

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ Α. ΜΠΕΣΑ

Βιοθεσμικές ιδιότητες στελεχών *Botrytis cinerea*  
με ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά  
και φαιλυλοκαρβαμικά μυκητοκτόνα



Πτυχιακή μελέτη που υποβάλλεται στο  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ  
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΒΟΛΟΣ 1995



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

Αριθ. Εισ.: 71/1

Ημερ. Εισ.: 02-09-2003

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΓΦΖΠ

1995

ΜΠΕ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070130

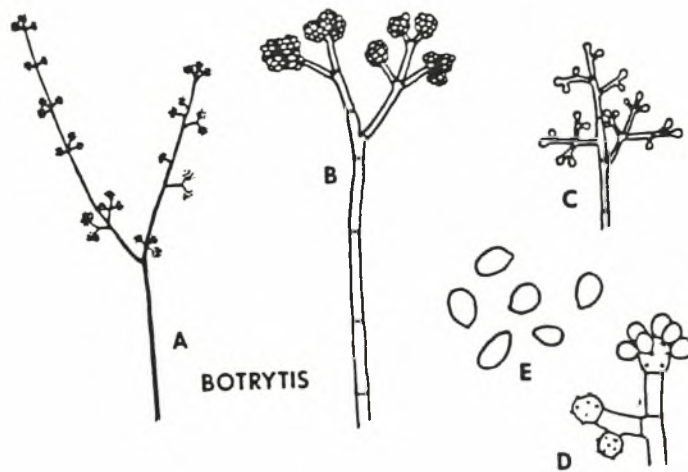
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΘΕΜΑ : ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *Botrytis cinerea*  
ΜΕ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΒΕΝΖΙΜΙΔΑΖΟΛΙΚΑ  
ΚΑΙ ΦΑΙΝΥΛΟΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

Πτυχιακή μελέτη  
της  
Παναγιώτα Α. Μπέσα

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΟΤΡΟΠΗ  
Εισηγητής : Α.Χ. Παππάς  
Ι. Τσιτσιλής  
Π. Λόβας

ΒΟΛΟΣ 1995



**Εικόνα εξώφυλλου :** Δομικές κατασκευές του μύκητα *Botrytis cinerea*.

(A,B) κονιδιοφόροι και κονίδια

(C,D) ανώτερο τμήμα κονιδιοφόρου που δείχνει μεγενθυμένο κύτταρο γένεσης κονιδίων

(E) κονίδια

(κατά Barnett και Hunter , 1987)

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	5
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	6
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b> .....	9
<b>ΜΕΡΟΣ Α' : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ</b>	
ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ - ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ .....	12
ΞΕΝΙΣΤΕΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ .....	14
ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ .....	16
ΑΝΑΠΤΥΞΗ .....	18
ΜΟΛΥΝΣΗ .....	20
ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ .....	22
ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ .....	25
ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ .....	27
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ .....	29
ΑΜΥΝΑ ΞΕΝΙΣΤΟΥ .....	30
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ .....	31
ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ .....	33
ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΒΕΝΖΙΜΙΔΑΖΟΛΙΚΑ ΚΑΙ ΦΑΙΝΥΛΟΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ .....	35
<b>ΜΕΡΟΣ Β' : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ</b>	
ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>BOTRYTIS CINEREA</i> .....	49
ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΒΕΝΖΙΜΙΔΑΖΟΛΙΚΑ ΚΑΙ ΦΑΙΝΥΛΟΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ .....	52
ΕΞΕΤΑΣΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΩΝ .....	57
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΗΚΗΛΙΟΥ .....	64
ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΟΣ .....	72
<b>ΜΕΡΟΣ Γ' : ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ</b>	
ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	76

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του αναπληρωτού καθηγητού φυτοπαθολογίας Δρ. Α. Χ. Παππά.

Για την παραχώριση του εργαστηρίου την διάθεση βιβλιογραφίας και την διόρθωση της μελέτης, ευχαριστώ τον Δρ. Α. Χ. Παππά.

Ευχαριστώ επίσης τους Δρ. Μπίρη φυτοπαθολόγο διευθυντή του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Βόλου για την δυνατότητα πρόσβασης στην βιβλιοθήκη του Ινστιτούτου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν οι επιδράσεις των βενζιμιδαζολικών και φαίνυλοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων στις βιολογικές ιδιότητες του παθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* καθώς επίσης και η αποτελεσματικότητά τους στην καταπολέμηση του.

Η έμφαση δόθηκε, στην εξέταση των βιολογικών ιδιοτήτων των ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά και φαίνυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα στελεχών του *Botrytis cinerea* σε σύγκριση πάντα με τα ευαίσθητα.

Η μελέτη αποτελείται από τρία μέρη : το βιβλιογραφικό, το πειραματικό και το συνθετικό.

Το βιβλιογραφικό μέρος περιλαμβάνει μια ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, επάνω στην ταξινόμηση και την βιολογία του παθογόνου και την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του *Botrytis cinerea* στα διάφορα μυκητοκτόνα σκευάσματα και ιδιαίτερα στα βενζιμιδαζολικά και φαίνυλοκαρβαμιδικά.

Στο τμήμα αυτό της μελέτης δίνεται μία όσο το δυνατόν ακριβής περιγραφή της μορφολογίας και της ανατομίας του *Botrytis cinerea* καθώς και ποιές συνθήκες του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, υγρασία, φώς κ.α.), συνδούν την μόλυνση από όργανα του μύκητα (μυκήθιο, κονίδια, σκληρώτια), την διεύδυση της μυκηθιακής υφής στο εσωτερικό του ξενιστή και την περετέρω ανάπτυξη του παθογόνου. Στη συνέχεια περιγράφονται τα συμπτώματα που εμφανίζονται στα διάφορα φυτικά όργανα μετά την εγκατάσταση του παθογόνου και δίνονται στοιχεία σχετικά με την παθογένεση την επιδημιολογία του μύκητα και την άμυνα των ξενιστών. Τέλος αναφέρονται δεδομένα για την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου στα μέσα χημικής καταπολέμησης που διαθέτουμε και ιδιαίτερα στα βενζιμιδαζολικά και φαίνυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα.

Στο πειραματικό μέρος έγινε κατάταξη στελεχών *Botrytis cinerea* βάση του επιπέδου ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαίνυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα. Στελέχη που αναπτύχθηκαν επάνω σε εμπλουτισμένο υπόστρωμα με συγκεντρώσεις 0, 1, 100mg/ml των ανωτέρω μυκητοκτόνων, χαρακτηρίσθηκαν σαν ευαίσθητα, μετρίως ανθεκτικά και ανθεκτικά.

Έγινε πείραμα σύγκρισης των μορφολογικών χαρακτήρων (ανάπτυξη μυκηθίου, σποριοπαραγωγή, σχηματισμός σκληρωτίων) των ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών. Τα ανθεκτικά στελέχη γενικά, εμφανίζουν μικρότερη ανάπτυξη μυκηθίου και παραγωγή κονιδίων και καλύτερο σχηματισμό σκληρωτίων σε σχέση με τα ευαίσθητα.

Σε πείραμα μέτρησης της παθογόνου ικανότητας, αυτή εκτιμήθηκε από τον αριθμό σπορίων που παράχθηκαν επάνω σε πέταλα τριανταφυλλιάς, τα οποία είχαν μολυνθεί με σπόρια παθογόνων στελεχών *Botrytis cinerea*. Τα ανθεκτικά στελέχη φαίνονται να έχουν μεγαλύτερη παθογόνο δύναμη από τα ευαίσθητα.

Το συμπέρασμα είναι ότι τα ανθεκτικά στελέχη στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα που εμφανίζουν μειωμένη ανάπτυξη του μυκηθίου και παραγωγή σπορίων εμφανίζουν καλύτερο σχηματισμό σκληρωτίων και μεγαλύτερη της παθογόνο ικανότητα. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα ανθεκτικά στελέχη έχουν αναπτύξει καλή προσαρμοστικότητα.

Το συνθετικό μέρος αποτελείται από τη συζήτηση και τα συμπεράσματα. Γίνεται η σύνθεση των συμπερασμάτων των πειραμάτων που έγιναν και των δεδομένων από πρόσφατες σχετικές μελέτες ερευνητών, που αναφέρθηκαν στο βιβλιογραφικό μέρος. Βασικό συμπέρασμα της όλης εργασίας, αποτελεί η πεποίθηση πως η εμφάνιση στελεχών *Botrytis cinerea* ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα καθώς και σε μίγματα αυτών, σε συνθήκες αγρού είναι γεγονός. Η υψηλή συχνότητα ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά δείχνει ότι περιορισμοί των εφαρμογών τους είναι στρατηγικές κατά της απόκτησης ανθεκτικότητας. Δίνεται έμφαση στην επείγουσα χρήση νέων χημικών ενώσεων, καθιερωθεισών πρακτικών και χρήση παραχόντων βιοελέγχου, για μείωση της ανθεκτικότητας και ολοκληρωμένης αντιμετώπισης του βοτρυτή σε συνθήκες αγρού.





Εκόνα 1 : Καρποφορίες του *Botrytis cinerea* πάνω σε κόρπους σπορουλίων



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η ασθένεια που είναι γνωστή και σαν τεφρά σήψη, σαπίλα ή γκριζομούχλα (grey mould) που οφείλεται σε προσβολή από το μύκητα *Botrytis cinerea*, έχει παγκόσμια εξάπλωση και προσβάλλει όλα σχεδόν τα καλλιεργούμενα φυτά (καρποφόρα δένδρα και θάμνους, αμπέλι, κηπευτικά, βιομηχανικά, καλληπιστικά). Ο παθογόνος μύκητας αναπτύσσεται επάνω σε υγιείς, χερασμένους, εξασθενημένους ή νεκρούς φυτικούς ιστούς, προσβάλλει φυτά κάθε ηλικίας, όλα σχεδόν τα φυτικά όργανα και προκαλεί αναλόγως του είδους και της ηλικίας των ιστών και των συνθηκών του περιβάλλοντος, συμπτώματα διαφόρων τύπων (κηλιδώσεις φύλλων, ανθέων και καρπών, έλκη βλαστών, σήψεις καρπών, ανθέων, κονδύλων, φυταρίων).

Κάτω από συνθήκες υψηλής υγρασίας ο μύκητας παράγει αχενώες καρποφορίες που εμφανίζονται σαν σταχτιά μούχλα, επάνω στους προσβεβλημένους ιστούς. Αυτό είναι χαρακτηριστικό σύμπτωμα των προσβολών *Botrytis cinerea* (εικόνα 1).

Η ανάπτυξη του μύκητα ευνοείται γενικά από συνθήκες υψηλής υγρασίας 90-98% και θερμοκρασίας 17-23°C και κατά συνέπεια οι ζημιές στην παραγωγή των διαφόρων καλλιεργειών είναι πάρα πολύ μεγάλες όταν επικρατούν τέτοιες συνθήκες. Στη χώρα μας αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες κυπευτικών και ανθέων. Γενικά η τεφρά σήψη είναι μια από τις πλέον διαδεδομένες και μεγάλης οικονομικής σημασίας αρρώστια των φυτών στις περιοχές που επικρατούν οι κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξή της.

Η αντιμετώπιση της τεφράς σήψης, συνίσταται στη λήψη όλων εκείνων των απαραίτητων μέτρων τα οποία συντελούν στη δημιουργία συνθηκών τέτοιων που δεν ευνοούν την ανάπτυξη και εξάπλωση της ασθένειας (καλός αερισμός θερμοκηπίων, αφαίρεση και απομάκρυνση των προσβεβλημένων καρπών, ανθέων, φύλλων, στελεχών, ολόκληρων φυτών κλπ.) Αντιμετωπίζεται με βιολογική καταπολέμηση (χρήση βιολογικών σκευασμάτων με βάση στελέχη του μύκητα *Trichoderma spp.* ανθεκτικά στο benomyl), καθώς και

με εφαρμογή σωστής χημικής καταπολέμησης.

Τα χρησιμοποιούμενα για την καταπολέμηση της βοτρυτίδας προστατευτικά μυκητοκτόνα χαρακτηρίζονται ως μετρίως αποτελεσματικά.

Η εισαγωγή εκλεκτικών μυκητοκτόνων στην καταπολέμηση της βοτρυτίδας έδωσε καλύτερα αποτελέσματα.

Σήμερα λόγω της συνεχούς χρήσης αυτών των μυκητοκτόνων, έχουμε εμφάνιση και επικράτηση ανθεκτικών στελεχών *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά και δικαρβοξυμιδικά μυκητοκτόνα.

Μετά από έρευνες βρέθηκε επαναδραστηριοποίηση των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων με την ανάμειξη τους με διάφορα μυκητοκτόνα της ομάδας των καρβαμιδικών. Η επαναδραστηριοποίηση αυτή οφείλεται στο φαινόμενο της αρνητικής διασταυρούμενης ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν κυρίως τα φαινυλοκαρβαμιδικά παράγωγα με τα βενζιμιδαζολικά.

Ο σκοπός της μελέτης αυτής, είναι η κατανόηση της απόκτησης ανθεκτικότητας και ειδικότερα των ανθεκτικών στελεχών του *B. cinerea*, στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα. Επίσης εξετάζεται η προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών και πως αυτή μπορεί να ελεγχθεί. Αναφέρονται οι μέθοδοι παράτασης της χρήσιμης ζωής των βενζιμιδαζολικών και φαινυλοκαρβαμιδικών και της εξασφάλισης αποτελεσματικού ελέγχου του παθογόνου με τη συνδυασμένη καταπολέμηση του. Για καλύτερη κατανόηση του ζητήματος, η μελέτη δίνει βιβλιογραφικά στοιχεία, σχετικά με την ταξινόμηση, φυσιολογία, συμπτωματολογία και επιδημιολογία του παθογόνου, καθώς και τα προβλήματα που εμφανίζει η χημική καταπολέμηση του.

(Ζιώγας 1981, Μπούρπος και Σκουντριδάκης 1987, Παναχόπουλος 1993, Παππάς 1992).

ΜΕΡΟΣ Α'

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

## ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ – ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Σαν αίτιο της ασθένειας που είναι κυρίως γνωστή σαν τεφρά σήψη, σαπίλα ή γκρίζα μούχλα (grey mould) αναφέρεται ο μύκητας *Botrytis cinerea*. Αυτή είναι και η ατελής μορφή του μύκητα. Η τέλεια μορφή του είναι γνωστή με το όνομα *Botryotinia fuckeliana*. (de Bary) Whetzel, και σχηματίζεται από τα σκληρώτια του μύκητα τα οποία βλαστάνονται, κάτω από ειδικές συνθήκες, παράχουν αποθήκια. Η τέλεια μορφή του παθογόνου ποθύ σπάνια εμφανίζεται στην φύση.

Η ταξινόμηση του μύκητα *Botrytis cinerea* αποσχολεύσε τους ερευνητές, από τα μέσα του περασμένου αιώνα.

Το γένος *Botrytis* είναι από τα πρώτα γνωστά γένη φυτοπαθογόνων μυκήτων (δημιουργήθηκε το 1729 από τον P.A. Micheli) και χαρακτηρίζεται για τη μεγάλη παραλλακτικότητα των ειδών και των στελεχών που περιλαμβάνονται σε κάθε είδος.

Το γένος *Botryotinia*, ο Whetzel(1945), το περιλαμβάνει στην οικογένεια Sclerotinaceae, που εγκαθίδρυσε ο ίδιος, τα γένη της οποίας διαχώρισε, χρησιμοποιώντας σαν βασικό κριτήριο την ανατομία του το στρώμα (stroma).

Ταξινομώντας το παθογόνο αίτιο της τεφράς σήψης με βάση την ατελή ή κονιδιακή μορφή, έχουμε την εξής συστηματική κατάταξη:

- Βασίλειο : Φυτικό
- Φύλο : Μύκητες (Mycophyta, Fungi)
- Κλάση : Αδηλομύκητες ή δευτερομύκητες ή ατελείς μύκητες
- Τάξη : Moniliales
- Οικογένεια : Botrytidaceae
- Γένος : Botrytis
- Είδος : cinerea

Ταξινομώντας με βάση την τέλεια μορφή έχουμε την εξής συστηματική κατάταξη :

Βασίλειο : Φυτικό  
 Φύλο : Μύκητες  
 Κλάση : Ασκομύκητες (Ascomycetes)  
 Υποκλάση : Δισκομύκητες  
 Τάξη : Helotiales  
 Οικογένεια : Sclerotiniaceae  
 Γένος : Botryotinia  
 Είδος : fuckeliana

Κατά τον Γεωργόπουλο (1984), οι ατελείς μύκητες, των οποίων είναι γνωστή η εχθρής αναπαραγωγή, θα πρέπει να αναφέρονται με το όνομα της τέλειας μορφής σύμφωνα με το Διεθνή κώδικα Ονοματολογίας. Εν' τούτοις, επειδή πολλών μυκήτων η ατελής μορφή είναι η πιο συχνή και εκείνη, που βρίσκουμε πιο εύκολα πάνω στα προσβεβλημένα φυτά, επιτρέπεται και η χρήση του ονόματος της ατελούς μορφής.

Σύμφωνα με τα ανωτέρω, για το παθογόνο αίτιο της τεφρής σήψης, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε και τους δύο τρόπους ταξινόμησης, ή έναν από τους δύο. Στην βιβλιογραφία επικρατεί η ταξινόμηση της ατελούς μορφής.

(Γεωργόπουλος 1984, Δημητριάδης 1987, Jarvis 1977, Παναχόπουλος 1985)

## ΞΕΝΙΣΤΕΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Η τεφρά σήψη, βοτρύτιδα ή γκρίζα μούχλα, οφείλεται στον μύκητα *Botrytis cinerea*. Είναι μια από τις πλέον διαδεδομένες και μεγάλης οικονομικής σημασίας αρρώστιες των φυτών στις περιοχές που επικρατούν συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας. Στη χώρα μας αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες κηπευτικών και ανθέων κατά τη χειμερινή περίοδο, λόγω εντόνων προσβολών και δυσχεριών στην αντιμετώπισή του.

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* είναι ένα πολύ διαδεδομένο και πολυφάγο παράσιτο, το οποίο μπορεί να ζει τόσο σαπροφυτικά όσο και παρασιτικά ή ημιπαρασιτικά. Αν και είναι παράσιτο περισσότερο αδυναμίας μπορεί να προξενήσει τεράστιες ζημιές κάτω από ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης.

Στη διεθνή βιβλιογραφία τα είδη του γένους *Botrytis*, αναφέρονται σαν σαπρόφυτα ή παράσιτα σε 235 και πλέον ξενιστές που ανήκουν σε διαφορετικές βοτανικές οικογένειες. Εξειδίκευση του είδους *B. cinerea* στην προσβολή ορισμένου ξενιστή δεν θεωρείται ότι υπάρχει. Πάντως έχουν αναφερθεί διαφορές στην παθογένεια μεταξύ απομονώσεων από διαφορετικούς ξενιστές.

Ο μύκητας προσβάλλει καλλιέργειες όπως τομάτα, αχχούρι, πιπεριά, μελιτζάνα, μαρούλι, σέλινο, φράουλα, τεύτλο, λάχανο, κρεμμύδι κ.α., διάφορα ανθοκομικά και καλλιπωπιστικά φυτά όπως χαρύφαλλο, τριαντάφυλλο, αζαλέα, χρυσάνθεμο κ.α. Προσβάλλει το αμπέλι και καρποφόρα δένδρα.

Οι ζημιές διακρίνονται σε ποιοτικές και ποσοτικές ανάλογα με τον ξενιστή και τις συνθήκες που ακολουθούν τη μόλυνση.

Ιδιαίτερα στα κηπευτικά η βοτρύτιδα προξενεί μεγάλες ζημιές, ιδίως μετά από βροχή, δροσιά, ή πυκνή ομίχλη πριν τη συγκομιδή και δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στις εξαχωχές λόγω υποβάθμισης της ποιότητας των προϊόντων. Στις καλλιέργειες θερμοκηπίου (τομάτα, αχχούρι, μελιτζάνα, πιπεριά κ.α.) όπου δημιουργούνται ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας για την ανάπτυξη του μύκητα, η βοτρύτιδα προσβάλλει τα στελέχη, τα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς όπου προκαλεί χαρακτηριστικές κηλίδες σήψεως και ολοκληρωτική εξασθένηση των φυτών, με αποτέλεσμα τη σοβαρή μείωση της παραγωγής.

Ο μύκητας σε θερμοκρασίες μικρότερες των 10°C προσβάλλει τα σπορόφυτα βαλβιδών λαχανικών (κρεμμύδι κ.α.) στην περιοχή του λαιμού καθώς τα φύλλα εξέρχονται από το έδαφος και τα ξηραίνει.



Τα φυλλώδη λαχανικά (μαρούλι, αγκινάρα, ραδίκι, κ.α.) προσβάλλονται σε όλα τα στάδια ανάπτυξής τους. Στο μαρούλι το παθογόνο προκαλεί κυρίως μαλακή σήψη των κεφαλών.

Εντονες προσβολές παρατηρούνται και στα ψυχανθή (φασόλια, κουκιά).

Στη φράουλα η μόλυνση αρχίζει κατά την περίοδο της άνθησης και στη συνέχεια προκαλείται σήψη καρπών και σημαντική μείωση της παραγωγής.

Στις καλλιέργειες τεύτων σποροπαραγωγής παρατηρούνται προσβολές στις ταξιανθίες από την άνθηση μέχρι την ωρίμανση.

Σε παγκόσμια κλίμακα, η βοτρυτίδα στο αμπέλι προξενεί σοβαρές ζημιές που επιφέρουν μείωση της παραγωγής που κυμαίνεται από 10% έως 50%. Η ασθένεια αποτελεί σοβαρό πρόβλημα για την αμπελοκαλλιέργεια στις περιοχές των χωρών εκείνων που επικρατούν υδροθερμικές κλιματολογικές συνθήκες. (Γαλλία, Ιταλία, Ισπανία, Ουγγαρία, Καλιφόρνια, κ.α.). Στη χώρα μας η οποία χαρακτηρίζεται από ξηροθερμικό κλίμα η ένταση προσβολής των αμπέλων από τη βοτρυτίδα εξαρτάται από την ένταση και τη συχνότητα των βροχών κυρίως κατά τη φθινοπωρινή περίοδο.

Η έντονη προσβολή των ραχών στο αμπέλι συντελεί σε υποβάθμιση της ποιότητας των επιτραπέζιων σταφυλιών και του παραχόμενου χιεύκου. Κατ' εξαίρεση, σε ορισμένες περιπτώσεις επωνύμων οίνων (Sauternes Γαλλίας, Tokays Ουγγαρίας), η ύπαρξη μικρής προσβολής των ραχών από βοτρυτίδα είναι επιθυμητή και είναι γνωστή σαν ευγενής σήψη (noble rot).

Στα ανθοκομικά φυτά (τριαντάφυλλα, κυκλάμινα, κ.α.) προκαλεί κηλίδωση ή σήψη των ανθέων που τα καθιστά ακατάλληλα για εμπορία.

Σημαντικής οικονομικής σημασίας είναι επίσης οι μετασπληκτικές σήψεις καρπών και ανθέων (ακτινίδιο, φράουλα, μήλα, σταφύλια, τριαντάφυλλα), κατά τη μεταφορά ή αποθήκευση εντός ψυκτικών θαλάμων. Επάνω στους καρπούς ή άνθη, παρατηρείται μαλακή σήψη που χαρακτηρίζεται από στρογγυλές καστανές κηλίδες. Η μόλυνση στους καρπούς αυτούς γίνεται από πληγές και μεταδίδεται εύκολα λόγω της επαφής των ανθέων με τους υγρούς καρπούς.

Ευάλωτα στην προσβολή είναι επίσης τα μοσχεύματα ή νεαρά φυτάρια διαφόρων ξενιστών κατά το στάδιο της ριζοβολίας και της πρώτης ανάπτυξης. Προσβολές παρατηρούνται σε καρποφόρα δένδρα (αμυγδαλιά, ροδακινιά, αχλαδιά, δαμασκηλιά, κερασιά), όταν επικρατούν μέτριες θερμοκρασίες και υψηλά επίπεδα υγρασίας κατά την περίοδο άνθησης. Η μόλυνση γίνεται από τον κάλυκα και οι ζημιές είναι μεγαλύτερες σε πυκνές ταξιανθίες.

(Ζιώγας 1981, Μπούρπος και Σκουντριδάκης 1987, Παππάς 1992)



## ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

### Μυκήλιο

Η μορφολογία και η ανατομία του θάλλου του *Botrytis cinerea* είναι τυπική των Ασκομυκήτων. Το μυκήλιο είναι γενικά κυλινδρικό και μεγάλης διαμέτρου με πολυάριθμα διαφράγματα (septa), μεσοκυττάριο, ενδοκυττάριο ή επιφανειακό. Τα διαφράγματα φέρουν έναν απλό πόρο. Συχνά σημειώνονται αναστομώσεις μεταξύ των υφών.

Τα βλαστώνοντα κύτταρα και τα κονίδια του *Botrytis cinerea* μπορεί να είναι ετεροκαρυστικά. Τα κύτταρα των υφών, με ελάχιστες εξαιρέσεις είναι πολυπύρρηνα. Η ετεροκαρυστική κατάσταση, αποτελεί μία πηγή ποικιλομορφίας (γενετικού ανασυνδιασμού) στον *Botrytis cinerea*. (Jarvis, 1977).

### Κονιδιοφόροι και κονίδια

Οι κονιδιοφόροι του *Botrytis cinerea*, είναι όρθοι, αρχικά απλοί στη συνέχεια διακλαδιζόμενοι ακανόνιστα ή με διχοτόμηση. Στη βάση έχουν ένα σφαιρικό κύτταρο (Hennebert, 1973). Στην κορυφή κάθε κονιδιοφόρου, παράγεται ένας αριθμός βραχέων, φαιόχρωμων, διαχωρισμένων με διαφράγματα βραχιόνων. Κάθε βραχιόνας καταλήγει σε μία αμπούλα, επάνω στην οποία και σε βραχέα στηρίγματα αναπτύσσονται κονίδια.

Τα κονίδια είναι υαλώδη ή έγχρωμα, ελλειψοειδή, απιοειδή ή σφαιρικά, λεία, συνήθως συνεχόμενα και μερικές φορές με 1-3 χωρίσματα. Έχουν διαστάσεις 8-14 x 6-9 μm. (Jarvis, 1977).

### Χλαμυδοσπόρια

Τα χλαμυδοσπόρια έχουν παχειά τοιχώματα, είναι μεγαλύτερα από τα κονίδια και παράγονται σε διαχωρισμένες υφές, που προεξέχουν από την επιφάνεια σκληρωτίων. Συνήθως σχηματίζονται στην άκρη των υφών αλλά μερικές φορές και ενδιάμεσα. Δεν έχει παρατηρηθεί βλάστηση χλαμυδοσπορίων. (Jarvis, 1977).

## Απρεσσόρια

Κατά τον Jarvis (1977), τα απρεσσόρια ή πλάκες συγκράτησης, ουσιώδεις δομές μόλυνσης, σχηματίζονται σαν διχοτομημένες διακλαδώσεις του βλαστικού σωλήνα και των άκρων των υφών, σε απάντηση ερεθίσματος που προήλθε από επαφή.

## Σκληρώτια

Όλα τα είδη *Botrytis* σχηματίζουν σκληρώτια σταθερά προσκολλημένα στο υπόστρωμα και η μορφολογία τους συμβάλλει στην ταξινόμηση. Η εξωτερική επιφάνεια του σκληρώτιου του *Botrytis cinerea*, συντίθεται από κλαιστά διασκευασμένες, λεπτού τοιχώματος υφές, που οι άκρες τους προβάλλουν προς τα έξω. Το σκληρώτιο αποτελείται εσωτερικά από ψευδοπαρέγχυμα, ενώ μία λεπτή στρώση χρωστικής το καλύπτει εξωτερικά στη μεγαλύτερη επιφάνεια (Willetts 1969). Τα σκληρώτια είναι μεγάλα, σκληρά, πολυκυτταρικά και επιτρέπουν στον μύκητα να επιβιώσει σε αντίξοες συνθήκες (Hsiang, 1992).

## ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Στο κεφάλαιο αυτό εξετάζονται οι επιδράσεις περιβαλλοντικών και άλλων παραχόντων, στην ανάπτυξη του μυκηλίου, στη βλάστηση των σπορίων και το σχηματισμό σκληρωτίων του *Botrytis cinerea*.

### Επιδράσεις της θερμοκρασίας

Το μυκήλιο μπορεί να αναπτυχθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες. Καλύτερος ρυθμός ανάπτυξης σημειώνεται στους 20-22°C και μειώνεται επάνω από τους 25°C.

Θερμοκρασίες που ευνοούν την παραγωγή μυκηλίου βρέθηκε ότι παρεμποδίζουν τον σχηματισμό σκληρωτίων και αντίστροφα (Kublitskaya and Ryabteva, 1972). Οι Morotchkovski και Vitas (1936) έδωσαν, τους 11-13°C σαν άριστο επίπεδο θερμοκρασίας για τον σχηματισμό σκληρωτίων, τους 12-22°C για παραγωγή σπορίων και τους 27-28°C για σχηματισμό απρεσσόρων (Jarvis, 1977).

### Επιδράσεις της σχετικής υγρασίας

Ο Snow (1949) συμπαίρανε ότι τα κονίδια του *Botrytis cinerea* απαιτούν υψηλά επίπεδα υγρασίας (93-100%) για να βλαστήσουν. Ο Sirry (1957) βρήκε ότι στους 21°C τα κονίδια του *Botrytis cinerea* βλαστάνουν σε σχετική υγρασία 100% αλλά όχι σε 95%. Τα σκληρωτίδια αναπτύσσονται καλύτερα σε υψηλή σχετική υγρασία.

### Επιδράσεις του φωτός

Όλα τα είδη *Botrytis* είναι ικανά να βλαστήσουν και να αναπτυχθούν στο σκοτάδι. Η ανάπτυξη μυκηλίου είναι καλύτερη στο σκοτάδι απ' ό,τι στο φως. Το κόκκινο φως παρεμποδίζει την ανάπτυξη μυκηλίου του *Botrytis cinerea* ενώ στο υπεριώδες γίνεται συνεχής (Jarvis, 1977). Αντίθετα το πορτοκαλί διεχειρεί την βλάστηση των σπορίων του (Zemlyanukhina 1973). Ο Leach κ.α. (1972) βρήκαν ότι ακτινοβολία κοντά στο υπεριώδες, διεχειρεί την σποριοπαραγωγή σε καθιέρχουσες *Botrytis cinerea*. Έτσι καθιερώθηκε μία σταθερή πρακτική, για τη διεξέρση της σποριοπαραγωγής ύλων των ειδών.

Οι κατάλληλες προϋποθέσεις για την παραγωγή σπορίων είναι γενικά αντίθετες με αυτές της παραγωγής σκληρωτίων.

## Επιδράσεις του pH

Όπως αναφέρεται στον Jarvis (1977), ο Webb (1921) βρήκε ότι το άριστο πεδίο pH για την βλάστηση των σπορίων είναι μεταξύ 3 και 7. Το άριστο pH για την ανάπτυξη μυκηθίου είναι μεταξύ 3 και 5. Τα σκληρωτία σχηματίζονται καλύτερα σε pH 4 και καθόλου στα αλκαλικά υποστρώματα.

## Επιδράσεις της ηλικίας και της διατροφής

Η βλαστικότητα των κονιδίων του *Botrytis cinerea* εξαρτάται κατά ένα μέρος από την ηλικία της καθιέρχειας. Κονίδια που λήφθηκαν από ποθύ νέες και από γηρασμένες καθιέρχειες βλάστησαν σχετικά αρχά, ενώ κονίδια από καθιέρχειες μέσης ηλικίας (16 ημερών) βλάστησαν ταχύτερα. Το ίδιο ισχύει και για την ανάπτυξη των βλαστικών υφών.

Αναφέρεται επίσης, ότι η βλάστηση σπορίων και η ανάπτυξη των βλαστικών υφών αυξάνεται με την προσθήκη παραγόντων ανάπτυξης, όπως βιοτίνη, θειαμίνη, L-serine, D-glucose και οξείκό νάτριο.

Ο Chou (1972) βρήκε ότι τα σπόρια βλαστάνουν σε διαλύματα σακχαρόζης, γλυκόζης, φρουκτόζης συγκεντρώσεως μεγαλύτερης των 100ppm.

Ο *Botrytis cinerea* μπορεί να αναπτυχθεί σε διαλύματα με υψηλή οσμωτική πίεση.

Όπως αναφέρεται στον Jarvis (1977), ένας άλλος σημαντικός παράγοντας στην βλάστηση των σπορίων βρέθηκε από τον Scutt (1971). Η συγκέντρωση των κονιδίων στά αιώρηματά τους να είναι της τάξης του  $10^5$ .

Ο σχηματισμός σκληρωτίων ευνοείται από υψηλή σχέση C/N στα θρεπτικά υποστρώματα. Αναπτύσσονται καλύτερα σε πλούσια θρεπτικά υποστρώματα.

## Επιδράσεις των ατμοσφαιρικών αερίων και ρυπαντών

Ο Adair (1971), βρήκε ότι συγκεντρώσεις  $O_2$  κάτω από 1.7% μειώνουν το ρυθμό ανάπτυξης του μυκηθίου στον *Botrytis cinerea* σε άγαρ. Βρήκε επίσης, ότι η σταχτιά σήψη στα αποθηκευμένα λαχανικά ελέγχεται με ατμόσφαιρα συγκέντρωσης 1.4% σε  $O_2$ .

Ο Jarvis (1977), αναφέρει ότι συγκεντρώσεις  $CO_2$ , 20-50% παρεμπόδισαν την βλάστηση σπορίων.

Οι Mc Callan και Weedon (1940) σύγκριναν την τοξικότητα των  $SO_2$ ,  $Cl_2$ , HCN,  $H_2S$  και  $NH_3$  σε κονίδια μυκήθιο και σκληρωτία του *Botrytis cinerea*. Τα  $SO_2$  και  $Cl_2$  βρέθηκαν περισσότερο τοξικά, τα HCN και  $H_2S$  ελάχιστα και η  $NH_3$  βρέθηκε μέσης τοξικότητας. Το  $SO_2$  σε σχετική υγρασία 90% ήταν 20 φορές πιο αποτελεσματικό από ότι σε σχετική υγρασία 75% (Jarvis, 1977).

## ΜΟΛΥΝΣΗ

### Μόλυνση από κονίδια

Όπως αναφέρεται στον Jarvis (1977) η διείσδυση των βλαστικών υφών σε μία άθικτη εφυμενίδα ξενιστή, είναι καθαρά μηχανική (Brown and Harvey 1927). Το κονίδιο εγκαθίσταται επάνω στην εφυμενίδα μέσα σε σταγόνα νερού και σύντομα προσκολλάται με τη βοήθεια μιας κολλώδους ουσίας που περιβάλλει τη βλαστική υφή. Συχνά η διείσδυση γίνεται από την άκρη της βλαστικής υφής, αλλά κάποιες φορές σχηματίζεται πρώτα ένα απρεσσόριο ή πλάκα συγκρατήσεως. Στην επιφάνεια επαφής μεταξύ της άκρης της βλαστικής υφής ή του απρεσσόριου και της εφυμενίδας του ξενιστή, μία μικρή ακίδα, το ράμφος μόλυνσεως που αναπτύσσεται εξωτερικά, διεισδύει στην εφυμενίδα, διαμέσου μιας ελάχιστης επιφάνειας διαμέτρου 0.2 μm (Mc Keen 1974), ασκώντας μηχανική πίεση.

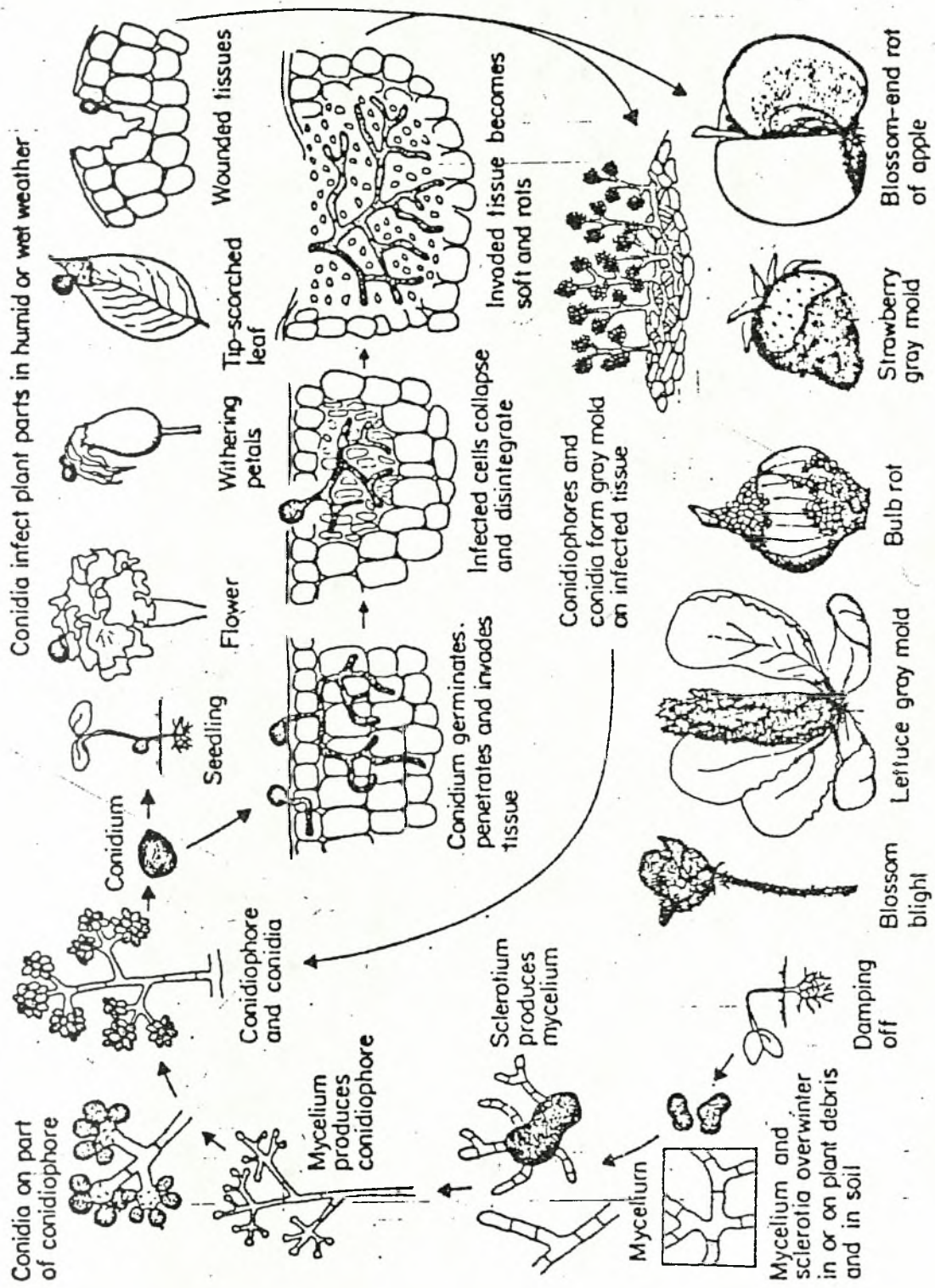
Ο Mc Keen (1974) επανεξετάζοντας τον τρόπο μόλυνσης, υποστήριξε ότι η εφυμενίδα διαλυόταν ενζυματικά μάλλον παρά διαπερνόταν μετά από μηχανική πίεση γιατί η τρύπα στην εφυμενίδα εμφανιζόταν απότομη και καθαρή χωρίς κατεστραμμένες απολήξεις. Μετά τη διείσδυση, ο Mc Keen παρατήρησε ότι το επιδερμικό τοίχωμα του ξενιστή άρχιζε να διαλύεται καθώς και την εφυμενίδα να αποκολλάται προς τα επάνω. Ερευνώντας την δραστηριότητα της κυτινο-εστεράσης στις άκρες των βλαστικών υφών την στιγμή της διείσδυσης υπέθεσε ότι αυτή βοηθά στη λύση της εφυμενίδας του ξενιστή.

Εκτός από την εφυμενίδα οι βλαστικές υφές του *Botrytis cinerea* μπορούν να διεισδύσουν και από την περιστοματική περιοχή, αλλά σπάνια διαμέσου των ίδιων των στοματίων. Πριν τη διείσδυση της εφυμενίδας ο μύκητας συμπεριφέρεται επάνω στην επιφάνεια της περιστοματικής περιοχής σαν σαπρόφυτο.

### Μόλυνση από μυκήλιο

Όπως αναφέρει ο Jarvis (1977), η διαδικασία μόλυνσης από μυκήλιο είναι στην ουσία η ίδια με αυτή των βλαστικών υφών που προέρχονται από την βλάστηση των κονιδίων. Επισημαίνεται ότι το μυκήλιο έχει σχεδόν πάντα, μία σαπροφυτική βάση προμήθειας υλικών (Bessis 1972). Για τον λόγο αυτό, το μολυσματικό δυναμικό του μυκηλίου είναι μεγαλύτερο, από αυτό των βλαστανόντων κονιδίων και επίσης λιγότερο εξαρτημένο από το εξωτερικό περιβάλλον π.χ. τον παράγοντα νερό για την βλάστηση των κονιδίων. Ο Jarvis (1962), βρήκε ότι μόνο το 1% περίπου των μολύνσεων, σε άθικτες ώριμες φράουλες, γίνεται από κονίδια. Το υπόλοιπο των μολύνσεων πραγματοποιείται από σαπροφυτικό μυκήλιο.





Σχήμα 1 : Διαδικασία μορύνσεως φυτικών ιστών από άρρονα (μικρήλιο, σκληρώτια, κονίδια) του *Botrytis cinerea* (κατά Αγρίος, 1978)

## ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ

Μολυσματικότητα ή μολυσματική ικανότητα, ονομάζεται η ικανότητα ενός μικροοργανισμού ή λού να μολύνει και να προκαλεί ασθένεια.

Αναφορές διαφόρων ερευνητών, δείχνουν ότι η μολυσματικότητα είναι ένα μέγεθος που τροποποιείται από παράγοντες του περιβάλλοντος όπως υγρασία και θερμοκρασία αλλά και από ενδογενείς παράγοντες.

Η μολυσματικότητα του *Botrytis cinerea*, περιορίζεται από τον συγκεκριμένο ιστό του ξενιστή και από την φυσιολογική ηλικία και την κατάσταση υγείας του ξενιστή.

Ο Last (1960), αναφέρει πως σπόρια 25 ημερών ήταν μόνο κατά το 1/10 μολυσματικά και σπόρια 35 ημερών μόνο κατά το 1/100, σε σχέση με νεαρά σπόρια.

Παρακάτω αναφέρονται οι κυριώτεροι παράγοντες ή συνθήκες, που επιδρούν ή σχετίζονται με τη μολυσματικότητα του *Botrytis cinerea*.

### Φυτικά υπολείματα

Ο Jarvis (1977), αναφέρει ότι ο De Bary (1886) και ο Brooks (1908), αρκετά νωρίς παρατήρησαν ότι προσβολές φυτών από *Botrytis cinerea*, συχνά συνδέονταν με μία πρόδρομη αποίκιση νεκρών φυτικών ιστών από τον μύκητα. Ο ίδιος αναφέρει ότι ο Thomas (1921) παρατήρησε πως τοματόφυτα ψεκασμένα με ένα αιώρημα κονιδίων *Botrytis cinerea* και σε περιβάλλον με υψηλή σχετική υγρασία, παρέμειναν υγιή για δύο εβδομάδες. Εάν όμως είχαν χρησιμοποιηθεί σαν μόλυσμα, κομμάτια από ασθενείς ιστούς, κηλίδες εμφανίζονταν πιο γρήγορα.

### Πληγές

Κάθε παράγοντας που προκαλεί μηχανική ζημιά στους ιστούς, μπορεί να διευκολύνει την είσοδο του *Botrytis cinerea*, προδιαθέτει γενικά τον ξενιστή για μόλυνση. Σε ζημιές που προκλήθηκαν από άνεμο, σαλιγκάρια ή έντομα, ακολούθησε προσβολή από *Botrytis cinerea*. Το ίδιο συνέβει, όταν προηγήθηκε προσβολή από άλλον μύκητα, όπως στην περίπτωση του *Uncinula necator* στα σταφύλια (Jarvis, 1977).

## Θερμοκρασία

Η Θερμοκρασία είναι φανερός σπουδαιότητας, στην προδιάθεση τόσο του παθογόνου όσο και του ξενιστή. Διάφορες Θερμοκρασίες, μπορούν να επιδράσουν διαφορετικά στην μολυσματική διαδικασία του παράσιτου, όσο και στην διαδικασία άμυνας του ξενιστή. Όπως αναφέρεται στον Jarvis (1977), ο Krantz (1959) παρατήρησε ότι η αποθήκευση σε χαμηλές Θερμοκρασίες 3<sup>o</sup>C αλλά όχι σε ψύξη, κονδύλων πατάτας, τους προδιαθέτει για μόλυνση από τον *Botrytis cinerea*. Κόνδυλοι που διατηρήθηκαν σε Θερμοκρασίες 15<sup>o</sup>C και 20<sup>o</sup>C παρέμειναν υγιείς.

## Υδατική κατάσταση

Όπως αναφέρεται στον Jarvis (1977), ο Tonchev (1972), διερεύνησε το ρόλο της άρδευσης στο φούσκωμα και στο σχίσμο των καρπών και συνεπώς, στην προδιάθεση προσβολής τους από τον *Botrytis cinerea*. Για μία εννιάχρονη περίοδο, μελέτησε τις σχέσεις ανάμεσα στο σχίσμο των καρπών, της συχνότητας εμφάνισης της σταχτιάς σήψης και των καιρικών συνθηκών κατά την διάρκεια της περιόδου που προκλήθηκαν σήψεις. Σε Ξηροθερμικές χρονικές περιόδους, η άρδευση δεν προκάλεσε σχίσμο στους καρπούς ή προσβολή τους από *Botrytis cinerea*. Τις υγραθερμικές χρονικές περιόδους όμως, πρόσθετη άρδευση προκάλεσε το σχίσμο των καρπών ιδιαίτερα όσων είχαν λεπτότερη επιδερμίδα και την μολυσή τους.

## Εξώσμωση

Ο Jarvis (1977), αναφέρει ότι γενικά τα κονίδια βλαστάνουν καλύτερα σε νερό επάνω στις επιφάνειες ξενιστών, από ότι επάνω σε αδρανείς επιφάνειες στο εργαστήριο (Blakeman 1973).

## Πτητικοί μεταβολίτες

Όπως αναφέρεται στον Jarvis (1977), ο Nichols (1964) βρήκε ότι το αιθυθαίνιο σε συγκέντρωση της τάξεως του 0.06ppm, προδιέθετε τα άνθη σε μόλυνση από *Botrytis cinerea*.

## Άλλα παρασιτοκτόνα

Όπως αναφέρεται στον Jarvis (1977), ο Mc Whoter (1939), παρατήρησε ότι μετά από εφαρμογές εντομοκτόνων για τον έλεγχο των θριπών στο *Antirrhinum majus*, συνέβαιναν προσβολές από *Botrytis cinerea*. Αυτό πιθανόν οφείλοταν σε χημική ή μηχανική βλάβη, ή σε συγκράτηση νερού στην φυτική επιφάνεια.



## Επίπεδο υδατανθράκων

Κατά τον Jarvis (1977), οι Horsfall και Dismond (1957), κατέταξαν τα είδη του γένους *Botrytis*, σαν υψηλών σακχάρων παθογόνα. Προσβάλλουν δηλαδή, ιστούς με υψηλό περιεχόμενο σακχάρων και μάλιστα με ανηχημένα σάκχαρα. Πολλά μυκητοκτόνα, εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, επιρεάζουν το μεταβολισμό των ξενιστών και κατά συνέπεια αλλάζουν την ευαισθησία τους.

## Φώς

Το φώς επιρεάζει το επίπεδο των υδατανθράκων στα φυτά καθώς και άλλες μεταβολικές διεργασίες τόσο του ξενιστή όσο και του παθογόνου. Έχει παρατηρηθεί πιο εκτεταμένη μόλυνση ανθέων φράουλας στο φώς της ημέρας από ότι στο σκοτάδι.

## Μικροοργανισμοί

Γενικά, προδιάθεση για μόλυνση, μπορεί να εμφανιστεί ύστερα από προσβολή του ξενιστού από άλλους μύκητες. Για παράδειγμα οι προσβολές από *Botrytis cinerea*, είναι συχνές σε πηχές από σκωρίαση στο σπαράγγι, από περονόσπορο στο μαρούλι.

## ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ

Αναφερόμενοι στην παθογένεση, θα εξετάσουμε πως ολοκληρώνεται η παρασιτική σχέση του παθογόνου με τον ξενιστή, πως ολοκληρώνεται δηλαδή, το συνδρομο της ασθένειας της σταχτιάς σήψης, που αρχίζει με την απλή επαφή παθογόνου ξενιστή.

Για την αποδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων ο *Botrytis cinerea* εκρίνει ηκτητινολυτικά και άλλα ένζυμα. Τα κύτταρα του ξενιστή νεκρώνονται και οι υφές περνούν διαμέσου των μοθυσμένων ιστών (Brown 1965).

Ο Jarvis (1977), αναφέρει ότι το καθαρό αποτέλεσμα είναι, πως αφού ο μύκητας κατόρθωσε να εισέλθει στον ξενιστή, ζεί σαπροφυτικά επάνω στο νεκρό παρεγχυματικά ιστό και συνεχίζει να αποικίζει ιστούς, από την άκρη της πληγής. Οι υφές όμως, δεν παρασιτούν ποτέ υγιείς ιστούς. Οι απολήξεις των υφών, είναι σε κάποια απόσταση πίσω από τα απεκρινόμενα ένζυμα και τοξίνες και πάντοτε μέσα στους αποθνήσκοντες ιστούς. Με την διαδικασία αυτή ο μύκητας δομεί ένα σαπροφυτικά βασισμένο μοθυσματικό δυναμικό, για να συνεχίσει την αποίκηση και την σποριοπαραγωγή.

Παρακάτω εξετάζονται χωριστά και εξειδικευμένα, παράγοντες και συνθήκες της παθογένεσης.

### Ένζυμα

Κατά τον Jarvis (1977) οι Verhoeff και Warren (1972), βρήκαν ότι η ενζυματική δραστηριότητα του *Botrytis cinerea*, επάνω σε παρασιτούμενα τοματόφυτα, ποίκιλε. Η δραστηριότητα της ηκτητινομεθυλεστεράσης, της ενδο- και εξω-πολυγαλακτονουράσης, παρατηρήθηκε στους μίσχους και τους καρπούς, αλλά της κυτταρινάσης μόνο σε εκείνα τα μέρη που μαλάκωσαν από την μοθυσματική διείσδυση του μύκητα. Η πολυγαλακτονουράση, βρέθηκε σε μαλακωμένα μόνο φυτικά μέρη, υπολειμμάτων μίσχων. Οι παραπάνω ερευνητές, θεώρησαν ότι ο *Botrytis cinerea* παρήγαγε ο ίδιος, όλα τα αναγκαία ένζυμα για την παθογένεση στην τομάτα.

### Τοξίνες

Κατά τον Jarvis (1977), οι Jamart και Kamonen (1972), αναφέρουν ότι το κυτόπλασμα, των κυτάρων νεκρώνεται πριν από το προχώρημα των υφών με την δράση τοξινών που εκρίνει ο *Botrytis cinerea*. Οι ίδιοι βρήκαν κυτρικό και οξαλικό οξύ μαζί, σε χυμό φύλλων μπεγκόνιας που περιείχαν κονίδια. Εντόπισαν επίσης το κυτρικό οξύ και σε κιτρινωμένους ιστούς μοθυσμένων φύλλων, στη ζώνη που περιείχε απολήξεις υφών και που επεκτείνεται λίγο πίσω από αυτές.

## Περιορισμένες κηλίδες

Στους καρπούς της τομάτας και στα άνθη της τριανταφυλλιάς η προσβολή μπορεί να εκδηλωθεί και με μικρές υπόλευκου χρώματος κηλίδες, διαμέτρου 3-8mm, με νεκρωτικό στίγμα στο κέντρο, περιτριχυρισμένων από μία φωτεινή άλω (ghost spot). Προσπάθειες πολλών ετών για την απομόνωση κάποιου μύκητα από τις κηλίδες ήταν ανεπιτυχείς. Κατά τον Jarvis (1977), οι Owen και Ferrer (1957), απέδειξαν πρώτοι την παρουσία του *Botrytis cinerea* στις κηλίδες, αλλά μόνο ο Verhoeff (1970), επέτυχε να απομονώσει τον μύκητα.

Ο Verhoeff (1970), εξετάζοντας τέτοιες περιορισμένες κηλίδες, βρήκε ότι στην πραγματικότητα δεν συνέβαινε διείσδυση. Μυκήλιο δεν μπορούσε να βρεθεί στα νεκρωμένα κύτταρα. Χρησιμοποιώντας σαν μόλυσμα, σίγα μόνο και στεχνά κονίδια, έλαβε τα τυπικά αποτελέσματα των κηλίδων (ghost spot). Χρησιμοποιώντας όμως, πυκνό αιώρημα κονιδίων και σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας, οι καρποί που μόλυνε, σχημάτισαν μεγάλες φουσκάλες πριν ακόμα ο μύκητας διαδοθεί στο παρέγχυμα. Ομοια, αλλά σε συνθήκες χαμηλής σχετικής υγρασίας, εμφανίστηκαν νεκρωτικές περιοχές.

Με βάση τα παραπάνω, ο Verhoeff υπέθεσε πως στην πρώτη περίπτωση, η μεριστωματική δραστηριότητα του καρπού, περιόρισε την ανάπτυξη και την ενζυματική δραστηριότητα του μύκητα. Για την δεύτερη περίπτωση, υπέθεσε ότι το ισοζύγιο του αυξημένου μολυσματικού δυναμικού και των συννοικών συνθηκών (υψηλή σχετική υγρασία), υπερίσχησε της γρήγορης ανάπτυξης του καρπού. Έτσι τελικά θεώρησε τις κηλίδες φάντασμα σαν ένα παράδειγμα, αρχοπορίας εξάπλωσης του παθογόνου.

## Ωσμωτικές πιέσεις

Ο Jarvis (1977), αναφέρει ότι πολλοί ερευνητές συμφωνούν ότι ο *Botrytis cinerea* μπορεί να αντέξει σε υψηλές ωσμωτικές πιέσεις. Ο Thatcher (1942), θεώρησε ότι η διαφορά ωσμωτικής πίεσης, μπορούσε να εξηγήσει την μεταφορά νερού και θρεπτικών υλικών από τα κύτταρα του ξενιστή στον παθογόνο μύκητα.

## Επιδράσεις στον μεταβολισμό των ξενιστών

Κατά τον Jarvis (1977), ο Harrison και ο Hopwood (1969), παρατήρησαν μία ενδιαφέρουσα επίδραση στην φυσιολογία των λουλουδιών του *Antirrhinum majus* όταν μολύνθηκαν από *Botrytis cinerea*. Απελευθερώθηκε μία γενετικά παρεμποδιζόμενη ανθοκυανίνη που έδωσε ένα στικτό χρωματισμό στα πέταλα. Ο Smith κ.α. (1964), βρήκε ότι χαρύφαλλα μολυσμένα από *Botrytis cinerea*, παρήγαγαν περισσότερο αιθυλαίνιο, το οποίο προδιέθετε και τα υγιή άνθη να προσβληθούν από το παθογόνο.

## ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Ο μύκητας αναπτύσσεται επί υγιών, εξασθενημένων ή νεκρών φυτικών ιστών. Προσβάλλει φυτά ύλων των ηλικιών και όλα σχεδόν τα μέρη τους (φύλλα, άνθη, καρπούς, στελέχη, ρίζες) και προκαλεί συμπτώματα διαφόρων τύπων.

