαρχο γονίδιο για ανθεκτικότητα στο metalaxyl (M^1A^1) και ένα στέλεχος αγρίου τύπου A^2 , παίρνοντας απογόνους ανθεκτικούς στο metalaxyl οι οποίοι μετέφεραν σε ετεροζυγωτή κατάσταση το κυρίαρχο γονίδιο.

Οι Bhat *et al.* (1993) επίσης ανέφεραν ότι η κληρονομία της ανθεκτικότητας στο metalaxyl στο ομοθαλλικό είδος *P. sojae* οφείλεται σε ημικυριαρχία.

Οι Zhimou *et al.* (1997) αφού μελέτησαν τον τρόπο κληρονομίας της ανθεκτικότητας στο είδος *P. boehmeriae* βρήκαν ότι αυτή δεν ήταν σταθερή και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ίσως οι μεταλλάξεις για την ανάπτυξη

ανθεκτικότητας στο metalaxyl να συμβαίνουν στο μιτοχονδριακό DNA στο κυτόπλασμα. Ο πληθυσμός του *P. boehmeriae* προερχόταν από ζωοσπόρια.

Οι Herong *et al.* (1999) όμως ανέφεραν ότι η ανθεκτικότητα στο metalaxyl και cytochanil μπορεί να κληρονομείται σταθερά από πληθυσμό που προέρχεται από ζωοσπόρια και ωοσπόρια.

Αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα

Όταν η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε ένα μυκητοκτόνο συμπίπτει με την αυξημένη ευαισθησία σε μια άλλη χημική ένωση, το φαινόμενο αυτό μπορεί να είναι μια περίπτωση αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας.

Η πιο κοινή στρατηγική για αποφυγή της εκδήλωσης ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα στην πράξη, είναι η απαγόρευση της συνεχούς χρήσης ενός σκευάσματος και να ενδείκνυται η χρησιμοποίηση του σε εναλλαγή με άλλους τύπους μυκητοκτόνων. Στα μυκητοκτόνα που είναι μίγμα δύο χημικών ουσιών, δεν πρέπει να υπάρχει θετική διασταυρωτή ικανότητα μεταξύ των ουσιών. Η αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα αυξάνει όταν ο ίδιος γενετικός παράγοντας παρέχει συγχρόνως ανθεκτικότητα σε μια τοξική ουσία και αυξάνει την ευαισθησία σε μια άλλη. Αυτό το φαινόμενο, μπορεί να συμβεί σε μεταλλάξεις στο εργαστήριο ή σε στελέχη στον αγρό, και αφορά τα μυκητοκτόνα σκευάσματα: α) που έχουν την ίδια ευαίσθητη θέση και παρόμοια χημική δομή, β) που εμποδίζουν την ίδια μεταβολική διαδικασία αλλά σε διαφορετικές θέσεις, γ) που έχουν διαφορετικούς τρόπους δράσης (Leroux, 1992).

Πολλές εργασίες έδειξαν την ύπαρξη αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ του metalaxyl και του fosetyl-Al καθώς επίσης και την ύπαρξη διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των μυκητοκτόνων της ομάδας των φαινυλαμιδίων. Οι Joseph and Coffey (1984) σε *in vivo* πειράματα βρήκαν ανθεκτικότητα στο metalaxyl η οποία σχετιζόταν με διασταυρωτή ανθεκτικότητα με τα μυκητοκτόνα της ομάδας των φαινυλαμιδίων: benalaxyl, RE 26745, cyprofuram και oxadixyl. Αυτά τα στελέχη όμως παρέμειναν ευαίσθητα στο χημικά διαφορετικό fosetyl-Al. Επίσης οι Romano and Garibaldi (1984) βρήκαν διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ του metalaxyl και των benalaxyl, furalaxyl, ofurace και oxadixyl. Οι Vigo *et al.* (1986) αφού προκάλεσαν την δημιουργία ανθεκτικών

στελεχών με UV ακτινοβολία, ανέφεραν ότι αυτά παρουσίαζαν ανθεκτικότητα σε όλα τα φαινυλαμίδια.

Οι Bower and Coffey (1985) ανέφεραν την ύπαρξη αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ του metalaxyl (και γενικά των ακυλαλανίνων) και του fosetyl-Al, fosetyl-Na και H_3PO_3 . Τα στελέχη που ήταν ανθεκτικά στο metalaxyl ήταν ευαίσθητα στο fosetyl-Al και H_3PO_3 , ενώ τα στελέχη που ήταν ανθεκτικά στο fosetyl-Al και H_3PO_3 ήταν ευαίσθητα στο metalaxyl. Τα ανθεκτικά στελέχη προέκυψαν με την έκθεση ζωοσπορίων του είδους *P. capsici* στην χημική μεταλλαξιγόνο ουσία MNNG (N-methyl-N-nitrosoguanidine).

Οι Utkhede and Gusta (1988) με έκθεση σε σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση metalaxyl δημιούργησαν ανθεκτικά στελέχη του είδους *P. cactorum* τα οποία ήταν ευαίσθητα στο fosetyl-Al, mancozeb και metalaxyl+mancozeb στα ίδια επίπεδα όπως και τα ευαίσθητα στελέχη. Επίσης ανέφεραν ότι υπήρχε σημαντική διαφορά στα επίπεδα ανθεκτικότητας στο metalaxyl μεταξύ των αγρών από όπου απομονώθηκε το παθογόνο.

Σε μια παλαιότερη εργασία, μία ανθεκτική στο metalaxyl σειρά έδειξε διασταυρωτή ανθεκτικότητα με το metolachlor και το propachlor αλλά όχι με το dimethachlor και alachlor (Devidse *et al.*, 1984).

Οι Yuanchao *et al.* (1997) ανέφεραν την ύπαρξη αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των μυκητοκτόνων metalaxyl και cytochanil, ενώ οι Leroux and Gredt (1981) και Chabane *et al.* (1996) μελετώντας ανθεκτικά στελέχη του είδους *P. parasitica* παρατήρησαν ότι κανένα στέλεχος δεν παρουσίαζε διασταυρωτή ανθεκτικότητα με την στρεπτομυκίνη και ότι τα στελέχη ήταν ανθεκτικά μόνο στο metalaxyl ή μόνο στην στρεπτομυκίνη αλλά όχι συγχρόνως και στις δύο ουσίες.

Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι από τα πρώτα χρόνια χρησιμοποίησης του metalaxyl, είχε αναφερθεί στο εργαστήριο η ύπαρξη διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ metalaxyl και milfuram στο είδος *P. cactorum*.

Προσαρμοστικότητα ανθεκτικών στελεχών

Προσαρμοστικότητα είναι η ικανότητα ενός γενότυπου να αναπαραχθεί ή επιβιώσει, περισσότερο ή λιγότερο επιτυχώς, από κάποιον άλλο γενότυπο, κάτω από τις ίδιες δεδομένες συνθήκες.

Οι Joseph and Coffey (1984) αφού προκάλεσαν με UV ακτινοβολία την δημιουργία ανθεκτικών στελεχών του είδους *P. citricola*, μελέτησαν την σταθερότητα της ανθεκτικότητας στο metalaxyl αυτών των στελεχών. Καλλιέργησαν για πάνω από 20 γενιές μονοζωοσποριακές απομονώσεις από τις ανθεκτικές σειρές, απουσία μυκητοκτόνου, και βρήκαν ότι κάποιες από τις απομονώσεις ήταν εξαιρετικά σταθερές *in vitro* και *in vivo*.

Μετά από απομόνωση ανθεκτικών στελεχών του είδους *P. nicotianae* από εσπεριδοειδή παρατηρήθηκε ότι τα ανθεκτικά στελέχη αναπτύσσονταν καλά παρουσία 100 mg/l metalaxyl, ενώ τα ευαίσθητα δεν αναπτύσσονταν ούτε σε συγκέντρωση 1 mg/l. Αποδείχθηκε ότι ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού παρέμενε ανθεκτικό στο metalaxyl ακόμη και μετά από 2,5 χρόνια από την τελευταία χρησιμοποίηση του σκευάσματος αυτού. Παρατηρήθηκε επίσης ότι παρατεταμένη χρήση του metalaxyl σε φυτώριο εσπεριδοειδών μείωσε την μελλοντική χρησιμότητα του προϊόντος σε δενδροκομεία με εσπεριδοειδή στην Φλώρινα (Timmer *et al.*, 1998).

1. Φυσιολογικές ιδιότητες

Το metalaxyl, ελέγχει τα ευαίσθητα στελέχη των μυκήτων του γένους *Phytophthora* σε όλα τα στάδια του βιολογικού τους κύκλου που χρειάζονται για να συμπληρωθεί ο κύκλος της ασθένειας: τον σχηματισμό σποριαγγείων από χλαμυδοσπόρια, την ανάπτυξη μυκηλίου μέσα στις ρίζες, τον σχηματισμό σποριαγγείου στις ρίζες και χλαμυδοσπορίων στις μολυσμένες πλέον ρίζες (Staub and Young, 1980). Στα ανθεκτικά όμως στελέχη ο σχηματισμός και βλάστηση των σπορίων γίνεται χωρίς παρεμπόδιση ή με μικρά ποσοστά παρεμπόδισης ανάλογα το επίπεδο ανθεκτικότητας που έχει αναπτυχθεί και την συγκέντρωση metalaxyl που χρησιμοποιείται. Αλλά και στα ευαίσθητα στελέχη μετά από εργασία των Farih *et al.* (1981) έγινε γνωστό ότι η βλάστηση των χλαμυδοσπορίων είναι πιο ευαίσθητη στο metalaxyl από ότι η βλάστηση των ζωοσπορίων, ενώ η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα είναι το ίδιο ευαίσθητη και στα δύο είδη σπορίων.

Μετά από πειράματα πάνω στα είδη *P. cinnamomi* και *P. citricola* παρατηρήθηκε ότι ο σχηματισμός χλαμυδοσπορίων στο είδος *P. cinnamomi* παρεμποδίστηκε περισσότερο από 60% σε συγκέντρωση 0,1 mg/l metalaxyl και ολοκληρωτικά σε 0,25 mg/l. Η βλάστηση των χλαμυδοσπορίων ήταν λιγότερο ευαίσθητη σε σχέση με την παραγωγή τους, με 70% παρεμπόδιση σε 10 mg/l,

ενώ η παραγωγή των σποριαγγείων ήταν εξαιρετικά ευαίσθητη στο metalaxyl. Οι απομονώσεις του είδους *P. citricola* ήταν γενικά λιγότερο ευαίσθητες από του είδους *P. cinnamomi* (Coffey *et al.*, 1984).

Οι Ferrin and Wadsworth (1992) ανέφεραν την επίδραση του metalaxyl σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη του είδους *P. parasitica*, ως προς την αύξηση και την σπορίωση τους *in vitro*. Παρατήρησαν ότι η παραγωγή των σποριαγγείων στις ανθεκτικές απομονώσεις δεν επηρεαζόταν με 100 mg/l metalaxyl, ενώ στις ευαίσθητες παρεμποδιζόταν ακόμη και με συγκέντρωση 1 μg/ml. Η παραγωγή χλαμυδοσπορίων, απουσία μυκητοκτόνου, διέφερε μεταξύ των ανθεκτικών στελεχών. Τα στελέχη που παρουσίαζαν μεγάλη ανθεκτικότητα (μέχρι την συγκέντρωση των 100 mg/l δεν εμφάνιζαν παρεμπόδιση) είχαν μικρότερη παραγωγή χλαμυδοσπορίων σε σχέση με την παραγωγή των ευαίσθητων στελεχών απουσία metalaxyl, ενώ τα στελέχη που είχαν μικρότερα επίπεδα ανθεκτικότητας (σε 100 mg/l εμφάνιζαν παρεμπόδιση στην παραγωγή χλαμυδοσπορίων) είχαν μεγαλύτερη παραγωγή χλαμυδοσπορίων σε σχέση με την παραγωγή των ευαίσθητων, απουσία metalaxyl. Επίσης η ανάπτυξη του μυκηλίου παρεμποδιζόταν στα 1000 μg/ml αλλά όχι στα 100 μg/ml.

2. Παθογόνος δύναμη

Παθογόνος δύναμη είναι η σχετική ικανότητα ενός παθογόνου οργανισμού να προκαλεί ασθένεια, είναι δηλαδή ο βαθμός της παθογόνου ικανότητας του μύκητα. Πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να εκτιμήσουν την παθογόνο ικανότητα ανθεκτικών στο metalaxyl στελεχών διαφόρων ειδών του γένους *Phytophthora* μεταφέροντας μόλυσμα από τα στελέχη αυτά σε φυτά-ξενιστές. Με τον τρόπο αυτό οι Romano and Garibaldi (1984) παρατήρησαν ότι τα ανθεκτικά στελέχη ήταν το ίδιο τοξικά στα φυτά όπως και τα ευαίσθητα και γενικά η ανάπτυξη και σποριοποίηση τους ήταν η ίδια.

Οι Serrhini *et al.* (1985) με επιτυχή υποκαλλιέργεια απομονώσεων του είδους *P. citrophthora* σε V₈/CaCO₃ άγαρ με συγκέντρωση 10 mg/l metalaxyl πήραν σειρές περισσότερο ανθεκτικές από τους γονείς. Η παθογένεια των ανθεκτικών αυτών στελεχών στα εσπεριδοειδή και η ανάπτυξη της ασθένειας, απουσία μυκητοκτόνου, ήταν μειωμένη. Όταν όμως τα ανθεκτικά στελέχη προέκυψαν από έκθεση των ζωοσπορίων, σε 30 mg/l MNNG (N-μεθυλ-N'-νιτροσογουανιδίνη) για 10 λεπτά, τότε οι ανθεκτικές σειρές αναπτύσσονταν το ίδιο καλά και σε υπόστρωμα χωρίς metalaxyl και είχαν την ίδια ικανότητα με τους γονείς να προκαλούν ασθένεια στα φύλλα των εσπεριδοειδών.

Επίσης έχει αναφερθεί ότι ανθεκτικά στελέχη του είδους *P. parasitica* που προέκυψαν με UV ακτινοβολία είχαν μεγαλύτερη παθογόνο δύναμη σε σχέση με τις ευαίσθητες απομονώσεις (Vigo *et al.*, 1986). Σε αντίθεση, οι Abdellaoui Maane *et al.* (1988) ανέφεραν ότι τα ανθεκτικά στελέχη του είδους *P. capsici*, που προέκυψαν επίσης με UV ακτινοβολία, παρουσίαζαν, σε φυτά πιπεριάς, παθογένεια, είτε παρόμοια με αυτήν των στελεχών του αγρίου τύπου είτε αρκετά μειωμένη.

Οι Lambou and Paxton (1992), μετά από 6 μεταφυτεύσεις σε cornmeal agar με συγκέντρωση 0,1 mg/l metalaxyl, κατάφεραν να μειώσουν την ευαισθησία στο metalaxyl απομονώσεων του είδους *P. megasperma* f. sp. *glycinea* και συγχρόνως να αυξήσουν την παθογόνο δύναμη σε φυτάρια σόγιας στα οποία είχε εφαρμοστεί metalaxyl. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι έκθεση σε metalaxyl στη σαπροφυτική ανάπτυξη μπορεί να προκαλέσει την μεταβολή της παθογόνου δύναμης και τη μείωση της ευαισθησίας στο μυκητοκτόνο, στα φυτά στα οποία χρησιμοποιήθηκε το metalaxyl.

Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι στους ανθεκτικούς στο metalaxyl πληθυσμούς του είδους *P. infestans* που αναπτύχθηκαν στο Ισραήλ παρατηρήθηκε ότι η ικανότητα να μολύνουν, να παράγουν σποριάγγεια και να αποικίζουν τους ιστούς του ξενιστή ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με την αντίστοιχη ικανότητα του ευαίσθητου πληθυσμού του είδους (Kadish and Cohen, 1989).

Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι η παθογόνος δύναμη των ανθεκτικών στελεχών μπορεί να μειωθεί, να αυξηθεί ή να παραμείνει στα ίδια επίπεδα παθογόνου δύναμης των ευαίσθητων στελεχών, χωρίς όμως να μπορούν να καθοριστούν οι παράγοντες που προκαλούν τις μεταβολές αυτές.

Ανθεκτικότητα στο mefenoxam

Το mefenoxam, είναι το πιο ενεργό εναντιομερές που περιέχεται στο ρακεμικό μείγμα του μυκητοκτόνου metalaxyl και το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως δραστική ουσία για την καταπολέμηση της ασθένειας που προκαλεί το είδος *P. capsici*, σε φυτά πιπεριάς και κολοκυθιάς. Το 1997 στη Βόρεια Καρολίνα αναφέρθηκε για πρώτη φορά ανθεκτικότητα στο mefenoxam σε φυτά πιπεριάς που είχαν ψεκάσει πολλές φορές με το σκεύασμα Ridomil Gold (mefenoxam).

Η ανθεκτικότητα ελέγχθηκε *in vitro* με συγκεντρώσεις 5 και 100 ppm mefenoxam. Οι απομονώσεις χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες:

- α) σε ευαίσθητες, αν η ανάπτυξη του μυκηλίου ήταν μικρότερη από 40% σε σύγκριση με τον μάρτυρα σε συγκέντρωση 5 ppm, και
- β) σε ανθεκτικές, αν η ανάπτυξη ήταν μεγαλύτερη από 40% σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μάρτυρα στα 100 ppm mefenoxam.

Από τις 161 απομονώσεις που δοκιμάστηκαν οι 92 βρέθηκαν ανθεκτικές. Ανθεκτικές απομονώσεις βρέθηκαν και για τους δύο συζευκτικούς τύπους A₁ και A₂ του είδους *P. capsici*, το οποίο σημαίνει ότι οι ανθεκτικές απομονώσεις μπορεί να διατηρηθούν στο έδαφος για τα επόμενα χρόνια. Οι απομονώσεις που ήταν ανθεκτικές στο mefenoxam ήταν επίσης ανθεκτικές στο metalaxyl. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι έχει γίνει μια δραματική μετατόπιση του πληθυσμού του *P. capsici* προς την ανθεκτικότητα στην νέα ουσία του metalaxyl, στο mefenoxam, σε αγρούς με φυτά πιπεριάς μέσα σε μία περίοδο μόνο 3 χρόνων (Parra and Ristaino, 1998).

ΜΕΡΟΣ Β΄
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της παρούσης πτυχιακής διατριβής είναι τα στερεά υποστρώματα “Potato Dextrose Agar” (PDA) και “Εκλεκτικό υλικό” και τα υγρά υποστρώματα “Soil Extract”, “V_g” και “Pea Broth” (PB).

Για την παρασκευή 1 l θρεπτικού υποστρώματος “Potato Dextrose Agar” (PDA) ακολουθείται η εξής διαδικασία: Τοποθετούνται 40 g έτοιμης αφυδατωμένης σκόνης του εμπορικού οίκου Amersham σε κωνική φιάλη χωρητικότητας 2 l και συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό έως το 1 l. Η αφυδατωμένη σκόνη πριν να τοποθετηθεί στην κωνική φιάλη ανακινείται με λίγο νερό έτσι ώστε να δημιουργηθεί ένα εναιώρημα. Η κωνική φιάλη θερμαίνεται και γίνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα ανάδευση υπό βρασμό. Αφού τοποθετηθεί το υλικό σε φιάλες (medicine bottles) και δοκιμαστικούς σωλήνες, ακολουθεί αποστείρωσή του σε Autoclave στους 121 °C για 15 λεπτά.

Το “Εκλεκτικό υλικό” είναι ένα ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα για φυκομύκητες, το οποίο περιέχει αντιβιοτικά που έχουν την δυνατότητα να εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων που τυχόν υπάρχουν στις απομονώσεις των φυκομυκήτων, χωρίς όμως να επηρεάζουν την ανάπτυξή τους. Παρασκευάζεται από αποστειρωμένο υλικό PDA και αντιβιοτικά κατά τον εξής τρόπο: Ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας αντιβιοτικά σε ποσότητες 10 mg mycostatine, 5

mg terramycin w/polymyxin και 6 mg penicillin. Τα αντιβιοτικά αυτά προστίθενται σε ένα φυαλίδιο που περιέχει 100 ml ρευστοποιημένο υλικό PDA, όταν το υλικό έχει θερμοκρασία πλησίον του σημείου πήξεως και αναμιγνύονται καλά δια αναταραχής του φυαλιδίου (με προσοχή όμως για να μην σχηματιστούν φυσαλίδες οι οποίες θα στερεοποιηθούν στην επιφάνεια των τρυβλίων). Στην συνέχεια απλώνεται το υλικό αυτό υπό ασηπτικές συνθήκες (σε θάλαμο νηματοειδούς ροής αέρα - Laminar air Flow transfer hood) σε τρυβλία και αφήνεται να στερεοποιηθεί.

Για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού **“Pea Broth” (PB)**, 140 g αρακά πολτοποιήθηκαν μέσα σε 1 l νερό. Επειδή η πολτοποίηση ήταν ατελής δεν μπορούσε να γίνει διήθηση του διαλύματος. Έτσι έγινε φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 4.000 στροφές για 20 min, και στη συνέχεια αποστειρώθηκε στους 121°C για 20 επίσης λεπτά.

Το **“Soil Extract”** παρασκευάζεται τοποθετώντας 10 g εδάφους σε 1 l νερό. Το διάλυμα παραμένει 24 ώρες σκεπασμένο και στην συνέχεια διηθείται και αποστειρώνεται.

