

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Τεχνολογικών Επιστημών
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής και Ζωικής Παραγωγής

Δ. Γ. Αντωνιάδης



**Ο τρόπος βλάστησης των σπορίων ως
μέθοδος προσδιορισμού ανθεκτικότητας του
Botrytis cinerea στα μυκητοκτόνα**



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

Αριθ. Εισ.: 1735/1

Ημερ. Εισ.: 29-09-2003

Δωρεά: _____

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΓΦΖΠ

2000

ΑΝΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070308

**Ο τρόπος βλάστησης των σπορίων ως μέθοδος
προσδιορισμού ανθεκτικότητας του *Botrytis cinerea* στα
μυκητοκτόνα**

Πτυχιακή διατριβή

Εξεταστική Επιτροπή

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

Μέλη : Ι.Α Τσιτσιπής, Καθηγητής Εντομολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σ. Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια Γεωργίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
Μέρος Α΄ : Βιβλιογραφική ανασκόπηση	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΟΥ ΒΟΤΡΥΤΗ - ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	7
Organικά μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος δράσης	7
Βενζιμιδαζολικά	8
Δικαρβοξυμιδικά	8
Φαινυλοκαρβαμιδικά	10
Ανυλινοπυριμιδίνες	11
Παρεμποδιστές Βιοσύνθεσης Εργοστερόλης	11
Παράγωγα υδροξανιλιδινών – Fenhexamid	12
ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ	13
Γενικές αρχές στα προγράμματα παρακολούθησης της ευαισθησίας των μυκήτων στα μυκητοκτόνα	13
Τρόποι μέτρησης της ευαισθησίας των μυκήτων στα μυκητοκτόνα.....	15
Ανίχνευση ανθεκτικότητας	16
Τεχνικές παρακολούθησης της ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά	17
Τεχνικές παρακολούθησης της ανθεκτικότητας στα δικαρβοξυμιδικά	18
Παρακολούθηση της ευαισθησίας στο dichlofluanid.....	19
Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μεθόδων	19
Εφαρμογές των αποτελεσμάτων παρακολούθησης για ανθεκτικότητα...	19
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ <i>Botrytis cinerea</i>	
Χαρακτηρισμός φαινοτύπων ανθεκτικότητας με βάση τον τρόπο βλάστησης των σπορίων	21
Περιπτώσεις που δεν μπορεί να εφαρμοστεί η τεχνική βλάστησης των σπορίων	24

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΤΗ ΒΛΑΣΤΗΣΗ ΤΩΝ
ΣΠΟΡΙΩΝ ΤΟΥ *B. cinerea***

Βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα	25
Δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα	25
Φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα	26
Ομάδα φθαλιμιδίων και συγγενών Σουλφιδίων	26
Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης	26
Ανυλινοπυριμιδίνες	27
Παράγωγα υδροξανιλιδινών – Fenhexamid	27
Πρότυπα βλάστησης σπορίων στους διάφορους φαινοτύπους ανθεκτικότητας στον <i>Botrytis cinerea</i>	27

Μέρος Β΄: Πειραματικό μέρος

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	29
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	30
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43

Μέρος Γ΄: Βιβλιογραφία	48
-------------------------------------	----

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* είναι το παθογόνο αίτιο της τεφράς σήψης (Grey mould), μια ασθένεια με παγκόσμια εξάπλωση και μεγάλο εύρος ξενιστών. Στις καλλιέργειες, η ασθένεια προξενεί τόσο ποσοτικές όσο και ποιοτικές ζημιές που οδηγούν σε σοβαρές απώλειες στην παραγωγή. Ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης της ασθένειας σήμερα είναι η χημική καταπολέμηση. Η αποτελεσματικότητα όμως των μέσων χημικής καταπολέμησης μειώθηκε δραματικά και αυτό οφείλεται κυρίως στην ιδιαίτερη ικανότητα του *Botrytis cinerea* να αναπτύσσει γρήγορα ανθεκτικά στελέχη στα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμησή του.