Στον αγρό οι μολύνσεις των ανθέων συχνά προηγούνται και οδηγούν σε σήψη καρπών και βλαστών. Ο μύκητας εγκαθίσταται στα πέταλα του άνθους, τα οποία είναι μερικώς ευαίσθητα όταν αρχίζουν να χερνούν και εκεί παράγει άφθονο μυκήλιο και κηλιδώσεις. Το μυκήλιο διεισδύει και στα υπόλοιπα μέρη του άνθους, αναπτύσσεται και τα καλύπτει με μία άσπρη σταχτιά ή ανοιχτή καστανή αραχνοειδή μούχλα· στο τέλος τα άνθη νεκρώνονται. Ο μύκητας στη συνέχεια μολύνει τον ποδίσκο που σαπίζει και αφίνει τα μπουμπούκια και τα άνθη να πέσουν σαν κομμένα.

Εάν κάποιος καρπός έχει αναπτυχθεί, ο μύκητας κινείται από τα πέταλα στον πράσινο ή ώριμο καρπό και προκαλεί στην άκρη του κάλυκα επιφυτία ή σήψη, που προχωρεί και μπορεί να καταστρέψει μέρος ή ολόκληρο τον καρπό και μπορεί επίσης να διαδοθεί σε άλλους καρπούς που εφάπτονται με τον προσβεβλημένο.

Οι μολυσμένοι καρποί και οι τρυφεροί χυμώδεις βλαστοί, γίνονται μαλακοί, υδαρείς και καλύπτονται από άφθονη εξάνθηση των καρποφοριών του παθογόνου, με ανοιχτό πράσινο χρωματισμό της προσβλημένης περιοχής αρχικά και αργότερα οι προσβλημένοι ιστοί εμφανίζονται με ανοιχτό καφέ χρωματισμό (π.χ. τομάτα, πιπεριά, μελιτζάνα κ.α.). Καθώς ο ιστός σαπίζει η επιδερμίδα σχίζεται και ο μύκητας καρποφορεί άφθονα. Οι ιστοί ύστερα ζαρώνουν και ξηραίνονται και πηλατιά μαύρα σκληρώτια, μπορεί να εμφανιστούν επάνω στην επιφάνεια ή να είναι βυθισμένα μέσα στον ιστό. Στην φράουλα η μόλυνση αρχίζει κατά την περίοδο της ανθήσεως και στη συνέχεια προκαλείται σήψη των καρπών. Στους καρπούς της τομάτας, η προσβολή μπορεί να εκδηλωθεί στην επιφάνεια του καρπού και με μορφή δακτυλιοειδών κηλίδων, ανοιχτού χρώματος με κέντρο χρώματος σταχτί. Στο μαρούλι η προσβολή εκδηλώνεται σαν καστανέρυθρη σήψη του λαμού και των φύλλων της βάσης. Μολύνσεις με μορφή υγρής σήψης εμφανίζονται στις ρίζες διαφόρων κονδυλοριζών φυτών (π.χ. καρότο).

Στους καρπούς που διατηρούνται μέσα σε ψυγεία, τα συμπτώματα είναι μαλακή σήψη δηλαδή καστανές κηλίδες με υδαρείς ιστούς. Οι προσβεβλημένοι καρποί έχουν ευχάριστη οσμή ζυμώσεως. Οι μολύνσεις γίνονται κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των καρπών πάνω στο δένδρο, ή από πτηνές κατά την συκομιδή και συσκευασία των καρπών. Επίσης μολύνσεις γίνονται από τα φακίδια.

Στο έλασμα των φύλλων η προσβολή εμφανίζεται με τον σχηματισμό κηλιδώσεων (π.χ. τομάτα, μελιτζάνα, κρεμμύδια, κολοκύθια). Στο χλαδίλο, τουλίπα, κρεμμύδια αρχικά οι κηλίδες είναι μικρές και κιτρινωπές, αργότερα γίνονται μεγαλύτερες άσπρου σταχτί χρωματισμού ή μαυριδερού, βαθουλωμένες ενούμενες και συχνά περιπλέκοντας ολόκληρο το φύλλο. Στο γεράνι είναι καστανές και υδατώδεις που τελικά νεκρώνονται και επάνω σ' αυτές σχηματίζονται τεφροκάστανες εξανθήσεις (μάζες κονιδιοφόρων και κονιδίων).

Πολλοί ερευνητές ισχυρίζονται ότι η μόλυνση του φυλλώματος γίνεται, μόνο αφού ο μύκητας έχει αναπτυχθεί σε νεκρά τμήματα των φυτών ή επάνω σε σήποντα υλικά στο έδαφος και μετά σε επαφή με τα υγιή φύλλα. Μετά την προσβολή το φύλλο ξηραίνεται, ενώ η προσβολή μέσω του μίσχου φθάνει στο στέλεχος στο οποίο αρχικά σχηματίζεται μικρό, ανοικτού καστανού ή καστανού χρώματος, έλκος. Ελκη βλαστών συνήθως εμφανίζονται σε χυμώδεις βλαστούς ή μίσχους και μπορεί να είναι είτε σκοτεινά, βυθισμένα, επιμηκυνόμενα έλκη με ένα προσδιορισμένο περιθώριο ή μπορεί να περιβάλλουν το στέλεχος. Στην τελευταία περίπτωση το μέρος του φυτού επάνω από το σημείο της προσβολής γίνεται χλωρωτικό, μαραίνεται, ξηραίνεται και μπορεί να σπάσει στο σημείο μόλυνσης, όπως συμβαίνει στην τουλίπα και την τριανταφυλλιά. Οι προσβλημένοι μίσχοι ή βλαστοί, με υγρό καιρό, καλύπτονται με ένα σταχτί καφέ βελούδινο στρώμα σπορίων του μύκητα. Επίσης στους μοθυσμένους βλαστούς μπορεί να παραχθούν και σκληρώτια. Η μόλυνση των κάτω του εδάφους τμημάτων, όπως βοηβοί, ριζώματα μπορεί να αρχίσει όταν τα όργανα αυτά είναι ακόμη μέσα στο έδαφος ή έχουν συλλεχθεί. Ελκη μπορεί να αναπτυχθούν σε κάθε σημείο της επιφάνειας τους, αλλά κυρίως στον ραιμό ή την βάση αυτών. Οι μοθυσμένοι ιστοί συνήθως εμφανίζονται μαλακοί και υδαρείς, αλλά καθώς προχωρεί η μόλυνση, οι μοθυσμένες περιοχές μεχενθύνονται, μεταχρωματίζονται καφέ και τελικά σκούρο καφέ και αποβαίνουν σποχώδεις ή φελλώδεις και τα προσβλημένα όργανα γίνονται ελαφρά στο βάρος. Δέσμες μυκηλίου μπορεί να αναπτυχθούν, μεταξύ χωρισμάτων των βοθβών και από τα κενά των σηπομένων ριζωμάτων ή στην επιφάνεια των ελκών. Μαύρα σκληρώτια βρίσκονται συχνά στην επιφάνεια ή μαζί με σηπόμενους ιστούς και μυκήλιο.

Τήξεις σπορίων οφειλόμενες στον *Botrytis cinerea*, παρατηρούνται σε κρύα σπορία όπου η υγρασία είναι υψηλή, αλλά επίσης και στον αχρό, εάν ο σπόρος είναι αναμειγμένος με σκληρώτια του μύκητα ή μυκήλιο του μύκητα, ή βρίσκονται σκληρώτια στο έδαφος.

(Ζιώγας 1981, Μπούρπος και Σκουντριδάκης 1987, Μπούρπος και Σκουντριδάκης 1993, Παναχόπουλος 1992, Παναχόπουλος 1993, Παναχόπουλος 1995, Παππάς 1992)



## ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο *Botrytis cinerea* ζεί σαν σαπρόφυτο υπό μορφή μυκηλίου ή σκληρωτίων πάνω σε εξασθενημένους φυτικούς ιστούς και υπολείμματα καλλιέργειας. Υγχείς ιστοί προσβάλλονται μόνο όταν υπάρχει μεγάλη πίεση μολύσματος ή έρθουν σε επαφή με εστίες σαπροφυτικής ανάπτυξης. Τα κατάλοιπα του άνθους (πέταλα, στύλος, στήμονες, σέπαλα) αποτελούν την πύλη εισόδου του παθογόνου στη σάρκα του καρπού και πηγές παραγωγής σπορίων. Σε κάποια είδη καρπών (φράουλα, ακτινίδιο, μήλο), ο μύκητας εγκαθίσταται στον κάλυκα του άνθους χωρίς την εμφάνιση συμπτωμάτων και όταν οι συνθήκες υγρασίας είναι ευνοϊκές εκδηλώνεται σήψη του καρπού κατά το στάδιο της ωρίμανσης (θανάτουσα προσβολή).

Κύρια πηγή μόλυνσης είναι οι προσβεβλημένοι ιστοί πάνω στους οποίους παράγονται άφθονα κονίδια τα οποία μεταφέρονται με τα ρεύματα του αέρα ή τη βροχή. Διάσπορά κονιδίων και μεταφορά τους στα υγιή φυτά γίνεται επίσης με τα χέρια, τα ρούχα και τα εργαλεία των εργατών κατά την εκτέλεση των καλλιεργητικών φροντίδων ιδιαίτερα μέσα στα θερμοκήπια. Τα κονίδια μπορούν να επιβιώσουν για 1-3 μήνες, αν ο καιρός παραμείνει υγρός και ψυχρός. Αν η μόλυνση εγκατασταθεί, το επίπεδο υγρασίας και θερμοκρασίας είναι λιγότερο σημαντικά για την επιβίωση του μύκητα. Φυτικά υπολείμματα που φιλοξενούν τον μύκητα σαν σαπρόφυτο αναφέρονται επίσης ότι μεταφέρονται με τον αέρα και προσκολλούνται πάνω σε υγχείς ιστούς τους οποίους μολύνουν εξ επαφής (π.χ. ράχες σταφυλών). Τα ασκοσπόρια του μύκητα παράγονται πολύ σπάνια και δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση της ασθένειας.

Ο βοτρύτης σχετίζεται άμεσα με τις καιρικές συνθήκες. Για να παραχθούν κονίδια απαιτείται σχετική ατμοσφαιρική υγρασία 65-90% και θερμοκρασία μεταξύ 15 και 25°C. Πέραν των ορίων αυτών η ασθένεια δεν ευνοείται. Για να γίνει η μόλυνση απαιτείται επιπλέον η διατήρηση ενός λεπτού στρώματος νερού στους φυτικούς ιστούς για 15 ώρες τουλάχιστον. Ιδανικές συνθήκες για ανάπτυξη επιδημίας επικρατούν κατά την περίοδο του χειμώνα-αρχές άνοιξης στις μη θερμαινόμενες καλλιέργειες κηπευτικών υπό κάλυψη.

(Παναχόπουλος 1995, Παππάς 1992)

## ΑΜΥΝΑ ΞΕΝΙΣΤΩΝ

### Μηχανική άμυνα

Κατά τον Jarvis (1977), η εφυμενίδα των φυτών είναι ανθεκτική στην απ' ευθείας μόλυνση από σπόρια με μηχανική διάτρηση, ενώ την διαπερνά εύκολα το σαπροφυτικό μυκήλιο. Η άθικτη εφυμενίδα σταφυλιού, είναι σχετικά ανθεκτική στον *Botrytis cinerea* και η μόλυνση, εξαρτάται καθοριστικά από τις πληγές της εφυμενίδας που προκαλούνται, από υπερβολικά υγρές συνθήκες ή με χρησιμοποίηση μυκητοκτόνου που επιδρά δυσμενώς στην αντοχή της, ή και από νύχματα εντόμων (Bessis 1972).

### Χημική άμυνα

Η εφυμενίδα έχει μερικές συνθέσεις που είναι μικροστατικές. Κατά τον Jarvis (1977), οι Blakeman και Szejnberg (1973), βρήκαν ότι η βλάστηση κονιδίων του *Botrytis cinerea*, παρεμποδίστηκε από το επιφανειακό κερί των φυλλών των τεύτων. Ο Staider (1955), θεώρησε ότι η ανθεκτικότητα σταφυλιών διαφόρων ποικιλιών στον *Botrytis cinerea*, δεν σχετιζόταν με μηχανικές προϋποθέσεις των ιστών του ξενιστή, ούτε με κάποια επαγωγική αλληλεπίδραση, αλλά με χημικές συνθέσεις του κυτταρικού χυμού. Από άλλες μελέτες που έγιναν, αναφέρονται στις αντιδράσεις των φυτών η παραγωγή χημικών ουσιών, όπως βενζοϊκή αλδεύδη, υψηλή συκέντρωση τανίνης, ανηγμένα φαινολικά παράγωγα.

## ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Η αντιμετώπιση του *Botrytis cinerea* είναι δύσκολη. Ιδιαίτερα όταν δεν ακολουθείται μία στρατηγική αντιμετώπισής του ολοκληρωμένη και ορθολογική. Μία τέτοια στρατηγική προϋποθέτει την χρησιμοποίηση σε συνδυασμό καλλιεργητικών, βιολογικών και χημικών μεθόδων. Κι αυτό γιατί το παθογόνο δημιουργεί εύκολα ανθεκτικά στελέχη σε πολλά μυκητοκτόνα περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των χημικών επεμβάσεων.

### Καλλιεργητικές μέθοδοι

Συνιστάται η λήψη τους για τη διατήρηση του μολύσματος σε χαμηλά επίπεδα και η δημιουργία δυσμενών συνθηκών για την ανάπτυξη της αρρώστιας όπως :

Καλός αερισμός, αποφυγή μεγάλων αυξομειώσεων της θερμοκρασίας στα θερμοκήπια και μείωση της υγρασίας.

Τήρηση καλής υγιεινής και απομάκρυνση προσβλημένων, ζηρασμένων ή νεκρών φυτικών ιστών.

Οι καλλιεργητικές μέθοδοι για καλύτερα αποτελέσματα πρέπει να εφαρμόζονται σε συνδυασμό με προληπτικές επεμβάσεις κατάλληλων μυκητοκτόνων.

### Βιολογικές μέθοδοι

Ερευνητές στη Γαλλία (Dubos, Jailloux, Bulit) πέτυχαν βιολογική καταπολέμηση του βοτρυτή χρησιμοποιώντας ένα σκεύασμα με βάση τον μύκητα, *Trichoderma spp.*, που είναι ανταγωνιστικοί του *Botrytis cinerea*. Μερικά από τα σκευάσματα αυτά περιέχουν στελέχη ανθεκτικά σε μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του βοτρυτή (benomyl, PCAF).

Οι ανταγωνιστές *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Onythyrium minutans* και η αμοιβάδα *Arachnula impatiens* σε δοκιμές in vitro και in vivo έλεγξαν ικανοποιητικά το παθογόνο καταστρέφοντας σε ένα σημαντικό βαθμό, δομές επιβίωσης του παθογόνου.

Ερευνητές εκμεταλλευόμενοι το φαινόμενο της αλληλοπάθειας,



διαπίστωσαν πως η L-αλανοσίνη, που παράγεται από τους *Streptomyces spp.* και το αιθέριο έλαιο του *Salvia romifera* (φασκομηλιά) σε πολύ μικρές δόσεις ελέγχουν τον βοτρυτή.

Επίσης έρευνες γίνονται σε μικροβιακά στελέχη, ανταγωνιστικά του *Botrytis cinerea* που απομονώθηκαν από *Brassica s.p.*

Ο *Botrytis cinerea*, μπορεί να ελεγχθεί από τον μύκητα *Myrothecium s.p.* ο οποίος δρά, εκκρίνοντας θερμοσταθερές τοξίνες.

### Χημικές μέθοδοι

Τα μυκητοκτόνα που συνιστώνται για την καταπολέμηση του βοτρυτή ανήκουν σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη περιλαμβάνονται τα dichlofluanid, chlorothalonil, captan και thiram που έχουν ευρύ φάσμα δράσης. Στη δεύτερη κατηγορία υπάχονται μυκητοκτόνα με ειδική δράση κατά του παθογόνου που ανήκουν στις ομάδες των βενζιμιδαζολικών (benomyl, carbendazim, thiophanate methyl) και των δικαρβοξιμιδικών (vinclozolin, procymidone, iprodione). Για τη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας τα μυκητοκτόνα κάθε ομάδας της δεύτερης κατηγορίας πρέπει πάντα να εφαρμόζονται σε μίγματα ή εναλλακτικές επεμβάσεις με αυτά της πρώτης κατηγορίας. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες (Garibaldi, Aloï και Gullino, 1989) το νέο σκεύασμα που περιέχει carbendazim + diethofencarb (Sumico) δίνει επί του παρόντος ικανοποιητική καταπολέμηση της αρρώστιας στις περιοχές που επικρατούν ανθεκτικά στελέχη του παθογόνου στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα.

Επίσης εφαρμογή γιβερρελλικού οξέος στο στάδιο που ο βλαστός έχει μήκος 10-15 cm δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα μόνο σε σοβαρές προσβολές από τον βοτρυτή ενώ δεν έχει καμμία επίδραση όταν η προσβολή είναι ελαφρά.

(Ζιώγας 1981, Leifert 1993, Μπούρπος και Σκουντριδάκης 1993, Παναχόπουλος 1995, Παππάς 1992,

## ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

Κατά τον Γεωργόπουλο (1974), όπως όλες οι ιδιότητες των οργανισμών, έτσι και η ευαισθησία στις τοξικές ουσίες μπορεί να μεταβληθεί με μεταλλαγή. Αν μία μεταλλαγή μειώσει σημαντικά την ευαισθησία σε μία ένωση, που χρησιμοποιούμε για την καταπολέμηση ενός παθογόνου, θα προκύψει ένα ανθεκτικό στελέχος, 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. Με την εισαγωγή των διασυστηματικών μυκητοκτόνων και των αντιβιοτικών είχαμε μεγάλη αύξηση της σημασίας της ανθεκτικότητας για την φυτοπαθολογία. Με τα φάρμακα αυτά η δημιουργία ανθεκτικότητας είναι ο κανόνας μάλλον παρά η εξαίρεση.

Θεωρητικά η ευαισθησία στα φάρμακα μπορεί να μεταβληθεί με την μεταλλαγή χρωματοσωματικού ή εξωχρωματοσωματικού γόνου. Στις περισσότερες περιπτώσεις περισσότεροι από ένας γόνου ελέγχουν την ευαισθησία στο ίδιο μυκητοκτόνο. Το επίπεδο της ανθεκτικότητας μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το ποιάς γόνου έχει υποστεί μεταλλαγή. Όταν στο ίδιο απλοειδές κύτταρο του μύκητα μεταλλάξουν περισσότεροι από ένας γόνου για την ανθεκτικότητα στο ίδιο μυκητοκτόνο, το επίπεδο αντοχής μπορεί να ανέβει πολύ. Αυτό έχει και πρακτική σημασία, γιατί συνεχίζοντας την χρήση του μυκητοκτόνου μπορεί να καταλήξουμε σε στελέχη με πολύ μικρή ευαισθησία. Στα διπλοειδή κύτταρα του μύκητα ο ανθεκτικός αλληλόμορφος μπορεί να συμπεριφέρεται σαν κυρίαρχος ή ημικυρίαρχος ή υποτελής. Αυτό εξαρτάται από τον γόνο, που μελετάμε μάλλον, παρά από το μυκητοκτόνο.

Ο πιο εύκολος τρόπος για την εμφάνιση αντοχής σε ένα φάρμακο και ίσως και ο πιο αποτελεσματικός είναι η αλλαγή στην ευαίσθητη θέση, δηλαδή στο κυτταρικό συστατικό (ένζυμο ή άλλο) που αντιδρά με το φάρμακο.

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 περατότητας της κυττοπλάσματικής μεμβράνης στο τοξικό μόριο.

Από τους μηχανισμούς αντοχής αξίζει να αναφερθεί ο μηχανισμός της αποτοξικοποίησης (detoxification).

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 (ευαίσθητου) πληθυσμού και ανθεκτικών στελεχών. Η ταχύτητα επιλογής εξαρτάται επίσης από την υποπληθυσμιακή δράση του φαρμάκου και την συχνότητα των επεμβάσεων με το ίδιο φάρμακο.

Η σταθερότητα τέλος της ανθεκτικότητας εξαρτάται από την προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών. 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 άλλες περιπτώσεις οι μεταλλάξεις ανθεκτικότητας δεν επηρεάζουν την προσαρμοστικότητα και ο πληθυσμός του παθογόνου μπορεί να παραμείνει ανθεκτικός για πολλά χρόνια μετά την διακοπή χρήσεως του φαρμάκου.

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* έχει την ικανότητα μετά από συνεχείς επεμβάσεις με ορισμένα μυκητοκτόνα να δημιουργεί στελέχη ανθεκτικά στα εφαρμοζόμενα μυκητοκτόνα.

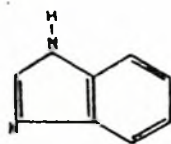
Κατά τον Ζιώγα (1981), η καταπολέμηση του βοτρυτή με τα προστατευτικά μυκητοκτόνα, Captan, Captafol, Folpet, Zineb, Thiram, Dithianon, κ. α., χαρακτηρίζεται μετρίως αποτελεσματική. Με την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών η αποτελεσματικότητα πέφτει κατά 50%. Κατά τον Lafoux (1994) τα προστατευτικά μυκητοκτόνα δεν επηρεάστηκαν από ανθεκτικότητα εξ αιτίας της πολύπλευρης δράσης τους.

Κατά τον Ziogas 1993, όταν πρωτοεμφανίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1960 τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, έδωσαν εξαιρετικό έλεγχο του βοτρυτή. Αλλά μετά από κάποια χρόνια εντατικής χρήσης βρέθηκε ότι επιλογή από στελέχη παθογόνα ανθεκτικά, μπορούν να καταστήσουν αυτά τα μυκητοκτόνα εντελώς αναποτελεσματικά. Συχνά στελέχη ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά, τείνουν να παραμείνουν κυρίαρχα αρκετά χρόνια μετά την απόσυρση των βενζιμιδαζολικών από την ίδια περιοχή. Στην περίπτωση του βοτρυτή αντικατάσταση των βενζιμιδαζολικών από τα δικαρβοξυμιδικά έδωσε μόνο προσωρινή λύση στο πρόβλημα ελέγχου της ασθένειας, γιατί και αυτά επίσης επιλέχουν ανθεκτικά στελέχη. Βάση του φαινομένου της αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν τα βενζιμιδαζολικά και φαινοθοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, χρησιμοποιήθηκε μίγμα αυτών για τον έλεγχο στελεχών *Botrytis cinerea* τα οποία ήταν ευαίσθητα στα βενζιμιδαζολικά και ανθεκτικά στα φαινοθοκαρβαμιδικά ή και το αντίθετο.

## ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΒΕΝΖΙΜΙΔΑΖΟΛΙΚΑ ΚΑΙ ΦΑΙΝΥΛΟΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

### Βενζιμιδαζολικά

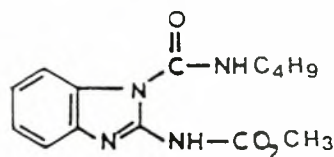
Στην ομάδα αυτή υπάρχουν όλα τα μυκητοτοξικά παράγωγα της βενζιμιδαζόλης (σχήμα α), που δεν είναι η ίδια σημαντικά τοξική στους μύκητες.



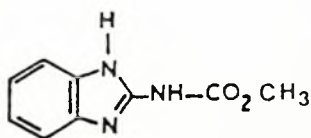
Σχήμα α

benzimidazole

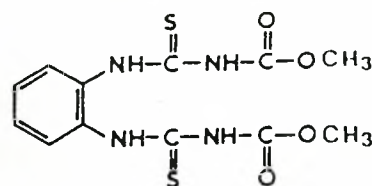
Στο σχήμα β, δίνονται οι δομικοί τύποι των πιο σημαντικών βενζιμιδαζολικών.



benomyl



carbendazim (MBC)



thiophanate-methyl

### Σχήμα β

Το benomyl, που ανακαλύφθηκε το 1968 από τους Delp και Kloring είναι μυκητοτοξικό σε εξαιρετικά μικρές συγκεντρώσεις (π.χ. 0.1ppm). Είναι διασυστηματικό και μπορεί να καταπολεμήσει τις κυριότερες μυκητολογικές ασθένειες. Είκοσι χρόνια μετά την εμφάνισή του εξακολουθεί να είναι ένα σημαντικό μυκητοκτόνο, αλλά η εικόνα εμφανίζεται λιγότερο αισιόδοξη από ότι τα πρώτα χρόνια μετά την ανακάλυψή του. Οι λόγοι είναι δύο, η ευκολία με την οποία στους ευαίσθητους μύκητες παράγονται, με μεταλλάξεις, στελέχη ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα στον αγρό και η γενετική δραστηριότητα των μυκητοκτόνων αυτών.

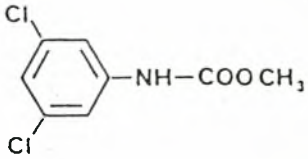
Σε υδατικό διάλυμα το benomyl μετατρέπεται γρήγορα στον μεθυλεστέρα του βενζιμιδαζολοκαρβαμιδικού οξέος, γνωστός με το όνομα carbendazim (MBC).

Το thiophanate-methyl, είναι διασυστηματικό και μοιάζει στη βιολογική δράση με τα προηγούμενα.



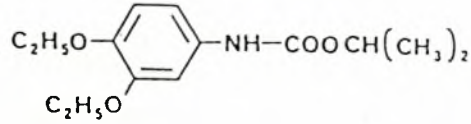
## Φαινυλοκαρβαμιδικά

Στο σχήμα 8, δίνονται οι δομικοί τύποι των σημαντικότερων φαινυλοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων.



N-(3-5-dichlorophenyl)carbamate

### Σχήμα 8



diethofencarb (NPC)

Οι ανωτέρω ενώσεις δεν είναι φυτοτοξικές και είναι κατάλληλες για την καταπολέμηση των ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών του *Botrytis cinerea*.

Οι Leroux και Gredt παρατήρησαν πρώτοι ότι στελέχη του *Botrytis cinerea*, ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά, παρουσίασαν μεγάλη ευαισθησία στα φαινυλοκαρβαμιδικά.

## Εμπειρία στον αγρό

Πολλές έρευνες διεξήχθησαν για να καθορίσουν την παρουσία ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα και στο μίγμα τους (carbendazim+diethofencarb) σε προστατευόμενες καλλιέργειες ή μη. Ανθεκτικά στελέχη έχουν βρεθεί στον αγρό και στο εργαστήριο.

Από το φθινόπωρο του 1970 οι Bollen και Scoffen, παρατήρησαν για πρώτη φορά στην Ολλανδία ανθεκτικότητα του μύκητα *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά, μέσα σε θερμοκήπια κυκλάμινων. Από το 1972 και μετά το ίδιο φαινόμενο αναφέρεται και στο αμπέλι.

Σε αμπελώνες στη Νέα Ζηλανδία το 1985 βρέθηκαν στελέχη *B. cinerea*, με μέση συχνότητα ανθεκτικότητας 8-40% στα βενζιμιδαζολικά (Beever 1989).

Στην Ισπανία το 1992, εντοπίστηκαν στελέχη *B. cinerea* με πολλαπλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξυμιδικά και στο μίγμα carbendazim+diethofencarb σε θερμοκήπια όπου είχαν γίνει ψεκασμοί με το τελευταίο (Raposo 1994). Στελέχη πολλαπλής ανθεκτικότητας εντοπίστηκαν και στο Ισραήλ το 1988 δύο χρόνια μετά την χρήση του μίγματος σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες αγγουριού (Katan et. al. 1989)

Μετά από τέσσερα χρόνια εφαρμογής του carbendazim+diethofencarb σε

αμπελώνες στη Γαλλία, η μέση συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών ήταν 43.7%.

Σε πρόσφατα πειράματα διαπιστώθηκε η παρουσία στελεχών του παθογόνου με διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα σε καλλιέργειες θερμοκηπίου στις περιοχές Τυμπακίου Κρήτης, Τριφυλίας Μεσσηνίας και Μαραθώνα Αττικής (Λάσκαρης, Παππάς, Κυριακόπουλος 1994).

Απομονώσεις με ανθεκτικότητα στο benomyl με τιμές  $ED_{50} > 70 \text{ mg/ml}$  στο εργαστήριο ξεπέρασαν την παρουσία του μυκητοκτόνου και προκάλεσαν αρρώστια σε φύλλα *Geranium* (Moorman 1992).