Για την παρασκευή του υποστρώματος **“V₈”** ακολουθείται η εξής διαδικασία: Ζυγίζεται 1,5 g ανθρακικού ασβεστίου (CaCO₃) και προστίθεται σε κωνική φιάλη (χωρητικότητας 1 l) που περιέχει 700 ml απεσταγμένο νερό. Γίνεται φυγοκέντρηση 300 ml χυμού V₈ στις 4.000 στροφές για 20 λεπτά για απομάκρυνση των διαλυτών στερεών. Στο κάτω μέρος παραμένει ίζημα, ενώ γίνεται συλλογή μόνο του διαλύματος (υπερκείμενο) το οποίο προστίθεται στην φιάλη με το νερό και το CaCO₃. Ο συνολικός όγκος είναι 1 l. Το περιεχόμενο θερμαίνεται υπό ανάδευση για να λιώσει το ανθρακικό ασβέστιο. Τέλος αποστειρώνεται στους 121°C για 20 λεπτά.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1) παρατίθενται τα συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων, των οποίων περιγράφηκε η παρασκευή.

Πίνακας 1

Είδη και συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων

Υπόστρωμα	Υλικά	Ποσότητες
“Potato Dextrose Agar” (PDA)	Αφυδατωμένη σκόνη	40 g
	Νερό	1 l
“Εκλεκτικό υλικό”	PDA	100ml
	Mycostatine	10 mg
	Terramycin/Polymyxin	5 mg
	Penicillin	6 mg
“Pea Broth” (PB)	Αρακάς	140 g
	Νερό	1 l
“Soil Extract” (SE)	Έδαφος	10 g
	Νερό	1 l
“V ₈ ”	Χυμό V ₈	300 ml
	CaCO ₃	1,5 g
	Νερό	700 ml

Απομόνωση μύκητα του γένους *Phytophthora*

Την άνοιξη του 2001 από φυτά διεφφενμπάχιας (*Dieffenbachia maculata*), που έφεραν συμπτώματα μαλακής σήψης στη βάση του στελέχους, απομονώθηκε μύκητας του γένους *Phytophthora*. Η συλλογή των προσβεβλημένων φυτών διεφφενμπάχιας, έγινε από θερμοκήπιο που βρίσκεται στην περιοχή του Αλμυρού, στο οποίο την περίοδο 1989-2001 εφαρμόζονταν κατά τις μεταφυτεύσεις σε 3μηνα διαστήματα, ριζοπότισμα με το μίγμα meta-laxyl 7,5% + mancozeb 56% στην συγκέντρωση σκευάσματος 1 g/l.

Για την επιτυχή απομόνωση του μύκητα ακολουθείται η εξής διαδικασία. Ξεπλένονται τα προσβεβλημένα φυτά στο σημείο της προσβολής με τρεχούμενο νερό βρύσης επί 2-3 ώρες και στην συνέχεια στεγνώνονται καλά με αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί, πριν την αφαίρεση των τεμαχίων και την τοπο-

θέτηση τους στο θρεπτικό υπόστρωμα. Με τον τρόπο αυτό έχει διαπιστωθεί ότι απομακρύνονται τα βακτήρια ή τα σπόρια άλλων μυκήτων και ταυτόχρονα το παθογόνο δραστηριοποιείται καλύτερα και παράγει ευκολότερα σποριάγγεια.

Από τους προσβεβλημένους ιστούς αφού αφαιρεθούν οι επιφανειακοί ιστοί, κόβονται με νυστέρι ασηπτικά μικρά τεμάχια, τα οποία τοποθετούνται απ' ευθείας σε σωλήνες που περιέχουν το υλικό "Potato Dextrose Agar". Σε κάθε τομή με το νυστέρι, γίνεται αποστείρωση του με εμβάπτιση σε αιθυλική αλκοόλη και στην συνέχεια απολύμανση του σε φλόγα λύχνου Bunsen. Το γένος *Phytophthora* είναι εξαιρετικά δύσκολο να απομονωθεί από νεκρούς ιστούς. Για τον λόγο αυτό τα τεμαχίδια των ιστών που χρησιμοποιούνται πρέπει να προέρχονται από το όριο της προσβολής, όπου αυτή βρίσκεται σε εξέλιξη και να συμπεριλαμβάνουν προσβεβλημένο και υγιή ιστό.

Οι απομονώσεις του μύκητα πραγματοποιήθηκαν με τον τρόπο που περιγράφηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Από τις 17 προσπάθειες που έγιναν για απομόνωση του μύκητα, οι 5 απέτυχαν (είχαν επιμολύνσεις από άλλα παθογόνα) ενώ οι 12 ήταν επιτυχείς. Μετά την αρχική απομόνωση του μύκητα από προσβεβλημένα φυτά, έγινε υποκαλλιέργεια του, κάτω από στείρες συνθήκες σε δοκιμαστικούς σωλήνες, έτσι ώστε να ελαττωθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης της καλλιέργειας από μύκητες διαφορετικού γένους. Στην συνέχεια έγινε μεταφορά μυκηλίου από τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε τρυβλία που περιείχαν "εκλεκτικό υλικό", ώστε να απαλλαγούν από βακτήρια που υπήρχαν στις καλλιέργειες. Παρατηρήθηκε όμως ότι ο μύκητας δεν αναπτύχθηκε στο υλικό αυτό και ότι υπήρχαν πολλές επιμολύνσεις. Επειδή υπήρχε η περίπτωση ο μύκητας να μην αναπτυσσόταν εξ' αιτίας των αντιβιοτικών, επαναλήφθηκε η υποκαλλιέργεια του, αυτή τη φορά σε τρυβλία που περιείχαν μόνο το θρεπτικό υπόστρωμα "Potato Dextrose Agar".

Προσδιορισμός άριστης-μέγιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης

Σε τρυβλία που περιείχαν υπόστρωμα "Potato Dextrose Agar" μεταφέρθηκαν μυκηλιακοί δίσκοι από 6 ημερών καλλιέργεια. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικούς θαλάμους με θερμοκρασίες 25 °C, 27 °C, 29 °C,

32 °C και 35 °C. Χρησιμοποιήθηκαν 8 απομονώσεις από 3 επαναλήψεις η κάθε απομόνωση.

Οι μυκηλιακοί δίσκοι που χρησιμοποιήθηκαν, διαμέτρου 5 mm, προέρχονταν από την περιφέρεια της κυκλικά αναπτυσσόμενης καλλιέργειας και διαχωρίστηκαν από αυτήν με διακορευτή (car borer). Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν στην περιφέρεια των τρυβλίων (3 μυκηλιακοί δίσκοι ανά τρυβλίο, σε κορυφές ισόπλευρου τριγώνου). Οι μυκηλιακοί δίσκοι εφάπτονταν στα τοιχώματα των τρυβλίων.

Μετά από 2, 5 και 7 ημέρες επώασης στις θερμοκρασίες που αναφέρθηκαν μετρήθηκε η ακτίνα ανάπτυξης της αποικίας με την βοήθεια ενός χάρακα.

Ανάπτυξη μυκηλίου με προσθήκη metalaxyl

Πείραμα 1ο

Για τον έλεγχο της ανάπτυξης μυκηλίου σε υπόστρωμα “Potato Dextrose Agar” που περιείχε διάφορες συγκεντρώσεις metalaxyl ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Μυκηλιακοί δίσκοι 6 απομονώσεων του μύκητα *Phytophthora*, από καλλιέργειες 7 ημερών, μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα “Potato Dextrose Agar” εμπλουτισμένο με Ridomil (metalaxyl), σε συγκεντρώσεις δραστικής ουσίας 0, 0,5, 1, 10, 50, 100, 250, 500 και 1000 mg/l. Το Ridomil έχει περιεκτικότητα σε δραστική ουσία 25%.

Για την δημιουργία των παραπάνω συγκεντρώσεων, έγιναν οι αρχικές διαλύσεις του metalaxyl με συγκέντρωση 10.000 mg/l και 1000 mg/l. Το metalaxyl είναι υδατοδιαλυτό και γι’ αυτό χρησιμοποιήθηκε νερό ως διαλύτης. Για την δημιουργία της συγκέντρωσης των 10.000 mg/l metalaxyl διαλύθηκαν 4000 mg (4g) Ridomil σε 100 ml νερό. Για το stock δ/μα της συγκέντρωσης των 1.000 mg/l metalaxyl, αραιώθηκαν 10 ml, από το δ/μα των 10.000 mg/l, σε 90 ml με νερό σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Ο τελικός όγκος ήταν πάλι 100 ml.

Αφού γίνει ρευστοποίηση του υλικού που βρίσκεται σε φιάλες με περιεκτικότητα 100 ml υλικού η κάθε φιάλη, για να παραχθούν οι προαναφερόμενες τελικές συγκεντρώσεις λίγο πριν το άπλωμα του υλικού στα τρυβλία, προστίθενται από τις αρχικές συγκεντρώσεις οι εξής ποσότητες:

Από την αρχική των 10.000 mg/l metalaxyl προστίθενται:

- 5 ml σε 100 ml υλικού ⇒ συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για τα 500 mg/l
- 2,5 ml σε 100 ml υλικού ⇒ συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για τα 250 mg/l
- 1 ml σε 100 ml υλικού ⇒ συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για τα 100 mg/l

Από την αρχική των 1.000 mg/l metalaxyl προστίθενται:

- 5 ml σε 100 ml υλικού ⇒ συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για τα 50 mg/l
- 1 ml σε 100 ml υλικού ⇒ συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για τα 10 mg/l

Από τη συγκέντρωση των 100 mg/l metalaxyl που προέκυψε προστίθενται:

- 1 ml σε 100 ml υλικού ⇒ συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για τα 1 mg/l
- 0,5 ml σε 100 ml υλικού ⇒ συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για τα 0,5 mg/l

Γενικά ο όγκος διαλύματος φαρμάκου, μόνο διαλύτη ή συνδυασμός διαλύματος φαρμάκου και διαλύτη, στο υλικό πρέπει να είναι πάντοτε ο ίδιος και ίσος στην προκειμένη περίπτωση με 5%. Επειδή όμως ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι το νερό, δεν είναι αναγκαία η προσθήκη του στο υλικό για την επίτευξη ίσων όγκων.

Μία φιάλη με περιεκτικότητα 100 ml υλικού, απλώθηκε σε 6 τρυβλία με αποτέλεσμα το κάθε τρυβλίο να περιείχε περίπου 16 ml υλικού.

Στα έτοιμα τρυβλία με το υλικό, τοποθετήθηκαν 3 μυκηλιακοί δίσκοι ανά τρυβλίο σε κορυφές ισόπλευρου τριγώνου, έχοντας έτσι 3 επαναλήψεις σε κάθε συγκέντρωση και απομόνωση. Οι μυκηλιακοί δίσκοι εφάπτονταν στα τοιχώματα των τρυβλίων.

Μετά την μεταφύτευση τους τα τρυβλία επώαστηκαν σε θάλαμο ο οποίος είχε ρυθμιστεί στους 27°C (βρέθηκε ότι είναι η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης). Μετά από επώαση 2, 5 και 7 ημερών στο σκοτάδι, μετρήθηκε η ακτίνα ανάπτυξης της αποικίας των απομονώσεων με τη βοήθεια ενός χάρακα.

Πείραμα 2ο

Έγινε επανάληψη του πειράματος κατά το οποίο μετρήθηκε η ακτίνα ανάπτυξης του μυκηλίου με προσθήκη metalaxyl. Αυτή τη φορά όμως οι συγκεντρώσεις metalaxyl που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μικρότερες. Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι οι 0,01, 0,1, 0,5 και 1 mg/l. Επίσης τα stock διαλύματα χρειάστηκε να παρασκευαστούν ξανά και για πιο επιτυχή διάλυση

του metalaxyl χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης DMSO. Οι αραιώσεις που χρειάζεται να γίνουν για την επίτευξη των παραπάνω συγκεντρώσεων είναι οι εξής:

Από την συγκέντρωση των 100 mg/l metalaxyl που δημιουργήθηκε προστίθενται:

1 ml σε 100 ml υλικού \Rightarrow συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για το 1 mg/l

0,5 ml σε 100 ml υλικού \Rightarrow συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για τα 0,5 mg/l

Από την συγκέντρωση των 1000 mg/l metalaxyl προστίθεται:

1 ml σε 99 ml DMSO \Rightarrow διάλυμα συγκέντρωσης 10 mg/l

Από την συγκέντρωση των 10 mg/l metalaxyl που προέκυψε προστίθεται:

1 ml σε 100 ml υλικού \Rightarrow συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για τα 0,1 mg/l

Από την συγκέντρωση των 1 mg/l metalaxyl προστίθεται:

1 ml σε 100 ml υλικού \Rightarrow συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για το 0,01 mg/l

Επειδή αυτή τη φορά διαλύτης είναι το DMSO θα πρέπει να προστεθεί στο μάρτυρα 1 ml DMSO, και στη φιάλη με συγκέντρωση 0,5 mg/l να προστεθεί 0,5 ml DMSO έτσι ώστε ο όγκος τους στο υλικό να είναι πάντοτε 1%. Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και οι 12 απομονώσεις με 3 επαναλήψεις στην κάθε απομόνωση. Η μέτρηση της ακτίνας ανάπτυξη του μυκηλίου έγινε μετά από 3 ημέρες επώαση στους 27 °C με τη βοήθεια ενός χάρακα.

Επίδραση του metalaxyl στον σχηματισμό σποριαγγείων και χλαμυδοσπορίων

Για τον έλεγχο της παραγωγής σποριαγγείων και χλαμυδοσπορίων σε υπόστρωμα "Soil Extract" που περιείχε διάφορες συγκεντρώσεις metalaxyl ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Μυκηλιακοί δίσκοι 10 απομονώσεων του γένους *Phytophthora* μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10 ml υποστρώματος "Soil Extract", εμπλουτισμένους με Ridomil (metalaxyl), σε συγκεντρώσεις δραστικής ουσίας 0,01, 0,1, 0,5 και 1 mg/l.

Για την παραγωγή των παραπάνω συγκεντρώσεων θα χρησιμοποιηθούν διαλύματα με συγκεντρώσεις σε metalaxyl 100, 10 και 1 mg/l που έχει ήδη περιγραφεί η παρασκευή τους (βλέπε σελ. 71).

Λαμβάνοντας υπόψην ότι ο κάθε σωλήνας περιέχει 10 ml υγρού υποστρώματος, προσθέτουμε από τις αρχικές συγκεντρώσεις τις εξής ποσότητες σε κάθε σωλήνα:

Από την αρχική των 100 mg/l metalaxyl προσθέτουμε:

0,1 ml σε 10 ml υλικού \Rightarrow συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για το 1 mg/l

0,05 ml σε 10 ml υλικού \Rightarrow συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για τα 0,5 mg/l

Από την αρχική των 10 mg/l metalaxyl προσθέτουμε:

0,1 ml σε 10 ml υλικού \Rightarrow συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για το 0,1 mg/l

Από την συγκέντρωση 1 mg/l που προέκυψε προσθέτουμε:

0,1 ml σε 10 ml υλικού \Rightarrow συγκέντρωση metalaxyl στο υλικό για το 0,01 mg/l

Επειδή ο διαλύτης είναι το DMSO θα πρέπει στους δοκιμαστικούς σωλήνες του μάρτυρα να προστεθεί 0,1 ml DMSO και στους σωλήνες που έχουν συγκέντρωση 0,5 mg/l να προστεθούν επιπλέον 0,05 ml DMSO ώστε ο τελικός όγκος να είναι ίδιος σε όλους τους σωλήνες και ίσος με 0,1 ml (δηλ. 1%).

Στον κάθε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκαν 3 μυκηλιακοί δίσκοι έχοντας έτσι τρεις επαναλήψεις σε κάθε συγκέντρωση και απομόνωση. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες στους οποίους προστέθηκαν οι μυκηλιακοί δίσκοι, τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με συνεχή φωτισμό, και σε θερμοκρασία 27 °C. Μετά από επώαση 3 ημερών μετρήθηκε ο αριθμός των σποριαγγείων και χλαμυδοσπορίων που σχηματίστηκαν. Επειδή δεν ήταν δυνατόν να μετρηθούν όλα τα σποριάγγεια και χλαμυδοσπόρια ενός μυκηλιακού δίσκου επιλέχθηκαν 3 οπτικά πεδία αντιπροσωπευτικά του μυκηλιακού δίσκου σε μικροσκόπιο σε μεγένθυση 400x.

Προσδιορισμός συνθηκών για σχηματισμό σποριαγγείων

Πείραμα 1

Χρησιμοποιήθηκαν μικρά τρυβλία διαμέτρου 5 cm πού περιείχαν 10ml απεσταγμένο - αποστειρωμένο νερό. Στα τρυβλία αυτά τοποθετήθηκαν μυκηλιακοί δίσκοι πού προέρχονταν από 6 ημερών καλλιέργειες. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε με 8 απομονώσεις από 3 επαναλήψεις στην κάθε απο-

μόνωση. Συνολικά δημιουργήθηκαν 8 τρυβλία εκ των οποίων τα 4 τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με συνεχή φωτισμό, τα δύο σε θάλαμο με εναλλαγή φωτός-σκότους και τα υπόλοιπα δύο σε συνεχές σκοτάδι. Σε όλους τους θαλάμους η θερμοκρασία που επικρατούσε ήταν 25°C. Μετά από 2 ημέρες επώασης έγινε η παρατήρηση των μυκηλιακών δίσκων.

Πείραμα 2

Το πείραμα επαναλήφθηκε, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά σαν υποστρώματα απεσταγμένο - αποστειρωμένο νερό ή “Soil Extract”. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν μόνο 2 απομονώσεις με 3 επαναλήψεις σε κάθε απομόνωση, οι οποίες επώαστηκαν σε όλες τις συνθήκες, δηλαδή συνεχούς φωτισμού, εναλλαγής φωτός-σκότους και συνεχές σκοτάδι σε συνδυασμό με τα υποστρώματα. Οι ίδιες απομονώσεις χρησιμοποιήθηκαν για όλες τις συνθήκες για να είναι τα αποτελέσματα συγκρίσιμα και για να αποφευχθεί η παραλακτικότητα που οφείλεται στις διαφορετικές απομονώσεις. Μετά από 7 ημέρες επώαση στους 25 °C μετρήθηκαν τα σποριάγγεια που σχηματίστηκαν στην περιφέρεια των μυκηλιακών δίσκων μετά από παρατήρηση τους σε μικροσκόπιο.

Πείραμα 3

Μυκηλιακοί δίσκοι από 3 ημερών καλλιέργειες, τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με περιεκτικότητα 10 ml θρεπτικών υποστρωμάτων “V₈” ή “Pea Broth”, και επώαστηκαν για 4 ημέρες στο σκοτάδι στους 27°C. Μετά το πέρας των τεσσάρων ημερών, αφαιρέθηκε το περιεχόμενο των σωλήνων με προσοχή (ώστε να μην πέσει το μυκήλιο) και ξεπλήθηκε το μυκήλιο 2 φορές με 10 ml αποστειρωμένο-απεσταγμένο νερό, τοποθετώντας για μερικά δευτερόλεπτα τον σωλήνα στο Vortex. Στην συνέχεια προστέθηκαν 10 ml “Soil Extract”, και επώαστηκαν για 24 ώρες υπό συνθήκες φωτός, σε θερμοκρασία 25°C. Μετά το πέρας των 24 ωρών, αφαιρέθηκε το περιεχόμενο, προστέθηκε νέα ποσότητα “Soil Extract” (10ml) και τοποθετήθηκαν οι σωλήνες για 1,5 ώρα στο ψυγείο (σε θερμοκρασία 4°C) και στη συνέχεια για 30 λεπτά στο σκοτάδι στους 25°C. Για την επίτευξη του πειράματος αυτού χρησιμοποιήθηκαν 8 απομονώσεις.

Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε ώστε να μπορέσει ο μύκητας να

σχηματίζει εύκολα σποριάγγεια. Γενικά όταν τμήματα της καλλιέργειας τοποθετηθούν σε υπόστρωμα πολύ πλούσιο σε θρεπτικά στοιχεία και μετά την πάροδο τουλάχιστον 24 ωρών μεταφερθούν σε υπόστρωμα πολύ φτωχό σε θρεπτικά στοιχεία, ο μύκητας υποβάλλεται σε συνθήκες καταπόνησης και σχηματίζει εύκολα σποριάγγεια τα οποία είναι απαραίτητα για την αναγνώριση του μύκητα. Τα θρεπτικά υποστρώματα “V₈” και “Pea Broth” είναι και τα δύο πολύ πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία.

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο υποστρώματα ώστε να μελετηθεί αν υπάρχουν διαφορές μεταξύ τους ως προς την επίδραση τους στον σχηματισμό σποριαγγείων. Επίσης το θρεπτικό υπόστρωμα “Soil Extract” είναι ένα πολύ φτωχό σε θρεπτικά στοιχεία υπόστρωμα. Η τοποθέτηση των σωλήνων στο ψυγείο και στη συνέχεια στο σκοτάδι, ευνοεί μετά τον σχηματισμό των σποριαγγείων, την διαφοροποίηση τους σε ζωοσπόρια και την απελευθέρωση των ζωοσπορίων. Το μυκήλιο ξεπλύθηκε 2 φορές με απεσταγμένο - αποστειρωμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του πλούσιου υποστρώματος (“V₈” ή “Pea Broth”) από τον σωλήνα.