Η ανάπτυξη μεθόδων έγκαιρης επισημάνσης των ανθεκτικών στελεχών αναμφίβολα θα συμβάλει στον καλύτερο προγραμματισμό των χημικών επεμβάσεων για την αντιμετώπιση της ασθένειας στην πράξη. Στην ανίχνευση και καταγραφή της ευαισθησίας των πληθυσμών των φυτοπαθογόνων μυκήτων στα διάφορα μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται οι συμβατικές μέθοδοι της Φυτοπαθολογίας που περιλαμβάνουν βιοδοκιμές *in vitro*, στις οποίες ελέγχεται η ακτινωτή ανάπτυξη του μυκηλίου ή ο τρόπος βλάστησης των σπορίων του μύκητα σε υπόστρωμα άγαρ εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο ή ο ρυθμός αύξησης του ξηρού βάρους του μύκητα σε υγρό θρεπτικό εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο, καθώς και βιοδοκιμές *in vivo* σε φυτά ή φυτικά μέρη που έχουν μεταχειριστεί με μυκητοκτόνο. Πρόσφατα έχουν εισαχθεί, εξελίσσονται και βρίσκουν εφαρμογή στην ταυτοποίηση ανθεκτικών στελεχών, διαγνωστικές τεχνικές που βασίζονται στην ανοσολογία όπως οι δοκιμές ανοσοεντοπισμού, στην τεχνολογία του DNA όπως η RAPD – PCR και η τεχνική RFLP και στην κυτογενετική όπως η PFGE.

Το πιο σημαντικό κριτήριο στις μεθόδους παρακολούθησης της ευαισθησίας των πληθυσμών των μυκήτων στα μυκητοκτόνα, είναι η απλότητα και η ευκολία στο χειρισμό τους. Απλές, γρήγορες τεχνικές, όπως οι δοκιμές βλάστησης σπορίων σε άγαρ είναι ιδανικές σε πολλές περιπτώσεις μυκήτων που παράγουν ικανοποιητικό αριθμό σπορίων όπως ο *Botrytis cinerea*. Ορισμένα μυκητοκτόνα επιδρούν στη φυσιολογία του μύκητα και προκαλούν διακριτές μορφολογικές τροποποιήσεις στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του μύκητα, όπως στο στάδιο βλάστησης των σπορίων ή ανάπτυξης του βλαστικού σωλήνα. Η παρατήρηση αυτών των αλλαγών παρέχει ένα ικανό μέσο ανίχνευσης ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα σε διάστημα 16- 20 ωρών, επιτρέποντας έτσι τη γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών στον πληθυσμό του μύκητα.

Η παρούσα εργασία χωρίζεται σε δύο μέρη: Το βιβλιογραφικό και το πειραματικό. Το πρώτο μέρος περιλαμβάνει μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που αφορά στη χημική καταπολέμηση του βοτρυτή και εστιάζεται στο μηχανισμό δράσης ο οποίος είναι υπεύθυνος για τις επιδράσεις του μυκητοκτόνου στον τρόπο βλάστησης των σπορίων. Περιγράφονται οι επιδράσεις των διαφόρων μυκητοκτόνων στη βλάστηση των σπορίων και την κανονική ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα καθώς και τεχνικές που αξιοποιούν αυτές τις διακριτές αλλαγές στην κανονική

βλάστηση των σπορίων για το χαρακτηρισμό ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα στελεχών του *Botrytis cinerea*.

Στο πειραματικό μέρος έγινε προσδιορισμός της ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα σε απομονώσεις αγρού του *Botrytis cinerea* με βάση τον τρόπο βλάστησης των σπορίων. Οι απομονώσεις αγρού είχαν αποκτηθεί από περισσότερα από 60 δείγματα που εμφάνιζαν συμπτώματα τεφράς σήψης και είχαν συλλεχθεί κατά τη διάρκεια προγράμματος παρακολούθησης της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα σε θερμοκήπια με καλλιέργειες τομάτας στην περιοχή Τυμπακίου Κρήτης. Συγκεκριμένα, έγινε παρατήρηση στο μικροσκόπιο διερχόμενου φωτισμού του τρόπου βλάστησης των σπορίων των απομονώσεων σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με carbendazim ή diethofencarb ή μίγματος carbendazim + diethofencarb σε συγκεντρώσεις 0, 1 και 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με iprodione σε συγκεντρώσεις 0, 3 και 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ και σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με dichlofluanid σε συγκεντρώσεις 0, 1, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Καταγράφηκε ο τρόπος βλάστησης των σπορίων, προσδιορίστηκαν οι επιδράσεις των μυκητοκτόνων στη βλάστηση των σπορίων και υπολογίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση που παρεμποδίζει την κανονική βλάστηση των σπορίων (MIC). Τέλος οι απομονώσεις κατατάχθηκαν σε φαινοτύπους ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα με βάση τις τιμές MIC.

Με τη δοκιμή βλάστησης των σπορίων δόθηκε η δυνατότητα ταυτοποίησης των διαφόρων ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα φαινοτύπων του *Botrytis cinerea* και αποδείχθηκε μια εύχρηστη, ευαίσθητη και γρήγορη βιοδοκιμή για την ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών στον πληθυσμό του *Botrytis cinerea*.