### Μηχανισμός δράσης των βενζιμιδαζολικών



Κατά τους Γεωργόπουλος και Ζιώγας 1992, ο μηχανισμός μυκητοτοξικής δράσης των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων είναι γνωστός σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό. Τις πρώτες ενδείξεις κάποιας επίδρασης στη διεργασία της μιτωτικής πυρηνοτομίας παρουσίασε ο Hastie, που χρησιμοποίησε γενετική μέθοδο. Στη συνέχεια έγιναν εργασίες από τους Hammerschlag, Sisler και κυρίως από τον Davidse (1973) για να δούν αν τα βενζιμιδαζολικά δρούσαν με παρόμοιο τρόπο με την κολχικίνη (τον κλασικό παρεμποδιστή της μίτωσης) που δρα προσκολλόμενη στην tubulin. Είναι τώρα γνωστό ότι στους ευαίσθητους μύκητες το carbendazim είναι τοξικό, γιατί παρεμποδίζει το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου, αποκλείοντας έτσι τον κανονικό αποχωρισμό των θυγατρικών χρωματοσωμάτων. Οι μικροσωληνίσκοι σχηματίζονται με πολυμερισμό υπομονάδων μιας πρωτεΐνης της tubulin. Η tubulin είναι ένα ετεροδιμερές, που οι δύο υπομονάδες της συμβολίζονται ως  $\alpha$ - και  $\beta$ -tubulin. Έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη δύο τουλάχιστον ειδών  $\beta$ -tubulin ( $\beta_1$  και  $\beta_2$ ) και τριών  $\alpha$ -tubulin ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ). Προσκόλληση του carbendazim στην  $\beta$ -tubulin εμποδίζει τον πολυμερισμό, άτρακτος δεν σχηματίζεται, εμποδίζεται η μείωση και η μίτωση, διαταράσσεται το κυτταρικό σχήμα και ο μύκητας δεν μπορεί να αναπτυχθεί.

Σημαντικό όμως ρόλο για την μυκητοτοξικότητα αυτών των ενώσεων παίζει και η παρεμπόδιση του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων του κυτοπλάσματος από τους οποίους εξαρτάται ο προανατολισμός της αύξησης των υφών.

Η διαφορετική συσχέτιση των βενζιμιδαζολικών με την  $\beta$ -tubulin από διάφορους οργανισμούς είναι ο κύριος παράγοντας που προσδιορίζει την εκλεκτικότητα των μυκητοκτόνων αυτών μέσα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

## Μηχανισμός δράσης των φαινυλοκαρβαμιδικών

Ως προς τον μηχανισμό δράσης, τα φαινυλοκαρβαμιδικά φαίνεται ότι προσκολλώνται στην  $\beta$ -tubulin και εμποδίζουν έτσι τη λειτουργία των μικροσωληνίσκων και την οργάνωση της μιτωτικής ατράκτου στους μύκητες. Σε ελέγχους βλάστησης σπορίων στελεχών ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά, τα φαινυλοκαρβαμιδικά προκάλεσαν τέτοιες αλλαγές, παρόμοιες με εκείνες που παρακαλούνται στα άγρια στελέχη από το carbendazim. Τέτοιες παρατηρήσεις υποθέτουν ότι τα φαινυλοκαρβαμιδικά μπορούν επίσης να επηρεάσουν την λειτουργία των μικροσωληνίσκων στα κύτταρα των μυκήτων. (Leroux).

Αλλαγές στη θέση προσκόλλησης, που μειώνουν τη συσχέτιση για τα βενζιμιδαζολικά μπορεί να αυξήσουν τη συσχέτιση για τα φαινυλοκαρβαμιδικά. Η αρνητική αυτή συσχέτιση όμως δεν είναι κανόνας χωρίς εξαίρεση και για αυτό τα φαινυλοκαρβαμιδικά δεν έδωσαν λύση στο πρόβλημα της ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά.

## Γενικές επιδράσεις των μυκητοκτόνων

Με χαμηλές συγκεντρώσεις βενζιμιδαζολικών η παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης συνοδεύεται από τυπική παραμόρφωση των υφών. Τέτοια αποτελέσματα πιθανόν αυξάνουν λόγω της σύγχυσης της λειτουργίας των μικροσωληνίσκων, σαν ένα αποτέλεσμα της προσκόλλησης αυτών των μυκητοκτόνων στην tubulin. (Leroux 1987).

Κατά την βλάστηση των σπορίων, ευαίσθητες απομονώσεις στα βενζιμιδαζολικά σχημάτισαν κοντούς διογκωμένους και παραμορφωμένους βλαστικούς σωλήνες σε υπόστρωμα malt extract agar εμπλουτισμένο με carbendazim (100 mg/ml) (Beever 1989).

Σε εργαστηριακές έρευνες έχει παρατηρηθεί ότι συκέντρωση 10μg/ml MDPC παρεμπόδισε την μίτωση, με ανώμαλη διαμόρφωση της χρωματίνης, στις ανθεκτικές απομονώσεις αλλά όχι και στις ευαίσθητες. Ενώ το carbendazim στην ίδια συκέντρωση διετάραξε την μίτωση στις απομονώσεις άγριου τύπου, αλλά δεν άσκησε καμία επίδραση στην δομή της χρωματίνης από τις ανθεκτικές απομονώσεις (Susuki κ.α. 1984).

## Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Μηχανισμοί ανθεκτικότητας έχουν μελετηθεί κυρίως σε εργαστηριακές μεταλλάξεις από μύκητα πρότυπο και περιλαμβάνουν διαφοροποιημένη συσχέτιση της tubulin με τα βενζιμιδαζολικά, αλλαγμένη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων, αμελητέες μεταλλάξεις σε μη απαραίτητα γονίδια tubulin και αλλαγές αμινοξέων στην tubulin. Τα περιορισμένα στοιχεία πάνω

στους μηχανισμούς ανάπτυξης ανθεκτικότητας στους φυτοπαθογόνους μύκητες, δείχνουν σαν βάση ανθεκτικότητας την αλληλαχμένη συσχένεια της ευαίσθητης θέσης που αντιδρά με το μυκητοκτόνο (Davidse).

Πολλοί ερευνητές προτείνουν ότι διαφορές στην ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα ανάμεσα σε απομονώσεις *Botryotinia fuckeliana*, θα μπορούσαν να οφείλονται στην συνύπαρξη διαφορετικών γενετικά πυρήνων σε ένα ετεροκαρμωτικό μυκήλιο. Η ετεροκαρμύωση δίνει την δυνατότητα στο μύκητα να προσαρμόζεται σε αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών. Ομως ετεροκαρμωτικοί μύκητες που έχουν αλληλαχμόμορφα για ανθεκτικότητα ή ευαισθησία σε μυκητοκτόνα σε διάφορους πυρήνες, μπορούν να προσαρμοστούν σε διαφορετικά περιβάλλοντα, αναδιαμορφώνοντας την αναλογία των δύο ειδών πυρήνων.

#### Διαφοροποιημένη συσχένεια της tubulin με τα βενζιμιδαζολικά

Εχιναν έρευνες πάνω στη γενετική βάση της ανθεκτικότητας, στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, απομονώσεων από σπόρο του μύκητα *Botryotinia fuckeliana*. Σε αυτόν τον μύκητα το γονίδιο Mbc1 με τα αλληλαχμόμορφα Mbc1LR και Mbc1HR, είναι υπεύθυνο για χαμηλή και υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά. Το Mbc1HR αλληλαχμόμορφο, επίσης είναι υπεύθυνο για την ευαισθησία στα φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα. Το αλληλαχμόμορφο Mbc1S είναι υπεύθυνο για την κανονική ευαισθησία στα μυκητοκτόνα (Faretta και Pollastro 1993).

Η συσχένεια της ευαίσθητης θέσης της tubulin με τα βενζιμιδαζολικά, προφανώς καθορίζει εξ ολοκλήρου αν ένα βενζιμιδαζολικό σκεύασμα έχει αντιμυκητοκτόνο δράση ή όχι.

#### Αλληλαχμένη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων

Πολλές μεταλλάξεις στο γονίδιο benA που αποδίδει ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, έχουν ποικίλα παρεμποδιστικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη σε υψηλή θερμοκρασία (*ts<sup>-</sup> mutants*) και/ή σε χαμηλή θερμοκρασία (*cs<sup>-</sup> mutants*) και στην ευαισθησία σε άλλους παράγοντες που επηρεάζουν τους μικροσωληνίσκους όπως griseofulvin και p-fluorophenylalanine. (Oakley and Morris 1981). Μια τέτοια μετάλλαξη, benA33 προκαλεί υπερσταθερότητα των μικροσωληνίσκων. Στελέχη που φέρουν το μεταλλαχμένο benA33 μολοκάρονται κατά την μίτωση, αν και σχηματίζεται μιτωτική άτρακτος. Λόγω της μεγαλύτερης τους σταθερότητας οι μικροσωληνίσκοι αντιστέκονται προφανώς και στην διασκόρπισή τους που προκαλείται από τα βενζιμιδαζολικά. Η υπερσταθερότητα των μικροσωληνίσκων που προκαλείται από την μετάλλαξη benA33 μπορεί να εξουδετερωθεί από επιπλέον μεταλλάξεις στο γονίδιο benA.



### Αμεληταίες μεταλλάξεις σε γονίδια tubulin

Οι μεταλλάξεις στη γονιδιακή θέση *benA* προκαλούν ανθεκτικότητα, μόνο κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης. Το στάδιο παραγωγής σπορίων είναι ακόμα ευαίσθητο στα βενζιμιδαζολικά. Αμεληταίες μεταλλάξεις στο γονίδιο *tubC* (υπεύθυνο για τον σχηματισμό της  $\alpha$ -tubulin) προκαλούν ανθεκτικότητα στο στάδιο παραγωγής σπορίων σε στελέχη που φέρουν *benA* μεταλλάξεις. Τέτοια μεταλλαχμένα στελέχη, θα μπορούσαν να επιτευχθούν μετά από έκθεση σε UV-ακτινοβολία ή από ολοκληρωτική διαφοροποίηση σε μία συγκεκριμένη θέση (Weatherbee et al., 1985).

Αμεληταίες μεταλλάξεις σε ένα από τα γονίδια της tubulin, προκαλεί αυξημένη ευαισθησία στα βενζιμιδαζολικά. Αν και δεν είναι σημαντικά για την ανάπτυξη των στελεχών τα παράγωγα αυτών των γονιδίων, συμμετέχουν προφανώς στον σχηματισμό των μικροσωληνίσκων. Μειωμένη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων ή αυξημένη συγγένεια της tubulin στα βενζιμιδαζολικά λόγω της έλλειψης ενός από τους τύπους  $\alpha$ -tubulin μπορεί να προκαλέσουν την τροποποιημένη ευαισθησία των αμεληταία μεταλλαχμένων στελεχών (Adachi et al. 1986).

### Αλλαγές αμινοξέων στην $\beta$ -tubulin

Μεταλλάξεις του *Botrytis cinerea* στο δομικό γονίδιο της  $\beta$ -tubulin, φαίνονται επίσης να αναμειγνύονται στην ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά.

Μετά από εργαστηριακές έρευνες οι Yarden και katan (1994) βρήκαν ότι στο κωδικό 198, της διαδοχής των νουκλεοτιδίων του γενετικού κώδικα που αντιστοιχεί στην διαδοχή των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που κωδικοποιεί για γλουταμινικό οξύ όταν αντικαταστάθηκε από κωδικό που κωδικοποιεί για αλανίνη εμφανίστηκαν φαινότυποι με ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά. Και όταν αντικαταστάθηκε από κωδικό που κωδικοποιεί για θυσίνη εμφανίστηκαν φαινότυποι με ανθεκτικότητα στα φαινυλοκαρβαμικά και βενζιμιδαζολικά. Το κωδικό 200 που κωδικοποιεί για φαινυλαμίνη όταν αντικαταστάθηκε με κωδικό που κωδικοποιεί για τυροσίνη εμφανίστηκαν φαινότυποι με ανθεκτικότητα στα φαινυλοκαρβαμικά και μέτρια ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά.

## Αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα

Όταν εμφάνιση ανθεκτικότητας σε ένα μυκητοκτόνο, συμπίπτει με αυξημένη ευαισθησία σε μία άλλη χημική ένωση, μπορεί να είναι μία περίπτωση αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας.

Η πιο κοινή στρατηγική για αποφυγή της εκδήλωσης ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα στην πράξη, είναι η απαχόρευση της συνεχούς χρήσης ενός σκευάσματος και ενδείκνυται ο συνδιασμός του και 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 μία τοξική ουσία και αυξάνει την ευαισθησία σε μία άλλη. Αυτό το φαινόμενο που μπορεί να συμβεί σε μεταλλάξεις στο εργαστήριο ή σε στείληξη στον αγρό, αφορά τα μυκητοκτόνα σκευάσματα α) έχοντας την ίδια ευαίσθητη θέση και παρόμοια χημική δομή, β) εμποδίζοντας την ίδια μεταβολική διαδικασία αλλά σε διαφορετικές θέσεις, γ) έχοντας διαφορετικούς τρόπους δράσης (Leroux).

Θεωρείται γενικά ότι η αντίσταση στα βενζιμιδαζολικά στους μύκητες, συνδέεται με αλλαγές στην  $\beta$ -tubulin, η οποία παρέχει μία μειωμένη συσχέτιση προσκόλλησης με αυτά τα μυκητοκτόνα. Τέτοιες αλλαγές μπορούν να οδηγήσουν σε μία αυξημένη συσχέτιση προσκόλλησης της tubulin με τα μυκητοκτόνα που αφορούν την αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα ανθεκτικά στελέχη. Σύμφωνα με τον Davidse (1985) αυτό το φαινόμενο της αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας μπορεί να αποδοθεί στην αλλαγμένη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων περισσότερο, παρά σε αλλαγές της συσχέτισης της tubulin με αυτά τα διάφορα τοξικά.

## Αποτελέσματα της αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας

Στα περισσότερα είδη μυκήτων κάποιοι φαινότυποι ανθεκτικοί στα βενζιμιδαζολικά εκδηλώνουν αρνητική διασταυρωτή συσχέτιση με τα φαινυλοκαρβαμιδικά. Γενικά αυτό το φαινόμενο αφορά τις απομονώσεις υψηλής ανθεκτικότητας, ενώ στελέχη μέτριας και ασθενούς ανθεκτικότητας παραμένουν ανεπηρέαστα από τα φαινυλοκαρβαμιδικά. Θετική διασταυρωτή ανθεκτικότητα έχει εμφανιστεί μεταξύ βενζιμιδαζολικών σε στελέχη αγρού και σε μεταλλαχθέντα στελέχη εργαστηρίου (Leroux 1994).

Διάφορες έρευνες δείχνουν ότι αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ MDRC και MBC, όχι μόνο στην μυκητοτοξικότητα αλλά επίσης και στις επιδράσεις στην μορφολογία των μυκήτων και στην μίτωση.

Η αποτελεσματικότητα από το diethofencarb (NPC), το carbendazim (MBC) και το μίγμα τους, συγκρίθηκαν in vitro σε επιλαχθέντα στελέχη *Botrytis cinerea*. Όλες οι ανθεκτικές απομονώσεις στο carbendazim,

δοκιμαζόμενες, παρουσίασαν αρνητική σχετιζόμενη διασταυρωτή ανθεκτικότητα στο diethofencarb (EC<0.05μg/ml για ανάπτυξη μυκηλίου). Το diethofencarb επίσης έδειξε μια ελαφρά παρεμποδιστική επίδραση σε ευαίσθητες απομονώσεις στο carbendazim. Το μίγμα (MBC+NPC) εξ ίσου παρεμπόδισε την μυκηλιακή ανάπτυξη και από τους δύο τύπους στελεχών (EC<0.1+0.1μg/ml) ενώ, ήταν ελαφρά πιο αποτελεσματικό στην βλάστηση спорίων των ανθεκτικών στο MBC απομονώσεων (Pappas κ.α. 1988).

Σε ανθεκτικό πληθυσμό *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά, υπάρχουν σε χαμηλή συχνότητα και φαινότυποι με ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά. Μετά όμως από χρήση του μίγματος carbendazim+diethofencarb η συχνότητα αυτή αυξήθηκε. Επίσης τριπλής ανθεκτικότητας στελέχη, στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξυμιδικά και φαινυλοκαρβαμιδικά, εμφανίζονται όταν χρησιμοποιηθεί το μίγμα σε πληθυσμό ο οποίος είναι ήδη ανθεκτικός στα βενζιμιδαζολικά και δικαρβοξυμιδικά (Elad κ.α. 1992).

Η ύπαρξη, στον άγριο πληθυσμό *Botryotinia fuckeliana*, στελεχών με αλληλόμορφα Mbc1R που καθορίζουν ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά αλλά δεν καταλήγουν σε ευαισθησία στα φαινυλοκαρβαμιδικά, δείχνει ότι στρατηγικές προσαπτάς καθλιεργειών που περιλαμβάνουν το μίγμα (MBC+NPC), μπορεί να χάσουν την αποτελεσματικότητά τους μακροπρόθεσμα, μετά από υψηλή πίεση επιλογής που ευνοεί απομονώσεις που δεν είναι ευαίσθητες σε κανένα από τα δύο μυκητοκτόνα (Farettra κ.α. 1993).

Απομονώσεις ανθεκτικές στα βενζιμιδαζολικά είχαν τιμές LC<sub>50</sub> για ανάπτυξη μυκηλίου μεταξύ 105-324mg/l, ενώ ανθεκτικές στα βενζιμιδαζολικά είχαν τιμές LC<sub>50</sub> μεταξύ 0.04-0.07mg/l. Όλες οι ευαίσθητες απομονώσεις, για το μίγμα carbendazim+diethofencarb είχαν τιμές LC<sub>50</sub> μεταξύ 0.01-0.15mg/l carbendazim και 0.01-0.15mg/ml diethofencarb και οι ανθεκτικές είχαν τιμές LD<sub>50</sub> μεταξύ 15-26mg/ml carbendazim και 75-130mg/ml diethofencarb (Raposso κ.α. 1994).

Μετά από έρευνες στη Γαλλία, επιβεβαιώθηκε ότι μία επέμβαση το χρόνο με δικαρβοξυμιδικά (μόνο ή σε μίγμα με thiram) άσκησε χαμηλότερη πίεση επιλογής από ότι το μίγμα carbendazim+diethofencarb (Leroux 1994).

## Προσαρμοστικότητα ανθεκτικών στελεχών

Προσαρμοστικότητα, είναι μία συγκριτική έννοια που σχετίζεται με την ικανότητα ενός γενότυπου να αναπαραχθεί ή επιβιώσει, περισσότερο ή λιγότερο επιτυχώς, από κάποιον άλλο γενότυπο, κάτω από τις ίδιες δεδομένες συνθήκες.

Μετά από ερευνητικές εργασίες που έχουν γίνει φαίνεται ότι τα ανθεκτικά στελέχη *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά, τουλάχιστον εκείνα που δεν είναι εξ ίσου ανθεκτικά και στα δικαρβοξιμιδικά, έχουν ίδια προσαρμοστικότητα με τα ευαίσθητα στελέχη στα βενζιμιδαζολικά (Beever κ.α. 1989).

Η επιμονή των ανθεκτικών στελεχών *Botrytis cinerea*, στα βενζιμιδαζολικά (benomyl), σε θερμοκήπια για περισσότερο από 10 χρόνια μετά την διακοπή της χρήσης του benomyl, δείχνει ότι η ανθεκτικότητα στο benomyl πιθανώς δεν είναι επιβλαβής στην προσαρμοστικότητα του πληθυσμού *Botrytis* (Faretta κ.α. 1989).

Μετά από εκθεση 18 μηνών στον αχρό, σκληρωτίων, ανθεκτικών στελεχών *Botrytis cinerea* σε μυκητοκτόνα, παρατηρήθηκε ότι η ανθεκτικότητα είχε παραμείνει (Hsiang και Chastagner 1992).

Σύγκριση μεταξύ αντιπροσωπευτικών ανθεκτικών στελεχών στα βενζιμιδαζολικά χωρίς αυξημένη ευαισθησία στο diethofencarb και των στελεχών γονέων τους, σε σχέση με κάποια χαρακτηριστικά που καθορίζουν την προσαρμοστικότητα, έδειξαν ότι παραγωγή κονιδίων, βλάστηση σπορίων και επιμήκηση βλαστικών σωλήνων, είναι σημαντικά μειωμένα στα μεταλλαχμένα στελέχη (Ziogas κ.α. 1993)

Παρατηρήθηκε μείωση της συχνότητας των ανθεκτικών στελεχών στα δικαρβοξιμιδικά και των στελεχών διπλής ανθεκτικότητας στο carbendazim+diethofencarb, σε αμπελώνες στη Γαλλία όταν σταμάτησε η πίεση επιλογής. Αυτή η όχι επίμονη ανθεκτικότητα που οφείλεται προφανώς σε μειωμένη προσαρμοστικότητα των στελεχών, επέτρεψε την διακεκομμένη χρήση των δικαρβοξιμιδικών και του μίγματος carbendazim+diethofencarb (Leroux 1994).

## Μορφολογικές και φυσιολογικές ιδιότητες

Πολλές μελέτες έχουν γίνει για να εκτιμηθούν in vitro με βάση τον φαινότυπο κάποια χαρακτηριστικά, που καθορίζουν την προσαρμοστικότητα και να συγκριθούν μεταξύ τους σε σχέση με την ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, φαινυλοκαρβαμιδικά και στο μίγμα carbendazim+diethofencarb.

Ο Beever κ.α. (1989) παρατήρησε ότι μέσα επίπεδα ανάπτυξης ήταν παρόμοια για στελέχη ανθεκτικά ή ευαίσθητα στα βενζιμιδαζολικά. Οι μόνες



διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν στην αντίδρασή τους στα μυκητοκτόνα.

Απομονώσεις που χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικές στο benomyl και το diethofencarb έδειξαν κανονικό, επίπεδο ανάπτυξης, σχήμα αποικίας και παραγωγή σπορίων, σε υπόστρωμα PDA, στους 22°C (Katan κ.α. 1989).

Οι Hsiang και Chastanger (1991) υποστήριξαν ότι η ανθεκτικότητα του μύκητα *Botrytis cinerea*, ήταν γενικά συνδιασμένη με μικρότερη ανάπτυξη και μειωμένη μολυσματικότητα.

Στελέχη τριπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμιδικά και φαινοθακαραμιδικά μυκητοκτόνα αναπτύσσονται με μικρότερο ρυθμό από τα άγρια στελέχη, σε ατροποποίητο υπόστρωμα και με μικρότερο ρυθμό σε σχέση με ανθεκτικά στελέχη στα βενζιμιδαζολικά σε υλικό εμπλουτισμένο με carbendazim και με ή χωρίς diethofencarb (Elad κ.α. 1992).

Οι Hsiang και Chastagner (1992), μετά από εύρευνα στην παραγωγή σκληρωτίων, στελεχών *Botrytis cinerea* με διαφορές στην ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, κατέληξαν ότι οι ευαίσθητες απομονώσεις σχημάτιζαν λιγότερα σκληρωτία από τις ανθεκτικές. Διαφορές στη βιοσιμότητα των σκληρωτίων δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα σε όλες τις απομονώσεις. Η μέση βιοσιμότητα μετά από 18 μήνες ήταν 77%.

Χαρακτηριστικά που καθορίζουν την προσαρμοστικότητα, τέτοια όπως σποριοπαραγωγή, βλαστικότητα σπορίων και επιμήκυνση των βλαστικών υφών, βρέθηκαν να μειώνονται σημαντικά στα μεταλλαχμένα στελέχη του *Botrytis cinerea* τα οποία ήταν ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά και το diethofencarb (Ziogas και Girgis, 1993).

Ο Raposo κ.α. (1994) παρατήρησε ότι ευαίσθητες απομονώσεις αναπτύχθηκαν με βραδύτερο ρυθμό σε PDA, από ότι οι ανθεκτικές, αλλά η σποριοπαραγωγή (στους 22°C), το ποσοστό βλάστησης σπορίων και η επιμήκυνση των βλαστικών υφών ήταν παρόμοια σε όλες τις απομονώσεις. Επίσης οι ανθεκτικές στα βενζιμιδαζολικά παρήγαγαν τα μεγαλύτερα σε μέγεθος σκληρωτία, ενώ οι διπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και τα δικαρβοξιμιδικά σχημάτιζαν τον μεγαλύτερο αριθμό σκληρωτίων ανά cm<sup>2</sup> αποικίας, σε υπόστρωμα PDA και έδειχναν μόνο τη μισή σποριοπαραγωγή από αυτή των ευαίσθητων απομονώσεων. Το μέγεθος και ο αριθμός σκληρωτίων έχουν επιπτώσεις στην επιβίωση και την βιοσιμότητα των στελεχών. Τέλος συγκρίνοντας την γραμμική ανάπτυξη του μυκηλίου φάνηκε ότι απομονώσεις τριπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμιδικά και στο μίγμα carbendazim+diethofencarb παρουσιάζουν την μικρότερη προσαρμοστικότητα σε σχέση με όλες τις άλλες.

Από έρευνες σε θερμοκήπια της περιοχής Τριφυλίας της Μεσσηνίας, διαπιστώθηκαν προσβολές από στελέχη διασταυρωτής ανθεκτικότητας. Σε συχθέντρωση carbendazim+diethofencarb 1+1μg/ml, τα σπόρια των στελεχών αυτών, βλάσταναν με κανονικούς βλαστικούς σωλήνες και σχημάτιζαν αποικίες παρόμοιες με αυτές σε υλικό χωρίς μυκητοκτόνο.

Αντίθετα τα σπόρια των ανθεκτικών μόνο στο carbendazim ή diethofencarb απομονώσεων, βλάσταναν με παραμορφωμένους, βραχείς σωλήνες και παρεμποδιζόταν η περαιτέρω ανάπτυξη αποικίας. Όλα τα στελέχη διασταυρωτής ανθεκτικότητας που απομονώθηκαν ήταν μέτριας ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά δηλαδή, η βλάστηση σπορίων γινόταν με παραμορφωμένους σωλήνες και η αποικία είχε περιορισμένη ανάπτυξη σε συγκέντρωση carbendazim  $>10\mu\text{g/ml}$ . (Πίνακας 1)  
(Λάσκαρης, Παππάς και Κυριακόπουλος 1994).

### Παθογόνος ικανότητα

Οι ερευνητές εκτιμούν την παθογόνο ικανότητα των στελεχών *Botrytis cinerea* συνήθως με δύο τρόπους. Με τον ένα τρόπο, χρησιμοποιούν σαν μόλυσμα κονίδια, τα οποία μπουκώνται την εγκαθίδρυση των πρωταρχικών θέσεων ασθένειας και με τον άλλο τρόπο χρησιμοποιούν σαν μόλυσμα δίσκο μυκηλίου, ο οποίος μιμείται δευτερεύουσα διάδοση της ασθένειας όπως για παράδειγμα, από σάπιο καρπό.

Σε πείραμα σύγκρισης, μεταξύ μεταλλαχμένου στελεχούς ανθεκτικού στα βενζιμιδαζολικά και στο diethofencarb και του αντίστοιχου άγριου στελεχούς, το μεταλλαχμένο στέλεχος έδειξε υψηλή παθογένεση ισοδύναμη με του άγριου στελεχούς, όταν εκτιμήθηκε η παθογόνος ικανότητα επάνω σε φυτά αχγουριού στο στάδιο των κοτυληδόνων στα οποία νωρίτερα είχε γίνει ή όχι εφαρμογή με benomyl (Ziogas κ.α. 1993).

Σε εργαστήριο έχιναν τεχνητές μολύνσεις, με δίσκους μυκηλίου, ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά φαινοθαοκαρβαμιδικά και στο μίγμα carbendazim+diethofencarb, επάνω σε κομμένες κοτυληδόνες φυτών αχγουριού. Παρατηρήθηκε ότι ανθεκτικά στελέχη στο μίγμα μυκητοκτόνων, ήταν όχι λιγότερο επιθετικά από τα ευαίσθητα στελέχη. Υψηλά επίπεδα μόλυνσης από όλα τα ανθεκτικά στο μίγμα στελέχη, παρατηρήθηκε πάνω σε κοτυληδόνες, στις οποίες είχε γίνει νωρίτερα εφαρμογή με carbendazim με ή χωρίς diethofencarb. Ενώ στελέχη ευαίσθητα στο carbendazim και ανθεκτικά στο diethofencarb και στελέχη ανθεκτικά στο carbendazim και ευαίσθητα στο diethofencarb δεν μόλυναν κοτυληδόνες, στις οποίες νωρίτερα είχε γίνει εφαρμογή με το μίγμα carbendazim+diethofencarb. Στην ίδια εργασία βρέθηκε ότι στελέχη τριπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, φαινοθαοκαρβαμιδικά και δικαρβοξυμιδικά ήταν παθογενή σε κοτυληδόνες στις οποίες νωρίτερα είχε γίνει εφαρμογή με carbendazim, iprodion ή carbendazim+diethofencarb (Elad κ.α. 1992).