Έγιναν προσπάθειες για ποσοτική μέτρηση δηλαδή μέτρηση του αριθμού των σποριαγγείων και ζωοσπορίων που υπήρχαν σε 1 cm³ “Soil Extract”, δεν ήταν όμως δυνατή η μέτρηση αυτή γιατί τα σποριάγγεια ήταν καλυμμένα πάνω στο μυκήλιο και επιπλέον ο όγκος του “Soil Extract” ήταν αρκετά μεγάλος ώστε να είναι αδύνατο να πραγματοποιηθεί οποιαδήποτε ποσοτική μέτρηση. Έτσι έγινε απλή παρατήρηση των μυκηλιακών δίσκων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Πείραμα 4

Μυκηλιακοί δίσκοι από 3 ημερών καλλιέργεια τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν “V₈” ή “Pea Broth” και επώαστηκαν για 5 ημέρες σε συνεχή φωτισμό στους 27°C. Μετά το πέρας των 5 ημερών, αφαιρέθηκε το περιεχόμενο του σωλήνα και προστέθηκαν 10 ml “Soil Extract” και έγινε επώαση των μυκηλιακών δίσκων για επιπλέον 24 ώρες στις ίδιες συνθήκες. Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω μεταχειρίσεων έγινε παρατήρηση των μυκηλιακών δίσκων σε μικροσκόπιο ώστε να μετρηθούν τα σποριάγγεια που τυχόν σχηματίστηκαν.

Πείραμα 5

Μυκηλιακοί δίσκοι από καλλιέργειες 5 ημερών τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με υπόστρωμα "Soil Extract" και επώαστηκαν σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού στους 27°C. Μετά από 24 ώρες επώαση παρατηρήθηκε σχηματισμός σποριαγγείων.

Στη συνέχεια ακολουθήθηκαν 3 διαφορετικές μεταχειρήσεις ώστε να προκληθεί απελευθέρωση ζωοσπορίων. Οι μεταχειρήσεις αυτές είναι οι εξής:

- A) Τοποθέτηση των τρυβλίων για 2 ώρες στο ψυγείο (4°C).
- B) Τοποθέτηση των τρυβλίων για 1.5 ώρες στους 9°C και στη συνέχεια στο σκοτάδι για 30 λεπτά στους 22°C.
- Γ) Τοποθέτηση των τρυβλίων στους 15°C για 12-15 ώρες.

Χρησιμοποιήθηκαν 2 απομονώσεις από 4 επαναλήψεις στην κάθε απομόνωση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προσδιορισμός άριστης-μέγιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης

Στους πίνακες 2 και 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από μετρήσεις κατά την 5η και 7η ημέρα επώασης, αντίστοιχα.

Πίνακας 2

Ανάπτυξη ακτίνας αποικίας (σε mm) 8 απομονώσεων *Phytophthora* μετά από 5 ημέρες επώασης σε υλικό PDA και 5 διαφορετικές θερμοκρασίες.
Οι τιμές εκφράζουν μέσους όρους 3 επαναλήψεων.

Θερμοκρασία	Απομονώσεις							
	1	2	3	4	5	6	7	8
25°C	20	21	26	26	31	22	26	18
27°C	22	21	22	28	30	20	28	19
29°C	20	20	24	23	20	20	21	23
32°C	7	7	9	6	7	7	6	7
35°C	-	-	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 3

Ανάπτυξη ακτίνας αποικίας (σε mm) 8 απομονώσεων *Phytophthora* μετά από 7 ημέρες επώασης σε υλικό PDA και 5 διαφορετικές θερμοκρασίες. Οι τιμές εκφράζουν μέσους όρους 3 επαναλήψεων.

Θερμοκρασία	Απομονώσεις							
	1	2	3	4	5	6	7	8
25°C	27	30	34	36	39	29	35	27
27°C	30	29	32	40	40	27	38	26
29°C	26	25	33	31	29	27	31	31
32°C	9	10	10	8	10	9	7	11
35°C	0	0	0	0	0	0	0	0

Μετά από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με κριτήριο Duncan προέκυψε ο παρακάτω πίνακας:

Πίνακας 4

Στατιστική ανάλυση της ανάπτυξης μυκηλίου και παρουσίαση των μέσων όρων όλων των απομονώσεων μαζί σε 4 διαφορετικές θερμοκρασίες για την 5η και 7η ημέρα ανάπτυξης.

Θερμοκρασία	Μέσοι όροι	
	5η ημέρα	7η ημέρα
25°C	23,375 α	31,833 α
27°C	23,625 α	32,667 α
29°C	21,25 β	19,125 β
32°C	7,083 γ	8,992 γ
LSD	1,056	1,411
CV (%)	9,66	10,94

* Δεδομένα που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σε επίπεδο $p < 0,01$.

* Στατιστική επεξεργασία κατά Duncan.

Όπως παρουσιάζεται στον πίνακα η ταχύτερη ανάπτυξη της αποικίας

παρατηρήθηκε στις θερμοκρασίες 25 °C και 27 °C οι οποίες δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Υπήρχαν όμως στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των θερμοκρασιών 29 °C και 32 °C, και για τις δύο ημέρες μετρήσεων. Στους 29 °C παρατηρήθηκε μικρότερη ανάπτυξη στην αποικία από ότι στους 25 °C και 27 °C και ακόμα μικρότερη στους 32 °C .

Επίσης βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές και μεταξύ των απομονώσεων σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,01$. Οι απομονώσεις 3, 4, 5 και 7 βρέθηκε ότι υπερέχουν και διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τις 1, 2, 6 και 8. Επίσης βρέθηκε ότι τα ζευγη απομονώσεων 4 και 5, 3 και 4, 3 και 7 δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 5).

Πίνακας 5

Στατιστική ανάλυση της ανάπτυξης μυκηλίου και παρουσίαση των μέσων όρων όλων των θερμοκρασιών μαζί για κάθε απομόνωση την 7η ημέρα ανάπτυξης.

Απομονώσεις	Μέσοι όροι 7η ημέρα
5	29,25 α
4	28,67 αβ
3	27,42 βγ
7	27,07 γ
8	23,58 δ
2	23,50 δ
1	22,92 δ
6	22,83 δ
LSD	1,368
CV (%)	10,94

* Δεδομένα που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σε επίπεδο $p < 0,01$.

* Στατιστική επεξεργασία κατά Duncan.

Με βάση την αύξηση της ακτίνας (σε mm) κατά την κυκλική ανάπτυξη του μυκηλίου έως την 7η ημέρα, ο μύκητας παρουσίαζε άριστη ανάπτυξη στις θερμοκρασίες 25°C - 27°C και μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 32°C.

Στη θερμοκρασία των 35°C δεν παρατηρήθηκε καμία ανάπτυξη του μυκηλίου. Για τον λόγο αυτό στα πειράματα που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκε η θερμοκρασία των 27°C ως άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης.

Η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης θα χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του είδους που απομονώθηκε από τα φυτά διεφφενμπάχιας. Το στοιχείο αυτό είναι από τα πιο βασικά χαρακτηριστικά με βάση τα οποία προσδιορίζεται ένα είδος του γένους *Phytophthora*. Έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές η θερμοκρασία ανάπτυξης στα διάφορα είδη. Οι Κουγέα και Χιτζανίδου (1968) μετά από μελέτη πάνω στα ελληνικά είδη του γένους *Phytophthora* δημιούργησαν τον Πίνακα 6 με την βοήθεια του οποίου και με τον συνδυασμό μορφολογικών χαρακτηριστικών, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού του είδους που απομονώθηκε.

Πίνακας 6

Θερμοκρασία αυξήσεως *Phytophthora* spp. σε °C

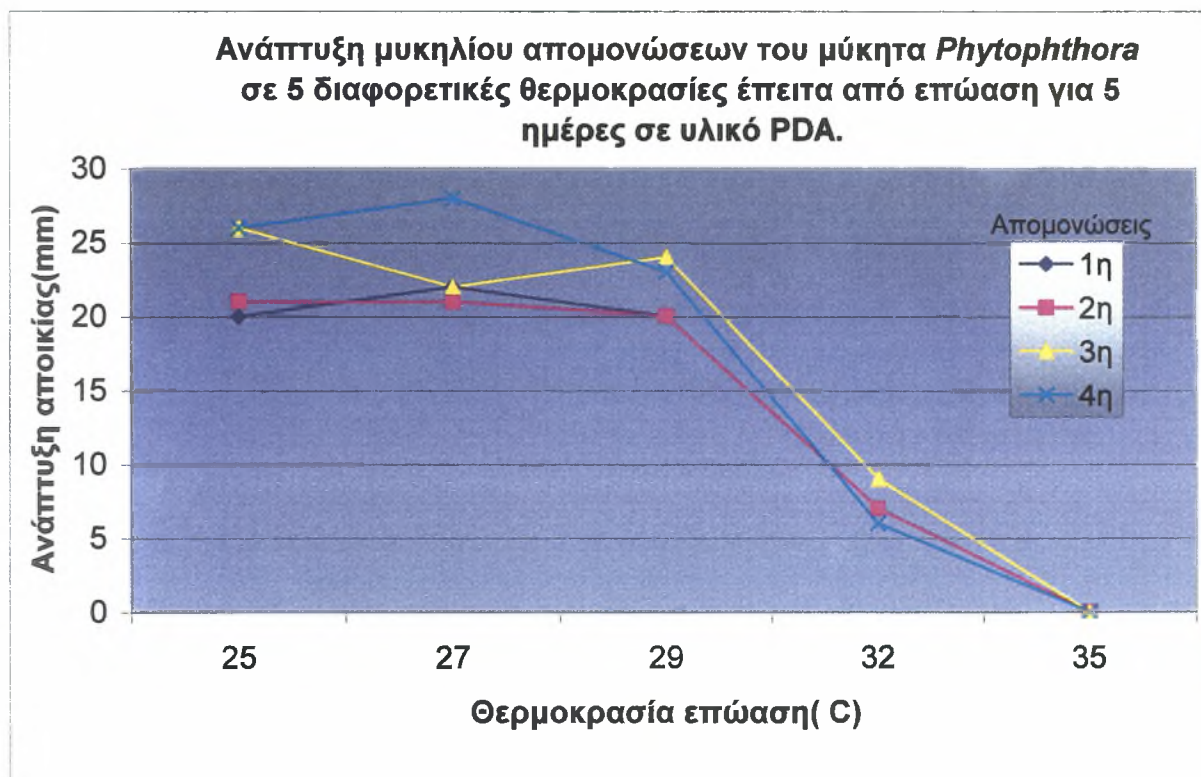
Απομόνωση	Ξενιστής	Θερμοκρασίες σε °C					
		25°	27°	29°	32,5°	35°	37°
<i>P. cactorum</i>	αμυγδαλιά	+	+	+	-		
” ”	φράουλα	+	+	+	-		
<i>P. citricola</i>	λυκίσκος	+	+	-			
” ”	αμυγδαλιά	+	+	-			
” ”	καρπός λεμονιάς	+	+	+	-		
<i>P. citrophthora</i>	αμυγδαλιά	+	+	+	-		
” ”	καρπός λεμονιάς	+	+	+	-		
” ”	φιστικιά	+	+	+	-		
<i>P. drechsleri</i>	αμυγδαλιά	+	+	+	+	+	+
<i>P. erythroseptica</i>	κόνδυλοι γεωμήλ.	+	+	+	-		
<i>P. hibernalis</i>	καρπός πορτοκαλ.	-	-	-	-		
<i>P. megasperma</i>	ελιά	+	+	+	-		
” ”	αμυγδαλιά	+	+	ίχνη			
” ”	ανθοκράμβη	+	+	+	-		
<i>P. palmivora</i>	μιμόζα	+	+	+	+	-	
<i>P. porri</i>	Baarn	ίχνη	-				
<i>P. syringae</i>	καρπός λεμονέας	+	-				
” ”	καρπός μανταριν.	+	-				
” ”	βερικοκιά	+	-				
” ”	ροδακινιά	+	-				
” ”	αμυγδαλιά	+	-				

Με βάση τον πίνακα αυτό το είδος *P. palmivora* είναι το μόνο είδος το οποίο αναπτύσσεται στους 32,5 °C αλλά δεν αναπτύσσεται στους 35 °C, εμφανίζει

δηλαδή μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 32,5 °C. Το στοιχείο αυτό παρέχει μια ένδειξη ότι οι απομονώσεις του μύκητα μπορεί να ανήκουν στο είδος *P. palmivora*. Επειδή όμως μερικές φορές απομονώσεις του γένους *Phytophthora* εμφανίζουν μια απόκλιση ± 2 °C από τις τιμές ανάπτυξης του πίνακα θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με μορφολογικούς χαρακτήρες ότι πρόκειται για απομονώσεις που ανήκουν στο είδος αυτό (*P. palmivora*).

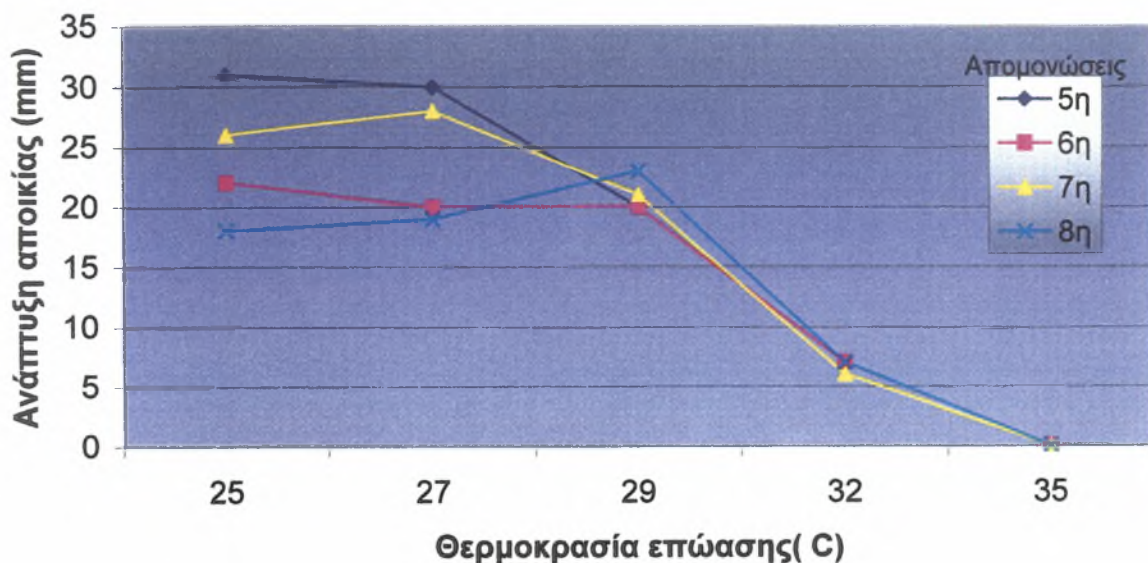
Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα που προέκυψαν από τα αποτελέσματα για την 5η και 7η ημέρα επώασης.

Διάγραμμα 1



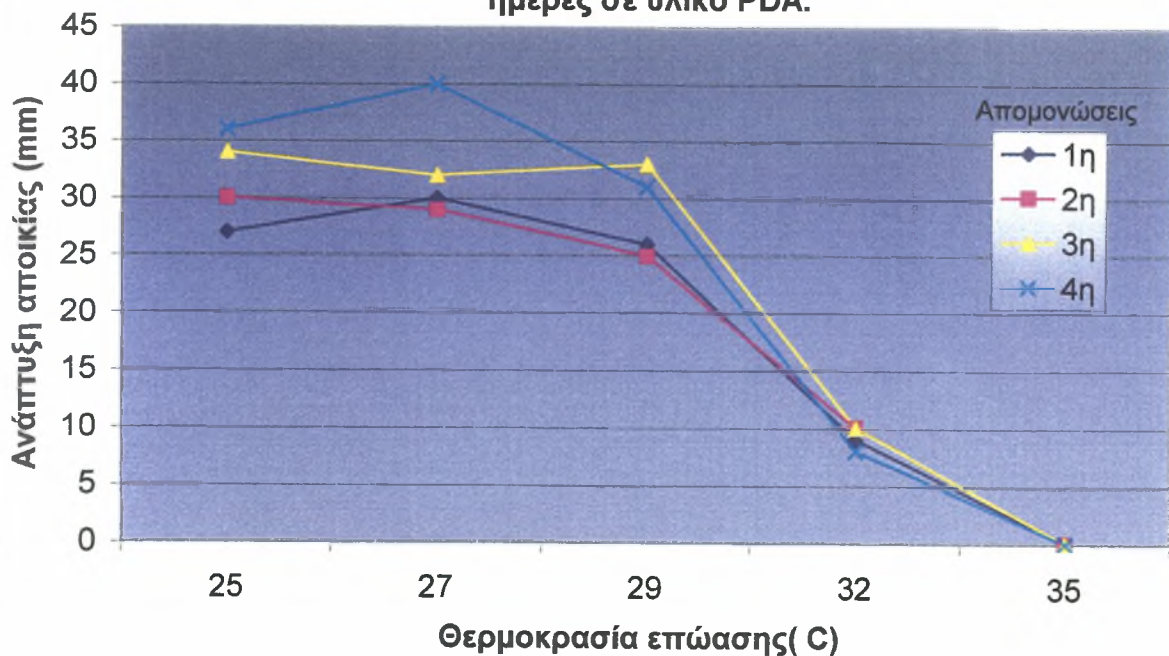
Διάγραμμα 2

Ανάπτυξη μυκηλίου απομονώσεων του μύκητα *Phytophthora* σε 5 διαφορετικές θερμοκρασίες έπειτα από επώαση για 5 ημέρες σε υλικό PDA.

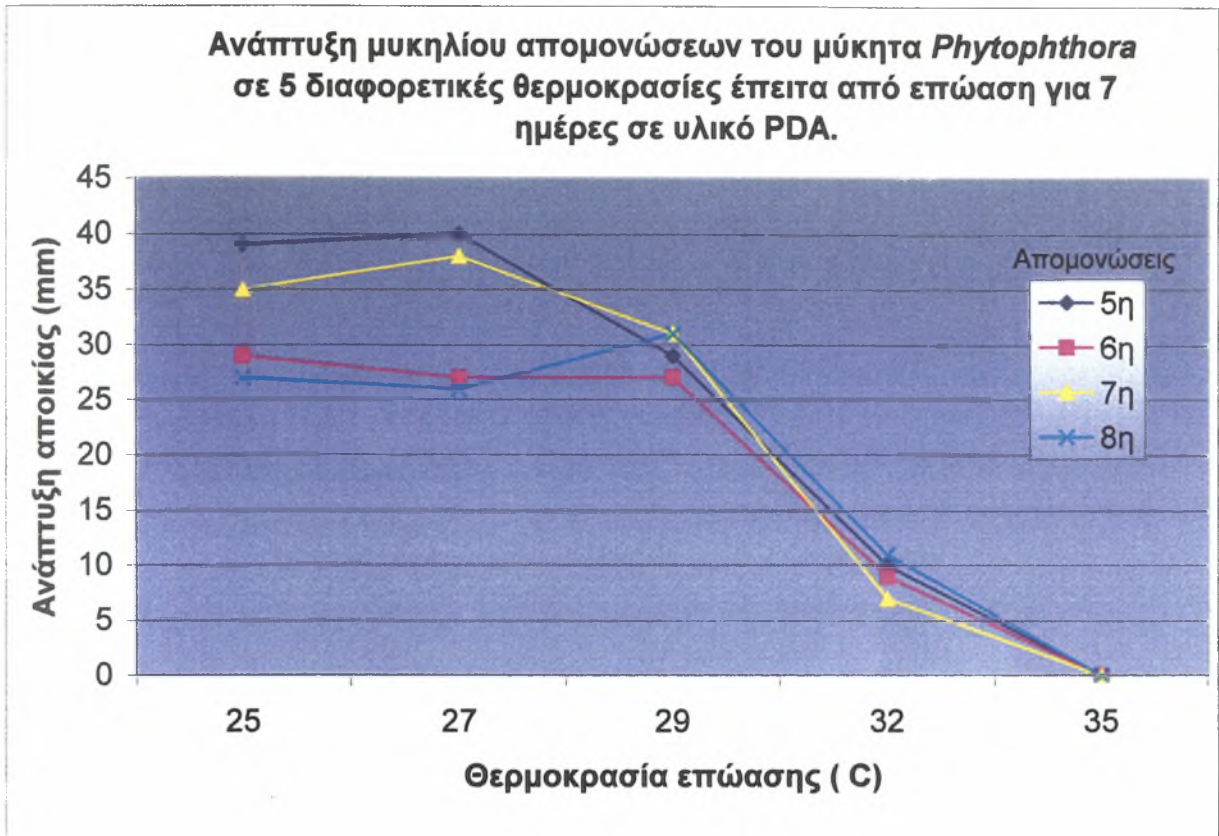


Διάγραμμα 3

Ανάπτυξη μυκηλίου απομονώσεων του μύκητα *Phytophthora* σε 5 διαφορετικές θερμοκρασίες έπειτα από επώαση για 7 ημέρες σε υλικό PDA.



Διάγραμμα 4



Ανάπτυξη μυκηλίου με προσθήκη metalaxyl

Πείραμα 1ο

Τα αποτελέσματα του πειράματος που προέκυψαν μετά από μετρήσεις κατά την 5η και 7η ημέρα ανάπτυξης παρουσιάζονται στους πίνακες 7 και 8 αντίστοιχα.