Μέρος Α': Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ασθένεια που είναι κυρίως γνωστή και σαν βοτρυτής, τεφρά ή σταχτιά σήψη (gray mold, grey mould), προκαλείται από το μύκητα *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. (Deuteromycotina, Hyphomycetes), έχει παγκόσμια εξάπλωση και προσβάλλει τα περισσότερα από τα καλλιεργούμενα φυτά. Σοβαρές ζημιές προκαλεί σε πολλά κηπευτικά (τομάτα, μαρούλι, αγκινάρα, λάχανο, κρεμμύδι, καρότο, αγγούρι, μελιτζάνα, φασόλι, πιπεριά κ.α.) και καλλωπιστικά φυτά. Είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη στις καλλιέργειες θερμοκηπίου λόγω των έντονων προσβολών και των δυσχερειών στην αντιμετώπισή της. Η ασθένεια προκαλεί επίσης και μετασυλλεκτικές σήψεις στα συγκομιζόμενα προϊόντα κατά τη διακίνηση και αποθήκευσή τους (Παναγόπουλος, 1995). Ο μύκητας αναπτύσσεται πάνω σε υγιείς ή εξασθενημένους ή νεκρούς φυτικούς ιστούς στους οποίους μπορεί να ζει ως προαιρετικό παράσιτο. Αν και είναι παράσιτο αδυναμίας μπορεί να προξενήσει τεράστιες ζημιές κάτω από ευνοϊκές συνθήκες. Εξειδίκευση του είδους *B.cinerea* σε ορισμένο ξενιστή δεν θεωρείται ότι υπάρχει. Πάντως έχουν αναφερθεί διαφορές στην παθογένεια μεταξύ απομονώσεων από διάφορους ξενιστές. Προσβάλλει φυτά όλων των ηλικιών και όλα σχεδόν τα μέρη τους (φύλλα, άνθη, καρπούς, στελέχη) και προκαλεί συμπτώματα διαφόρων τύπων. Ανάλογα με το είδος και την ηλικία των ιστών που προσβάλλει και τις συνθήκες του περιβάλλοντος που επικρατούν, προκαλεί κηλιδώσεις φύλλων, ανθέων και καρπών, έλκη βλαστών, σήψεις καρπών, ανθέων, κονδύλων και μικρών φυτών (Παναγόπουλος, 1997). Ο μύκητας προσβάλλει σημαντικές οικονομικά καλλιέργειες όπως τομάτα, αγγούρι, πιπεριά, μελιτζάνα, μαρούλι, σέλινο, φράουλα, τεύτλο, λάχανο, κρεμμύδι κ.α., καθώς και διάφορα ανθοκομικά και καλλωπιστικά φυτά όπως γαρύφαλλο, τριαντάφυλλο, αζαλέα, χρυσάνθεμο κ.α. Επίσης προσβάλλει το αμπέλι και τα καρποφόρα δέντρα. Οι ζημιές που προκαλεί το παθογόνο διακρίνονται σε ποιοτικές και ποσοτικές ανάλογα με τον ξενιστή και τις συνθήκες που επικρατούν μετά τη μόλυνση.

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* σχηματίζει όρθιους κονιδιοφόρους που αποτελούνται από ένα ποδίσκο καστανού χρώματος, αρχικά απλούς που στη συνέχεια διακλαδίζονται ακανόνιστα ή με διχοτόμηση και φέρουν στην κορυφή τους πάνω σε μικρές διακλαδώσεις κονίδια κατά κεφαλές, σε μορφή βότρυος (Παναγόπουλος, 1997). Το μυκήλιο του μύκητα είναι γενικά κυλινδρικό και μεγάλης διαμέτρου με πολυάριθμα διαφράγματα (septa), τα οποία φέρουν έναν απλό πόρο. Το μυκήλιο μπορεί να είναι μεσοκυττάριο, ενδοκυττάριο ή επιφανειακό, ενώ συχνά σημειώνονται αναστομώσεις μεταξύ των υφών. Τα κύτταρα των υφών, με ελάχιστες εξαιρέσεις είναι πολυπύρηνα. Τα βλασάνοντα κύτταρα και τα σπόρια του *Botrytis cinerea* μπορεί να είναι ετεροκαρυωτικά. Η ετεροκαρυώση αποτελεί μια πηγή ποικιλομορφίας στο μύκητα. Η τέλεια μορφή του παρασίτου ονομάζεται *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel συν. *Sclerotinia fuckeliana* (Discomycetes, Helotiales) και σχηματίζεται από τα σκληρώτια του μύκητα τα οποία όταν βλαστώνουν υπό ειδικές συνθήκες παράγουν αποθήκια. Πάντως, η τέλεια μορφή πολύ σπάνια

εμφανίζεται στη φύση. Τα σκληρώτια του παρασίτου όταν βλαστάνουν δίνουν συνήθως μυκήλιο ή κονιδιοφόρους (Παναγόπουλος, 1995).