Σε έλεγχο παθογόνου ικανότητας επάνω σε φυτά αχγουριού στο στάδιο των κοτυληδόνων, παρατηρήθηκε ότι μεταλλαχμένα στελέχη με :




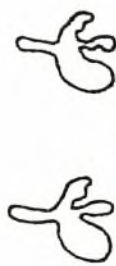

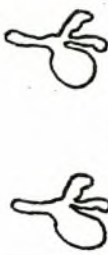



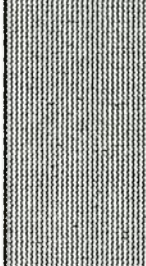





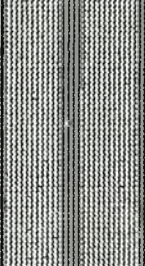
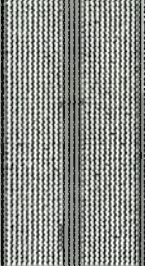
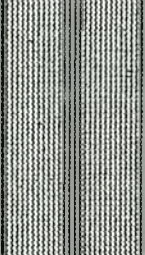

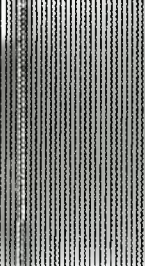





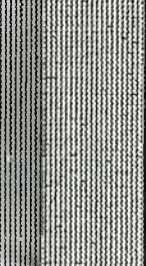
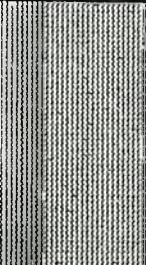







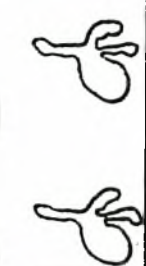
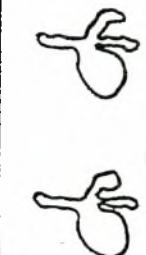


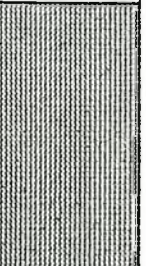
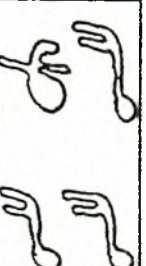
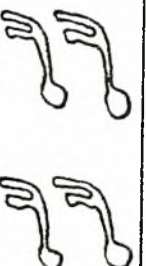

α) ευαίσθησία στο benomyl και ανθεκτικότητα στο diethofencarb

β) ανθεκτικότητα στο benomyl και ευαισθησία στο diethofencarb και  
γ) ανθεκτικότητα στο benomyl και diethofencarb, προκάλεσαν 100% μόθωση. Η παθογένεια του τελευταίου στελεχούς ήταν παρόμοια με αυτή του αντίστοιχου άγριου στελεχούς (Katan κ.α. 1989).

Από τις προηγούμενες έρευνες που αφορούν την εκτίμηση της παθογόνου ικανότητας είναι φανερό ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών, επίσης δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην παθογόνο ικανότητα μεταξύ των μεταλλαχθέντων στελεχών και των αντίστοιχων άγριων στελεχών.



Πίνακας 1. Μέθοδος ελέγχου ευαισθησίας στελεχών του *B. cinerea* στα μυκητοκτόνα με βάση τον τρόπο βλάστησης των σπορίων (point inoculation method). (κατά Αδάκωρη, Παππάς και Κυριακόπουλος, 1994)

ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ	ΜΑΡΤΥΡΑΣ	DICHLIFLUANID	IPRODIONE	CARBENDAZIM	DIETHOFENCARB	CARBENDAZIM + DIETHOFENCARB
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (µg / ml)		1	3	10	1	100
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ		3	3	100	1	100
Άγριο						
Μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid						
Μετρίως ανθεκτικότητας στα dicarboximides						
Υψηλής ανθεκτικότητας στα dicarboximides						
Μετρίως ανθεκτικότητας στα benzimidazoles						
Υψηλής ανθεκτικότητας στα benzimidazoles						
Διασταυρωτής ανθεκτικότητας στα benzimidazoles και phenylcarbamades						



ΜΕΡΟΣ Β'

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

Εγιναν τα πειράματα

- ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *BOTRYTIS CINEREA*
- ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *BOTRYTIS CINEREA* ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΒΕΝΖΙΜΙΔΑΖΟΛΙΚΑ ΚΑΙ ΦΑΙΝΥΛΟΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ
- ΕΞΕΤΑΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *BOTRYTIS CINEREA*
- ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΚΗΛΙΟΥ
- ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *BOTRYTIS CINEREA*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν πριν από τα δικαρβοξιμιδικά, επέλεξαν στελέχη υψηλής ανθεκτικότητας τα οποία ήταν πολύ ευαίσθητα στα φαινυλοκαρβαμιδικά. Μετά τη χρήση του μίγματος carbendazim+diethofencarb το 1987, ένας νέος φαινότυπος διπλής ανθεκτικότητας στις δύο ανωτέρω ομάδες μυκητοκτόνων εμφανίστηκε.

Στην εργασία που πραγματοποιήθηκε μελετήθηκαν οι βιολογικές ιδιότητες των ανθεκτικών στελεχών του *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, σε σύγκριση με των ευαίσθητων στελεχών.

Αρχικά έγινε ανίχνευση ανθεκτικότητας στις δύο ομάδες μυκητοκτόνων, από στελέχη που απομονώθηκαν από προσβολές *Botrytis cinerea* σε καλλιεργειές τομάτας θερμοκηπίου στην Κρήτη. Διαπιστώθηκε ύπαρξη αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των στελεχών στις δύο ανωτέρω ομάδες μυκητοκτόνων.

Επίσης έγινε κατάταξη στελεχών του *Botrytis cinerea* βάση της ανθεκτικότητάς τους στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, η οποία εκτιμήθηκε από τον τρόπο βλάστησης των σπορίων των στελεχών, παρουσία των μυκητοκτόνων σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Στη συνέχεια έγινε εξέταση βιολογικών ιδιοτήτων (ανάπτυξη μυκηλίου, παραγωγή σπορίων, σχηματισμός σκληρωτίων) των ανθεκτικών στελεχών σε σχέση με των ευαίσθητων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη μυκηλίου, με τα ευαίσθητα να παρουσιάζουν έναν ελαφρώς πιο αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης. Η διάμετρος αποικίας καλλιεργειών των ανθεκτικών στελεχών, μετά από επώαση 72 ωρών στους 22°C, είχε τιμές μεταξύ 73.7mm και 81.7mm. Οι αποικίες από καλλιεργειές ευαίσθητων στελεχών είχαν καλήσει όλη την επιφάνεια του τρυβλίου (διάμετρος 85mm). Στην παραγωγή σπορίων πάνω σε υπόστρωμα PDA, σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών. Τα ανθεκτικά στελέχη παρήγαγαν λιχότερα σπόρια από τα ευαίσθητα. Η παραγωγή σπορίων πάνω σε μοθυσμένους φυτικούς ιστούς δεν παρουσίασε μεγάλες διαφορές μεταξύ των ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών. Όταν όμως εξετάστηκε ο σχηματισμός σκληρωτίων, βρέθηκε ότι τα ανθεκτικά στελέχη σχημάτισαν τα περισσότερα σκληρωτία. Το νωπό βάρος των σκληρωτίων ανθεκτικών στελεχών ήταν μεταξύ 0.236 και 0.379mg/τρυβλίο, ενώ των ευαίσθητων από 0 έως 0.101mg/τρυβλίο.

Κατά την εκτίμηση της παθογόνου ικανότητας, παρατηρήθηκε ότι τα ανθεκτικά στελέχη είναι το ίδιο μορφοσμητικά με τα ευαίσθητα στελέχη. Όλα αυτά που αναφέρθηκαν για τις βιολογικές ιδιότητες και την παθογόνο ικανότητα, δείχνουν ότι τα ανθεκτικά στελέχη έχουν αναπτύξει προσαρμοστικότητα.

Σε πείραμα επίδρασης της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του μυκηλίου, βρέθηκε ότι αύξηση της θερμοκρασίας στους 30°C αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη μυκηλίου όλων των στελεχών. Όταν όμως στη συνέχεια οι ίδιες καλλιέργειες επώασθηκαν στους 22°C, τα ανθεκτικά στελέχη παρουσίασαν πολύ μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με τα ευαίσθητα.



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο βοτρυτής είναι μία σημαντική οικονομικά ασθένεια για τις περισσότερες υπό καλλιψη καλλιέργειες σε όλο τον κόσμο, εξ αιτίας των ποιοτικών και ποσοτικών επιδράσεων που έχει στην παραγωγή. Ο χημικός έλεγχος του βοτρυτή έχει βασιστεί κυρίως στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξυμιδικά και φαινοθοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα. Όμως η εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών *Botrytis cinerea* σε μία ή σε δύο ομάδες μυκητοκτόνων, μείωσε σημαντικά την αποτελεσματικότητά τους.

Ανθεκτικά στελέχη στα βενζιμιδαζολικά, έχουν αναπτύξει υψηλή προσαρμοστικότητα και τείνουν να κυριαρχούν αρκετά χρόνια μετά τη διακοπή της χρήσης των βενζιμιδαζολικών σε μία συγκεκριμένη περιοχή. Έτσι ο χημικός έλεγχος του βοτρυτή παραμένει πρόβλημα. Καλά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του βοτρυτή, δίνει η χρήση μιγμάτων μυκητοκτόνων που παρουσιάζουν το φαινόμενο της αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας. Στο εμπόριο σήμερα κυκλοφορεί το μίγμα carbendazim +diethofencarb, δίνοντας καλά αποτελέσματα (Ziogas και Girgis, 1993).

Από πειραματικές μελέτες έχει βρεθεί ότι τα βενζιμιδαζολικά και φαινοθοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, εμποδίζουν το σχηματισμό της μυκητικής στράκτου και τη λειτουργία των μικροσωληνίσκων στους μύκητες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης και το σχηματισμό παραμορφωμένων βλάστικων σωληνών (Davidse, 1987).

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* έχει την ικανότητα ανάπτυξης μηχανισμών ανθεκτικότητας. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται γενικά, ότι η ανθεκτικότητα συνοδεύεται από μειωμένη προσαρμοστικότητα και μορφοματικότητα (Hsiang και Chastanger, 1991).

Η επιμονή όμως ανθεκτικών στελεχών *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά αρκετά χρόνια μετά τη διακοπή της χρήσης τους σε συγκεκριμένη περιοχή, δείχνει ότι η ανθεκτικότητα πιθανόν δεν επηρεάζει την προσαρμοστικότητα του μύκητα (Farettra και Pollastro, 1989).

Επίσης από πειραματικές έρευνες αναφέρεται ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη μορφοματικότητα μεταξύ των μεταλλαχθέντων ανθεκτικών στελεχών και των αντίστοιχων άγριων στελεχών (Ziogas και Girgis, 1993).

Η ανάπτυξη πολλαπλής ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα, δείχνει περαιτέρω, την προσαρμοστική ικανότητα του *Botrytis cinerea* και δίνει έμφαση στην επείγουσα ανάγκη για εξεύρεση εναλλακτικών μεθόδων ελέγχου.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σε όλα τα πειράματα σαν υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε potato dextrose agar (PDA : εκχύλισμα πατάτας, σάκχαρο dextrose, άγαρ). Για την παρασκευή του, διαλύθηκαν 50gη σκόνης PDA σε 1 λίτρο δις- απεσταχμένου νερού. Το διάλυμα θερμάνθηκε για να γίνει πλήρης διάλυση και πήξη της σκόνης και τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες των 50ml. Οι φιάλες με το υλικό και μπουκάλια (περιεκτικότητας 100ml) με δις-απεσταχμένο νερό που χρειάστηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αποστειρώθηκαν σε ειδικό κλίβανο στους 121°C για 15min.

### **Αναγνώριση ανθεκτικών στελεχών *Botrytis cinerea***

Εγινε πείραμα αναγνώρισης ανθεκτικών στελεχών, από δείγματα προσβολών *Botrytis cinerea*, από καλλιέργειες τομάτας θερμοκηπίου, στο Τυμπάκι Κρήτης.

**Υλικά :** Σαν υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε PDA, εμπλουτισμένο με carbendazim (50% wp) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 0, 1, 5, 10, 50, 100mg/l και με diethofencarb (50% wp) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 0, 1, 5, 10, 50, 100mg/l.

**Μέθοδος :** Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της τοπικής μόλυνσης, με άιχα σπόρια (Pappas, 1982). Η σειρά των εργασιών έχει ως εξής :

Εγιναν αρχικές διαλύσεις του carbendazim και του diethofencarb με συκέντρωση 10000mg/l και 1000mg/l, με διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Για την πρώτη, διαλύθηκαν 200mg carbendazim σε 10ml DMSO. Για τη δεύτερη αρχική διάλυση αραιώθηκε 1ml της πρώτης σε 9ml διαλύτη. Το ίδιο επαναλήφθηκε και για το diethofencarb. Το υλικό του υποστρώματος (PDA), που βρισκόταν σε κωνικές φιάλες (50ml ανά φιάλη) θερμάνθηκε για να ρευστοποιηθεί.

Για να γίνουν οι προαναφερόμενες τελικές συγκεντρώσεις, προστέθηκαν στις κωνικές φιάλες που περιείχαν 50ml ρευστοποιημένου υλικού οι ακόλουθες ποσότητες από τις αρχικές συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων.

## I. Για το carbendazim

Από την αρχική των 10000mg/l, προστέθηκαν 0.5 ml σε 50ml υλικού για την τελική συγκέντρωση των 100mg/l.

Από την αρχική των 10000mg/l, προστέθηκαν 0.25ml+0.25ml DMSO σε 50ml υλικού για την τελική συγκέντρωση των 50mg/l.

Από την αρχική των 1000mg/l, προστέθηκαν 0.5ml σε 50ml υλικού για την τελική συγκέντρωση των 10mg/l.

Από την αρχική των 1000mg/l, προστέθηκαν 0.25ml+0.25ml DMSO σε 50ml υλικού για την τελική συγκέντρωση των 5mg/l.

Από την αρχική των 1000mg/l, προστέθηκαν 0.05ml+0.45ml DMSO σε 50ml υλικού για την τελική συγκέντρωση των 1mg/l.

## II. Για το diethofencarb

Εχινε η ίδια ακριβώς εργασία όπως με το carbendazim.

Στους μάρτυρες προστέθηκε 1% διαλύτης (DMSO), δηλαδή 0.5ml διαλύτη σε κάθε 50ml υλικού. Έτσι η συγκέντρωση διαλύματος δραστικού συστατικού, ή μόνο διαλύτη στο υλικό, είναι πάντα 1%.

Το υλικό χύθηκε στα τρυβλία (10ml σε κάθε τρυβλίο). Στα έτοιμα τρυβλία σημειώθηκαν από κάτω και περιφερειακά 6 ισαπέχοντα σημεία, τα οποία και αριθμήθηκαν. Πάνω από κάθε αριθμημένο σημείο, τοποθετήθηκε μόλυσμα κονιδίων, τώπων, όσων μπορεί να μεταφέρει η άκρη βελόνας, με μία απλή επαφή στις καρποφορίες που έχουν δημιουργηθεί από το μύκητα, πάνω στο συλλεχμένο δείγμα. Έτσι σε κάθε τρυβλίο δοκιμάστηκαν 6 στελέχη. Εγιναν τρεις επαναλήψεις.

Μετά από επώαση 24 ωρών σε σκοτάδι και σε θερμοκρασία 22°C, τα τρυβλία παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Οπου τα σπόρια είχαν βλάστησει, σημειώθηκε το αριθμημένο σημείο με έναν κύκλο.

### **Κατάταξη στελεχών *Botrytis cinerea* βάση του επιπέδου ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα**

Εχινε πείραμα κατάταξης στελεχών *Botrytis cinerea* που προέρχονταν από προσβλημένες θερμοκηπιακές καλλιέργειες, τομάτας στο Τυμπάκι Κρήτης, μελιτζάνας στην Κυπαρισσία Μεσσηνίας, αγγουριού στο Ισραήλ και από αμπέλι στη Γαλλία. Η κατάταξη έγινε με βάση τον τρόπο βλάστησης των σπορίων των στελεχών σε διάφορες συγκεντρώσεις βενζιμιδαζολικών και φαινυλοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων.

Χρησιμοποιήθηκαν δώδεκα στελέχη. Αναλυτικά τα στελέχη ελήφθησαν :

από τομάτα :	3 94	ευαίσθητο στα βενζιμιδαζολικά ανθεκτικό στα φαινυλοκαρβαμιδικά
	4 94	ανθεκτικό στα βενζιμιδαζολικά ευαίσθητο στα φαινυλοκαρβαμιδικά
από μελιτζάνα :	La 100	ανθεκτικό στα βενζιμιδαζολικά ανθεκτικό στα φαινυλοκαρβαμιδικά
	La 221	ανθεκτικό στα βενζιμιδαζολικά ανθεκτικό στα φαινυλοκαρβαμιδικά
	La 238	ανθεκτικό στα βενζιμιδαζολικά ανθεκτικό στα φαινυλοκαρβαμιδικά
	La 252	ανθεκτικό στα βενζιμιδαζολικά ανθεκτικό στα φαινυλοκαρβαμιδικά
από αμπέλι :	Le 2	ανθεκτικό στα βενζιμιδαζολικά ανθεκτικό στα φαινυλοκαρβαμιδικά
από αχχούρι :	C 1	ανθεκτικό στα βενζιμιδαζολικά ανθεκτικό στα φαινυλοκαρβαμιδικά
	C 2	ανθεκτικό στα βενζιμιδαζολικά ανθεκτικό στα φαινυλοκαρβαμιδικά
	C 3	ανθεκτικό στα βενζιμιδαζολικά ανθεκτικό στα φαινυλοκαρβαμιδικά
	C 4	ανθεκτικό στα βενζιμιδαζολικά ανθεκτικό στα φαινυλοκαρβαμιδικά
	C 5	ανθεκτικό στα βενζιμιδαζολικά ανθεκτικό στα φαινυλοκαρβαμιδικά

**Υλικά :** Αιώρημα σπορίων που ελήφθη από καλλιέργειες 7 ημερών, σε PDA, που επωάσθησαν στους 22°C, στο σκοτάδι. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης, αποστειρωμένο νερό στο αιώρημα σπορίων, ύφασμα μουσελίνας, αιματοκυτόμετρο και μετρητής χεριού για τη μέτρηση των σπορίων.

Σαν υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε PDA, εμπλουτισμένο :

**I.** με carbendazim (MBC)(50% wp) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 0,1, 100mg/l.

**II.** με diethofencarb (NPC)(50% wp) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 0,1, 100mg/l.

**III.** με μίγμα carbendazim+diethofencarb (MBC+NPC) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 0, 1mg/l(1mg/l carbendazim + 1mg/l diethofencarb), 100mg/l(100mg/l carbendazim + 100mg/l diethofencarb).

**Μέθοδος :** Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Λάσκαρη, Παππά και Κυριακόπουλου (1994).

Η σειρά των εργασιών έχει ως εξής : **I.** Εχιναν αρχικές διαλύσεις του carbendazim με συκέντρωση 10000mg/l και 1000mg/l, με διαλύτη



διμεθυλοσουλφοξείο DMSO(C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS). Για τα 10000mg/l, διαλύθηκαν 200mg carbendazim σε 10ml διαλύτη. Για τη δεύτερη αρχική διάλυση αραιώθηκε 1ml της πρώτης σε 9ml διαλύτη.

II. Εχιναν αρχικές διαλύσεις του diethofencarb με συγκέντρωση 10000mg/l και 1000mg/l, με διαλύτη DMSO. Για τα 10000mg/l, διαλύθηκαν 200 mg diethofencarb σε 10ml διαλύτη. Για τη δεύτερη αρχική διάλυση αραιώθηκε 1ml της πρώτης σε 9ml διαλύτη.

III. Εχιναν αρχικές διαλύσεις του μίγματος carbendazim+diethofencarb με συγκέντρωση 10000mg/l και 1000mg/l, με διαλύτη DMSO. Για τα 10000mg/l διαλύθηκαν 200mg carbendazim και 200mg diethofencarb σε 10ml διαλύτη. Για τη δεύτερη αρχική διάλυση αραιώθηκε 1ml της πρώτης σε 9ml διαλύτη.

Το υλικό του υποστρώματος (PDA), που βρισκόταν σε κωνικές φιάλες, (50ml ανά φιάλη), θερμάνθηκε για να ρευστοποιηθεί.

Για να γίνουν οι προαναφερόμενες τελικές συγκεντρώσεις, προστέθηκαν στις κωνικές φιάλες που περιείχαν 50ml ρευστοποιημένου υλικού οι ακόλουθες ποσότητες από τις αρχικές συγκεντρώσεις.

I. Για το carbendazim

Από την αρχική των 10000mg/l προστέθηκαν 0.5ml σε 50ml υλικό για την τελική συγκέντρωση των 100mg/l.

Από την αρχική των 1000mg/l προστέθηκαν 0.05ml + 0.45ml διαλύτη σε 50ml υλικό για την τελική συγκέντρωση του 1mg/l.

II. Για το diethofencarb

Ακολούθηθηκε η ίδια ακριβώς εργασία όπως με το carbendazim.

III. Για το μίγμα carbendazim+diethofencarb (Sumico)

Ακολούθηθηκε η ίδια εργασία όπως με τα δυο προηγούμενα μυκητοκτόνα.

Στους μάρτυρες προστέθηκε 1% DMSO, δηλαδή 0.5ml διαλύτη σε κάθε 50ml υλικού. Έτσι τελικά η συγκέντρωση διαλύματος δραστικής ουσίας ή μόνο διαλύτη στο υλικό είναι 1%.

Το υλικό χύθηκε στα τρυβλία (10ml σε κάθε τρυβλίο).

Στη συνέχεια σε καλλιέργειες 7 ημερών, των στελεχών, μέσα σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν 10 ml αποστειρωμένο νερό και με χυάλινο αναδευτήρα επετεύχθη αιώρημα των спорίων που είχαν παραχθεί. Το αιώρημα διηθήθηκε από διπλό στρώμα μουσελίνας και σε δοκιμαστικό σωλήνα ελήφθη καθαρό σχετικά αιώρημα. Υπολογίζοντας με το αιματοκυτόμετρο, παρασκευάσθηκαν αιωρήματα 200.000 спорίων/ml για κάθε στέλεχος.

Σε κάθε τρυβλίο με PDA, εμπλουτισμένο με carbendazim, diethofencarb και carbendazim+diethofencarb στις συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν ανωτέρω, τοποθετήθηκαν με πιπέτα Παστέρ, 3 σταγόνες από 3 διαφορετικά αιωρήματα спорίων, 3 διαφορετικών στελεχών. Η κάθε δοκιμή επαναλήφθηκε 3 φορές.

Ανασηκώνοντας ελαφρά το τρυβλίο, αφέθηκαν οι σταγόνες να κυλήσουν στο πλαίσιο τριών ζωνών (μία για κάθε στέλεχος) στις οποίες είχε χωρισθεί το κάθε τρυβλίο με μαρκαδόρο.

Τα τρυβλία επώασθησαν στους 22°C στο σκοτάδι και μετά 24 ώρες έγινε έλεγχος της βλάστησης των σπορίων των στελεχών στο μικροσκόπιο. Ο έλεγχος έγινε σε οπτικό πεδίο με 50 περίπου σπόρια.

## Εξέταση βιολογικών ιδιοτήτων ανθεκτικών στελεχών

### I. Ανάπτυξη μυκηλίου

**Υλικά :** Χρησιμοποιήθηκαν πέντε στελέχη *Botrytis cinerea*. Τα : 3 94, 4 94, La 238, La 252, Le 2. Σαν υπόστρωμα για την ανάπτυξη μυκηλίου των στελεχών, χρησιμοποιήθηκε PDA, 10 ml σε κάθε τρυβλίο.

**Μέθοδος :** Από τα πέντε στελέχη ετοιμάσθηκαν αρχικές καλλιέργειες, μεταφυτεύοντας σε τρυβλία με PDA, μυκήλια, ή κονίδια. Από αυτές τις αρχικές καλλιέργειες, ετοιμάσθηκαν νέες μητρικές, μεταφυτεύοντας δίσκους 3 ημερών και διαμέτρου 5mm σε τρυβλία με PDA. Οι δίσκοι κόπηκαν με φελοτρυπητή από την περιφέρεια της αποικίας.

Από τις τελευταίες αυτές μητρικές καλλιέργειες, μεταφυτεύθηκαν δίσκοι μυκηλίου 5mm που πάρθηκαν την τρίτη ημέρα από την περιφέρεια του κυκλικά αναπτυσσόμενου μυκηλίου, σε 3 τρυβλία PDA (επαναλήψεις) για κάθε στέλεχος.

Μετά από 24 ώρες και κάθε ημέρα (συνολικά 3 ημέρες), γινόταν μετρήσεις της ταχύτητας ανάπτυξης μυκηλίου των αποικιών. Μέτρηση δύο κάθετων διαμέτρων και εξαγωγή μέσου όρου.

Όλες αυτές οι διαδοχικές καλλιέργειες, επώασθησαν σε θάλαμο επώασης 22°C, σε σκοτάδι.

### II. Παραγωγή σπορίων

**Υλικά :** Η παραγωγή σπορίων των στελεχών, εκτιμήθηκε σε καλλιέργειες 7 ημερών σε υλικό PDA, που επώασθησαν στους 22°C, σε σκοτάδι. Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένο νερό, ύφασμα μουσελίνας, αιματοκυτόμετρο και μηχανικός μετρητής χεριού, για τη μέτρηση των σπορίων.

**Μέθοδος :** Από κάθε τρυβλίο με καλλιέργεια 7 ημερών, κόπηκαν 3 δίσκοι διαμέτρου 10mm και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10ml αποστειρωμένο νερό. Ο σωλήνας αναταράχθηκε στον ανοδευτήρα, για

να αποκολληθούν τα σπόρια από την επιφάνεια των μυκηλιακών δίσκων. Το αιώρημα διηθήθηκε από διητικό στρώμα μουσελίνας. Σε δοκιμαστικό σωλήνα ελήφθη καθαρό σχετικά αιώρημα σπορίων.

Ο δοκιμαστικός σωλήνας με το αιώρημα αναταράχθηκε στον αναδευτήρα για να γίνει ομογενοποίηση του αιωρήματος. Στη συνέχεια με πιπέτα Παστέρ, τοποθετήθηκαν δυο σταγόνες στο αιματοκυτόμετρο και μετρήθηκαν τα σπόρια στο μικροσκόπιο, με τη βοήθεια του μηχανικού μετρητή χεριού.

Ο αριθμός των σπορίων ανά ml, ισούται με τον αριθμό, που έδωσε η καταμέτρηση σπορίων στο τετράγωνο του αιματοκυτόμετρου, που φαίνεται στο οπτικό πεδίο του μικροσκόπιου και στη μεθέθυνση 40 επί 10000.

### III. Σχηματισμός σκληρωτίων

**Υλικά, μέθοδος :** Καλλιέργειες των 5 στελεχών *Botrytis cinerea* σε τρυβλία με PDA, τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης 5°C για 25 ημέρες σε σκοτάδι. Ο σχηματισμός σκληρωτίων εκτιμήθηκε με τη ζύγιση, σε ζυγαριά ακριβείας, του νηπού βάρους αυτών, για το κάθε στέλεχος.

#### Επίδραση θερμοκρασίας στην ανάπτυξη μυκηλίου

Χρησιμοποιήθηκαν 12 στελέχη *Botrytis cinerea* από τομάτα, μελιτζάνα, αγγούρι και αμπέλι.