Πίνακας 7

Ανάπτυξη μυκηλίου (σε mm) 6 απομονώσεων *Phytophthora*, σε 9 διαφορετικές συγκεντρώσεις metalaxyl έπειτα από 5 ημέρες επώαση σε υλικό PDA στους 27 °C. Οι τιμές εκφράζουν μέσους όρους 3 επαναλήψεων.

Συγκέντρωση metalaxyl (mg/l)	Απομονώσεις					
	1	2	3	4	5	6
0	17	22	20	20	19	22
0,5	5	-	1	2	4	1
1	4	-	3	1	3	-
10	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 8

Ανάπτυξη μυκηλίου (σε mm) 6 απομονώσεων *Phytophthora*, σε 9 διαφορετικές συγκεντρώσεις metalaxyl μετά από 7 ημέρες επώαση σε υλικό PDA στους 27 °C. Οι τιμές εκφράζουν μέσους όρους 3 επαναλήψεων.

Συγκέντρωση metalaxyl (mg/l)	Απομονώσεις					
	1	2	3	4	5	6
0	28	32	33	30	29	29
0,5	6	4	2	3	6	2
1	4	3	3	5	5	-
10	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-

Όπως ήταν αναμενόμενο, μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων, βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα (0 mg/l metalaxyl) και των συγκεντρώσεων 0,5 και 1 mg/l, ενώ οι συγκεντρώσεις 0,5 και 1 mg/l μεταξύ τους δεν παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στον Πίνακα 9:

Πίνακας 9

Στατιστική ανάλυση της ανάπτυξης μυκηλίου και παρουσίαση των μέσων όρων όλων των απομονώσεων μαζί σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις metalaxyl για την 5η και 7η ημέρα ανάπτυξης.

Συγκέντρωση metalaxyl (mg/l)	Μέσοι όροι	
	5η ημέρα	7η ημέρα
0	20,278 α	30,111 α
0,5	2,444 β	3,556 β
1	1,917 β	3,167 β
LSD	1,164	1,923
CV (%)	20,6	22,77

* Δεδομένα που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σε επίπεδο $p < 0,01$.

* Στατιστική επεξεργασία κατά Duncan.

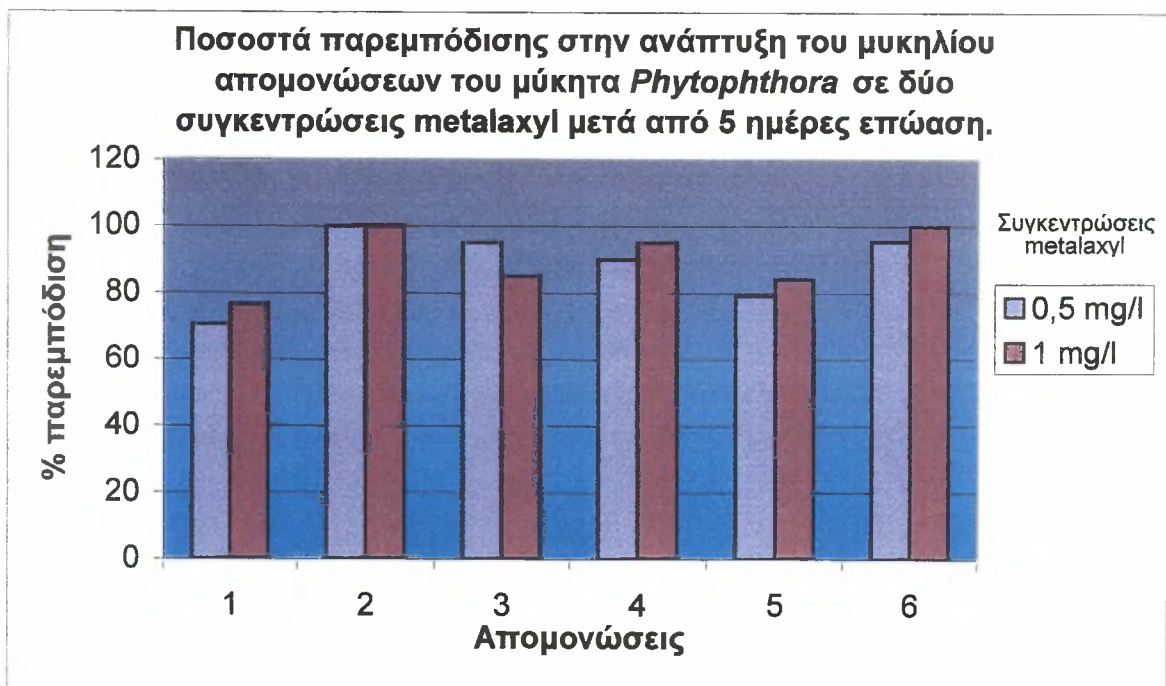
Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των απομονώσεων (βρέθηκε $prob=0.3317$).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι όλες οι απομονώσεις του παθογόνου ήταν ευαίσθητες στο metalaxyl αφού στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις 0,5 και 1 mg/l παρόλο που παρατηρήθηκε μια μικρή ανάπτυξη του μυκηλίου, η παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του σε σχέση με τον μάρτυρα ήταν μεγάλη (70%-100% παρεμπόδιση).

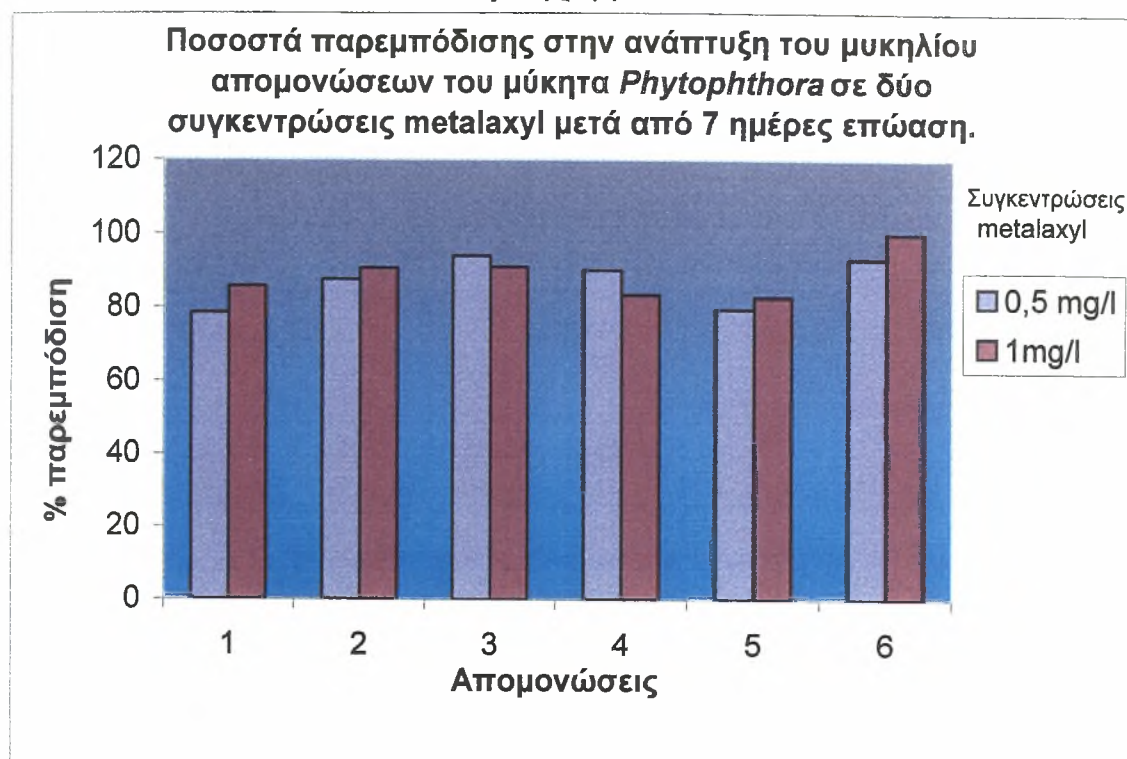
Επίσης στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 250, 500 και 1000 mg/l metalaxyl δεν παρατηρήθηκε καμία ανάπτυξη.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψαν ραβδόγραμμα τα οποία απεικονίζουν τα ποσοστά παρεμπόδισης στην ανάπτυξη του μυκηλίου σε σχέση με τον μάρτυρα στις συγκεντρώσεις 0,5 και 1 για την 5η και 7η ημέρα και για τις έξι απομονώσεις.

Ραβδόγραμμα 1



Ραβδόγραμμα 2



Πείραμα 2ο

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από τρεις ημέρες επώασης στους 27 °C στο σκοτάδι παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10

Ανάπτυξη μυκηλίου (σε mm) 10 απομονώσεων *Phytophthora*, σε 5 συγκεντρώσεις metalaxyl μετά από 3 ημέρες επώαση στους 27 °C σε υλικό PDA. Οι τιμές εκφράζουν μέσους όρους 3 επαναλήψεων.

Συγκέντρωση metalaxyl (mg/l)	Απομονώσεις											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	7	7	7	9	10	6	4	8	6	8	7	7
0,01	7	7	7	9	9	5	5	7	6	6	7	7
0,1	2	2	2	3	5	2	2	2	2	2	4	7
0,5	_*	_*	_*	_*	_*	_*	_*	_*	_*	_*	_*	_*
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* ίχνη

Μετά από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων βρέθηκε ότι όλες οι συγκεντρώσεις metalaxyl είχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους παρόλο που η ανάπτυξη της αποικίας στον μάρτυρα και στη συγκέντρωση 0,01 mg/l παρουσίαζε μικρές διαφορές (Πίνακας 11).

Πίνακας 11

Στατιστική ανάλυση της ανάπτυξης μυκηλίου και παρουσίαση των μέσων όρων όλων των απομονώσεων μαζί σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις metalaxyl για την 3η ημέρα ανάπτυξης.

Συγκέντρωση metalaxyl (mg/l)	Μέσοι όροι
0	7,167 α
0,01	6,695 β
0,1	2,444 γ
0,5	0,5 δ
LSD	0,2803
CV (%)	14,21

* Δεδομένα που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σε επίπεδο $p < 0,01$.

* Στατιστική επεξεργασία κατά Duncan.

Επίσης εμφανίζονται σημαντικές διαφορές και μεταξύ των απομονώσεων. Οι απομονώσεις 4 και 5 βρέθηκε ότι υπερέχουν και διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τις υπόλοιπες. Οι απομονώσεις 1, 2, 3, 8, 9, 10, 12 δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, ενώ οι απομονώσεις 6 και 7 εμφανίζουν την μικρότερη ανάπτυξη από όλες τις απομονώσεις (Πίνακας 12).

Πίνακας 12

Στατιστική ανάλυση της ανάπτυξης μυκηλίου και παρουσίαση των μέσων όρων για όλες τις συγκεντρώσεις metalaxyl μαζί σε κάθε απομόνωση για την 3η ημέρα ανάπτυξης.

Απομονώσεις	Μέσοι όροι	
5	6,124	α
4	5,292	β
11	4,542	γ
12	4,208	γδ
8	4,208	γδ
1	4,125	δ
3	4,042	δ
10	3,958	δ
2	3,958	δ
9	3,875	δ
6	3,375	ε
7	2,708	ζ
LSD	0,374	
CV (%)	14,21	

* Δεδομένα που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σε επίπεδο $p < 0,01$.

* Στατιστική επεξεργασία κατά Duncan.

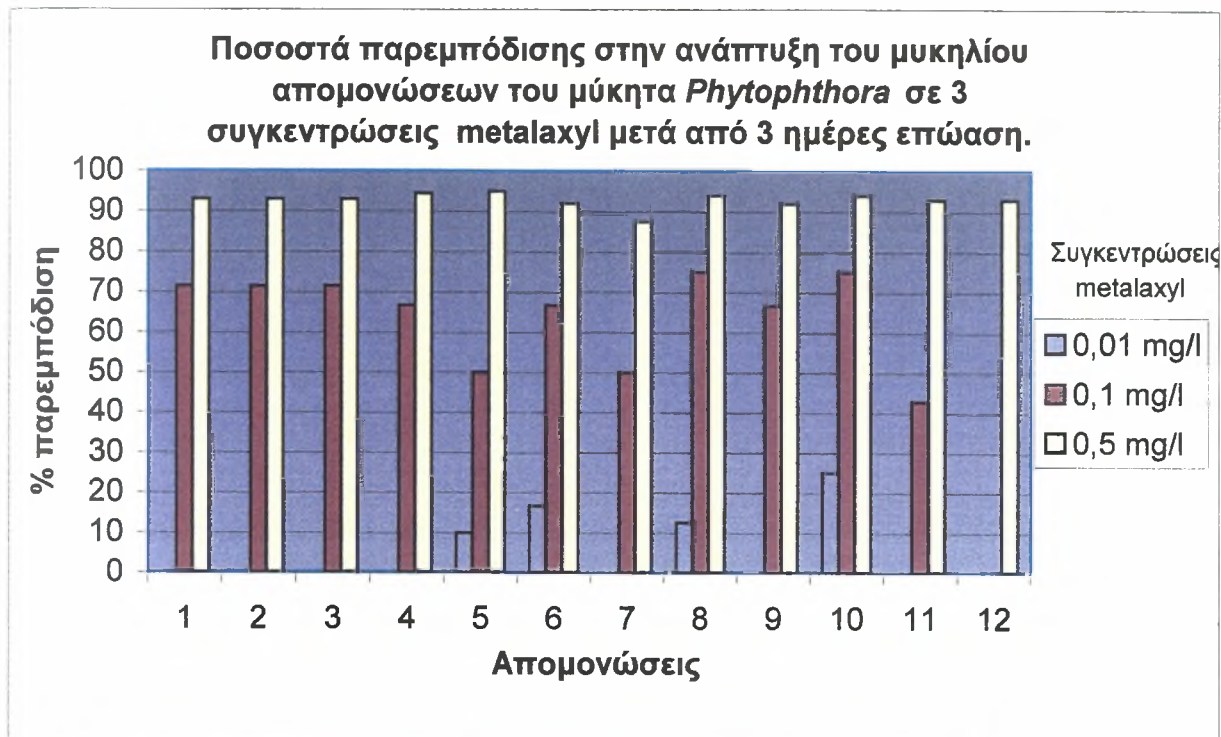
Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα στις συγκεντρώσεις 0,5 και 1 mg/l δεν παρατηρείται σχεδόν καθόλου ανάπτυξη του μυκηλίου, παρόλο που στο αρχικό πείραμα στις ίδιες συγκεντρώσεις είχε παρατηρηθεί μια μικρή ανάπτυξη (Εικόνα 12)*. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η μέτρηση έγινε μετά από 3 ημέρες επώασης και δεν πρόλαβε ο μύκητας να αναπτυχθεί. Εξάλλου σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος 1 μια μικρή ανάπτυξη του μυκηλίου σε αυτές τις συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε μόνο μετά από 5 ημέρες επώασης.

Παρατηρήθηκε επίσης ότι στη συγκέντρωση 0,01 mg/l το μυκήλιο ήταν σχετικά πυκνό, όπως και στον μάρτυρα, ενώ στην συγκέντρωση 0,1 mg/l το μυκήλιο παρουσίαζε μια πιο αραιή μορφή μέχρι αραχνοειδή.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει το εξής ραβδόγραμμα:

* Βλέπε παράρτημα εικόνων στο τέλος της εργασίας

Ραβδόγραμμα 3



Επίδραση του metalaxyl στον σχηματισμό σποριαγγείων και χλαμυδοσπορίων

Επειδή δεν ήταν δυνατόν να μετρηθούν όλα τα σποριάγγεια και χλαμυδοσπορίων ενός μυκηλιακού δίσκου, επιλέχθηκαν 3 οπτικά πεδία αντιπροσωπευτικά του μυκηλιακού δίσκου. Στους Πίνακες 13 και 14 παρουσιάζεται ο μέσος όρος συνολικά των 3 επαναλήψεων και των 3 οπτικών πεδίων σε κάθε επανάληψη. Δηλαδή ο μέσος όρος προέκυψε από 9 τιμές.

Πίνακας 13

Αριθμός σποριαγγείων 10 απομονώσεων *Phytophthora* σε 5 συγκεντρώσεις metalaxyl, μετά από 3 ημέρες επώαση στους 24°C σε υπόστρωμα SE.

Οι τιμές εκφράζουν μέσους όρους 3 επαναλήψεων.

Συγκέντρωση metalaxyl (mg/l)	Απομονώσεις									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	-	-	2	-	2	13	1	5	-	3
0,01	-	-	7	-	-	11	-	2	-	1
0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 14

Αριθμός χλαμυδοσπορίων 10 απομονώσεων *Phytophthora* σε 5 συγκεντρώσεις metalaxyl, μετά από 3 ημέρες επώαση στους 24°C σε υπόστρωμα SE.
Οι τιμές εκφράζουν μέσους όρους 3 επαναλήψεων.

Συγκέντρωση metalaxyl (mg/l)	Απομονώσεις									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	5	78	31	8	27	20	3	10	2	22
0,01	-	-	12	1	1	16	-	6	2	21
0,1	5	-	1	-	-	-	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα η παραγωγή των χλαμυδοσπορίων είναι αρκετά μειωμένη στην συγκέντρωση 0,01 mg/l σε σχέση με τον μάρτυρα (0 mg/l) ενώ στη συγκέντρωση 0,1 mg/l η παραγωγή χλαμυδοσπορίων παρεμποδίζεται σχεδόν πλήρως. Το γεγονός αυτό δείχνει την μεγάλη ευαισθησία που έχει η παραγωγή των χλαμυδοσπορίων στο metalaxyl. Ως προς την παραγωγή σποριαγγείων όμως δεν μπορούν να ειπωθούν τα ίδια γιατί στον μάρτυρα, στον οποίο δεν είχε προστεθεί metalaxyl, παρατηρήθηκε επίσης σχεδόν μηδενική παραγωγή σποριαγγείων.

Το γεγονός αυτό και λαμβάνοντας υπόψη ότι ο σχηματισμός χλαμυδοσπορίων ήταν γενικά μειωμένος, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπήρχε κάποιος παρεμποδιστικός παράγοντας που προκαλούσε την μείωση αυτή. Ο παράγοντας αυτός ήταν πιθανόν η έλλειψη οξυγόνου (αναερόβιες συνθήκες).

Όπως αναφέρθηκε στην βιβλιογραφική ανασκόπηση η περιεκτικότητα σε οξυγόνο στην περιοχή ανάπτυξης του μυκηλίου, μπορεί να επηρεάσει θετικά ή αρνητικά τον σχηματισμό των σποριαγγείων και χλαμυδοσπορίων, ανάλογα το είδος. Έτσι στην περίπτωση αυτή, οι αναερόβιες συνθήκες στις οποίες αναπτύχθηκε το μυκήλιο ήταν υπεύθυνες για την μη παραγωγή σποριαγγείων με αποτέλεσμα να μην μπορούν να βγουν συμπεράσματα ως προς την ευαισθησία τους στο metalaxyl.

Παρατηρήθηκε ότι ο σχηματισμός των μυκηλιακών διογκώσεων δεν παρεμποδιζόταν από την προσθήκη του metalaxyl.

Στις υψηλές συγκεντρώσεις του metalaxyl (0,5 και 1 mg/l) στις οποίες δεν σχηματίστηκαν σποριαγγεία και χλαμυδοσπόρια, το μυκήλιο παρουσίαζε πιο πολλές διακλαδώσεις και η διάμετρός ήταν γενικά πιο μικρή (πιο λεπτό μυκήλιο).

Προσδιορισμός συνθηκών για σχηματισμό σποριαγγείων

Πείραμα 1ο

Επειδή το πλήθος των σποριαγγείων ήταν πολύ μεγάλο δεν ήταν δυνατή η μέτρηση του συνολικού αριθμού τους, αλλά ούτε και η μέτρηση των σποριαγγείων της περιφέρειας θα εκπροσωπούσε πραγματικά στοιχεία, λόγω της ανομοιόμορφης κατανομής τους στον μυκηλιακό δίσκο. Έτσι έγινε απλή παρατήρηση των μυκηλιακών δίσκων, που όμως έδινε ξεκάθαρα αποτελέσματα.

Κατά την παρατήρηση των μυκηλιακών αυτών δίσκων βρέθηκε ότι ο σχηματισμός σποριαγγείων σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού υπερείχε ξεκάθαρα. Οι συνθήκες εναλλαγής φωτός-σκότους προκάλεσαν τον σχηματισμό ικανοποιητικού αριθμού σποριαγγείων αλλά μειωμένου σε σχέση με τις συνθήκες συνεχούς φωτισμού, ενώ σε συνθήκες με συνεχές σκοτάδι ο αριθμός των σποριαγγείων που σχηματίστηκαν ήταν πολύ μικρός.

Πρέπει να αναφερθεί ότι σε πολλούς μυκηλιακούς δίσκους τα σποριαγγεία σχηματίστηκαν στην επιφάνεια του δίσκου που βρισκόταν έξω από το νερό ενώ στο μέρος που ήταν βυθισμένο στο νερό δεν σχηματίστηκε κανένα σποριαγγείο. Επίσης σε μερικούς μυκηλιακούς δίσκους, από τις ίδιες απομονώσεις παρατηρήθηκε και το αντίθετο φαινόμενο.