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

Η καταπολέμηση του *Botrytis cinerea* είναι δύσκολη και προϋποθέτει τη χρησιμοποίηση καλλιεργητικών, βιολογικών και χημικών μεθόδων σε συνδυασμό. Κι αυτό γιατί το παθογόνο δημιουργεί εύκολα ανθεκτικά στελέχη σε πολλά μυκητοκτόνα περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των χημικών επεμβάσεων (Παναγόπουλος, 1995). Η καταπολέμηση της τεφράς σήψης γίνεται με την εφαρμογή καλλιεργητικών πρακτικών όπως μείωση της υγρασίας και τήρηση καλής υγιεινής, με χημική καταπολέμηση ακολουθώντας προγράμματα εφαρμογής ψεκασμών σε τακτά χρονικά διαστήματα ενώ τελευταία διεξάγεται εντατική έρευνα για την ανάπτυξη μεθόδων βιολογικής καταπολέμησης της ασθένειας. Τέλος συνιστάται η καταπολέμηση με την εφαρμογή συνδυασμού των παραπάνω μεθόδων (Παναγόπουλος, 1995).

ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΟΥ ΒΟΤΡΥΤΗ - ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Η χημική καταπολέμηση παραμένει ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης της ασθένειας του βοτρυτή στις περισσότερες καλλιέργειες. Πολλές οικογένειες συνθετικών μυκητοκτόνων είναι σήμερα διαθέσιμες στη χημική καταπολέμηση του βοτρυτή. Τα μυκητοκτόνα που συνιστώνται ανήκουν στα οργανικά μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος δράσης, τα διασυστηματικά της ομάδας των βενζιμιδαζολικών και τα μυκητοκτόνα ειδικής δράσεως της ομάδας των δικαρβοξυμιδικών (Παναγόπουλος 1997). Επίσης στη χημική καταπολέμηση του βοτρυτή χρησιμοποιούνται νέες οικογένειες βοτρυδιοκτόνων όπως οι ανυλινοπυριμιδίνες και οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης καθώς και μίγματα βενζιμιδαζολικών και φαινυλοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων (Leroux *et al.*, 1999).

Οργανικά μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος δράσης

Στην ομάδα αυτή υπάγονται μυκητοκτόνα όπως το captan, το captafol, το chlorothalonil, το dichlofluanid, το folpet, το iminoctadine, το thiram, το tolyfluanid κ.α., τα περισσότερα από τα οποία είναι ασθενή βοτρυδιοκτόνα και η προστατευτική τους δράση σχετίζεται με την αναστολή πολλών ενζύμων που συμμετέχουν στην κυτταρική αναπνοή των σπορίων. Παρά την εκτεταμένη χρήση μυκητοκτόνων ευρέως φάσματος δράσης στην αντιμετώπιση του βοτρυτή για πολλές δεκαετίες, μόνο μερικές περιπτώσεις ανθεκτικότητας έχουν δημοσιευτεί σε χώρες της Ευρώπης (Pollastro *et al.*, 1996).

Στους παρεμποδιστές ευρέως φάσματος δράσης ανήκουν τα φθαλιμίδια και τα συγγενή σουλφίδια. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα μυκητοκτόνα captan, folpet, captafol, dichlofluanid, tolyfluanid. Δεν υπάρχει απόλυτη συμφωνία των ειδικών στο θέμα του μηχανισμού βιοχημικής δράσης των μυκητοκτόνων της κατηγορίας αυτής. Στους ευαίσθητους μύκητες η αναπνοή παρεμποδίζεται πιθανότατα από αντίδραση του μυκητοκτόνου με ένζυμο που έχουν σουλφιδρυλική ομάδα (-SH) στο ενεργό τους κέντρο και από την αντίδραση του μυκητοκτόνου με το συνένζυμο Q (CoQ) που επίσης έχει τέτοια ομάδα. Η τοξικότητα μειώνεται αν αυξηθεί η ποσότητα των (-SH) ομάδων στο υλικό καλλιέργειας πριν από την προσθήκη του μυκητοκτόνου. Όμως *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές παρεμποδίζουν και ένζυμο που δεν έχουν σουλφιδρυλικές ομάδες. Η ικανότητα τους να αντιδρούν με τις ιστόνες ίσως εξηγεί τη γενετική δραστηριότητά τους. Φαίνεται ότι μειώνουν την ικανότητα των ιστονών να σταθεροποιούν τη δομή του DNA και τα χρωμοσώματα μένουν ακάλυπτα στη δράση των νουκλεασών, με αποτέλεσμα την αυξημένη συχνότητα θραύσεων (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992).