Αναλυτικά τα στελέχη ελήφθησαν :

από τομάτα τα 3 94 και 4 94

από μελιτζάνα τα La 100, La 221, La 238 και La 252

από αγγούρι τα C 1, C 2, C 3, C 4 και C 5

από αμπέλι το Le 2

**Υλικά και μέθοδος :** Σαν υπόστρωμα για την ανάπτυξη μυκηλίου των στελεχών, χρησιμοποιήθηκε PDA, 10 ml σε κάθε τρυβλίο. Από τα 12 στελέχη, ετοιμάσθηκαν αρχικές καλλιέργειες, μεταφυτεύοντας σε τρυβλία, μυκήλιο ή κονίδια. Τα τρυβλία επώασθηκαν στους 22°C σε σκοτάδι.

Στη συνέχεια από αυτές τις αρχικές καλλιέργειες ετοιμάσθηκαν νέες μητρικές μεταφυτεύοντας δίσκους μυκηλίου 3 ημερών και διαμέτρου 5 mm, σε τρυβλία με υλικό PDA. Τα τρυβλία επώασθηκαν στους 22°C, σε σκοτάδι για 3 ημέρες.

Από τις τελευταίες αυτές μητρικές καλλιέργειες, μεταφυτεύθηκαν δίσκοι μυκηλίου 5mm, που πάρθηκαν την τρίτη ημέρα από την περιφέρεια του κυκλικά αναπτυσσόμενου μυκηλίου, σε 9 τρυβλία PDA (επαναλήψεις) για κάθε στέλεχος. Από το κάθε στέλεχος, 3 επαναλήψεις επώασθηκαν στους

30°C, 3 επαναλήψεις στους 40°C και 3 επαναλήψεις στους 50°C. Η επώαση διήρκησε 3 ημέρες σε σκοτάδι σε θάλαμους επώασης κατάλληλα ρυθμισμένους.

Μετά από 24 ώρες και κάθε ημέρα (συνολικά 3 ημέρες), γινόταν μετρήσεις της ταχύτητας ανάπτυξης μυκηλίου των στελεχών.

Όλα τα τρυβλία που επώασθηκαν στους 30, 40 και 50°C, στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε θάλαμο επώασης 22°C, για 3 ημέρες σε σκοτάδι, ώστε να παρατηρηθεί η νέα συμπεριφορά των στελεχών σε σχέση με την ταχύτητα ανάπτυξης μυκηλίου.

Μετά από 24 ώρες και κάθε ημέρα (συνολικά 3 ημέρες), γινόταν μετρήσεις της ταχύτητας ανάπτυξης μυκηλίου.

### Εκτίμηση παθογόνου ικανότητας ανθεκτικών στελεχών

**Υλικά και μέθοδος :** Σε τρυβλίο, με λεπτό στρώμα βαμβακιού στη βάση, από πάνω φύλλο τυποχάρτου και 10ml αποστειρωμένο νερό, τοποθετήθηκαν 50 σπόροι αχγουριού (mini αχγούρι, belisimo F1, ανθεκτικό στο μίδιο) για να προβλαστήσουν. Μετά από 3 ημέρες έγινε φύτευση των προβλαστημένων σπόρων σε μικρές γλάστρες. Μετά από 4 ημέρες κόπηκαν και οι δύο κοτυλιδόνες από κάθε φυτό για να χρησιμοποιηθούν στο πείραμα της εκτίμησης της παθογόνου ικανότητας. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και πέταλα τριανταφυλλιάς. Από τις κοτυλιδόνες αχγουριού και τα πέταλα τριανταφυλλιάς κόπηκαν δίσκοι διαμέτρου 20 mm.

Αιώρημα σπορίων ελήφθη από καθαίρεσεις 10 ημερών, των στελεχών 3 94, 4 94, La 100, La 238, La 252, Le 2, C 4 του *Botrytis cinerea*, σε υπόστρωμα PDA, που είχαν επωασθεί στους 22°C, σε σκοτάδι. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης, αποστειρωμένο νερό στο αιώρημα σπορίων, ύφασμα μουσελίνας, αιματοκυτόμετρο και μετρητής χεριού για τη μέτρηση των σπορίων.

Μέσα σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν 10 ml αποστειρωμένο νερό, και με γυάλινο αναδευτήρα επιτεύχθη το αιώρημα των σπορίων που είχαν παραχθεί. Το αιώρημα διηθήθηκε από διηθή στρώμα μουσελίνας και σε δοκιμαστικό σωλήνα ελήφθη καθαρό σχετικά αιώρημα σπορίων. Υπολογίζοντας με το αιματοκυτόμετρο, για το στέλεχος 3 94 βρέθηκε πυκνότητα αιωρήματος 770000 σπόρια/ml, για το 4 94 830000 σπόρια/ml, για το La 100 750000 σπόρια/ml, για το La 238 520000 σπόρια/ml, για το La 252 640000 σπόρια/ml, για το Le 2 730000 σπόρια/ml και για το C 4 750000 σπόρια/ml. Από αυτά τα αιωρήματα παρασκευάσθηκαν αιωρήματα πυκνότητας 50000 σπορίων/ml για κάθε στέλεχος.

Από δοκιμαστικό σωλήνα με 10ml αποστειρωμένο νερό αφαιρέθηκαν 0.7ml από αυτό και αντικαταστάθηκαν με 0.7ml από το αιώρημα των 770000



σπορίων/ml του στελεχούς 3 94. Έτσι παρασκευάσθηκαν 10ml αιωρήματος σπορίων του στελεχούς 3 94, πυκνότητας 50000 σπορίων/ml.

Αντίστοιχα σε 9.4ml αποστειρωμένο νερό, προστέθηκαν 0.6ml του αιωρήματος 830000 σπορίων/ml του στελεχούς 4 94.

Σε 9.3ml αποστειρωμένο νερό προστέθηκαν 0.7ml του αιωρήματος 750000 σπορίων/ml του στελεχούς La 100.

Σε 9ml αποστειρωμένο νερό προστέθηκε 1ml του αιωρήματος 520000 σπορίων/ml του στελεχούς La 238.

Σε 9.2ml αποστειρωμένο νερό προστέθηκαν 0.8ml του αιωρήματος 640000 σπορίων/ml του στελεχούς La 252.

Σε 9.3ml αποστειρωμένο νερό προστέθηκαν 0.7ml του αιωρήματος 730000 σπορίων/ml του στελεχούς La 2.

Σε 9.3ml αποστειρωμένο νερό προστέθηκαν 0.7ml του αιωρήματος 750000 σπορίων/ml του στελεχούς C 4.

Για όλα τα στελέχη παρασκευάσθηκαν 10ml αιωρήματος σπορίων με πυκνότητα 50000 σπόρια/ml.

Σε τρυβλία , τοποθετήθηκε στη βάση λεπτό στρώμα βαμβακιού, από πάνω φύλλο στυπόχαρτου και 10 ml αποστειρωμένο νερό. Πάνω στο φύλλο στυπόχαρτου τοποθετήθηκαν από 3 δίσκοι κοτυλιδίων αχχουριού, διαμέτρου 20mm.

Πάνω σε κάθε δίσκο κοτυλιδόνας, τοποθετήθηκαν με πιπέτα Παστέρ, 3 σταχόνες από το ίδιο αιώρημα σπορίων, 50000 σπόρια/ml. Αυτό έγινε για το κάθε ένα στέλεχος χωριστά και επαναλήφθηκε 3 φορές. Στην περίπτωση αυτή, έγινε δοκιμή μόθωσης χωρίς πήξη.

Η ίδια ακριβώς εργασία επαναλήφθηκε με δίσκους κοτυλιδίων αχχουριού αλλά συγχρόνως με την τοποθέτηση της σταχόνας έγινε και μικρή πήξη πάνω στην επιφάνεια του φύλλου με την άκρη της πιπέτας. Στην περίπτωση αυτή η δοκιμή μόθωσης έγινε με πήξη και επαναλήφθηκε 3 φορές.

Σε άλλα τρυβλία με 3 δίσκους από πέταλα τριανταφυλλιάς, πάνω σε κάθε δίσκο τοποθετήθηκαν με πιπέτα Παστέρ, χωρίς πήξη, 3 σταχόνες από το ίδιο αιώρημα σπορίων, 50000 σπόρια/ml. Αυτό έγινε για το κάθε στέλεχος χωριστά και επαναλήφθηκε 3 φορές.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, σε αιωρήματα σπορίων των στελεχών La 100 και C 4, με πυκνότητα 750000 σπόρια/ml, προστέθηκαν σάκχαρα (σακχαρόζη και δεξτrose) για να παρατηρηθεί αν θα υπάρξουν διαφορές στο χρόνο μόθωσης, σε σχέση με τα αντίστοιχά τους αιωρήματα σπορίων στα οποία δεν είχε γίνει προσθήκη καμμίας ουσίας.

Η εργασία έγινε ως εξής. Σε 100ml αποστειρωμένο νερό προστέθηκαν 10gr σακχαρόζης. Το διάλυμα ήταν περιεκτικότητας 10% κ.ο. 1ml από το διάλυμα αυτό προστέθηκε σε 9ml αποστειρωμένο νερό και παρασκευάσθηκε διάλυμα 10 ml, με περιεκτικότητα 0.1% κ.ο. σε σακχαρόζη.

Από δοκιμαστικό σωλήνα με 10ml αποστειρωμένο νερό περιεκτικότητας 0.1% σε σακχαρόζη, αφαιρέθηκαν 0.7ml και αντικαταστάθηκαν από 0.7ml αιωρήματος σπορίων, πυκνότητας 750000 σπόρια/ml του στελεχούς La 100. Έτσι παρασκευάσθηκε αιώρημα σπορίων πυκνότητας 50000 σπόρια/ml και περιεκτικότητας 0.1% κ.ο. σε σακχαρόζη. Το ίδιο έγινε και για το στελεχος C 4. Η ίδια ακριβώς εργασία έγινε και με διάλυμα dextrose 0.1% κ.ο. για τα δύο στελέχη La 100 και C 4.

Από τα αιωρήματα πυκνότητας 50000 σπόρια/ml των στελεχών La 100 και C 4, στα οποία έγινε προσθήκη σακχαρόζης και dextrose, έγιναν δοκιμές μόλυνσης πάνω σε δίσκους από κοτυλιδόνες φυτών αγουριού και πετάλων τριανταφυλλιάς, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω.

Δέκα ημέρες μετά την εμφάνιση μόλυνσης, πάνω στους δίσκους από τα πέταλα τριανταφυλλιάς, έγινε μέτρηση των παραχόμενων σπορίων του κάθε στελεχούς. Για τη μέτρηση των παραχόμενων σπορίων οι δίσκοι τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10ml αποστειρωμένο νερό. Ο σωλήνας αναταράχθηκε στον αναδευτήρα, για να αποκολληθούν τα σπόρια από την επιφάνεια των δίσκων. Το αιώρημα διηθήθηκε από διηλώ στρώμα μουσελίνας. Σε δοκιμαστικό σωλήνα ελήφθη σχετικά καθαρό αιώρημα σπορίων.

Ο δοκιμαστικός σωλήνας αναταράχθηκε στον αναδευτήρα για να γίνει ομογενοποίηση του αιωρήματος σπορίων. Στη συνέχεια με πιπέτα Παστέρ, τοποθετήθηκαν δύο σταχόνες στο αιματοκυτόμετρο και μετρήθηκαν τα σπόρια στο μικροσκόπιο, με τη βοήθεια του μηχανικού μετρητή χεριού. Ο αριθμός σπορίων ανά ml, ισούται με τον αριθμό που έδωσε η καταμέτρηση σπορίων στο τετράγωνο του αιματοκυτόμετρου που φαίνεται στο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου και στη μεθέθυνση 40 επί 10000.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Αναγνώριση ανθεκτικών στελεχών *Botrytis cinerea*

Η ανίχνευση ανθεκτικότητας των 6 στελεχών του *Botrytis cinerea*, έγινε βάση του τρόπου βλάστησης των σπορίων τους. Έγινε χρήση του πίνακα 1. Στελέχη των οποίων τα σπόρια βλάστησαν και σχημάτισαν κανονικούς βλαστικούς σωλήνες, θεωρήθηκαν ανθεκτικά (R). Στελέχη των οποίων τα σπόρια δεν βλάστησαν ή βλάστησαν με παραμορφωμένους βλαστικούς σωλήνες, θεωρήθηκαν ευαίσθητα (S). Τα αποτελέσματα ήταν ίδια και στις τρεις επαναλήψεις και φαίνονται στον πίνακα 2.

**Πίνακας 2 :** Συχνότητα ανθεκτικών στελεχών του *Botrytis cinerea*, πάνω σε υλικό PDA, εμπλουτισμένο με carbendazim και diethofencarb σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Στελέχη	Συγκέντρωση μυκητοκτόνου σε mg/l								
	μάρτυρας	carbendazim				diethofencarb			
	0	1	5	10	100	1	5	10	100
1	R	R	R	R	R	S	S	S	S
2	R	S	S	S	S	R	R	R	R
3	R	R	R	R	R	S	S	S	S
4	R	R	R	R	R	S	S	S	S
5	R	R	R	R	R	S	S	S	S
6	R	S	S	S	S	R	R	R	R

Τα στελέχη που δοκιμάστηκαν είναι υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητας στο carbendazim εκτός από δύο στελέχη που είναι ευαίσθητα, σε όλες τις συγκεντρώσεις του carbendazim.

Τα στελέχη είναι επίσης ευαίσθητα στο diethofencarb εκτός από δύο στελέχη που είναι ανθεκτικά σε όλες τις συγκεντρώσεις του diethofencarb.

Από τον πίνακα 2, φαίνεται ότι τα στελέχη που είναι ανθεκτικά στο carbendazim είναι ευαίσθητα στο diethofencarb και τα στελέχη που είναι ευαίσθητα στο carbendazim είναι ανθεκτικά στο diethofencarb. Παρατηρούμε το φαινόμενο της αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν οι βενζιμιδαζολικές και φαινολοκαρβαμιδικές ενώσεις.

**Κατάταξη στελεχών *Botrytis cinerea* βάση του  
επιπέδου ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά  
και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα**

Τα αποτελέσματα του ελέγχου της βλάστησης των σπορίων των στελεχών, φαίνονται στον πίνακα 3. Η κατάταξη των στελεχών ως προς την ανθεκτικότητά τους στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, έγινε βάση του τρόπου βλάστησης των σπορίων τους και χρησιμοποιήθηκε ο πίνακας 1. Στελέχη των οποίων τα σπόρια βλάστησαν και σχημάτισαν κανονικούς βλαστικούς σωλήνες θεωρήθηκαν ανθεκτικά (R) στην αντίστοιχη συγκέντρωση. Στελέχη των οποίων τα σπόρια δεν βλάστησαν ή βλάστησαν με παραμορφωμένους βλαστικούς σωλήνες θεωρήθηκαν ευαίσθητα (S) στην αντίστοιχη συγκέντρωση μυκητοκτόνου. Τα αποτελέσματα ήταν ίδια και στις τρεις επαναλήψεις.

**Πίνακας 3 :** Κατάταξη 12 στελεχών *Botrytis cinerea* με βάση τον τρόπο βλάστησης των σπορίων, σε υλικό PDA εμπλουτισμένο με carbendazim, diethofencarb και μίγμα carbendazim+ diethofencarb, μετά από επώαση 24 ωρών, στους 22°C, στο σκοτάδι.

Στελέχη	Μυκητοκτόνα							
	Μάρτυρας		carbendazim		diethofencarb		carbendazim+ diethofencarb	
	Συγκεντρώσεις (σε mg/l)							
	0	1	100	1	100	1	100	
3 94	R	S	S	R	R	S	S	
4 94	R	R	R	S	S	S	S	
La 100	R	R	S	R	R	R	S	
La 221	R	R	S	R	R	R	S	
La 238	R	R	S	R	R	R	S	
La 252	R	R	S	R	R	R	S	
Le 2	R	R	S	R	R	R	R	
C 1	R	R	R	R	R	R	R	
C 2	R	R	R	R	R	R	R	
C 3	R	R	R	R	R	R	R	
C 4	R	R	R	R	R	R	R	
C 5	R	R	R	R	R	R	R	

Με βάση την ανθεκτικότητα που δείχνουν τα στελέχη στις διάφορες συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων, μπορούμε να τα ομαδοποιήσουμε ως εξής:

I. Σε σχέση με το carbendazim

I) Το 3 94 είναι ευαίσθητο

II) Τα La 100, La 221, La 238, La 252, Le 2 είναι μετρίως ανθεκτικά

III) Τα 4 94, C 1, C 2, C 3, C 4, C 5 είναι ανθεκτικά



II. Σε σχέση με το diethofencarb

I) Το 4 94 είναι ευαίσθητο

II) Τα 3 94, La 100, La 221, La 238, La 252, Le 2, C 1, C 2, C 3, C 4, C 5 είναι ανθεκτικά

III. Σε σχέση με το carbendazim+ diethofencarb

I) Τα 3 94, 4 94, είναι ευαίσθητα

II) Τα La 100, La 221, La 238, La 252 είναι μετρίως ανθεκτικά

III) Τα Le 2, C 1, C 2, C 3, C 4, C 5 είναι ανθεκτικά

Από τα ανωτέρω μπορούμε να χαρακτηρίσουμε το κάθε στελεχος ως εξής:

3 94 MBC<sup>S</sup>NPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>

4 94 MBC<sup>R</sup>NPC<sup>S</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>

La 100 MBC<sup>MR</sup>NPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>

La 221 MBC<sup>MR</sup>NPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>

La 238 MBC<sup>MR</sup>NPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>

La 252 MBC<sup>MR</sup>NPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>

Le 2 MBC<sup>MR</sup>NPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>R</sup>

C 1 MBC<sup>R</sup>NPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>R</sup>

C 2 MBC<sup>R</sup>NPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>R</sup>

C 3 MBC<sup>R</sup>NPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>R</sup>

C 4 MBC<sup>R</sup>NPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>R</sup>

C 5 MBC<sup>R</sup>NPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>R</sup>

## ΕΞΕΤΑΣΗ βιολογικών ιδιοτήτων ανθεκτικών στελεχών

### I. Ανάπτυξη μυκηλίου

Οι μετρήσεις της ταχύτητας ανάπτυξης μυκηλίου όλων των επαναλήψεων, παρουσιάζονται στον πίνακα 4. Στον πίνακα 5, οι τιμές εκφράζουν τους μέσους όρους ανάπτυξης μυκηλίου των 3 επαναλήψεων

**Πίνακας 5 :** Ταχύτητα ανάπτυξης μυκηλίου 5 στελεχών *Botrytis cinerea* σε υλικό PDA, στους 22°C, σε σκοτάδι.

Στελέχη	Χρόνος επίασης σε ώρες		
	24	48	72
3 94	27	56.7	85
4 94	23.4	57.7	85
La 238	23.7	48	78.7
La 252	21	44.4	73.7
Le 2	26	53.4	81.7

Με βάση την αύξηση της διαμέτρου κατά την κυκλική ανάπτυξη του μυκηλίου μέσα σε 72 ώρες, μπορούμε να ομαδοποιήσουμε τα στελέχη ως εξής :

I) πολύ γρήγορης ανάπτυξης τα 3 94 και 4 94 που παρουσιάζουν το φαινόμενο της αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα.

II) γρήγορης ανάπτυξης το Le 2 που είναι ανθεκτικό στα φαινυλοκαρβαμιδικά και μετρίως ανθεκτικό στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα.

III) αργής ανάπτυξης τα La 238 και La 252 που είναι ανθεκτικά και στις δύο ομάδες μυκητοκτόνων.

Η διαφορά στο ρυθμό ανάπτυξης του μυκηλίου μεταξύ των 5 στελεχών, που παρατηρήθηκε στις 24 ώρες διατηρήθηκε σταθερή μέχρι τις 72 ώρες. Επίσης το κάθε στέλεχος όπως φαίνεται από το σχέδιο 2 είχε σχεδόν σταθερό ρυθμό ανάπτυξης κατά τη διάρκεια των 72 ωρών.

Αν και οι διαφορές στην ανάπτυξη μυκηλίου, μεταξύ των 5 στελεχών, δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικές, παρατηρήθηκε ότι τα ανθεκτικά στελέχη είχαν μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης από τα ευαίσθητα στελέχη. Επίσης τα ανθεκτικά στελέχη είχαν αραιότερο μυκήλιο από τα ευαίσθητα.

## II. Παραγωγή σπορίων

Την πέμπτη ημέρα επώασης είχε παράγει σπόρια το στέλεχος Le 2 και μία από τις επαναλήψεις των 3 94 και 4 94. Την έκτη ημέρα της επώασης είχαν παράγει σπόρια όλα τα στελέχη. Οι μετρήσεις παραχόμενων σπορίων των 3 επαναλήψεων των 5 στελεχών παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

Στον πίνακα 7 οι τιμές (x) εκφράζουν το μέσο όρο παραχόμενων σπορίων των 3 επαναλήψεων.

**Πίνακας 7 :** Παραγωγή σπορίων 5 στελεχών *Botrytis cinerea*, σε καθαιέρχειες 7 ημερών, σε υλικό PDA, στους 22°C, σε σκοτάδι.

	Στέλεχη				
	3 94	4 94	La 238	La 252	Le 2
$x \cdot 10^4 / \text{ml}$	17.5	31.2	3.7	1.33	12.83

Με βάση την παραγωγή σπορίων, μπορούμε να ομαδοποιήσουμε τα στελέχη ως εξής :

I) πολύ καλής παραγωγής σπορίων το 4 94 που είναι ανθεκτικό στα βενζιμιδαζολικά και ευαίσθητο στα φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα.

II) καλής παραγωγής σπορίων τα 3 94 και Le 2 που είναι ευαίσθητο και μετρίως ανθεκτικό αντίστοιχα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα.

III) ελάχιστης παραγωγής σπορίων τα La 238 και La 252 που είναι ανθεκτικά και στα δύο μυκητοκτόνα.

Υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην παραγωγή σπορίων μεταξύ των στελεχών (Σχέδιο 3). Τα ανθεκτικά στελέχη παρουσιάζουν μειωμένη παραγωγή σπορίων σε σχέση με τα ευαίσθητα. Επίσης το ανθεκτικό στέλεχος La 252, απέτυχε να παράγει σπόρια σε μία από τις τρεις επαναλήψεις.

### III. Σχηματισμός σκληρωτίων

Τα ανθεκτικά στελέχη La 238 και La 252 και στα δύο μυκητοκτόνα, σχημάτισαν πρώτα σκληρωτία. Στη φωτογραφία 1, διακρίνονται τα σκληρωτία που σχημάτισαν τα 5 στελέχη.

Το βάρος των σχηματισμένων σκληρωτίων των 3 επαναλήψεων των 5 στελεχών παρουσιάζεται στον πίνακα 8. Στον πίνακα 9, οι τιμές εκφράζουν το μέσο βάρος σχηματισμένων σκληρωτίων των 3 επαναλήψεων.

**Πίνακας 9 :** Σχηματισμός σκληρωτίων 5 στελεχών *Botrytis cinerea*, σε καλλιέργειες 25 ημερών, με υλικό PDA, στους 5°C, σε σκοτάδι.

	Στέλεχη				
	3 94	4 94	La 238	La 252	Le 2
Νωπό βάρος σκληρωτίων σε mg	0	0.101	0.295	0.379	0.236

Με βάση το νωπό βάρος των σχηματισμένων σκληρωτίων μπορούμε να ομαδοποιήσουμε τα στελέχη ως εξής :

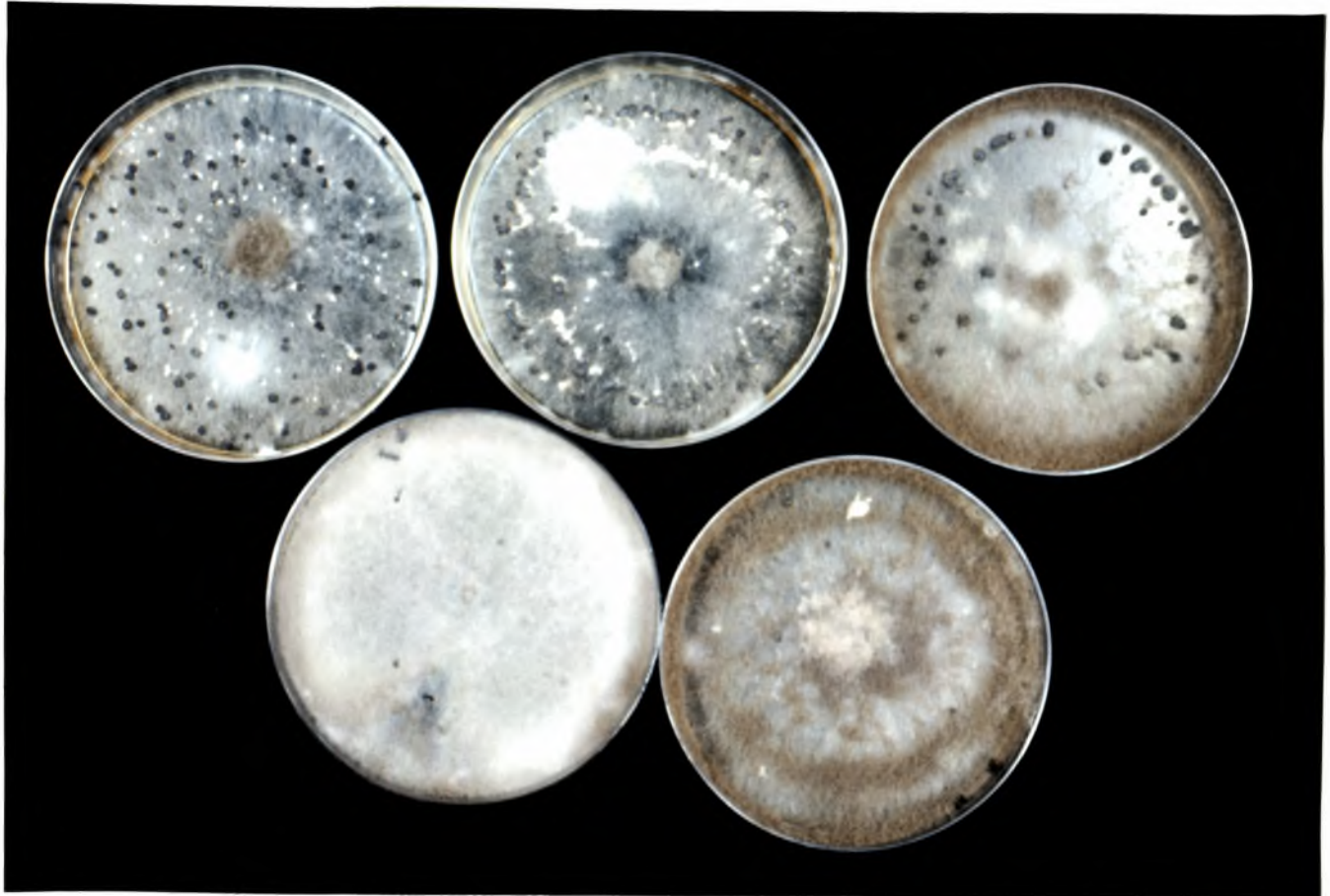
I) καλού σχηματισμού, το La 252 που είναι ανθεκτικό και στις δύο ομάδες μυκητοκτόνων.

II) αρκετά καλού σχηματισμού, τα La 238 και Le 2 που είναι επίσης ανθεκτικά και στις δύο ομάδες μυκητοκτόνων.

III) μικρού σχηματισμού, το 4 94 που είναι ευαίσθητο στα φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα.

III) μηδενικού σχηματισμού, το 3 94 που είναι ευαίσθητο στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα.