Πείραμα 2ο

Μετρήθηκαν τα σποριαγγεία που σχηματίστηκαν στην περιφέρεια του μυκηλιακού δίσκου. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι τα εξής:

Πίνακας 15

Παραγωγή σποριαγγείων του μύκητα *Phytophthora* μετά από 7 ημέρες επώασης σε υπόστρωμα SE σε 6 διαφορετικές συνθήκες.
Οι τιμές εκφράζουν μέσους όρους 3 επαναλήψεων.

Συνθήκες επώασης	Αριθμός σποριαγγείων	
	Απομονώσεις	
	1	2
Φως - SE	314	343
Σκότος - SE	201	86
Φως - Σκότος - SE	146	135
Φως - Νερό	176	361
Σκότος - Νερό	124	67
Φως - Σκότος - Νερό	19	121

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι στις συνθήκες συνεχούς φωτισμού και οι δύο απομονώσεις είχαν την μεγαλύτερη παραγωγή σποριαγγείων. Ακολούθησαν οι συνθήκες συνεχούς σκότους, ενώ σε συνθήκες εναλλαγής φωτός-σκότους εμφανίστηκε η μικρότερη παραγωγή. Επίσης η απομόνωση 1 παρουσίαζε μεγαλύτερο αριθμό σποριαγγείων σε υπόστρωμα "Soil Extract", ενώ στην απομόνωση 2 μεταξύ των δύο υποστρωμάτων δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές.

Κατά την διάρκεια των μετρήσεων παρατηρήθηκε ότι υπήρχαν πολλά άδεια σποριάγγεια από τα οποία μερικά είναι πιθανό να είχαν απελευθερώσει τάζωσπορία τους αλλά στα περισσότερα σποριάγγεια το πρωτόπλασμα ήταν συρρικνωμένο.

Ενώ σε πολλούς μυκηλιακούς δίσκους ο σχηματισμός των σποριαγγείων ήταν ομοιόμορφα κατανεμημένος σε κάποιους δίσκους σχηματίστηκαν σποριάγγεια μόνο περιφεριακά ενώ σε άλλους μόνο στην πάνω επιφάνεια (δηλαδή στο μυκήλιο που βρισκόταν έξω από το υπόστρωμα) ή στη κάτω επιφάνεια (στο μυκήλιο που ήταν βυθισμένο στο υπόστρωμα).

Υπήρχαν μυκηλιακοί δίσκοι στους οποίους δεν σχηματίστηκε κανένα σποριάγγειο (σε συνθήκες σκότους), το μυκήλιο των οποίων όμως εμφάνιζε πολλές μυκηλιακές διογκώσεις.

Πείραμα 3 & 4

Παρατηρήθηκε ότι δεν είχαν σχηματιστεί καθόλου σποριάγγεια. Μετά από επιπλέον επώαση τους για 2 εβδομάδες σε σκοτάδι, παρατηρήθηκε ότι το μυκήλιο είχε αναπτυχθεί αρκετά και είχε πλησιάσει την επιφάνεια του υγρού υποστρώματος ("Soil Extract"). Στην επιφάνεια του υποστρώματος αυτού είχε σχηματίσει μια ισχυρή κρούστα μυκηλίου. Σε αυτό το μυκήλιο που βρισκόταν έξω από το υγρό υπόστρωμα είχαν σχηματιστεί αμέτρητα σποριάγγεια και χλαμυδοσπόρια.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων προκύπτει ότι σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού και με την επικράτηση αναερόβιων συνθηκών, ο μύκητας δεν σχημάτισε καθόλου σποριάγγεια, ενώ όταν οι συνθήκες μεταβλήθηκαν σε συνεχές σκοτάδι και σε αερόβιες συνθήκες (ατμοσφαιρικού οξυγόνου) σχηματίστηκαν άφθονα σποριάγγεια (πείραμα 4).

Στο πρώτο πείραμα σε συνθήκες φωτισμού ο μύκητας σχημάτισε επίσης άφθονα σποριάγγεια, αλλά επικρατούσαν εξ αρχής αερόβιες συνθήκες (χρησιμοποιήθηκαν μικρά τρυβλία και οι μυκηλιακοί δίσκοι δεν ήταν βυθισμένοι στο υπόστρωμα). Επίσης στο 2^ο πείραμα, όπου επικρατούσαν αναερόβιες συνθήκες (χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες), και υπήρχε μια χρονική περίοδος 4 ημερών με συνεχές σκοτάδι, επίσης παρατηρήθηκε σχηματισμός σποριαγγείων.

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία προκύπτει ότι οι ίδιες απομονώσεις αντιδρούν διαφορετικά στις συνθήκες φωτισμού και περιεκτικότητας σε O_2 , και επίσης υπάρχει μία αλληλεπίδραση των παραγόντων αυτών μεταξύ τους.

Επιπλέον, επειδή το υπόλοιπο μυκήλιο που παρέμεινε σε αναερόβιες συνθήκες για όλη την διάρκεια των 2 εβδομάδων στο σκοτάδι, δεν σχημάτισε σποριάγγεια είναι φανερό ότι ο κύριος παράγοντας που προκάλεσε στο συγκεκριμένο πείραμα την παρεμπόδιση του σχηματισμού των σποριαγγείων, είναι η έλλειψη οξυγόνου.

Πείραμα 5

Δεν μπόρεσε να παρατηρηθεί απελευθέρωση ζωοσπορίων. Σχηματίστηκαν πολλά σποριάγγεια από τα οποία τα περισσότερα παρουσίαζαν λύση του πρωτοπλάσματος.

Μορφολογία μυκηθιακών κατασκευών, αναπαραγωγικών οργάνων και αποικίας

Τα σποριάγγεια που σχηματίστηκαν στις διάφορες απομονώσεις ήταν σφαιρικά, ωοειδή, λεμονοειδή και γενικά διαφόρων σχημάτων που έφεραν στην κορυφή τους ευδιάκριτη θηλή στις περισσότερες των περιπτώσεων (Εικ. 1 και 2)*.

Επίσης τα σποριάγγεια αποκόπτονται από τον σποριαγγειοφόρο με μίσχο (Εικ. 1 και 2)*. Πρέπει να αναφερθεί ότι οι σποριαγγειοφόροι είναι δυνατόν να σχηματίσουν απλά συμπόδια (Εικ. 3)*. Στην εικόνα 4* παρατηρείται απελευθέρωση των ζωοσπορίων ενός σποριαγγείου.

Μετρήθηκαν οι διαστάσεις δύο αντιπροσωπευτικών σποριαγγείων και προέκυψαν οι εξής τιμές:

Για το πρώτο σποριάγγειο οι διαστάσεις μήκος x πλάτος είναι:

χωρίς θηλή	32x28 μικρά (μm)
με θηλή	40x20 μm

Για το δεύτερο σποριάγγειο οι διαστάσεις μήκος x πλάτος είναι:

χωρίς θηλή	36x24 μικρά (μm)
με θηλή	44x24 μm

Ο λόγος μήκος/πλάτος για τα δύο σποριάγγεια(με θηλή) είναι 1,428 και 1,83 αντίστοιχα.

Τα χλαμυδοσπόρια του μύκητα είναι σφαιρικά, και μπορεί να είναι ενδιάμεσα ή επάκρια (Εικ. 5)*. Τα χλαμυδοσπόρια συνήθως βλαστάνουν με υφή αλλά παρατηρήθηκε σε μερικές περιπτώσεις και βλάστηση απευθείας σε σποριάγγειο (Εικ. 6)*.

Τα ωοσπόρια σχηματίζονταν δύσκολα σε απλές καλλιέργειες και γι' αυτό προέκυψε το συμπέρασμα ότι το είδος είναι ετερόθαλλο. Στα ετερόθαλλα είδη για να σχηματιστούν ωοσπόρια χρειάζεται να γίνει διασταύρωση του μύκητα με διαφορετικού συζευκτικού τύπου στελέχη.

Παρόλα αυτά ο μύκητας σχημάτισε ωοσπόρια σε μία μόνο εκ των 12 απομονώσεων (στην απομόνωση 2), τα δε ανθηρίδια βρέθηκαν να είναι αμφίγυνα (Εικ. 7 και 8)*.

* Βλέπε παράρτημα εικόνων στο τέλος της εργασίας

Ακόμη διαπιστώθηκε ότι το μυκήλιο σχηματίζει μυκηλιακές διογκώσεις και δεν παρουσιάζεται στο είδος αυτό το φαινόμενο της δευτερογενούς σποριαγγειοπλασίας.

Στις περιπτώσεις που δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός σποριαγγείων, η μορφολογία του μυκηλίου ήταν διαφορετική. Παρουσίαζε πολλές διακλαδώσεις, μικρές σε μήκος, ενώ γενικά το μυκήλιο είχε πιο μικρή διάμετρο σε σχέση με το μυκήλιο στο οποίο είχαν σχηματιστεί σποριάγγεια.

Μετά από ανάπτυξη του μύκητα σε υλικό “Malt Extract Agar” η αποικία εμφάνιζε την ακτινωτή μορφή της εικόνας 11*.

* Βλέπε παράρτημα εικόνων στο τέλος της εργασίας

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αντικείμενο έρευνας της παρούσας εργασίας αποτέλεσαν απομονώσεις που προήλθαν από φυτά διεφφενμπάχιας (*Dieffenbachia maculata*), που έφεραν συμπτώματα μαλακής σήψης στην βάση του στελέχους.

Κατά την μελέτη των διαφόρων απομονώσεων, ορισμένοι βασικοί χαρακτήρες-κριτήρια λαμβάνονται υπόψη ώστε να γίνει ο προσδιορισμός του είδους που ανήκει στο γένος *Phytophthora*. Αυτοί οι χαρακτήρες-κριτήρια, που έχουν καθοριστεί από την διεθνή βιβλιογραφία καθώς και από την παραδοσιακή εργαστηριακή πρακτική, είναι οι ακόλουθοι:

- i) Το μέγιστο της θερμοκρασίας ανάπτυξης
- ii) Ωογόνια με παράγυνα ή αμφίγυνα ανθηρίδια
- iii) Η ικανότητα ή μη παραγωγής ωοσπορίων
- iv) Μορφολογία σποριαγγείων (ωοειδή, ελλειψοειδή, με ή χωρίς θηλή, σχέση μήκος / πλάτος, ποδίσκος)
- v) Μορφολογία μυκηλιακών υφών
- vi) Παρουσία ή όχι μυκηλιακών διογκώσεων
- vii) Δευτερογενής σποριαγγειοπλασία (*Sporangium proliferation*)
- viii) Σποριάγγεια που αποκόπτονται από το σποριαγγειοφόρο με μίσχο ή μη αποκοπτόμενα σποριάγγεια.

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων έγιναν παρατηρήσεις με βάση τις οποίες επιχειρήθηκε προσδιορισμός του είδους. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το μέγιστο της θερμοκρασίας ανάπτυξης του παθογόνου βρέθηκε ότι είναι 32 °C, στοιχείο πολύ σημαντικό για τον προσδιορισμό του είδους. Με την βοήθεια του πίνακα 5 (σελ. 81) των Κουγέα και Χιτζανίδου (1968) υπάρχει μια ένδειξη ότι

πρόκειται για το είδος *P. palmivora* αφού σύμφωνα με τον πίνακα αυτόν είναι το μόνο είδος που ενδημεί στη χώρα μας και αναπτύσσεται στους 32,5 °C αλλά δεν αναπτύσσεται στους 35 °C.

Τα σποριάγγεια που σχηματίστηκαν στις διάφορες απομονώσεις ήταν σφαιρικά, ωσειδή και γενικά διαφόρων σχημάτων που έφεραν ευδιάκριτη θηλή στις περισσότερες των περιπτώσεων. Κατά την διάρκεια πειράματος στο οποίο η παραγωγή των σποριαγγείων έγινε σε συνθήκες σκότους παρατηρήθηκαν ανώμαλα σποριάγγεια, που πολλά είχαν μικρή δυσδιάκριτη θηλή ή δεν έφεραν καθόλου θηλή. Η διαφορετική αυτή μορφολογία των σποριαγγείων μπορεί να εξηγηθεί με την βοήθεια της εργασίας του Hendrix (1967) κατά την οποία παρατήρησε ότι τα σποριάγγεια των ειδών *P. palmivora* και *P. capsisi* που σχηματίζονταν στο φως ήταν διαφορετικά σε σχήμα και μέγεθος από αυτά που σχηματίζονταν στο σκοτάδι. Ιδιαίτερα τα σποριάγγεια του *P. palmivora* που σχηματίζονταν στο σκοτάδι είχαν τόσο διαφορετικό σχήμα ώστε μπορούσε το είδος αυτό να συγχυστεί με άλλα είδη.

Επίσης τα σποριάγγεια αποκόπτονται από τον σποριαγγειοφόρο με μίσχο. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι οι σποριαγγειοφόροι είναι δυνατόν να σχηματίσουν απλά συμπόδια.

Τα χλαμυδοσπόρια του μύκητα είναι σφαιρικά, και μπορεί να είναι ενδιάμεσα ή επάκρια. Τα χλαμυδοσπόρια συνήθως βλαστάνουν με υφή αλλά παρατηρήθηκε σε μερικές περιπτώσεις και βλάστηση απευθείας σε σποριάγγειο.

Τα ωσπόρια σχηματίζονταν δύσκολα σε απλές καλλιέργειες και γι' αυτό προέκυψε το συμπέρασμα ότι το είδος είναι ετερόθαλλο. Στα ετερόθαλλα είδη για να σχηματιστούν ωσπόρια χρειάζεται να γίνει διασταύρωση του μύκητα με διαφορετικού συζευκτικού τύπου στελέχη.

Παρόλα αυτά ο μύκητας σχημάτισε ωσπόρια σε μία μόνο εκ των 12 απομονώσεων (στην απομόνωση 2), τα δε ανθηρίδια βρέθηκαν να είναι αμφίγυνα.

Ακόμη διαπιστώθηκε ότι το μυκήλιο σχηματίζει μυκηλιακές διογκώσεις και δεν παρουσιάζεται στο είδος αυτό το φαινόμενο της δευτερογενούς σποριαγγειοπλασίας.

* Βλέπε παράρτημα εικόνων στο τέλος της εργασίας

Μετρήθηκαν οι διαστάσεις δύο αντιπροσωπευτικών σποριαγγείων και προέκυψαν οι εξής τιμές: Για το πρώτο σποριάγγειο οι διαστάσεις (μήκος x πλάτος είναι 40 x 28 μικρά (μm) ενώ για το δεύτερο 44 x 24 μm.

Ο λόγος μήκος/πλάτος για τα δύο σποριάγγεια είναι 1,428 και 1,83 αντίστοιχα.

Από όλα τα παραπάνω δεδομένα, που προέκυψαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων, και εφόσον εφαρμοστεί ως κανόνας προσδιορισμού η κλείδα της Waterhouse (1963), προκύπτει ότι το είδος του γένους *Phytophthora*, το οποίο απομονώθηκε από τα προσβεβλημένα φυτά διεφφενμπάχιας, ανήκει στην δεύτερη ομάδα και κατά πάσα πιθανότητα πρόκειται για το είδος *P. palmivora*.

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά του μύκητα ταιριάζουν με την εργασία των Tompkins and Tucker (1947) οι οποίοι για πρώτη φορά περιέγραψαν τις σοβαρές ζημιές που προκαλεί ο μύκητας *P. palmivora* σε φυτά διεφφενμπάχιας. Σύμφωνα με την εργασία αυτή το πρώτο ορατό σύμπτωμα στα φυτά είναι μια μικρή, ακανόνιστου σχήματος κηλίδα στο λαιμό των φυτών η οποία αυξάνει με γρήγορους ρυθμούς. Είναι δυνατόν, όταν τα φυτά είναι ακόμα μικρά, να προκαλέσει το θάνατό τους μέσα σε μία έως δύο ημέρες. Οι σοβαρές ζημιές που προκαλεί ο μύκητας σε καλλιέργεια διεφφενμπάχιας μπορούν να γίνουν αντιληπτές και από τα μεγάλα κενά που δημιουργούνται στην καλλιέργεια αυτή. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του μύκητα στην ίδια εργασία αναφέρεται ότι η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 28 °C και η μέγιστη 31 °C. Στους 35 °C δεν παρατηρήθηκε καθόλου ανάπτυξη. Αναφέρεται επίσης ότι τα σποριάγγεια του μύκητα αποκόπτονταν με μίσχο καθώς και ότι το μέγεθος των σποριαγγείων κυμαίνεται μεταξύ των τιμών (26-80) x (18-36) μm με μέσο μέγεθος 48,4 x 27,8 μm. Τα χαρακτηριστικά αυτά που αναφέρονται στον μύκητα *P. palmivora* ταιριάζουν απόλυτα με αυτά που βρέθηκαν στην παρούσα εργασία.

Απομονώσεις *Phytophthora* με τα ίδια μορφολογικά και λοιπά χαρακτηριστικά είχαν γίνει από το ίδιο θερμοκήπιο με φυτά διεφφενμπάχιας το 1997 και είχαν περιγραφεί χωρίς όμως να γίνει προσδιορισμός τους (Κουλούρης, 1996).

Ως ερμηνεία των αποτελεσμάτων των πειραμάτων που έγιναν για τον προσδιορισμό συνθηκών για σχηματισμό σποριαγγείων μπορούν να ειπωθούν τα εξής:

Όπως αναφέρθηκε στη βιβλιογραφική ανασκόπηση η περιεκτικότητα σε O_2 (αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες που επικρατούν), καθώς και η επίδραση του φωτός, μπορεί να επηρεάσουν θετικά ή αρνητικά τον σχηματισμό των σποριαγγείων και χλαμυδοσπορίων, ανάλογα το είδος. Πολλές φορές μπορεί να παρατηρηθεί διαφορετική συμπεριφορά σε απομονώσεις του ίδιου είδους υπό την επίδραση των παραγόντων αυτών.

Με βάση τα αποτελέσματα προέκυψε ότι οι ίδιες απομονώσεις αντιδρούν διαφορετικά στις συνθήκες φωτισμού και περιεκτικότητας σε O_2 , και επίσης υπάρχει μία αλληλεπίδραση των παραγόντων αυτών μεταξύ τους. Έτσι ενώ η έλλειψη οξυγόνου έπαιξε παρεμποδιστικό ρόλο σε μερικά πειράματα, σε κάποια άλλα στις ίδιες απομονώσεις δεν υπήρξε καθόλου παρεμπόδιση.

Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι και η ηλικία του μύκητα θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για τις διαφορετικές συμπεριφορές του παθογόνου. Έτσι όταν πρωτοαπομονώθηκε ο μύκητας, σχημάτιζε πολύ εύκολα άφθονα σποριάγγεια και χλαμυδοσπόρια ακόμη και σε αναερόβιες συνθήκες. Με την αύξηση όμως της ηλικίας του μύκητα παρατηρήθηκε μια μειωμένη ικανότητα του παθογόνου να παράγει τα όργανα αναπαραγωγής (σποριάγγεια, ανθηρίδια, ωοσπόρια) και σε πολλές περιπτώσεις μπορεί τα σποριάγγεια που τυχόν παρήγαγε να μην ήταν λειτουργικά.

Σε κάποια πειράματα παρατηρήθηκαν πολλά σποριάγγεια με λύση του πρωτοπλάσματος. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην μεγάλη ηλικία του μύκητα (8 μήνες μετά την πρώτη απομόνωση του από το φυτό διεφφενμπάχια) με αποτέλεσμα να έχει χάσει την δύναμη του και να μην μπορεί να διαφοροποιηθεί το περιεχόμενο των σποριαγγείων σε ζωοσπόρια. Επίσης όπως έχει αναφερθεί στην διεθνή βιβλιογραφία (Hendrix, 1967) σε φως, απουσία στερολών ήταν δυνατή η παραγωγή αρκετών σποριαγγείων τα οποία όμως εκφυλίζονταν μέσα σε λίγες μέρες. Η ύπαρξη στερολών έχει αναφερθεί ότι είναι απαραίτητη για την λειτουργικότητα των σποριαγγείων. Έτσι ένας ακόμα παράγοντας που μπορεί να είναι υπεύθυνος για την λύση του πρωτοπλάσματος του σποριαγγείου (συρρικνωμένο πρωτόπλασμα) είναι η έλλειψη στερολών από το υπόστρωμα ανάπτυξης.

Το δεύτερο κομμάτι της προκείμενης πτυχιακής διατριβής αφορά τον έλεγχο της ευαισθησίας των απομονώσεων του είδους *P. palmivora* στο metalaxyl. Το 1984 οι Coffey and Bower μελέτησαν την ευαισθησία στο metalaxyl 6

διαφορετικών ειδών του γένους *Phytophthora* και διαπίστωσαν ότι το είδος *P. palmivora* παρουσίαζε τη μεγαλύτερη ευαισθησία.

Μεταγενέστερα πειράματα των Lucas *et al.* (1990) έδειξαν ότι για το ίδιο είδος (*P. palmivora*) κάτω από συνθήκες εργαστηρίου είναι δυνατόν να επιλεγούν στελέχη ισχυρά παθογόνα με σταθερή συγχρόνως ανθεκτικότητα στο metalaxyl. Έτσι παρόλο που στον αγρό ακόμα δεν έχει αναφερθεί η ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών στο συγκεκριμένο είδος, είναι ένα ενδεχόμενο το οποίο δεν πρέπει να αποκλισθεί για το μέλλον. Με βάση την εργασία των Lucas *et al.*, αν αυξηθεί η πίεση επιλογής από τη συνεχή χρησιμοποίηση του metalaxyl ή γενικά των φαινυλαμιδίων τα οποία παρουσιάζουν τον ίδιο τρόπο δράσης, είναι δυνατόν να επιλεγούν ανθεκτικά στελέχη.