Βενζιμιδαζολικά

Τα βενζιμιδαζολικά, ειδικά το carbendazim καθώς και το benomyl και το thiophanate-methyl, ήταν και είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα στο βοτρυτή. Η επίδρασή τους στους μύκητες οφείλεται στην παρεμπόδιση της δημιουργίας των μικροσωληνίσκων, ως αποτέλεσμα της σύνδεσής τους στην τουμπουλίνη, την κύρια πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων. Ανθεκτικότητα σε αυτά τα μυκητοκτόνα έχει αναφερθεί πολλές φορές και σχετίζεται με σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο της β-τουμπουλίνης (Davidse and Ishii, 1995). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά αναπτύχθηκε ταχύτατα σε πληθυσμούς του *Botrytis cinerea* και οδήγησε σε αποτυχία τα προγράμματα προστασίας των φυτών με benomyl. Μέχρι την εμφάνιση των βενζιμιδαζολικών δεν υπήρχε άλλο τόσο υψηλά αποτελεσματικό μυκητοκτόνο. Η επαναλαμβανόμενη όμως και αποκλειστική χρήση των βενζιμιδαζολικών οδήγησε γρήγορα στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητά τους μέσα σε δύο ως τέσσερα χρόνια (Delp, 1994).

Το benomyl έχει προστατευτική και θεραπευτική δράση. Μετατρέπεται στα φυτά, στο έδαφος ή στα ζώα σε carbendazim. Ο μηχανισμός μυκητοτοξικής δράσης των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων είναι γνωστός σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό και βασίζεται στην επίδραση τους στην πρωτεΐνη τουμπουλίνη, υπομονάδα των μικροσωληνίσκων. Σήμερα είναι γνωστό ότι στους ευαίσθητους μύκητες το carbendazim παρεμποδίζει το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου (spindle), αποκλείοντας έτσι τον κανονικό αποχωρισμό των θυγατρικών χρωμοσωμάτων. Οι μικροσωληνίσκοι είναι πολυμερείς έλικες που σχηματίζονται με πολυμερισμό υπομονάδων της πρωτεΐνης τουμπουλίνης, η οποία είναι ένα ετεροδιμερές μόριο, αποτελείται δηλαδή από δυο υπομονάδες οι οποίες χαρακτηρίζονται ως α- και β- τουμπουλίνη. Έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη δύο τουλάχιστον ειδών β-τουμπουλίνης (β1 και β2) και τριών α-τουμπουλίνης (α1, α2, α3). Η προσκόλληση (binding) του carbendazim στη β-τουμπουλίνη εμποδίζει τον πολυμερισμό της με αποτέλεσμα να μη σχηματίζεται η άτρακτος, ο θυγατρικός πυρήνας να μη μπορεί να διαχωριστεί και τελικά το κύτταρο να πεθαίνει και ο μύκητας να μην μπορεί να αναπτυχθεί. Σημαντικό ρόλο για τη μυκητοτοξικότητα αυτών των μορίων παίζει και η παρεμπόδιση του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων του κυτταροπλάσματος από τους οποίους εξαρτάται ο προσανατολισμός των υφών (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Μεταλλαγές που προκαλούν ανθεκτικότητα βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στο γονίδιο της β- τουμπουλίνης. Μεταλλαγές στο γονίδιο της α- τουμπουλίνης φαίνεται να αυξάνουν την ευαισθησία στα βενζιμιδαζολικά όπως και στα Ν-φαινυλοκαρβαμιδικά. Παρά το γεγονός ότι οι αλληλουχίες των αμινοξέων είναι εξελικτικά υψηλά συντηρημένες, αλλαγές στα αμινοξέα είναι πιθανόν να τροποποιούν την ευαισθησία στα βενζιμιδαζολικά χωρίς να καταστρέφουν τη λειτουργικότητα της τουμπουλίνης. Ένας αριθμός από αλλαγές στην α- και τη β-τουμπουλίνη είναι επιτρεπτός και καθεμία από τις αλλαγές αυτές επιτρέπει στους μικροσωληνίσκους να λειτουργούν παρουσία των βενζιμιδαζολικών (Davidse and Ishii, 1995).