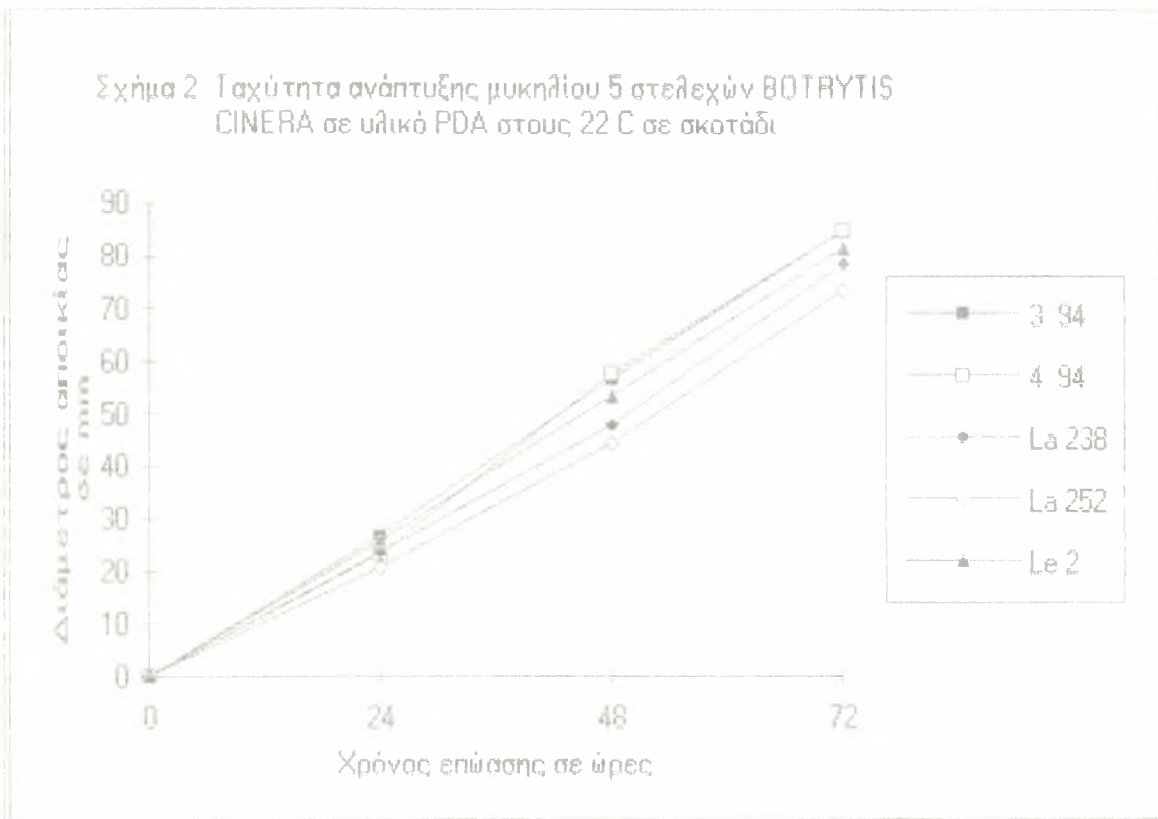
Γενικά τα ανθεκτικά στελέχη La 238, La 252, Le 2 δείχνουν μία τάση για σχηματισμό περισσότερων σκληρωτίων συγκριτικά με το στέλεχος 4 94 που είναι ευαίσθητο στο diethofencarb και ανθεκτικό στο carbendazim. Αξιοσημείωτο είναι ότι το ευαίσθητο στέλεχος 3 94 στο carbendazim και ανθεκτικό στο diethofencarb δεν σχημάτισε σκληρώτια (Σχήμα 4).



**Φωτογραφία 1 :** Σχηματισμός σκληρωτίων 5 στελεχών *Botrytis cinerea* σε καλλιέργειες 25 ημερών, σε υλικό PDA, στους 5°C, σε σκοτάδι.  
 Επάνω : Τα ανθεκτικά στελέχη La 238, La 252, Le 2.  
 Κάτω : Τα ευαίσθητα στελέχη 3 94 και 4 94.



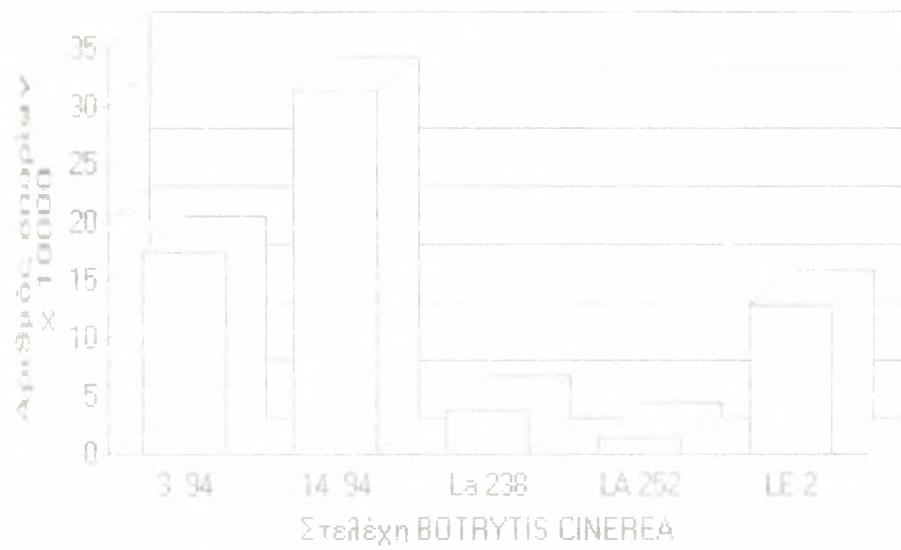
Σχήμα 2 Ταχύτητα ανάπτυξης μυκηλίου 5 στελεχών ΒΟΤΡΥΤΙΣ CINERA σε υλικό PDA στους 22 C σε σκοτάδι



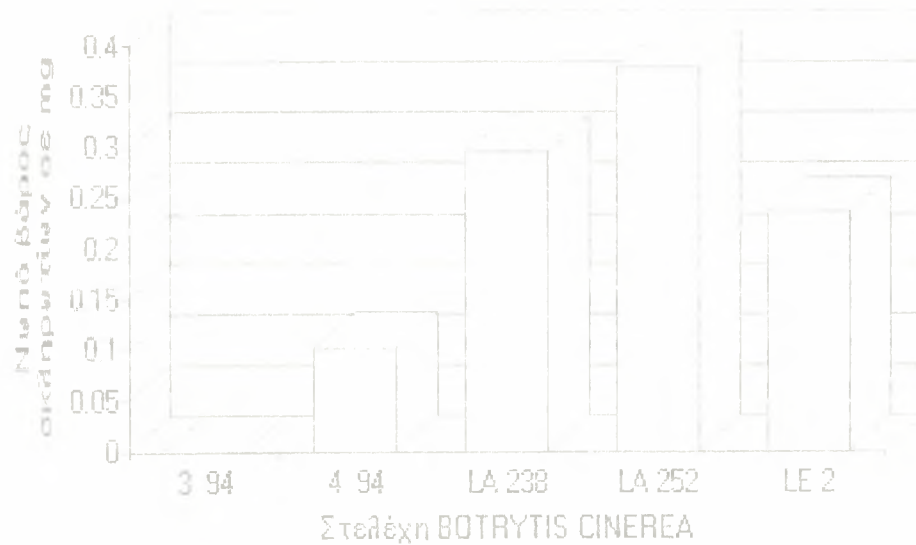
Τα στελέχη έχουν χαρακτηρισθεί ως :

3\_94 MBC<sup>S</sup>NPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>  
 4\_94 MBC<sup>R</sup>NPC<sup>S</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>  
 La\_238 MBC<sup>M</sup>RNPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>  
 La\_252 MBC<sup>M</sup>RNPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>  
 Le\_2 MBC<sup>M</sup>RNPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>R</sup>

Σχήμα 3 Παραγωγή σπορίων 5 στελεχών BOTRYTIS CINEREA, σε καλλιέργειες 7 ημερών, σε υλικό PDA, στους 22 C, σε σκοτάδι



Σχήμα 4 Σχηματισμός σκληρωτίνων 5 στελεχών BOTRYTIS CINEREA σε καλλιέργειες 25 ημερών σε υλικό PDA στους 5 C σε σκοτάδι



## Επίδραση Θερμοκρασίας στην ανάπτυξη μυκηλίου

Σε καλλιέργειες των 12 στελεχών *Botrytis cinerea*, που επώασθησαν στους 40°C και 50°C δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη μυκηλίου. Σε καλλιέργειες που επώασθησαν στους 30°C, παρατηρήθηκε ανάπτυξη μυκηλίου.

Οι μετρήσεις της ταχύτητας ανάπτυξης μυκηλίου, όλων των επαναλήψεων των στελεχών, παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

Στον πίνακα 12 οι τιμές εκφράζουν τους μέσους όρους των 3 επαναλήψεων.

**Πίνακας 12 :** Ταχύτητα ανάπτυξης μυκηλίου 12 στελεχών *Botrytis cinerea*, σε υλικό PDA, στους 30°C, σε σκοτάδι.

Στελέχη	Χρόνος επώασης σε ώρες		
	24	48	72
	Διάμετρος αποικίας σε mm		
3 94	8.3	9.7	10.0
4 94	5.0	5.3	5.3
Le 2	8.0	8.7	8.7
La 100	9.0	10.3	10.7
La 221	9.0	9.3	9.7
La 238	8.3	9.7	12.3
La 252	9.0	10.7	11.7
C 1	9.7	12.0	12.7
C 2	7.3	7.3	7.3
C 3	7.0	8.0	8.3
C 4	7.3	7.7	7.7
C 5	8.0	9.3	10.0

Με βάση την αύξηση της διαμέτρου κατά την κυκλική ανάπτυξη του μυκηλίου μέσα σε 72 ώρες, μπορούμε να ομαδοποιήσουμε τα στελέχη ως εξής :

- I) πολύ γρήγορης ανάπτυξης τα La 238, La 252 και C 1
- ii) γρήγορης ανάπτυξης τα 3 94, La 100, La 221 και C 5
- III) αρχής ανάπτυξης τα Le 2, C 2, C 3 και C 4
- IIII) πολύ αρχής ανάπτυξης το 4 94

Υπάρχει μεγάλη ανομοιομορφία στα αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε ότι τα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη αναπτύχθηκαν πολύ γρήγορα. Επίσης από τα ευαίσθητα στελέχη, το μεν ευαίσθητο στα βενζιμιδαζολικά 3 94 είχε γρήγορη ανάπτυξη, το δε 4 94 ευαίσθητο στα φαινοθιοκαρβαμιδικά είχε τη μικρότερη ανάπτυξη από όλα τα στελέχη.

Από το σχέδιο 5, φαίνεται ότι το στέλεχος C 2 δεν παρουσιάζει ανάπτυξη μυκηλίου μετά τις 24 ώρες. Επίσης μετά τις 48 ώρες δεν παρουσιάζουν ανάπτυξη μυκηλίου τα 4 94, Le 2 και C 4. Μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης

την δεύτερη ημέρα εμφανίζουν τα La 252 και C 1. Την τρίτη ημέρα μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης εμφανίζει το La 238.

Στο δεύτερο μέρος του πειράματος ανάπτυξη μυκηλίου δεν παρατηρήθηκε στα τριβύα που αρχικά είχαν επωασθεί στους 40 και 50°C.

Ανάπτυξη του μυκηλίου παρατηρήθηκε, στα τριβύα που αρχικά είχαν επωασθεί στους 30°C.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ανάπτυξης μυκηλίου, όλων των επαναλήψεων, παρουσιάζονται στον πίνακα 11.

Στον πίνακα 13 οι τιμές εκφράζουν τους μέσους όρους ανάπτυξης μυκηλίου των 3 επαναλήψεων.

**Πίνακας 13** : Ταχύτητα ανάπτυξης μυκηλίου 12 στελεχών *Botrytis cinerea*, σε υλικό PDA, στους 22°C, σε σκοτάδι, τα οποία αρχικά είχαν επωασθεί στους 30°C.

	Χρόνος επώασης σε ώρες			
	0	24	48	72
Στελέχη		Διάμετρος	αποικίας σε	mm
3 94	10.0	10.0	10.0	29.7
4 94	5.3	5.3	9.0	36.7
Le 2	8.7	8.7	21.0	50.0
La 100	10.7	10.7	21.0	49.3
La 221	9.7	15.3	32.0	59.7
La 238	12.3	25.3	43.3	68.3
La 252	11.7	15.7	32.7	61.7
C 1	12.7	12.7	19.3	52.3
C 2	7.3	7.3	16.3	42.3
C 3	8.3	15.0	36.0	66.0
C 4	7.7	14.7	35.7	64.3
C 5	10.0	19.7	45.7	78.0

Από τα στοιχεία του πίνακα 13 και του σχεδίου 6 παρατηρούμε ότι τα ανθεκτικά στελέχη έχουν αναπτυχθεί περισσότερο από τα ευαίσθητα στελέχη, τα οποία αρχίζουν να αναπτύσσονται την τρίτη ημέρα της επώασης, ενώ τα ανθεκτικά αναλαμβάνουν από τις 24 πρώτες ώρες. Σημαντικές διαφορές στην ταχύτητα ανάπτυξης μυκηλίου παρατηρήθηκαν και ανάμεσα στα ανθεκτικά στελέχη.

Σε όλα τα στελέχη, που αρχικά είχαν επωασθεί στους 30°C, παρατηρήθηκε αύξηση της ανάπτυξης του μυκηλίου μετά από επώαση 72 ωρών στους 22°C, αλλά η ανάπτυξη αυτή ήταν πολύ μικρότερη της ανάπτυξης που παρατηρήθηκε στο πείραμα ανάπτυξης μυκηλίου στους 22°C, του οποίου τα

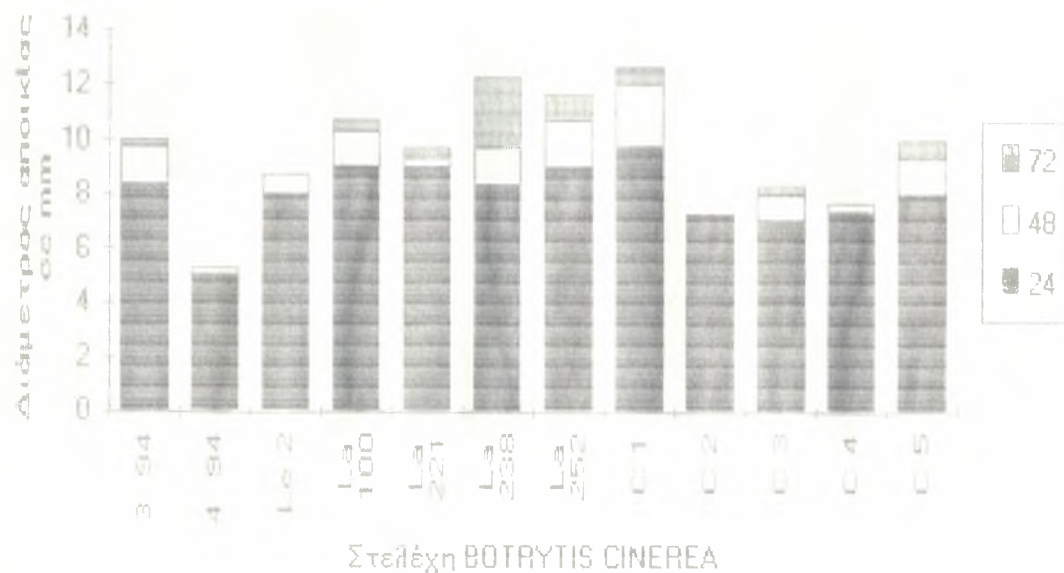


στοιχεία δίνονται στον πίνακα 5.

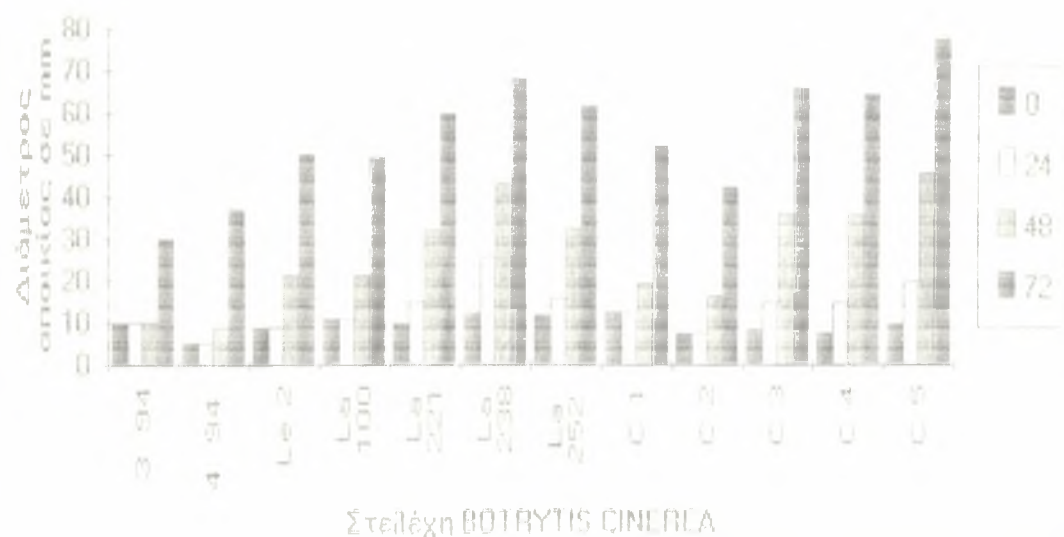
Κάνοντας χρήση των στοιχείων από τους πίνακες 5 και 13 μπορούμε να κάνουμε παρατηρήσεις στον ρυθμό της ταχύτητας ανάπτυξης του μυκηλίου στους 22°C και 30°C των στελεχών 3 94, 4 94, La 238, La 252 και Le 2.

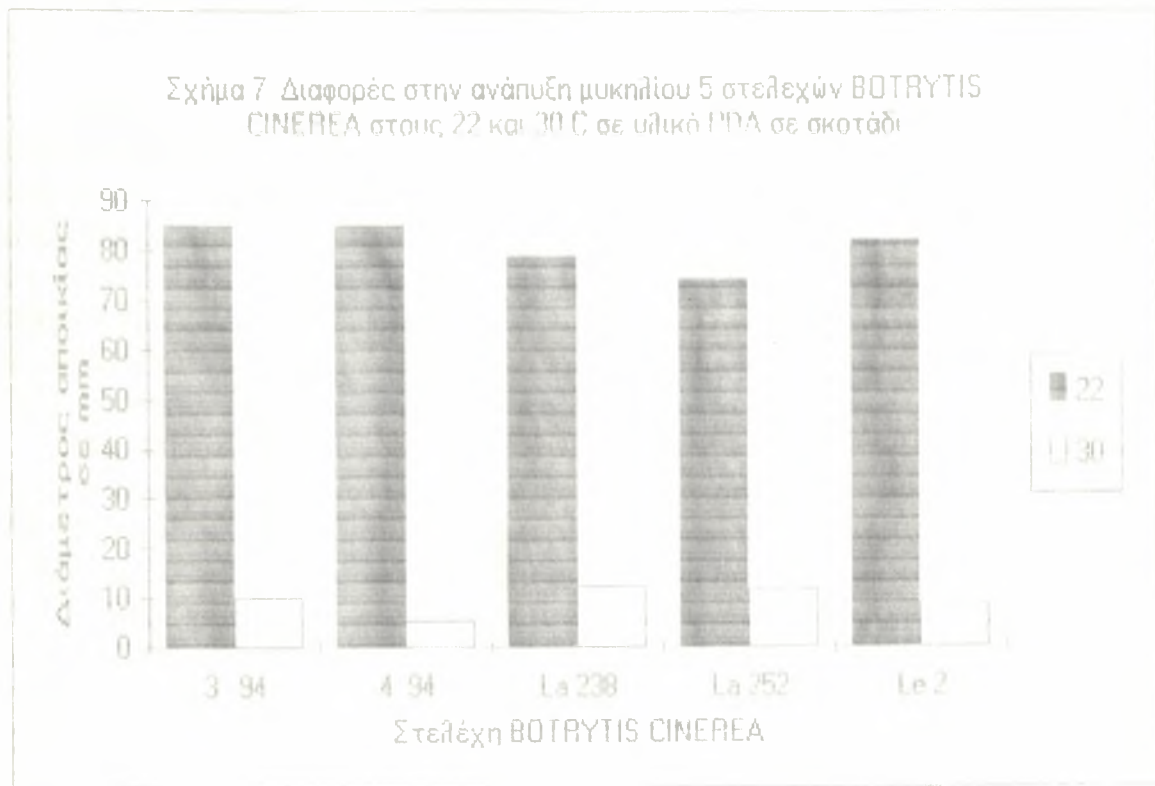
Τα ανθεκτικά στελέχη La 238 και La 252 που έχουν τη μικρότερη ανάπτυξη στους 22°C σε σχέση με τα άλλα στελέχη, στους 30°C παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ανάπτυξη. Τα ευαίσθητα στελέχη που έχουν τη μεγαλύτερη ανάπτυξη στους 22°C, παρουσιάζουν τη μικρότερη στους 30°C. Το στέλεχος Le 2 και στους 22°C και στους 30°C εμφανίζει ένα ρυθμό ανάπτυξης ενδιάμεσο των ανθεκτικών La 238, La 252 και των ευαίσθητων 3 94 και 4 94 (Σχέδιο 7).

Σχήμα 5 Ανάπτυξη μυκηλίου 12 στελεχών ΒΟΤΡΥΤΙΣ CINEREA σε υλικό PDA στους 30 C σε σκοτάδι



Σχήμα 6 Ανάπτυξη μυκηλίου 12 στελεχών ΒΟΤΡΥΤΙΣ CINEREA σε υλικό PDA, στους 22 C. σε σκοτάδι, τα οποία αρχικά είχαν επωασθεί στους 30 C.





Τα στελέχη έχουν χαρακτηριστεί ως :

3 94  $MBC^S NPC^R (MBC+NPC)^S$   
 4 94  $MBC^R NPC^S (MBC+NPC)^S$   
 La 238  $MBC^{MR} NPC^R (MBC+NPC)^S$   
 La 252  $MBC^{MR} NPC^R (MBC+NPC)^S$   
 Le 2  $MBC^{MR} NPC^R (MBC+NPC)^R$

## Εκτίμηση παθογόνου ικανότητας ανθεκτικών στελεχών

Μέσα στις επόμενες 24 ώρες από τη δοκιμή μόλυνσης, δεν παρατηρήθηκαν μολύνσεις πάνω στους δίσκους κοτυλιδίων φυτών αχγουριού. Παρατηρήθηκαν μολύνσεις πάνω στους δίσκους πετάλων τριαντάφυλλου. Οι κηλίδες μόλυνσης ήταν διαμέτρου 4mm και εμφανίστηκαν στα πέταλα, στα οποία είχαν γίνει μολύνσεις με αιωρήματα σπορίων των στελεχών 3 94, 4 94, La 238. Επίσης εμφανίστηκαν μολύνσεις και στα πέταλα που είχαν μολυνθεί με αιωρήματα σπορίων του στελέχους La 100, στα οποία είχε γίνει προσθήκη σακχαρόζης και dextrose.

Στις επόμενες 48 ώρες κηλίδες μόλυνσης εμφανίστηκαν πάνω σε όλους τους δίσκους πετάλων. Μέσα σε 6 ημέρες από την δοκιμή μόλυνσης οι κηλίδες μόλυνσης είχαν καλύψει ολοκληρή την επιφάνεια των δίσκων. Μολύνσεις στις κοτυλιδόνες φυτών αχγουριού δεν παρατηρήθηκαν.

10 ημέρες μετά την εμφάνιση μόλυνσης έγινε μέτρηση των σπορίων που παρήχθησαν πάνω στους δίσκους των μολυσμένων φυτικών ιστών.

Οι μετρήσεις των παραχόμενων σπορίων, των 3 επαναλήψεων, των 7 στελεχών παρουσιάζονται στον πίνακα 14. Στον πίνακα 15 οι τιμές  $\chi$  εκφράζουν το μέσο όρο των παραχόμενων σπορίων, των 3 επαναλήψεων.

**Πίνακας 15 :** Παραγωγή σπορίων 7 στελεχών *Botrytis cinerea*, από μολύνσεις 10 ημερών, πάνω σε δίσκους από πέταλα τριαντάφυλλου.

	Στελέχη						
	3 94	4 94	La 100	La 238	La 252	Le 2	C 4
$\chi \cdot 10^4$	2.5	1.5	4.1	1.16	2.83	3.33	1.0

Με βάση την παραγωγή σπορίων πάνω σε μολυσμένους φυτικούς ιστούς όπως φαίνεται στον πίνακα 15, μπορούμε να ομαδοποιήσουμε τα στελέχη ως εξής:

I) πολύ καλής παραγωγής σπορίων τα ανθεκτικά στελέχη La 100, La 252, και Le 2.

II) καλής παραγωγής σπορίων το ευαίσθητο στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα στέλεχος 3 94.

III) μικρής παραγωγής σπορίων το ανθεκτικό στα φαινυλοκαρβαμιδικά La 238, το ευαίσθητο στα φαινυλοκαρβαμιδικά 4 94 και το ανθεκτικό C 4 στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα.

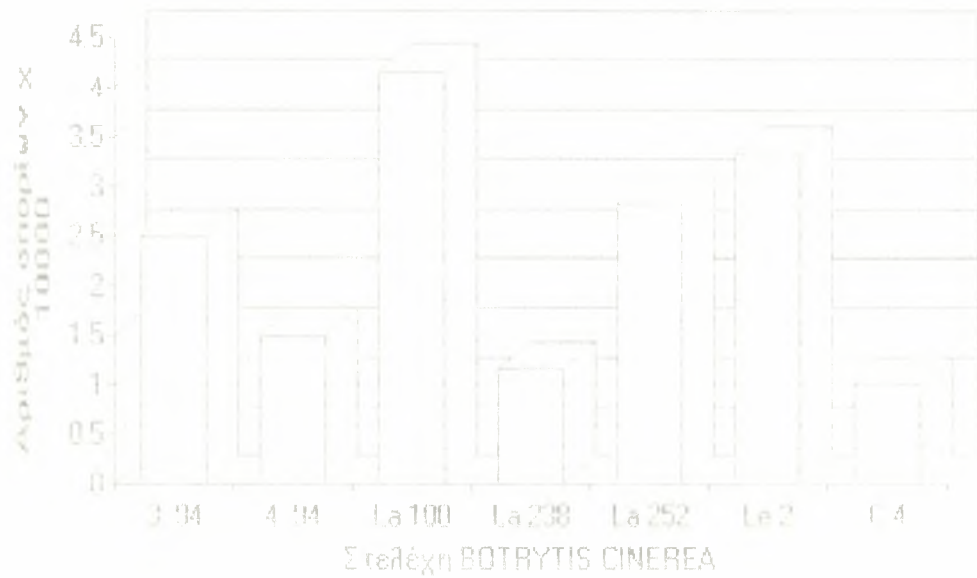


Από τα αποτελέσματα του πειράματος δεν παρατηρούνται διαφορές στην παθογόνο ικανότητα μεταξύ των ανθεκτικών και των ευαίσθητων στελεχών, στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμικά μυκητοκτόνα. Μικρή διαφορά παρατηρείται στο χρόνο εμφάνισης της μόλυνσης, όπου τα ευαίσθητα στελέχη προηγούνται.

Διαφορές στην παραγωγή σπορίων πάνω σε μολυσμένους φυτικούς ιστούς παρατηρούνται ανάμεσα στα ευαίσθητα στελέχη 3-94 και 4-94. Επίσης διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα ανθεκτικά στελέχη, με το στέλεχος La 100 να παράγει τα περισσότερα σπόρια από όλα τα στελέχη και το C 4 να παράγει τα λιγότερα σπόρια από όλα τα στελέχη (Σχήμα 8).

Η καλή παθογόνο ικανότητα και παραγωγή σπορίων των ανθεκτικών στελεχών, αποτελεί ένδειξη ανάπτυξης προσαρμοστικότητας των στελεχών αυτών.