Για να αποφευχθεί η δημιουργία ανθεκτικότητας σε είδη που παραμένουν ακόμα ευαίσθητα στο metalaxyl, όπως είναι το είδος *P. palmivora* συνιστάται η χρησιμοποίηση των φαινυλαμιδίων εναλλακτικά ή σε μίγματα με άλλα προστατευτικά, ή συγγενή μυκητοκτόνα. Επίσης θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση, εναλλακτικά ή σε μίγματα, κατηγοριών μυκητοκτόνων στα οποία εμφανίζεται διασταυρωτή ανθεκτικότητα από στελέχη του μύκητα *Phytophthora*.

Σε πολλές εργασίες στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται η ύπαρξη διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των μυκητοκτόνων της ομάδας των φαινυλαμιδίων. Οι Bower and Coffey (1985) ανέφεραν την ύπαρξη αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ του metalaxyl και των μυκητοκτόνων fosetyl-Al, fosetyl-Na και H_3PO_3 , ενώ οι Wang *et al.* (1997) μεταξύ του metalaxyl και cymoxanil.

Το 1988 οι Utkhede and Gusta μετά από έκθεση σε σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση metalaxyl δημιούργησαν ανθεκτικά στελέχη του είδους *P. cactorum*, τα οποία όμως βρέθηκε ότι ήταν ευαίσθητα στο fosetyl-Al, στο mancozeb και στο μίγμα metalaxyl + mancozeb στα ίδια επίπεδα ευαισθησίας όπως και τα ευαίσθητα στελέχη. Το μίγμα αυτό (metalaxyl + mancozeb) εφαρμοζόταν στα φυτά διεφφενμπάχιας από τα οποία απομονώθηκε ο μύκητας *P. palmivora* με τον οποίο διεξήχθησαν τα πειράματα της παρούσας εργασίας. Η εφαρμογή γινόταν με ριζοποτίσματα κατά τις μεταφυτεύσεις σε διαστήματα 3 μηνών, χρησιμοποιώντας το μίγμα σε αναλογία: 7,5% metalaxyl + 56% mancozeb σε συγκέντρωση σκευάσματος 1 g/l. Ο μύκητας απομονώθηκε μετά από 12 χρόνια συνεχούς εφαρμογής του παραπάνω μίγματος μυκητοκτόνων.

Για να διερευνηθεί αν και κατά πόσο η ευαισθησία στο metalaxyl του είδους *P. palmivora*, που απομονώθηκε από το συγκεκριμένο θερμοκήπιο μειώθηκε, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου της ευαισθησίας αυτής.

Ελέγχθηκε η παρεμπόδιση που προκλήθηκε στην ανάπτυξη του μυκηλίου σε υπόστρωμα "Potato Dextrose Agar" μετά από προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων metalaxyl (από 0,01 mg/l έως 1.000 mg/l).

Διαπιστώθηκε ότι η παρεμπόδιση στις χαμηλές συγκεντρώσεις (0,1 και 0,5 mg/l) κυμαινόταν από 70% μέχρι 100% με αποτέλεσμα να χαρακτηριστούν όλες οι απομονώσεις ως ευαίσθητες. Επίσης κατά την διεξαγωγή ελέγχου της επίδρασης του metalaxyl στον σχηματισμό σποριαγγείων και χλαμυδοσπορίων παρατηρήθηκε στο μάρτυρα μειωμένη παραγωγή χλαμυδοσπορίων και σχεδόν μηδενική παραγωγή σποριαγγείων. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι επικρατούσε κάποιος παρεμποδιστικός παράγοντας κατά την διεξαγωγή του πειράματος που δεν επέτρεψε να φανούν οι επιδράσεις του metalaxyl στο σχηματισμό σποριαγγείων. Όσον αφορά όμως στην παραγωγή των χλαμυδοσπορίων διαπιστώθηκε ότι αυτή παρουσίαζε μεγάλη ευαισθησία στο metalaxyl αφού στην συγκέντρωση 0,01 mg/l δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καθόλου παραγωγή χλαμυδοσπορίων.

Ο παρεμποδιστικός παράγοντας που προκάλεσε τα παραπάνω αποτελέσματα βρέθηκε ότι ήταν οι αναερόβιες συνθήκες που επικρατούσαν στην περιοχή του μυκηλίου. Οι Mitchell and Zentmyer(1971) παρατήρησαν ότι η παραγωγή σποριαγγείων μειωνόταν με την μείωση της συγκέντρωσης του O_2 ή την αύξηση του CO_2 σε σχέση με τις συγκεντρώσεις που επικρατούν στην ατμόσφαιρα. Ως προς την επίδραση του O_2 στην παραγωγή των χλαμυδοσπορίων στην διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται εργασίες με αντίθετα αποτελέσματα. Ως παράδειγμα παρατίθενται αφ' ενός ο Huguenin (1974) ο οποίος ανέφερε ότι η παραγωγή χλαμυδοσπορίων του είδους *P. palmivora* ευνοείται από την έλλειψη O_2 και αφ' ετέρου ο Chee (1973) που ανέφερε ότι για το ίδιο είδος ο σχηματισμός παρεμποδίζεται πλήρως στις συνθήκες έλλειψης O_2 .

Με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω μπορεί να γίνει αντιληπτό ότι το είδος *P. palmivora* ανήκει στα είδη του γένους *Phytophthora*, στα οποία έχει διαπιστωθεί ότι δεν αναπτύσσονται εύκολα ανθεκτικά στελέχη στον αγρό παρά μόνο μετά από αυξημένη πίεση επιλογής προς την πορεία αυτή. Επιπλέον κατά την παρούσα πειραματική εργασία οι απομονώσεις του είδους *P. palmivora*

προήλθαν από φυτά στα οποία για 12 συνεχή χρόνια γινόταν χρήση του μυκητοκτόνου metalaxyl σε μίγμα με το προστατευτικό μυκητοκτόνο mancozeb με αποτέλεσμα η πίεση επιλογής που ασκήθηκε στον μύκητα *P. palmivora* να είναι μειωμένη. Αυτό αποδεικνύεται και από την εργασία των Lucas *et al.* (1990) που αναφέρουν ότι ανθεκτικά στο metalaxyl στελέχη ήταν ευαίσθητα στο μίγμα αυτό. Έτσι έπειτα από 12 χρόνια συνεχούς εφαρμογής του μίγματος αυτού μυκητοκτόνων η καταπολέμηση της ασθένειας εξακολουθεί να είναι ικανοποιητική.

ΜΕΡΟΣ Γ΄
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αντικείμενο έρευνας της παρούσας εργασίας αποτέλεσαν απομονώσεις που προήλθαν από φυτά διεφφενμπάχιας (*Dieffenbachia maculata*), που έφεραν συμπτώματα μαλακής σήψης στην βάση του στελέχους. Τα φυτά προήλθαν από θερμοκήπιο στο οποίο την περίοδο 1989-2001 εφαρμοζόταν κατά τις μεταφυτεύσεις σε 3μηνα διαστήματα ριζοπότισμα με το μίγμα metalaxyl 7,5% + mancozeb 56% σε συγκέντρωση σκευάσματος 1 g/l.

Σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός του είδους στο οποίο ανήκουν οι παραπάνω απομονώσεις και ο έλεγχος της ευαισθησίας των απομονώσεων αυτών στο μυκητοκτόνο metalaxyl.

Με βάση την περιγραφή του είδους δηλαδή τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της αποικίας, των χλαμυδοσπορίων και των οργάνων αναπαραγωγής (σποριάγγεια, ανθηρίδια, ωοσπόρια) καθώς και τον προσδιορισμό του ανωτάτου ορίου θερμοκρασίας ανάπτυξης προέκυψε ότι οι απομονώσεις ανήκουν στο είδος *P. palmivora* Butler.

Όσον αφορά την ευαισθησία των απομονώσεων του είδους αυτού στο metalaxyl, βρέθηκε ότι όλες οι απομονώσεις ήταν ευαίσθητες ακόμα και στην πολύ χαμηλή συγκέντρωση των 0,1 mg/l metalaxyl, αφού η παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μυκηλίου στην συγκέντρωση αυτή κυμαινόταν μεταξύ 70% και 100%.

Ως τελικό συμπέρασμα αναφέρεται ότι έπειτα από 12 χρόνια συνεχούς εφαρμογής του μίγματος metalaxyl + mancozeb η καταπολέμηση της ασθένειας εξακολουθεί να είναι ικανοποιητική.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ)

- Abdellaoui-Maane, S., Seng, J. M. Saindrenan, P. and Bompeix, G. 1988. Fosetyl-Al is effective against mutants of *Phytophthora capsici* resistant to metalaxyl. *Cryptogamie. Mycologie* 9 :47-56.
- Ann, P. J. and Ko, W. H. 1980. *Phytophthora insolita*, a new species from Taiwan. *Mycologia* 72: 1180-1185.
- Ayers, W. A. and Zentmyer, G. A. 1971. Effect of soil solution and two soil pseudomads on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 61:1188-1193.
- Bal, E., Gilles, G., Creemers, P. and Vandergetennbollen, J. 1987. Resistance of *Phytophthora cactorum* to some phenylamides in strawberry culture. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 52 :881-894.
- Banihashemi, Z. and Mitchell, J. E. 1976. Factors affecting oospores of *Phytophthora cactorum* and *P. citricola*. *Proc. Am. Pytopathlol. Soc.* 66:443-448.
- Bhat, R. G., McBlain, B. A. and Schimithenner, A. F. 1993. The inheritance of resistance to metalaxyl and to fluorophenylalanine in matings of homothallic *Phytophthora sojae*. *Mycological Research* 97 :965-870.
- Borner, H., Schatz, G. and Grisebach, H. 1983. Influence of the systemic fungicide metalaxyl on glyceollin accumulation of soybean infested with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Pathology* 23: 145-152.
- Bower, L. A. and Coffey, M. D. 1985. Development of laboratory tolerance to phosphorous acid, foseyl-Al, and metalaxyl in *Phytophthora capsici*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 7: 1-6.
- Brasier, C. M. 1967. Physiology of reproduction in *Phytophthora*. Ph. D. Thesis. Univ. of Hull, England, 220 pp.
- Brasier, C. M. 1969. The effect of light and temperature on reproduction *in vitro* of two tropical species of *Phytophthora*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 52:105-113.
- Brasier, C. M. and Griffin, M. J. 1979. Taxonomy of *Phytophthora palmivora* on cocoa. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 72:111-143.
- Brasier, C. M. and Sansome, E. 1975. Diploidy and gametangial meiosis in *Phytophthora cinnamomi*, *P. infestans* and *P. drechsleri*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 65:49-65.

- Bruin, G.C.A. and Edgington, L.V. 1983. The chemical control of diseases caused by zoosporic fungi, a many-sided problem. *Zoosporic Plant Pathogens* : 193-233.
- Chabane, K., Leroux , P. and Bompeix, G. 1996. Resistance to fungicides and streptomycin in *Phytophthora parasitica*: genetic determinism and use in hybrid determination. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 82-90.
- Chang, T. T. and Ko, W. H. 1990. Resistance to fungicides and antibiotics in *Phytophthora parasitica*: generic nature and use in hybrid determination. *Phytopathology* 80 :1414-1421.
- Chang, T. T. and Ko, W. H. 1992. Variation in growth rate and colony morphology of *Phytophthora parasitica* induced by metalaxyl. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 58 :72-77.
- Chauhan, V. B. and Singh, U. P. 1987. A natural occurring resistant forma specialis of *Phytophthora drechsleri* to metalaxyl. *Journal of Phytopathology* 120 :93-96.
- Chee, K. H. 1973. Production, germination and survival of chlamydospores of *Phytophthora palmivora* from *Hevea brasiliensis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 61:21-26.
- Chen, D. W. and Zentmyer, G. A. 1970. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia* 62: 397-402.
- Clerk, G. C. 1972, Germination of sporangia of *Phytophthora palmivora* (Butler) Butl. *Ann. Bot.* 36:801-807.
- Coffey, M. D. and Bower, L. A. 1984. *In vitro* variability among isolates of six *Phytophthora* species in response to metalaxyl. *Phytopathology* 74 :502-506.
- Coffey, M. D., Klure, L. J. and Bower, L. A. 1984. Variability in sensitivity to metalaxyl of isolates of *Phytophthora cinnamoni* and *Phytophthora citricola*. *Phytopathology* 74 :417-422.
- Coghe, M., Gennari, M. and Gentile, I. A. 1984. Variations in the DNA, RNA and protein content induced by metalaxyl in *Phytophthora capsici*. *Annali della Facolta di Scienze Agrarie della Universita degli Studi di Torino* 13:129-136.
- Cohen, Y. and Coffey, M.D. 1986. Systemic Fungicides and the control of Oomycetes. *Annual Review Phytopathology* 24: 311-318.
- Cohen, Y. and Reuveni, M. 1983. Occurrence of metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in potato fields in Israel. *Phytopathology* 73: 925-927.
- Cohen, Y. and Samoucha, Y. 1984. Cross-resistance to four systemic fungicides in

- metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* and *Pseudoperonospora cubensis*. Plant Disease 68: 137-139.
- Cohen, Y. and Samoucha, Y. 1990. Competition between oxadixyl-sensitive and -resistant field isolates of *Phytophthora infestans* on fungicide-treated potato crops. Crop Protection 9: 15-20.
- Cohen, Y., Reuveni, M. and Eyal, H. 1979. The systemic antifungal activity of Ridomil against *Phytophthora infestans* on tomato plants. Phytopathology 69: 645-649.
- Crute, I. R. 1979. Lettuce mildew - Destroyer of quality. Agric. Res. coun. (U.K.) Res. Rev 5: 9-12.
- Csinos, A.S. and Bertrand, P. F. 1994. Distribution of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* races and their sensitivity to metalaxyl in Georgia. Plant Disease 78: 471-474.
- Davidse, L. C. 1981. Resistance to acylalanine fungicides in *Phytophthora megasperma* f.sp. *medicaginis*. Netherland Journal of Plant Pathology 87 :11-24.
- Davidse, L. C., Gerritsma, O. C. M., Ideler, J., Pie, K. and Velthuis, G. C. M. 1988. Antifungal modes of action of metalaxyl, cyprofuram, benalaxyl and oxadixyl in phenylamidesensitive and phenylamide-resistant strains of *Phytophthora megasperma* f.sp. *medicaginis* and *Phytophthora infestans*. Crop Protection 7 :347-355.
- Davidse, L. C., Gerritsma, O. C. M. and Hofman, A. E. 1981. Mode of action of metalaxyl. Phytartie-Phytopharmacie 30 :235-244.
- Davidse, L. C., Gerritsma, O. C. M. and Velthuis, G. C. M. 1984. A different basis of antifungal activity of acylalanine fungicides and structurally related chloroacetanilide herbicides in *Phytophthora megasperma* f.sp. *medicaginis*. Pesticide Biochemistry and Physiology 21 :301-308.
- de Bary, A. 1881. Zur kenntniss der Peronosporeen. Bot. Zeitung Jahtgang 39 : 33-39.
- Englander, L. and Turbitt, W. 1979. Increased chlamydospore production by *Phytophthora cinnamomi* using sterolis and nearultraviolet light. Phytopathology 69:813-817.
- Englander, L. and Roth, L. F. 1980. Interaction of light and sterol on sporangium and chlamydospore production by *Phytophthora lateralis*. Phytopathology 70:650-654.
- Ersek, T. 1975. The sensitivity of *Phytophthora infestans* to several antibiotics. Z. Pflanzenkr. Pflanzeschutz 82:614-617.
- Ersek, T., Schoelz, J. E. and English, J. T. 1994. Characterization of selected drug-resistant

- mutants of *Phytophthora capsici*, *P. parasitica* and *P. citrophthora*. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 29: 215-229.
- Eye, L. L., Sneh, B. and Lockwood, J. L. 1978. Factors affecting zoospore production by *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Phytopathology 68:1766-1768.
- Farih, A., Tsao, P. H. and Menge, J. A. 1981. *In vitro* effects of metalaxyl on growth, sporulation, and germination of *Phytophthora parasitica* and *P. citrophthora*. Plant Disease 65 :651-654.
- Ferrin, D. M. and Kabashima, J. N. 1991. *In vitro* insensitivity to metalaxyl of isolates of *Phytophthora citricola* and *P. parasitica* from ornamental hosts in southern California. Plant Disease 75 :1041-1044.
- Ferrin, D. M. and Rohde, R. G. 1992. *In vitro* expression of resistance to metalaxyl by a nursery isolate of *Phytophthora parasitica* from *Catharanthus roseus*. Plant Disease 76 :82-84.
- Ferrin, D. M. and Wadsworth, M. L. 1992. Effect of metalaxyl on sporulation and growth of metalaxyl-resistant and metalaxyl-sensitive isolates of *Phytophthora parasitica in vitro*. Plant Disease 76 :492-495.
- Fisher, D.J. and Hayes, A. L. 1979. Fungicides, and mode of action. Phycomycetes fungicides. Annu. Res. Rep., 137.
- Fisher, D.J. and Hayes, A.L. 1982. Mode of action of the systemic fungicides furalaxyl, metalaxyl and ofurace. Pestic. Sci. 13: 330-339.
- Fisher, D. J. and Hayes, A. L. 1984. Studies of mechanisms of metalaxyl fungitoxicity and resistance to metalaxyl. Crop Protection 3 :177-185.
- Frezzi, M. J. 1950. Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. Rev. Invest. Agric. 4:47-133.
- Gallegly, M. E. 1983. New criteria for classifying *Phytophthora* and critique of existing approaches. In Erwin, D.C. et al. (eds). *Phytophthora*, its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. APS, St. Paul, Minnesota 167-172.
- Garibaldi, A., Romano, M.L. and Gullino, M. L. 1985. Synergism between fungicides with different mechanisms of action against acylalanine-resistant strains of *Phytophthora* spp. EPPO Buletin 15: 545-551.
- Gillis, A. M. 1993. The magnificent devastator gets around. Bio-Science 43: 368-371.
- Gisi, U., Oertli, J. J. and Schwinn, F. J. 1977. Wasser-und Salzbeziehungen der Sporangien

- von *Phytophthora cactorum* (Leb. et Cohn) Schroet. *in vitro*. Phytopathol. Z. 89: 261-284.
- Gooding, G. V. and Lucas, G. B. 1959. Factors influencing sporangial formation and zoospore activity in *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Phytopathology 49:277-281.
- Goodwin, S. B. and McGrath, M. T. 1995. Insensitivity to metalaxyl among isolates of *Phytophthora erythroseptica* causing pink rot of potato in New York. Plant Disease 79 : 967.
- Grohmann, U. J. and Hoffman, G. M. 1989. Leaf infection and tissue colonization in potato plants by *Phytophthora infestans* influenced by increasing dosages of metalaxyl. Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz 96: 585-603.
- Halsall, D. M. and Forrester, R. I. 1977. Effects of certain cations on the formation and infectivity of *Phytophthora zoospores*. Effects of copper, boron, cobalt, manganese, molybdenum, and zincions. Can J. Microbiol. 23:1002-1010.
- Harnish, W. N. 1965. Effect of light on production of oospores and sporangia in spesies of *Phytophthora*. Mycologia 57:85-90.
- Hendrix, J. W. 1964. Sterol induction of resprodution and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. Science 144:1028-1029.
- Hendrix, J. W. 1967. Light-cholesterol relationships in morphogenesis of *Phytophthora palmivora* and *P. capsici* sporangia. Mycologia 59:1107-1111.
- Herong, L., Bingyan, X., Fenghai, M. and Guoren, Z. 1999. A study on *Phytophthora capsici*'s genetic resistance to metalaxyl and cynoxanil. Journal of Human Agricultural Universtity 25 :52-56.
- Ho, H. H. 1978. Hyphal branching systems in *Phytophthora* and other phycomycetes. Mycopathologia 64:83-86.
- Huguenin, B. 1974. Influence des conditions de culture sur la formation et la germination *in vitro* des chlamydospores du *Phytophthora palmivora*. Ann. Phytopathology 6: 425-440.
- Hunger, R. M., Hamm, P. B., Horner, C. E. and Hansen, E. M. 1982. Tolerance of *Phytophthora megasperma* isolates to metalaxyl. Plant Disease 66 :645-649.
- Hwang, B.K. and Sung, N.K. 1989. Effect of metalaxyl on capsidiol production in stems of pepper plants with *P. capsici*. Plant Disease 73: 748-751.
- Hwang, B.K., Ebrahim-Nesbat, F., Wolf-Dieter, I. and Heitefuss, R. 1990. An

- ultrastructural study of the effect of metalaxyl on *Phytophthora capsici* infected stems of *Capsicum annuum*. Pestic. Sci. 29: 151-162.
- Joseph, M. C. and Coffey, M. D. 1984. Development of laboratory resistance to metalaxyl in *Phytophthora citricola*. Phytopathology 74:1411-1414.
- Kadish, D. and Cohen, Y. 1989. Population dynamics of metalaxyl sensitive and metalaxyl - resistant isolates of *Phytophthora infestans* in untreated crops of potato. Plant Pathology 38: 271-276.
- Kadish, D. and Cohen, Y. 1992. Overseasoning of metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in potato tubers. Phytopathology 82 : 887-889.
- Kaosiri, T., Zentmyer, G. A. and Erwin, D. C. 1980. Oospore morphology and germination in the *Phytophthora palmivora* complex from cacao. Mycologia 72:888-907.
- Keen, N. T. 1990 Phytoalexins and their elicitors. Pages 114-129. in: Microbes and Microbial Products as Herbicides R.E. Hoagland, ed. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 439. Washington, D. C. 341.
- Keen, N. T. and Yoshikawa, M. 1983. Physiology of disease and the nature of resistance to *Phytophthora*. Pages 279-287 in: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P.H. Tsao, eds. American Phytopathological Society, St, Paul, Minn. 392.
- Kennedy, B. W. and Erwin, D. C. 1961. Some factors influencing sporangium formation of a *Phytophthora* species isolated from lucerne in certain salt solutions. Trans. Br. Mycol. Soc. 44:: 291-297.
- Klisiewicz, J. M. 1970. Factors affecting production and germination of oospores of *Phytophthora drechsleri*. Phytopathology 60:1738-1742.
- Ko, W. H. and Chang, H. S. 1979. *Phytophthora katsurae*, a new name for *P. castaneae*. Mycologia 71: 840-844.
- Kuan, T.-L. and Erwin, D. C. 1980. Formae speciales differentiation of *Phytophthora megasperma* isolates from soybean and alfalfa. Phytopathology 70:333-338.
- Lambert, D. H. and Salas, B. 1994. Metalaxyl insensitivity of *Phytophthora erythroseptica* causing pink rot of potato in Maine. Plant Disease 78: 1010.
- Lambou, J. S. and Paxton, J. D. 1992. Metalaxyl sensitivity selection within *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Plant Disease 76 :932-936.