Δικαρβοξιμιδικά

Στα τέλη της δεκαετίας του '70 και τις αρχές της δεκαετίας του '80, στις καλλιέργειες όπου η ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά είχε γίνει πρόβλημα, τα

δικαρβοξυμιδικά μυκητοκτόνα όπως το iprodione, το procymidone και το vinclozolin πρακτικά αντικατέστησαν τα βενζιμιδαζολικά. Εξαιτίας της πολύ καλής δραστηριότητάς τους χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα, αν όχι και αποκλειστικά, για την καταπολέμηση του βοτρυτή. Γρήγορα ξεκίνησαν οι μελέτες τόσο στον αγρό όσο και στο εργαστήριο ώστε να μελετηθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Τα πρώτα αποτελέσματα έδειχναν τη σχετική ευκολία με την οποία μπορεί να δημιουργηθούν ανθεκτικά στελέχη σε κατάλληλες συνθήκες εργαστηρίου ανεξάρτητα από το υλικό (σπόρια, μυκήλιο), την προετοιμασία ή τη μέθοδο δοκιμής. Πάντως, από εντατικές μελέτες σε πειραματικούς αγρούς διαπιστώθηκε ότι σε συνθήκες αγρού η ταχύτητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε στελέχη του *Botrytis cinerea* δεν ήταν αυτή που αναμενόταν από τα εργαστηριακά αποτελέσματα. Παρόμοια, κανένα ανθεκτικό στέλεχος δεν απομονωνόταν μετά από δύο χρόνια σε πείραμα αγρού (αμπέλι - *Botrytis cinerea*) στο οποίο είχαν χρησιμοποιηθεί vinclozolin και iprodione σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις (5- 100 μgml^{-1}) μέχρι και 11 φορές το χρόνο (Lorenz, 1994). Παρόλα αυτά απομονώσεις αγρού του *Botrytis cinerea* ανθεκτικές στα δικαρβοξυμιδικά δεν άργησαν να εμφανιστούν (Pappas, 1979) και από τότε στελέχη ανθεκτικά στα δικαρβοξυμιδικά εμφανίζονταν σε διάφορες περιοχές του κόσμου όπου τα μυκητοκτόνα αυτά χρησιμοποιούνταν σε κανονική βάση.

Στις Μεσογειακές περιοχές όπου τα λαχανικά όπως τομάτα και αγγούρι καλλιεργούνται υπό κάλυψη στη διάρκεια των χειμερινών μηνών οι συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου είναι εξαιρετικά ιδανικές για την ανάπτυξη του *Botrytis cinerea* και είναι απαραίτητη η συχνή εφαρμογή βοτρυδιοκτόνων. Παρόλα αυτά από τις παρατηρήσεις και τα δεδομένα διαπιστώνεται ότι ακόμη και σε αυτές τις συνθήκες η αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων στην καταπολέμηση της ασθένειας εμφανίζει διακυμάνσεις στους διάφορους πληθυσμούς του μύκητα. Αυτό αποδίδεται κυρίως στις ιδιαιτερότητες των στελεχών του *Botrytis cinerea* που είναι ανθεκτικά στα δικαρβοξυμιδικά και τη δυναμική των πληθυσμών τους (Lorenz, 1994).

Για τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των δικαρβοξυμιδικών έγιναν πολλές εργασίες καμία όμως δεν φαίνεται να εξηγεί ικανοποιητικά την πρωταρχική δράση των μυκητοκτόνων αυτής της ομάδας. Έτσι σε μέλη της ομάδας αποδόθηκε επίδραση στην πρωτεϊνοσύνθεση, την αναπνοή, τη μιτοχονδριακή διαίρεση, τη βιοσύνθεση συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος, την κυτταρική αναπνοή, τη μιτοχονδριακή δομή, την κυτταρική διαίρεση, τις ημιπερατές ιδιότητες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και τον σχηματισμό των μικροσωληνίσκων που είναι υπεύθυνοι για την κίνηση. Οι Pappas and Fisher, (1979), συγκρίνοντας τους μηχανισμούς δράσης των vinclozolin, procymidone, iprodione και prochloraz, διαπίστωσαν ότι όλα παρεμποδίζουν τη μυκηλιακή αύξηση περισσότερο από τη βλάστηση των σπορίων. Κανένα από τα συστατικά δεν επηρέαζε την αναπνοή, τη διαπερατότητα της μεμβράνης ή την παραγωγή RNA αλλά το iprodione παρεμπόδιζε τη σύνθεση DNA και το prochloraz τη σύνθεση πρωτεϊνών. Παρότι όλα αυτά τα μυκητοκτόνα παρεμπόδιζαν τη βιοσύνθεση χιτίνης δεν φάνηκε αυτός να είναι ο στόχος δράσης τους. Τα μυκητοκτόνα αυτά τροποποιούσαν τη σύνθεση λιπιδίων του μύκητα. Το vinclozolin και το procymidone παρεμπόδιζαν την παραγωγή τριγλυκεριδίων αλλά το iprodione δεν είχε καμία επίδραση σε αυτή. Το iprodione και το prochloraz μείωναν επίσης τη βιοσύνθεση εργοστερόλης. Πάντως κανένας πρωταρχικός στόχος δράσης δεν βρέθηκε για τα δικαρβοξυμιδικά ενώ η κύρια δράση του prochloraz αποδόθηκε στην παρεμπόδιση βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (Pappas and Fisher, 1979). Μια θεωρία που υποστηρίζεται ότι εξηγεί όλες τις επιδράσεις των δικαρβοξυμιδικών, είναι ότι προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων κυρίως στη

μιτοχονδριακή μεμβράνη, στην πυρηνική μεμβράνη και το ενδοπλασματικό δίκτυο των ευαίσθητων μυκήτων (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992).