Σχήμα 8 Παραγωγή σπορίων 7 στελεχών BOTRYTIS CINEREA, από μολύνσεις πάνω σε πέταλα τριαντάφυλλου



Τα στελέχη έχουν χαρακτηριστεί ως :

3-94 MBC<sup>S</sup>NPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>  
 4-94 MBC<sup>R</sup>NPC<sup>S</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>  
 La 100 MBC<sup>M</sup>RNPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>  
 La 238 MBC<sup>M</sup>RNPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>  
 La 252 MBC<sup>M</sup>RNPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>S</sup>  
 Le 2 MBC<sup>M</sup>RNPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>R</sup>  
 C 4 MBC<sup>R</sup>NPC<sup>R</sup>(MBC+NPC)<sup>R</sup>

ΜΕΡΟΣ Γ΄

ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η αντιμετώπιση του *Botrytis cinerea* με με τα προστατευτικά μυκητοκτόνα captan, captafol, folpet, zineb, thiram κ.α., χαρακτηρίζεται σήμερα ως μέτρια αποτελεσματική (Ζιώγας, 1981). Οι Leroux και Moncomble (1994) όμως, υποστηρίζουν ότι τα μυκητοκτόνα αυτά δεν υφίστανται τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας εξ' αιτίας της πολύπλευρης βιοχημικής δράσης τους.

Η εμφάνιση των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων στα τέλη της δεκαετίας του 1960, έδωσε εξαιρετικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση του βοτρυτή. Μετά όμως από κάποια χρόνια εντατικής χρήσης τους, εμφανίστηκαν ανθεκτικά παθογόνα στελέχη στα βενζιμιδαζολικά. Στην περίπτωση του βοτρυτή, αντικατάσταση των βενζιμιδαζολικών από τα δικαρβοξυμιδικά, έδωσε μόνο μία προσωρινή λύση στο πρόβλημα ελέγχου της ασθένειας, γιατί και σ' αυτά τα μυκητοκτόνα είχαμε εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών. Αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά θα μπορούσε να γίνει με τη χρήση μυκητοκτόνων, όπως των φαινυλοκαρβαμιδικών, που εμφανίζουν το φαινόμενο της αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας με τα βενζιμιδαζολικά. Βάση του φαινομένου της αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των δύο αυτών ομάδων μυκητοκτόνων, το μίγμα carbendazim+ diethofencarb μπορεί να ελέγξει στελέχη που είναι ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά και ευαίσθητα στα φαινυλοκαρβαμιδικά ή και το αντίθετο.

Συνεπώς ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα στον αγρό, θα μπορούσε να ελεγχθεί από τη χρήση μιγμάτων βενζιμιδαζολικών και φαινυλοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων. Δυστυχώς όμως, στις περισσότερες περιπτώσεις που έχουν μελετηθεί, στελέχη διπλής ανθεκτικότητας και στις δύο ομάδες μυκητοκτόνων έχουν εμφανιστεί στον αγρό, μετά τη χρήση του μίγματος Leroux (1992).

Στο πειραματικό μέρος της μελέτης, έγινε ανίχνευση ανθεκτικότητας, στελεχών *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των στελεχών



Επίσης έγινε κατάταξη στελεχών *Botrytis cinerea* με βάση την ανθεκτικότητά τους στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα και στο μίγμα carbendazim+diethofencarb. Η εκτίμηση της ανθεκτικότητας έγινε από τον τρόπο βλάστησης των σπορίων των στελεχών, παρουσία των μυκητοκτόνων σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη :

α) φαινοτύπων μετρίως ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά, ευαίσθητων στο μίγμα carbendazim+diethofencarb και ανθεκτικών στα φαινυλοκαρβαμιδικά. Οι φαινότυποι χαρακτηρίστηκαν ως  $MBC^{MR}NPC^R(MBC+NPC)^S$ .

β) φαινοτύπων ανθεκτικών και στις δύο ομάδες μυκητοκτόνων και στο μίγμα που χαρακτηρίστηκαν ως  $MBC^R NPC^R(MBC+NPC)^R$ .

γ) φαινοτύπων μετρίως ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά και ανθεκτικών στα φαινυλοκαρβαμιδικά και στο μίγμα που χαρακτηρίστηκαν ως  $MBC^{MR}NPC^R(MBC+NPC)^R$ .

Στη βιβλιογραφία, υπάρχουν πολλές αναφορές από ερευνητές για εμφάνιση τέτοιων φαινοτύπων σε άλλες χώρες.

Για πρώτη φορά ανθεκτικότητα στελεχών του *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά, παρατηρήθηκε στην Ολλανδία το 1970 από τους Bollen και Scolten, σε θερμοκήπιο κυκλάμινων. Στις αρχές της δεκαετίας του 1980 αναφέρεται εμφάνιση στελεχών διπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα στο Ισραήλ, από την Katan κ.α.(1989).

Ο Elad κ.α.(1992), περιγράφουν ένα νέο φαινότυπο με τριπλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξυμιδικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, που χαρακτηρίζεται ως  $BEN^R Dic^R NPC^R$ . Ο νέος αυτός φαινότυπος παρατηρήθηκε ότι μπορούσε να επιβιώσει κατά τη ζεστή περίοδο του καλοκαιριού στο Ισραήλ και να προκαλέσει μολύνσεις τον επόμενο χειμώνα. Η χρήση εμφάνιση τέτοιων στελεχών, σχετίζεται με τη χρήση του μίγματος carbendazim+diethofencarb.

Στην Ελλάδα για πρώτη φορά έχουν αναφερθεί, από τους Λάσκαρη, Παππά και Κυριακόπουλο (1994), προσβολές από στελέχη του *Botrytis cinerea* διασταυρωτής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, σε θερμοκήπια της δυτικής Πελοποννήσου.

Από τα ανωτέρω φαίνεται ότι η συνεχής χρήση του μίγματος carbendazim+diethofencarb στον αγρό, αν και δίνει επί του παρόντος ικανοποιητική καταπολέμηση του βοτρυτή στις περιοχές που επικρατούν ανθεκτικά στελέχη του παθογόνου στα βενζιμιδαζολικά, εν τούτοις επιλέγει στελέχη διπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά, καθώς και στελέχη τριπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξυμιδικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα.

Για το λόγο αυτό συνιστάται περιορισμένη χρήση του μίγματος, καθώς και η χρήση του με εναλλαχές με άλλα μυκητοκτόνα, όπως το dichlofluanid. Μετά από έρευνες στη Γαλλία επιβεβαιώθηκε ότι μια επέμβαση το χρόνο με δικαρβοξυμιδικά (μόνο ή σε μίγμα με thiram) άσκησε χαμηλότερη πίεση

επιλογής από το μίγμα carbendazim+diethofencarb (Leroux, 1989).

Ενας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει τη σοβαρότητα του προβλήματος της ανθεκτικότητας στον αγρό, είναι η προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών που σχετίζεται με την ικανότητά τους να αναπαραχθούν ή επιβιώσουν περισσότερο ή λιγότερο επιτυχώς, από τα ευαίσθητα στελέχη, κάτω από τις ίδιες δεδομένες συνθήκες. Χαρακτηριστικά που καθορίζουν την προσαρμοστικότητα είναι η παραγωγή σπορίων, η βλαστικότητα των σπορίων, η επιμήκυνση των βλαστικών σωληνών. Γενικώς αναφέρεται ότι η ανθεκτικότητα των στελεχών του *Botrytis cinerea*, επιδρά αρνητικά στην προσαρμοστικότητα των στελεχών (Ziogas και Givgis, 1993) και συνδυάζεται με μικρότερη ανάπτυξη και μειωμένη μορυσματικότητα (Hsiang και Chastagner, 1991).

Στην περίπτωση των ανθεκτικών στελεχών του *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, συνήθως δεν παρατηρείται μειωμένη προσαρμοστικότητα (Beever κ.α., 1989).

Η επιμονή των ανθεκτικών στελεχών *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά, σε θερμοκήπια για αρκετά χρόνια μετά τη διακοπή της χρήσης τους, δείχνει ότι η ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά πιθανώς, δεν επηρεάζει την προσαρμοστικότητα του ανθεκτικού πληθυσμού *Botrytis* (Faretta και Pallastro, 1989).

Στο πειραματικό μέρος της μελέτης, σύγκριση βιολογικών ιδιοτήτων μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών του *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, έδειξε μειωμένη ταχύτητα της ανάπτυξης μυκηλίου, μειωμένη παραγωγή σπορίων και σχηματισμό περισσότερων σκληρωτίων για τα ανθεκτικά στελέχη.

Οι διαφορές στην ταχύτητα ανάπτυξης του μυκηλίου μεταξύ των ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών δεν ήταν σημαντικές.

Ανάλογες αναφορές έχουν γίνει από τον Beever κ.α. (1989), που υποστηρίζει ότι μέσα επίπεδα ανάπτυξης είναι παρόμοια για στελέχη ανθεκτικά και ευαίσθητα στα βενζιμιδαζολικά. Στελέχη τριπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμιδικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, αναπτύσσονται με μικρότερο ρυθμό από τα άγρια στελέχη (Elad κ.α., 1992).

Κατά την εξέταση των βιολογικών ιδιοτήτων ανθεκτικών στελεχών, στο πειραματικό μέρος, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στην παραγωγή σπορίων σε υπόστρωμα PDA, μεταξύ των ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών, με τα ευαίσθητα στελέχη να υπερέχουν των ανθεκτικών στην παραγωγή σπορίων. Όταν όμως εξετάσθηκε η παραγωγή σπορίων πάνω σε μορυσμένους φυτικούς ιστούς (πέταλα τριανταφυλλιάς), βρέθηκε ότι η μεγαλύτερη και η μικρότερη παραγωγή σπορίων είχε σημειωθεί από ανθεκτικά στελέχη.

Από τους Ziogas και Givgis (1993), αναφέρεται ότι σύγκριση μεταξύ ανθεκτικών στελεχών στα βενζιμιδαζολικά (τα οποία δεν έχουν αυξημένη

ανθεκτικότητα στα φαινυλοκαρβαμιδικά) και των αντίστοιχων άχριων στελεχών, έδειξε ότι παραγωγή σπορίων, βλάστηση σπορίων και επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα, ήταν σημαντικά μειωμένα στα ανθεκτικά στελέχη.

Αντίθετα με τη μειωμένη ανάπτυξη του μυκηλίου και παραγωγή σπορίων, όπως αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος, τα ανθεκτικά στελέχη σχημάτισαν περισσότερα σκληρώτια από τα ευαίσθητα. Το ίδιο αναφέρεται και από έρευνες των Hsiang και Chastagner (1992), ότι τα ευαίσθητα στελέχη σχημάτισαν λιγότερα σκληρώτια από τα ανθεκτικά. Δεν παρατηρήθηκαν όμως διαφορές στη βιωσιμότητα των σκληρωτίων όλων των στελεχών.

Βάση των βιολογικών ιδιοτήτων που εξετάσθηκαν (ταχύτητα ανάπτυξης μυκηλίου, παραγωγή σπορίων, σχηματισμός σκληρωτίων), μπορούμε να πούμε ότι τα ανθεκτικά στελέχη στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, παρουσιάζουν καλή προσαρμοστικότητα, συγκρινόμενα με τα ευαίσθητα.

Μετά από έρευνες ο Raposo κ.α.(1994), ισχυρίζεται ότι οι τιμές του επιπέδου χραμμικής ανάπτυξης, δείχνουν ότι τα τριπλής ανθεκτικότητας στελέχη ( $Ben^R Prc^R CD^R$ ) έχουν μικρότερη προσαρμοστικότητα απ' ότι όλα τα άλλα στελέχη του *Botrytis cinerea*. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί με βάση τη μακρά διάρκεια της πίεσης επιλογής και από τις δύο ομάδες μυκητοκτόνων, εφ' όσον η εφαρμογή δε διακόπηκε τα τελευταία χρόνια.

Κατά το πείραμα εκτίμησης της παθογόνου ικανότητας, στελεχών *Botrytis cinerea* πάνω σε πέταλα τριανταφυλλιάς, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές της παθογόνου ικανότητας ανάμεσα στα ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα. Διαφορές παρατηρήθηκαν στο χρόνο εκδήλωσης της μόλυνσης, πάνω στους φυτικούς ιστούς. Μολύνσεις που προήλθαν από ευαίσθητα στελέχη εμφανίστηκαν πρώτες.

Η Katan κ.α. (1989), υποστήριξε ότι η παθογόνος ικανότητα των ανθεκτικών στελεχών στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα ήταν παρόμοια με αυτή των αντίστοιχων άχριων στελεχών και ότι στελέχη που χαρακτηρίζονται ως  $Ben^R NPC^S$ ,  $Ben^S NPC^R$ ,  $Ben^R NPC^R$ , προκάλεσαν μόλυνση 100%.

Αποτελέσματα μελέτης, των Ziogas και Girgis (1993), των παραμέτρων της προσαρμοστικότητας σε άχρια στελέχη και αντιπροσωπευτικά ανθεκτικά στελέχη του *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, έδειξαν μειωμένη, παραγωγή σπορίων, βλάστηση σπορίων και επιμήκυνση βλαστικών σωλήνων, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Σε τέστ παθογένειας των ίδιων στελεχών, ένα ανθεκτικό στέλεχος και στις δύο ομάδες μυκητοκτόνων εμφανίστηκε εξ' ίσου μοθυσματικό με τα άχρια στελέχη και μίγμα βενζιμιδαζολικών και φαινυλοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων ήταν αναποτελεσματικό στον έλεγχο αυτού του στελεχούς.



Στελέχη τριπλής ανθεκτικότητας, στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμιδικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, που έχουν αναφερθεί από τον Elad κ.α.(1992), ήταν παθογενή σε κοτυλιδόνες φυτών αχγουριού, στις οποίες νωρίτερα είχε γίνει εφαρμογή με carbendazim, iprodione ή carbendazim+diethofencarb.

Από τις ανωτέρω ερευνητικές εργασίες που αφορούν την εκτίμηση της παθογόνου ικανότητας είναι φανερό ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα. Επίσης δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην παθογόνο ικανότητα μεταξύ των μεταλλαχθέντων ανθεκτικών στελεχών και των αντίστοιχών τους άγριων στελεχών.

Από το πειραματικό μέρος έγινε επίσης φανερό, ότι αιωρήματα σπορίων στελεχών *Botrytis cinerea* στα οποία είχε γίνει προσθήκη 0.1% κ.ο. σακχαρόζης ή dextrose, προκάλεσαν μοιύνσεις πάνω στα πέταλα τριαντάφυλλου γρηγορότερα, από τα αντίστοιχα ατραποποιητά αιωρήματα σπορίων των ίδιων στελεχών.

Στη βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι η παρουσία σακχάρων βοηθά στη βλάστηση των σπορίων (Jarvis, 1977 και Pappas, 1982).

Τέλος η αύξηση της θερμοκρασίας φάνηκε να επιδρά σημαντικά στην ταχύτητα ανάπτυξης του μυκηλίου των στελεχών *Botrytis cinerea*.

Κατά τη διάρκεια επώασης καλλιιεργειών στελεχών *Botrytis cinerea*, στους 30°C, παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης του μυκηλίου μετά τις 24 πρώτες ώρες. Επίσης τα στελέχη που είχαν την πιο γρήγορη ανάπτυξη μυκηλίου στους 30°C, σε σύγκριση με αποτελέσματα προηγούμενου πειράματος (ανάπτυξης στους 22°C), φάνηκε ότι τα ίδια στελέχη είχαν την πιο αρχή ανάπτυξη μυκηλίου στους 22°C. Όταν οι καλλιέργειες που αρχικά είχαν επωασθεί στους 30°C για 72 ώρες, στη συνέχεια επώασθηκαν στους 22°C παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των ανθεκτικών στελεχών ήταν μεγαλύτερος του ρυθμού ανάπτυξης των ευαίσθητων στελεχών.

Στη βιβλιογραφία δεν αναφέρονται πειράματα επίδρασης της θερμοκρασίας στην ταχύτητα ανάπτυξης του μυκηλίου ανθεκτικών στελεχών *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα.

Από όσα έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα γίνεται φανερό ότι η συνεχής χρήση των μυκητοκτόνων στον αγρό επιλέγει ανθεκτικά στελέχη, τα οποία στη συνέχεια αναπτύσσουν υψηλή προσαρμοστικότητα και παθογόνο ικανότητα και καταστύβουν αναποτελεσματικά τα μυκητοκτόνα. Συγκεκριμένα η χρήση του μίγματος carbendazim+diethofencarb, σε ανθεκτικό πληθυσμό *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά, στον οποίο υπάρχουν σε χαμηλή συχνότητα και φαινότυποι με ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, έχει σαν συνέπεια την αύξηση αυτών των φαινοτύπων. Επίσης χρήση του μίγματος σε πληθυσμό που ήδη είναι ανθεκτικός στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, έχει σαν αποτέλεσμα εμφάνιση στελεχών τριπλής ανθεκτικότητας στα

βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξυμιδικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα (Elad, κ.α., 1992).

Πρέπει λοιπόν από άποψη εφαρμοσμένης φυτοπαθολογίας, πριν αποφασίσουμε τη χρησιμοποίηση ενός μυκητοκτόνου για την καταπολέμηση μιας ασθένειας σε μία περιοχή, θα ενδιαφέρει να έχουμε απάντηση στα ακόλουθα ερωτήματα:

- Πόσο πιθανό είναι να εμφανισθούν στον αγρό στελέχη του παθογόνου με σημαντική ανθεκτικότητα στο μυκητοκτόνο.

- Πόσο γρήγορα τα στελέχη αυτά θα επιβεχούν, ώστε να αποτελέσουν σημαντικό μέρος του πληθυσμού του παθογόνου και να προκαλέσουν αποτυχίες στην καταπολέμηση.

- Πόσο σταθερή θα είναι η ανθεκτικότητα στον αγρό, δηλαδή μπορούν τα ανθεκτικά στελέχη να ανταγωνιστούν με τα ευαίσθητα και όταν δεν υπάρχει το μυκητοκτόνο στο περιβάλλον Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Η αντιμετώπιση του *Botrytis cinerea* είναι δύσκολη, ιδιαίτερα όταν δεν ακολουθείται μία στρατηγική αντιμετώπισης του ολοκληρωμένη και ορθολογική. Μία τέτοια στρατηγική προϋποθέτει τη χρησιμοποίηση σε συνδυασμό καθαυερχητικών, βιολογικών και χημικών μεθόδων. Και αυτό γιατί το παθογόνο δημιουργεί εύκολα ανθεκτικά στελέχη σε πολλά μυκητοκτόνα περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των χημικών επεμβάσεων.

Από την παρούσα ερευνητική προσπάθεια διερεύνησης των βιολογικών ιδιοτήτων διαφόρων απομονώσεων, προέκυψε ότι τα ανθεκτικά στελέχη του *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα έχουν πολλές πιθανότητες να επικρατήσουν στον άγριο πληθυσμό του παθογόνου και μελλοντικά να προκαλέσουν προβλήματα στην πράξη όπου γίνεται συχνή εφαρμογή τέτοιων μυκητοκτόνων.

#### Βιβλιογραφικές πηγές

Beever κ.α. (1989), Γεωργόπουλος και Ζιώγας (1992), Elad κ.α. (1992), Ζιώγας (1981), Faretra και Pollastro (1993), Hsiang και Chastangner (1992), Jarvis (1977), Katan κ.α. (1989), Λάσκαρης κ.α. (1994), Leroux (1992), Leroux και Moncomble (1994), Pappas (1982), Raposo κ.α. (1994), Ziogas και Girgis (1993).



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agrios G. N. (1978) *Plant Pathology*, 2nd ed. Academic, Press Inc. New York p.p. 703.
2. Barnett H. and Barry B. Hunter (1987) *Illustrated genera of imperfect fungi*. Collier Macmillan Company. London.
3. Beever R. E., Laracy E. P. and Pak H. A. (1989) Strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards. *Plant Pathology* **38**, 427-437.
4. Γεωργόπουλος Σ. Γ. (1984) *Βασικές γνώσεις Φυτοπαθολογίας*. Αθήνα.
5. Γεωργόπουλος Σ. Γ. και Ζώγας Β. Ν. (1992) *Αρχές και μέθοδοι καταπολέμησης των ασθενειών των φυτών*. Αθήνα.
6. Davidse L. C. (1987) *Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and resistance*. The Netherlands.
7. Elad Y., Yunis H. and Katan T. (1992) Multiple fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathology* **41**, 41-46.
8. Faretra F. and Pollastro S. (1993) Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) from nine countries. *Plant Pathology* **42**, 48-57.
9. Ζώγας Β. Ν. (1981) *Τεχνά σήψη της αμπέλου*. Θεσσαλονίκη.
10. Jarvis W. R. (1977) *Botryotinia and Botrytis species*. Canada Department of Agriculture, Ottawa.
11. Hsiang T. and Chastagner G.A. (1992) Production and viability of sclerotia from fungicide-resistant and fungicide-sensitive isolates of *Botrytis cinerea*, *B. elliptica*, *B. tulipae*. *Plant Pathology* **41**, 600-605.
12. Katan Talma, Elad Y. and Yunis H. (1989) Resistance to diethofencarb (NPC) in benomyl-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* **38**, 86-92.
13. Λάσκαρης Δ., Παππάς Α. Χ. και Κυριακόπουλος Χ. Κ. (1994) Εμφάνιση στελεχών του *Botrytis cinerea* Pers. με διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και φαινολοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα σε καλλιέργειες θερμοκηπίου. 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο. Αθήνα.

14. Leroux P. (1992) Negative cross-resistance in fungicides: from the laboratory to the field p.179-190. *Developments in Combating Pesticide Resistance*.
15. Leroux P. and Moncomble D. (1994) Resistance of *Botrytis cinerea* to Dicarboximides, Benzimidazoles and Phenylcarbamates in the Champagne vineyards. *BCPC Monograph no 60: Fungicide Resistance*.
16. Μπούρμπος Β.Α. και Σκουντριδάκης Μ. (1987) *Εχθροί και ασθένειες της τομάτας θερμοκηπίου*. Εκδοτική αγροτεχνική.
17. Μπούρμπος Β. Α. και Σκουντριδάκης Μ. (1993) *Ασθένειες και εχθροί των κολλοκυνθοειδών*. Χανιά.
18. Pappas A. C. (1982) Inadequate control of grey mould on cyclamen by dicarboximide fungicides in Greece. *Journal of Plant Diseases and Protection* **89**, 52-58.
19. Pappas A. C. and Elena K. (1988) Sensitivity to diethofencarb and control of *Botrytis cinerea* pers. in greenhouse grown plants. *5th International Congress of Plant Pathology*. Kyoto Japan.
20. Παππάς Α. Χ. (1992) Ο βοτρυτής στα κηπευτικά και σε άλλες καλλιέργειες. *Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία. Φύλο 4*.
21. Παναχόπουλος Χ. Γ. (1992) *Ασθένειες λαχανικών, βιομηχανικών και καλλιπωπιστικών φυτών*. Αθήνα.
22. Παναχόπουλος Χ.Γ. (1993) *Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου*. Αθήνα.
23. Παναχόπουλος Χ. Γ. (1995) *Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών*. Αθήνα - Πειραιάς.
24. Raposo R., Delcan J., Melgarejo P. and Gomez V. (1994) Multiple fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from commercial greenhouses in southeastern Spain. *Pests and Diseases* **4C-15**.
25. Suzuki K., Kato T., Takahashi J. and Kamoshita K. (1984) Mode of Action of Methyl N-(3,5-Dichlorophenyl)-carbamate in the Benzimidazole -resistant Isolate of *Botrytis cinerea*. *J. Pesticide Sci.* **9**, 497-501.
26. Ziogas B. N. and Girgis S. M. (1993) Cross-Resistance Relationships between Benzimidazole Fungicides and Diethofencarb in *Botrytis cinerea* and their Genetical Basis in *Ustilago maydis*. *Pestic. Sci.* **39**, 199-205.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 4 Ταχύτητα ανάπτυξης μυκηλίου 5 στελεχών <i>BOTRYTIS CINEREA</i> σε υλικό PDA στους 22 C σε σκοτάδι				
		Χρόνος επώασης σε ώρες		
		24	48	72
Στελέχη	Επαναλήψεις	Διάμετρος	απουκίας	σε mm
3 94	1	27	57	85
	2	28	59	85
	3	26	54	85
4 94	1	22	57	85
	2	21	56	85
	3	27	60	85
La 238	1	24	48	79
	2	24	49	79
	3	23	47	78
La 252	1	21	44	74
	2	21	44	73
	3	21	45	74
Le 2	1	26	53	80
	2	25	53	82
	3	27	54	83

Πίνακας 6 Παραγωγή σπορίων σε καλλιέργειες 7 ημερών από στελέχη <i>BOTRYTIS CINEREA</i> σε υλικό PDA στους 22 C σε σκοτάδι			
Αριθμός		σπορίων x 10000	
Επαναλήψεις			
Στελέχη	1	2	3
3 94	12	25.5	15
4 94	36	31	27
La 238	3	1	7
La 252	1	2	<1
Le 2	7	14.5	17

Πίνακας 8 Σχηματισμός σκληρωτίων σε καλλιέργειες 25 ημερών από στελέχη <i>BOTRYTIS CINEREA</i> σε υλικό PDA στους 22 C σε σκοτάδι			
Νηπό		σκληρωτίων σε mg	
Επαναλήψεις			
Στελέχη	1	2	3
3 94	0	0	0
4 94	0.038	0.03	0.235
La 238	0.357	0.303	0.226
La 252	0.085	0.433	0.621
Le 2	0.264	0.195	0.281

Πίνακας 10 Ανάπτυξη μυκήθιου 12 στελεχών BOTRYTIS CINEREA				
σε υλικό ΡDΑ, στους 30 C, σε σκοτάδι				
		Χρόνος επώασης σε ώρες		
		24	48	72
Στελέχη	Επανάληψεις	Διάμετρος	αποκίας	σε mm
3 94	1	8	10	10
	2	9	10	11
	3	8	9	9
4 94	1	5	5	5
	2	5	6	6
	3	5	5	5
Le 2	1	7	8	8
	2	9	9	9
	3	8	9	9
La 100	1	8	10	10
	2	10	11	11
	3	9	10	11
La 221	1	9	9	9
	2	9	10	11
	3	9	9	9
La 238	1	8	9	11
	2	8	10	13
	3	9	10	13
La 252	1	9	11	12
	2	10	11	12
	3	8	10	11
C 1	1	9	10	10
	2	10	12	14
	3	10	14	14
C 2	1	7	7	7
	2	8	8	8
	3	7	7	7
C 3	1	7	8	9
	2	7	8	8
	3	7	8	8
C 4	1	7	7	7
	2	7	8	8
	3	8	8	8
C 5	1	7	9	10
	2	9	10	10
	3	8	9	10



Πίνακας 11 Ανάπτυξη μικηλίου 12 σταίτεχων ΒΟΥΤΥΡΙΣ ΟΙΝΕΡΕΑ, σε υλικό PDA, ΣΤΟΥΣ 22 C, σε σκοτάδι, τα οποία αρχικά είχαν επωασθεί στους 30 C					
		Χρόνος επώασης		σε ώρες	
		0	24	48	72
Σταίτεχη	Επανάληψεις	Διάμετρος	αποκίας	σε	mm
3 94	1	10	10	10	32
	2	11	11	11	28
	3	9	9	9	29
4 94	1	5	5	7	31
	2	6	6	10	40
	3	5	5	10	39
Le 2	1	8	8	19	49
	2	9	9	22	50
	3	9	9	22	51
La 100	1	10	10	22	51
	2	11	11	21	47
	3	11	11	20	50
La 221	1	9	14	30	58
	2	11	20	38	67
	3	9	12	29	54
La 238	1	11	23	41	65
	2	13	28	46	71
	3	13	25	43	69
La 252	1	12	17	35	63
	2	12	16	32	62
	3	11	14	31	60
C 1	1	10	10	18	52
	2	14	14	20	52
	3	14	14	20	53
C 2	1	7	7	15	42
	2	8	8	19	45
	3	7	7	15	40
C 3	1	9	16	30	68
	2	8	14	33	63
	3	8	15	37	67
C 4	1	7	12	32	63
	2	8	15	36	64
	3	8	17	39	66
C 5	1	10	22	48	79
	2	10	20	45	78
	3	10	17	44	77

Πίνακας 14 Παραγωγή σπορίων 7 στελεχών BOTRYTIS CINEREA, από μοδύνοις σε πέταλα τριαντάφυλλου

	Αριθμός	σπορίων	x	10000
Επαναλήψεις				
Στελέχη	1	2	3	
3 94	25	2	3	
4 94	15	2	1	
La 100	3	35	6	
La 238	15	1	1	
La 252	3	2	35	
Le 2	1	65	25	
C 4	1	1	1	