- Lazarovits, G., Unwin, C. H. and Ward, E. W. B. 1980. Rapid assay of systemic fungicides against *Phytophthora* rot of soybeans. *Plant Disease* 64: 163-165.
- Leonian, L. H. 1925. Physiological studies on the genus *Phytophthora*. *Am. J. Bot.* 12:444-498.
- Leonian, L. H. 1934. Identification of *Phytophthora* species. Agricultural Experiment Station, Bulletin 262 :36.
- Leroux, P. 1992. Negative cross-resistance in fungicides: from the laboratory to the field. *Developments in combating Pesticide Resistance*: 179-190.
- Leroux, P. and Gredt, M. 1981. Phenomena of resistance to anti-mildew fungicides: some laboratory results. *Phytiatrie-Phytopharmacie* 30 :273-282.
- Locke, T., Scrace, J. and Peace, J. M. 1997. Resistance of *Phytophthora porri* to metalaxyl. *Pesticide Science* 371-374.
- Long, M., Keen, N. T., Ribeiro, O. K., Leary, J. V., Erwin, D. C. and Zentmyer, G. A. 1975. *Phytophthora megasperma* var *sojae*. Development of wild-type strains for genetic research. *Phytopathology* 65:592-597.
- Lucas, J. A., Bower, L. A. and Coffey, M. D. 1990. Fungicide resistance in soil-borne *Phytophthora* species. *Bulletin OEPP* 20: 199-206.
- Malathrakis, N.E. 1980. Control of downy mildew of cucumber by systemic and nonsystemic fungicides. Pages 145-146 in: *Proc. Congr. Mediterr. Phytopathol Union, 5th, Patras, Greece. Hellenic Phytopathol. Soc., Athens, Greece.*
- Millat, M. L., Ducruet, J. M., Ricci, R., Marty, F. and Blein, J. P. 1991. Physiological and structural changes in tobacco leaves treated with cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Phytopathology* 81 : 1364 - 1368.
- Mircetich, S. M., Zentmyer, G. A. and Kendrick, J. B. J. 1968. Physiology of germination of chlamydospores of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 58:666-671.
- Mircetich, S. M. and Zentmyer, G. A. 1969. Effect of carbon and nitrogen compounds on germination of chlamydospores of *Phytophthora cinnamomi* in soil. *Phytopathology* 59:1732-1735.
- Mitchell, D. J. and Zentmyer, G. A. 1971. Effects of oxygen and carbon dioxide tensions on sporangium and oospore formation by *Phytophthora* species. *Phytopathology* 61:807-812.
- Muino, B. L., Diaz, I. and Jaenz, A. 1990. Evidence of metalaxyl resistance in *Phytophthora*

- parasitica* var. *nicotianae* in tobacco areas of the province Pinar del Rio. Ciencia y Tecnica en la Agricultura, Tabaco 13: 59-67.
- Newhook, F. J., Waterhouse, G. M. and Stamps, D. J. 1978. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey, England. Micologia 143: 20 .
- Oros, G. and Komives, T. 1991. Effects of phenylamide pesticides on the GSH-conjugation system of *Phytophthora* spp. fungi. Zeitschrift fur Naturforschung. Section C. Biosciences 46: 866-874.
- Pan, J., Ho, H. H. and Long, S. C. 1994. A scanning electron microscopy study of *Phytophthora* and *Halophytophthora* species. Mycotaxon 51:257-279.
- Pappas, A. C. 1978. New diseases caused by *Phytophthora* spp. Phytophthora Newsletter 6:72-73.
- Pappas, A. C. 1980. Effectiveness of metalaxyl and phosetyl-Al against *Pseudoperonospora cubensis* (Berk and Curt) Rostow isolates from cucumbers. Pages 146-148 in: Proc. Congr. Mediterr. Phytopathol Union, 5th, Patras, Greece. Hellenic Phytopathol. Soc., Athens, Greece.
- Pappas, A. C. 1985. Metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans* on greenhouse tomatoes in Greece. Plant Pathology, 34:293-296.
- Parra, G. and Ristaino, J. 1998. Insensitivity to Ridomil Gold (mefenoxam) found among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight on bell pepper in North Carolina and New Jersey. Plant Disease 82 :711.
- Pennisi, A. M., Agosteo, G. E., Cacciola, S. O., Pane, A. and Faedda, R. 1998. Insensitivity to metalaxyl among isolates of *Phytophthora capsici* causing root and crown rot of pepper in Southern Italy. Plant Disease 82 :1283.
- Ramachandran, N., Sarma, Y. R. and Anandaraj, M. 1988. Sensitivity of *Phytophthora* species affecting different plantation crops in Kerala to metalaxyl. Indian Phytopathology 41 :438-442.
- Ribeiro, O. K., Erwin, D. C., and Zentmyer, G. A. 1975a. An improved synthetic medium for oospore production and germination of several *Phytophthora* species. Mycologia 67:1012-1019.
- Ribeiro, O. K., Zentmyer, G. A. and Erwin, D. C. 1975b. Comparative effects of monochromatic radiation on the germination of three *Phytophthora* species. Phytopathology 65:904-907.

- Ribeiro, O. K., Zentmyer, G. A. and Erwin, D. C. 1976. The influence of qualitative and quantitative radiation on reproduction and spore germination of four *Phytophthora* species. *Mycologia* 68:1162-1173.
- Ricci, P., Trentin, F., Bonnet, P., Venard, P., Mouton-Perronnet, F. and Btuneteau, M. 1992. Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. *Plant Pathology* 41 : 298 - 307.
- Romano, M. L., and Garibaldi, A. 1984. Biological characteristics of *Phytophthora capsici* Leonian strains resistant to acylalanine obtained in the laboratory. *Difesa della Plante* 3: 145-152.
- Rosenbaum, J. 1917. Studies of the genus *Phytophthora*. *J. Agric. Res.* 8:233-276.
- Sansome, E. and Brasier, C. M. 1974. Polyploidy associated with varietal differentiation in the *megasperma* complex of *Phytophthora*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 63:461-467.
- Schwinn, F. J. 1965. Untersuchungen zum Wirt-Parasit-Verhältnis bei der Kragefaule des Apfebaumes (*Phytophthora cactorum*) und zu ihrer Bekämpfung. III. Die Eignung verschiedener Grundungungspflanzen zur Bekämpfung des Erregers im Boden. *Phytopathol. Z.* 54:258-274.
- Seemuller, E. and Sun, C. 1989. Occurrence of metalaxyl resistance in *Phytophthora fragariae*. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 41 :71-73.
- Serrhini, N., Maraite, H. and Meyer, J. A. 1985. *In vitro* selection of *Phytophthora citrophthora* strains resistant to metalaxyl. *EPPO Bulletin* 15 :443-449.
- Shattock, R. C. 1988. Studies on the inheritance of resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 37:4-11.
- Shattock, R. C., Shaw, D. S., Fyfe, A. M., Dunn, J. R., Loney, K. H. and Shattock, J. A. 1990. Phenotypes of *Phytophthora infestans* collected in England and Wales from 1985 to 1988: Mating type, response to metalaxyl and isoenzyme analysis. *Plant Pathology* 39: 242-248.
- Shaw, D. S. 1967. A method of obtaining single-oospore cultures of *Phytophthora cactorum* using live water snails. *Phytopathology* 57-454.
- Shew, H. D. 1984. *In vitro* growth response of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* isolates to metalaxyl. *Plant Disease* 68 :764-766.
- Shew, H. D. 1985. Response of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* to metalaxyl exposure. *Plant Disease* 69 :559-562.

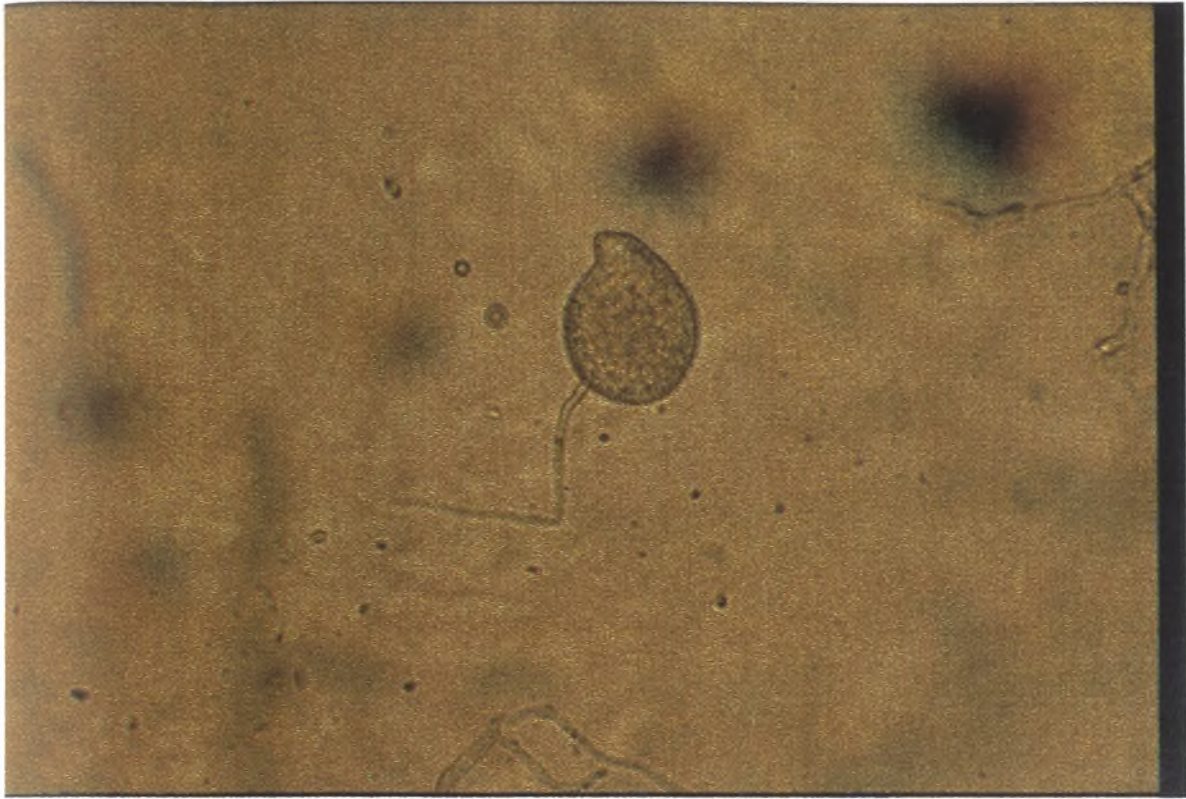
- Stack, J. P. and Millar, R. L. 1985. Isolation and characterization of a metalaxyl-insensitive isolate of *Phytophthora megasperma* f.sp. *medicafinis*. *Phytopathology* 75 :1387-1392.
- Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J. and Hallo, G. S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. *Mycological Papers*. No. 162.
- Staub, T. and Sozzi, D. 1981. Resistance to metalaxyl in practise and consequences for its use. *Phytiartie-Phytopharmacie* 30 :283-291.
- Staub, T. H. and Young, T. R. 1980. Fungitoxicity of metalaxyl against *Phytophthora parasitica* var *nicotianae*. *Phytopathology* 70: 797-801.
- Timmer, L. W., Graham, J. H. and Zitko, S. E. 1998. Metalaxyl resistant isolates of *Phytophthora nicotianae*: occurrence, sensitivity, and competitive parasitic ability on citrus. *Plant Disease* 82 : 254-261.
- Tompkins, C. M. and Tucker, C. M. 1947. Stem rot of *Dieffenbachia picta* caused by *Phytophthora palmivora* and its control. *Phytopathology* 37: 868-874.
- Tsao, P. H. 1971. Chlamyospore formation in sporangium-free liquid cultures of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology* 61:1412-1413.
- Tucker, C. M. 1931. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. *Mo. Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 153: 208.
- Urech, P. A., Schwinn, F. and Staub, T. 1977. CGA 48988, a novel fungicide for the control of late blight, downy mildews and related soil-borne diseases. *Proc. Br. Crop Prot. Conf.*, 9th 2: 623-631.
- Utkhede, R. S. and Gusta, V. K. 1988. *In vitro* selection of strains of *Phytophthora cactorum* resistant to metalaxyl. *Journal of Phytopathology* 122 :35-44.
- Vigo, M., Romano, M. L. and Gullino, M. L. 1986. Biological characters of phenylamide-resistant isolates of *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* obtained in the laboratory. *Atti Giornate Gitopatologiche* 2: 347-358.
- Ward, E. W. B., Lazarovits, G., Stossel, P., Barrie, S. D. and Unwin, C. H. 1980. Glyceollin production associated with control of *Phytophthora* rot of soubeans by the systemic fungicide, metalaxyl. *Phytopathology* 70: 738-740..
- Waterhouse, G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Commonw. Mycol. Inst.*, Kew, Surrey, England. *Micologia* 92: 22 .
- Yoshikawa, M., Tanaka, H., Miyata, Y. and Masago, H. 1976. Evaluation by specific inhibitions of metabolic dependence of asexual differentiation processes in *Phytophthora capsici*. *Sci. Rep. Kyoto Prefect. Univ. Agric.* 28:57-62.

- Yuanchao, W., Xiaobo, Z., Yonggang, H. and Jiayun, L. 1997. Inheritance of resistance of *Phytophthora* spp. to cymoxanil and its cross-resistance to cymoxanil and metaxyl. *Plant Protection* 23 : 7-10.
- Zaviezo, T., Latorre, B. A. and Torres, R. 1993. Effectiveness of three phenylamide fungicides against *Phytophthora cryptogea* isolated from kiwi and their mobility in soil. *Plant Disease* 77: 1239-1243.
- Zhimou, G., Xiaobo, Z. and Jiayun, L. 1997. On inheritance of resistance of *Phytophthora boehmeriae* to metalaxyl. *Journal of Nanjing Agricultural University* 20: 54-59.

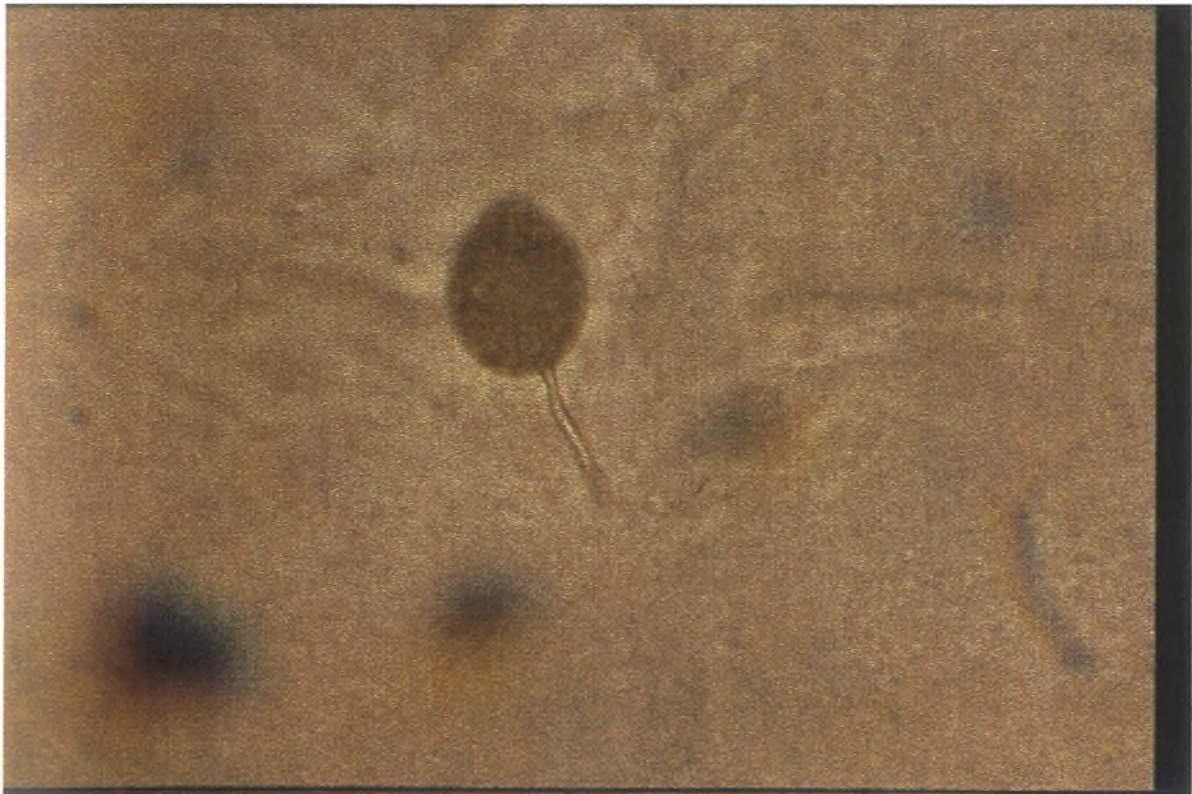
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (ΕΛΛΗΝΙΚΗ)

- Γεωργόπουλος, Σ. Γ. 1984. Βασικές γνώσεις φυτοπαθολογίας. Αθήνα.
- Γεωργόπουλος, Σ. Γ. και Ζιώγας, Β. Ν. 1992. Αρχές και Μέθοδοι καταπολέμησης των ασθενειών των φυτών. Αθήνα.
- Ελένα, Κ. 1999. Μύκητες του γένους *Phytophthora* στην Ελλάδα. Είδη - Ασθένειες (Τεχνικό Δελτίο αρ. 13). Μπενάκειο φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Κηφισιά, Αθήνα.
- Ζάχος, Δ. Γ., Παναγόπουλος, Χ. Γ., Θανασουλόπουλος, Κ. Κ., Μπίρης, Δ. Α. και Κυριακοπούλου, Π. Η. 1984. Λεξικό φυτοπαθολογικών όρων. Αθήνα.
- Κουγέα, Η. και Χιτζανίδου, Α. 1968. Παρατηρήσεις επί ελληνικών ειδών του γένους *Phytophthora*. *Χρονικά Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου* 8: 183 - 201.
- Κουλούρης, Α. Ρ. 1996. Προσδιορισμός των ειδών του γένους *Phytophthora* σε απομονώσεις του παθογόνου από φυτά ανθουρίου και διεφφενμπάχιας. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
- Παναγόπουλος, Χ. Γ. 1997. Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου, Αθήνα.
- Παναγόπουλος, Χ. Γ. 2000. Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών, Αθήνα.
- Παππάς, Α. Χ. και Ψαλίδας, Π. 1998, Χημική αντιμετώπιση των ασθενειών των Φυτών: Ανασκόπηση - Προοπτικές. Πρακτικά 2ης Πανελλήνιας συνάντησης Φυτοπροστασίας Λάρισα.