Το fludioxonil που ανήκει στις φαινυλπυρρόλες, εισήχθηκε πρόσφατα σε πολλούς Ευρωπαϊκούς αμπελώνες (Legoux, 1996). Τα δικαρβοξυμιδικά, οι φαινυλπυρρόλες και επίσης τα μυκητοκτόνα που ταξινομούνται στους αρωματικούς υδρογονάνθρακες ή AHFs (π.χ. chloroneb, dicloran, quintozone, tolclofos –methyl) δεν είναι χημικά συγγενή. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τον Legoux *et al.*, (1999), οι Legoux and Fritz το 1984 και άλλοι ερευνητές αργότερα διαπίστωσαν σε εργαστηριακά μεταλλαγμένα στελέχη του *Botrytis cinerea* και σε πολλούς άλλους μύκητες ότι εμφανίζεται διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ αυτών των μυκητοκτόνων. Σύμφωνα με τον ίδιο συγγραφέα, βιοχημικές μελέτες του Legoux το 1996 δείχνουν ότι αυτά τα μυκητοκτόνα επηρεάζουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και επάγουν τη συσσώρευση γλυκερόλης στα μυκηλιακά κύτταρα ενώ ο Orth *et al.*, το 1995 και άλλοι ερευνητές αργότερα υποστηρίζουν ότι ο πρωταρχικός στόχος δράσης αυτών των μυκητοκτόνων μπορεί να είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης πολυόλης.

Φαινυλοκαρβαμιδικά

Τα βενζιμιδαζολικά συνεισφέρουν στη Φυτοπροστασία για περισσότερο από τρεις δεκαετίες εξαιτίας του εύρους των μυκήτων στους οποίους είναι μυκητοτοξικά και της υψηλής προστατευτικής δράσης τους. Παρόλα αυτά η εντατική χρήση τους είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση στελεχών ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά. Η στρατηγική των εναλλαγών ή των μιγμάτων βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων με ευρέως φάσματος μυκητοκτόνα ήταν αποτελεσματική στο να καθυστερήσει την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά σε μερικά παθογόνα. Μια προσέγγιση στην αντιμετώπιση του προβλήματος της ανθεκτικότητας ήταν η χρήση μυκητοκτόνων στα οποία τα ανθεκτικά στελέχη δείχνουν αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα. Οι Legoux and Gredt (1979) ανέφεραν πρώτοι ότι στελέχη ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά των μυκήτων *Botrytis cinerea* και *Penicillium expansum* εμφάνιζαν αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα της ομάδας των N- φαινυλοκαρβαμιδικών barban, chlorpropham και chlorbufam. Καθώς αυτά τα συστατικά είναι φυτοτοξικά και δεν είναι χρήσιμα στην αντιμετώπιση των ασθενειών, αναζητήθηκαν άλλα N- φαινυλοκαρβαμιδικά. Έτσι ανακαλύφθηκαν δύο ενδιαφέροντα συστατικά, το MDPC και το diethofencarb (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Το diethofencarb ήταν υψηλά δραστικό σε ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά στελέχη αγρού του *Botrytis cinerea*, *Cercospora beticola*, *Fusarium nivale*, *Mycosphaerella melonis*, *Venturia nashicola*, ενώ η δραστικότητά του στις απομονώσεις αγρίου τύπου ήταν μικρή. Οι τιμές ED₅₀ (συγκέντρωση μυκητοκτόνου που προκαλεί παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μύκητα κατά 50 % σε σχέση με το μάρτυρα) για το MDPC και το diethofencarb για τα ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά στελέχη του *Botrytis cinerea* ήταν μικρότερη από 0.4 και 0.04 μgml⁻¹ αντίστοιχα ενώ για τις απομονώσεις αγρίου τύπου ήταν περίπου 30 μgml⁻¹ και μεγαλύτερη από 100 μgml⁻¹ αντίστοιχα (Kato, 1994).