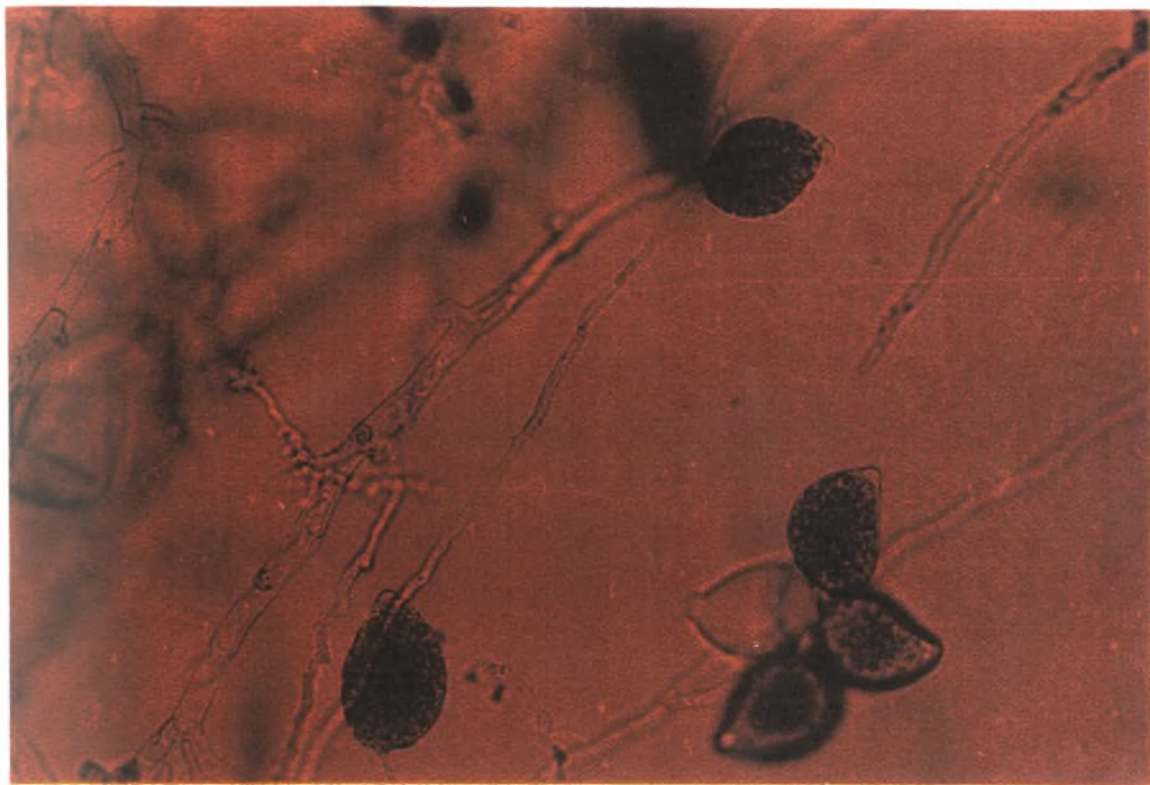
**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ
ΕΙΚΟΝΩΝ**



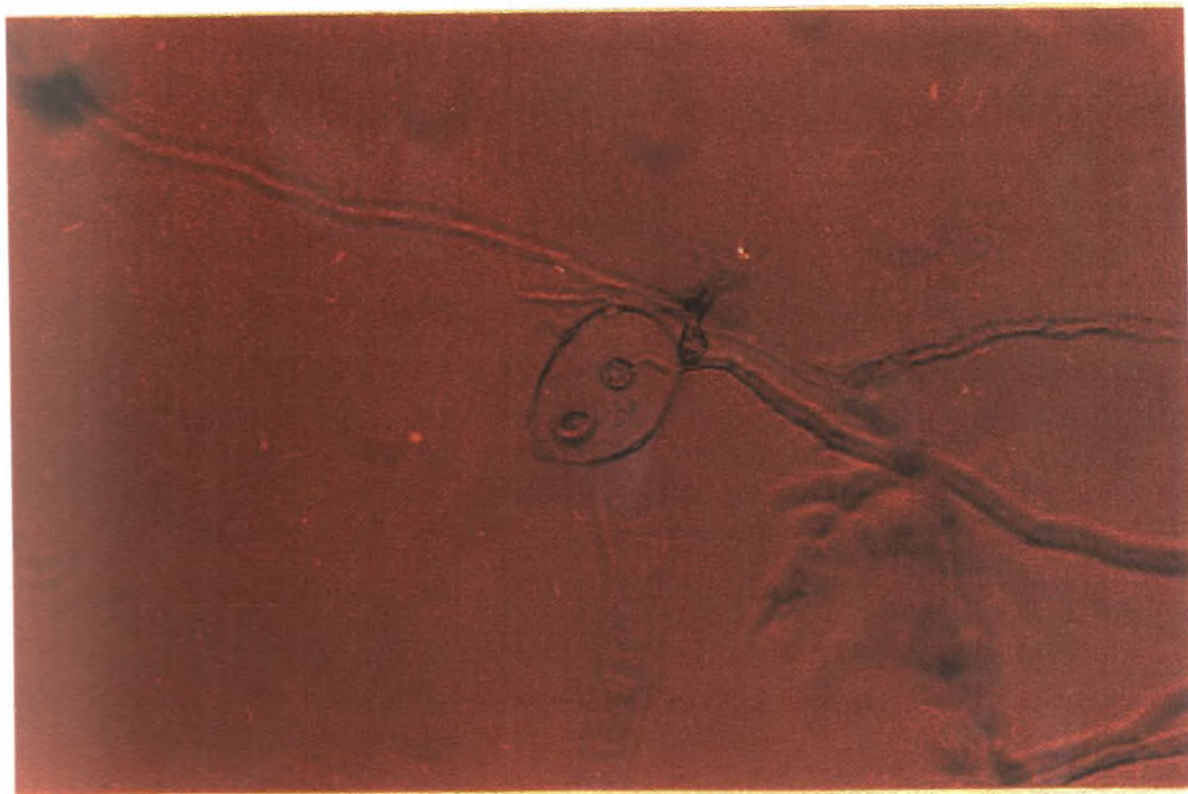
Εικόνα 1
Σποριάγγειο αποκοπτόμενο με μίσχο που φέρει ευδιάκριτη θηλή



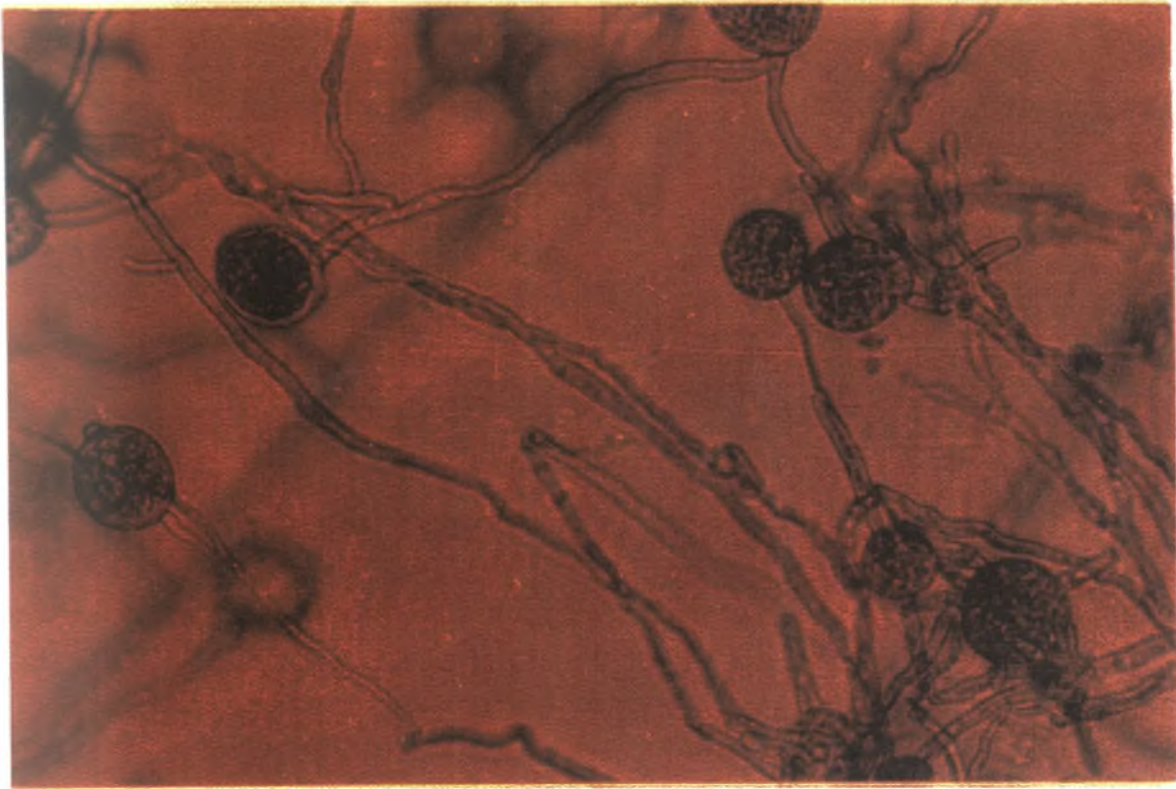
Εικόνα 2
Σποριάγγειο αποκοπτόμενο με μίσχο που φέρει ευδιάκριτη θηλή



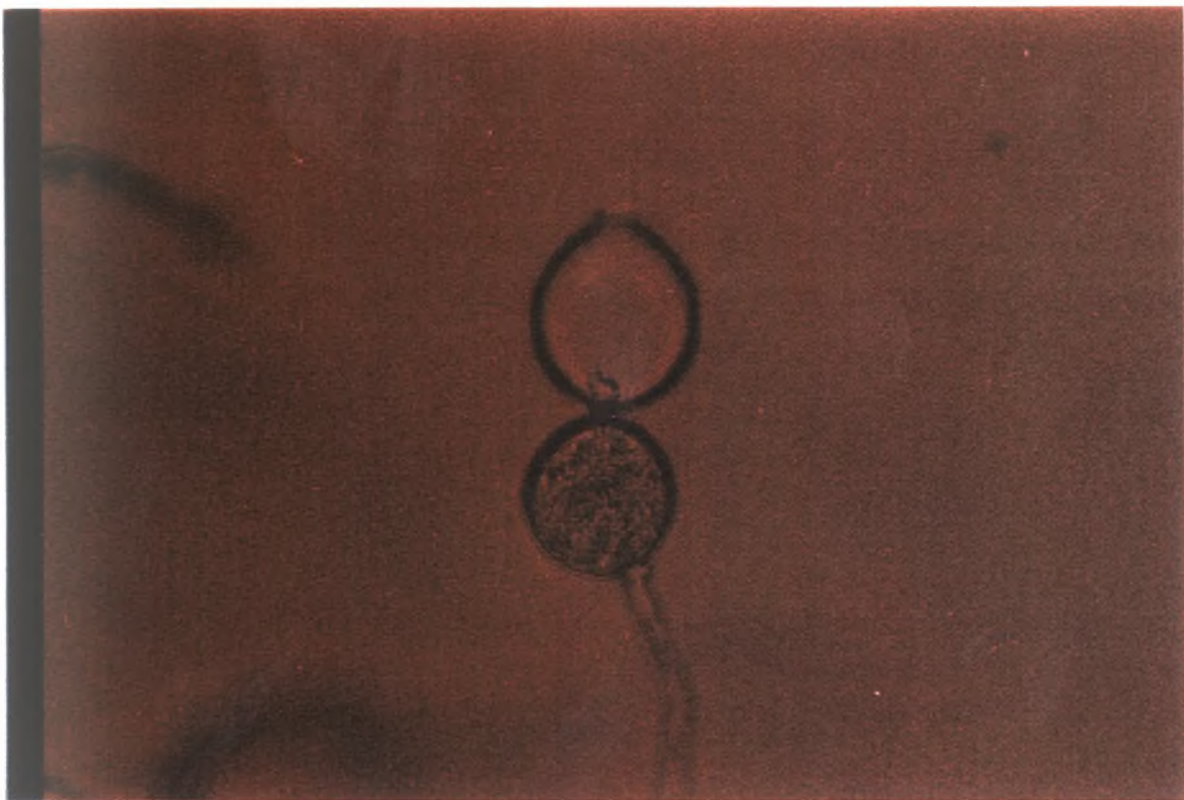
Εικόνα 3
Σποριάγγεια σε απλό συμπόδιο



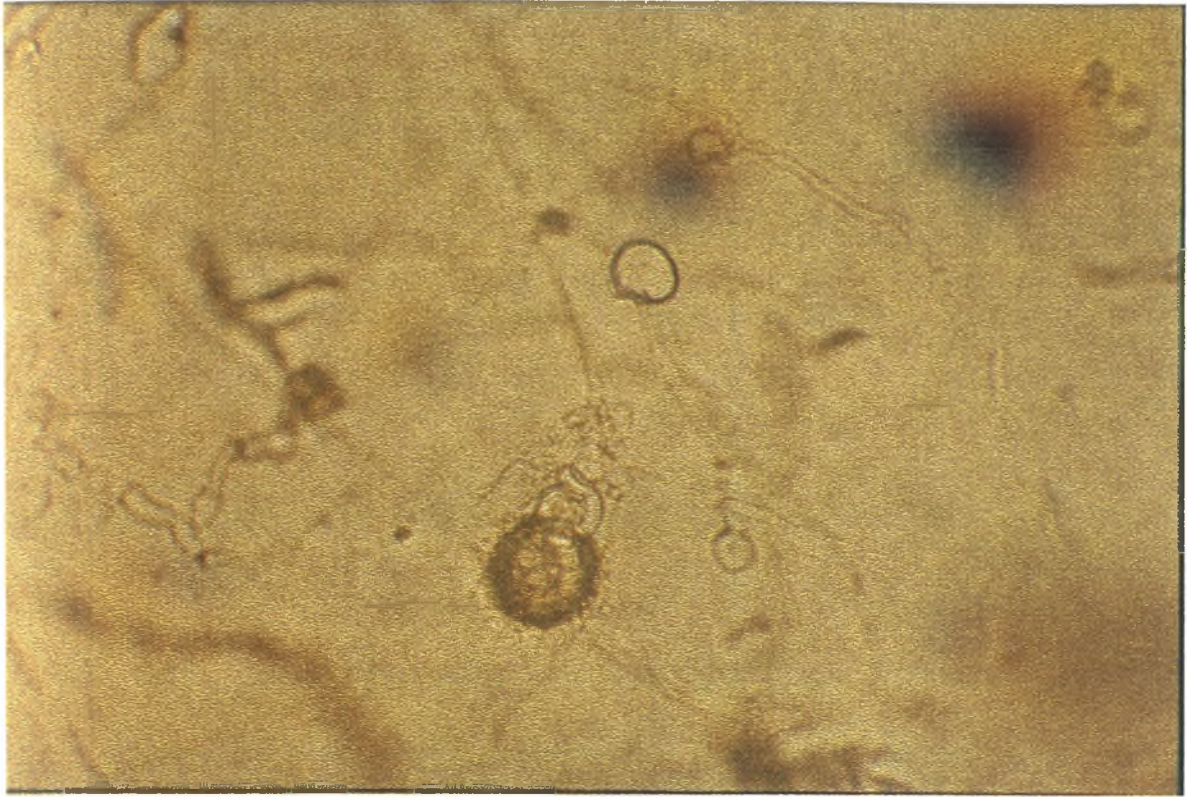
Εικόνα 4
Απελευθέρωση ζωοσπορίων ενός σποριαγγείου



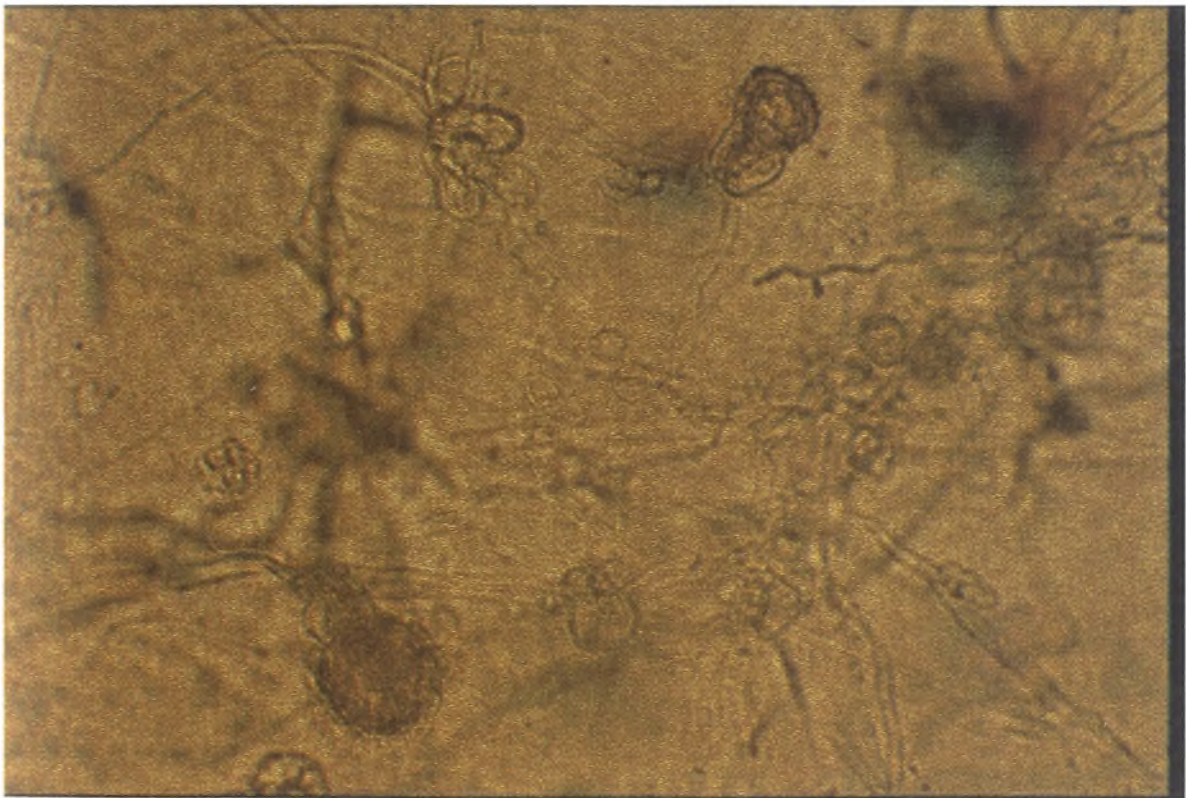
Εικόνα 5
Σφαιρικά χλαμυδοσπόρια επάκρια ή ενδιάμεσα



Εικόνα 6
Βλάστηση χλαμυδοσπορίου απευθείας σε σποριάγγειο



Εικόνα 7
Ωοσπόριο με αμφίγυνο ανθηρίδιο



Εικόνα 8
Ωοσπόρια με αμφίγυνα ανθηρίδια



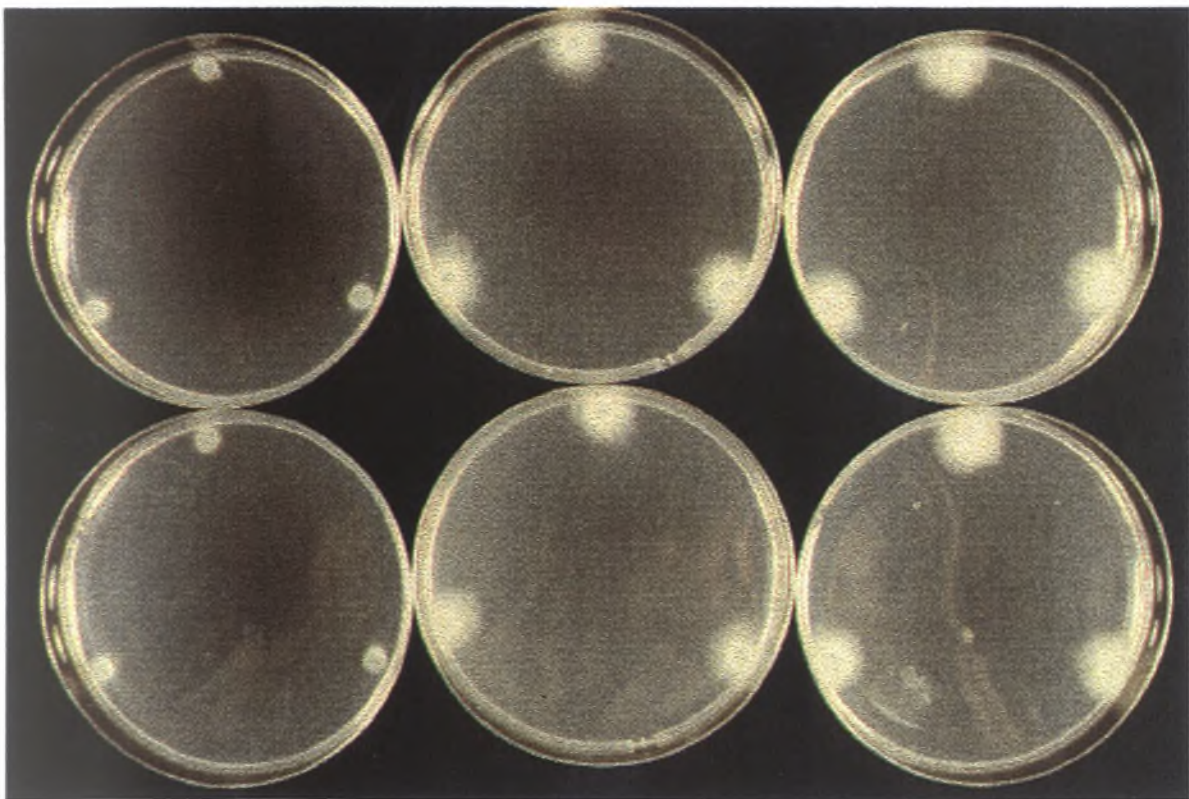
Εικόνα 9
Συμπτώματα του μύκητα *Phytophthora* σε φυτά διεφφενμπάχιας



Εικόνα 10
Ζημιές του μύκητα *Phytophthora* σε καλλιέργεια διεφφενμπάχιας



Εικόνα 11
Μορφή της αποικίας του μύκητα Phytophthora σε υλικό "Malt Extract Agar"



Εικόνα 12
Ανάπτυξη μυκηλίου με προσθήκη metalaxyl σε συγκεντρώσεις 0,01 και 0,1mg/l