Το MDPC και το diethofencarb προκαλούσαν μορφολογικές ανωμαλίες στα ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά στελέχη του *B. cinerea*. Οι βλαστικοί σωλήνες ήταν παραμορφωμένοι και διογκωμένοι και δεν παρατηρούνταν περαιτέρω ανάπτυξη των υφών. Αυτές οι μορφολογικές ανωμαλίες ήταν παρόμοιες με αυτές των ευαίσθητων απομονώσεων που μεταχειρίζονταν με βενζιμιδαζολικά. Η μεταχείριση των βλαστανόντων σπορίων των ανθεκτικών στελεχών με MDPC ή diethofencarb είχε ως

αποτέλεσμα τον διασκορπισμό της χρωματίνης και την απώλεια του καλά καθορισμένου πυρήνα, αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που εμφανίζονταν στα σπόρια των ευαίσθητων στα βενζιμιδαζολικά απομονώσεων αλλά διαφορετικά με τα αποτελέσματα που εμφανίζονταν στα σπόρια που δεν είχαν μεταχειριστεί με MDPC ή diethofencarb. Τα N-φαινυλκαρβαμίδια, ειδικά το diethofencarb φάνηκε να είναι δραστικό μόνο εναντίον των ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών των μυκήτων, ένα φαινόμενο που περιγράφεται ως αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα. Θεωρήθηκε ότι αυτά τα συστατικά επηρεάζουν την τουμπουλίνη των στελεχών των ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά και παρεμποδίζουν τη μίτωση. Οι εφαρμογές μιγμάτων του diethofencarb με βενζιμιδαζολικά ήταν αποτελεσματικές στην καταπολέμηση του βοτρυτή των λαχανικών και της αμπέλου. Παρόλα αυτά θεωρείται προτιμότερο να εναλλάσσεται αυτό το μίγμα με δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα ώστε να καθυστερήσει πιθανή επιλογή στελεχών ανθεκτικών τόσο στα βενζιμιδαζολικά όσο και στα φαινυλοκαρβαμιδικά (Kato, 1994).

Ανυλινοπυριμιδίνες

Οι ανυλινοπυριμιδίνες π.χ. cyprodinil, mepanipyridin, pyrimethanil, αντιπροσωπεύουν μια νέα οικογένεια βοτρυδιοκτόνων. Σύμφωνα με το Leroux *et al.*, (1999), ο Leroux το 1996 υποστηρίζει ότι η δραστικότητα τους *in vivo* στους μύκητες είναι αποτέλεσμα της αναστολής έκκρισης υδρολυτικών ενζύμων που εμπλέκονται στη διαδικασία παθογένεσης και / ή της παρεμπόδισης της βιοσύνθεσης της μεθειονίνης στα κύτταρα των μυκήτων. Σύμφωνα με τον ίδιο συγγραφέα, ο Chapeland *et al.*, το 1999, μετά από βιοχημικές και γενετικές μελέτες υποστηρίζει ότι ένας πιθανός μηχανισμός ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα αυτά είναι η μειωμένη άθροιση του μυκητοκτόνου στα ανθεκτικά στελέχη λόγω της αυξημένης έκκρισης του από το κύτταρο του μύκητα, κάτι που πιθανόν να συνδέεται με πρωτεΐνες-μεταφορείς της κυτταρικής μεμβράνης (ATP binding cassette –ABC-transporters).

Στελέχη του *Botrytis cinerea* υψηλά ανθεκτικά στις ανυλινοπυριμιδίνες έχουν ανιχνευθεί σε πολλούς Ευρωπαϊκούς αμπελώνες (Hilber and Hilber- Bodmer, 1998).

Παρεμποδιστές Βιοσύνθεσης Εργοστερόλης (SBIs).

Η εργοστερόλη είναι η κύρια στερόλη των μεμβρανών των μυκήτων τόσο της κυτταροπλασματικής όσο και εκείνων του ενδοπλασματικού δικτύου, των μιτοχονδρίων κ.τ.λ., με εξαίρεση τους Ωομύκητες. Τόσο τα ανώτερα φυτά όσο και τα θηλαστικά δεν έχουν εργοστερόλη. Συνεπώς η βιοσύνθεση της εργοστερόλης φαίνεται να είναι ένας κατάλληλος στόχος για την επίτευξη εκλεκτικής τοξικότητας για τους μύκητες. Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης (SBIs), συχνά εμφανίζουν ευρύ φάσμα αντιμυκητικής δράσης και είναι κατάλληλοι για την καταπολέμηση σημαντικών ασθενειών όπως είναι τα ωΐδια, οι σκωριάσεις, τα φουζικλάδια, η φαιά σήψη, οι κερκοσποριάσεις και οι μετασυλλεκτικές σήψεις (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Διακρίνουμε τρεις κύριες κατηγορίες SBIs ανάλογα με το βιοχημικό στόχο δράσης τους. Τα περισσότερο αποτελεσματικά SBIs περιλαμβάνουν το prochloraz και το tebuconazole που και τα δύο ανήκουν στην κατηγορία DMIs, στους παρεμποδιστές δηλαδή της 14^α-διμεθυλεστεράσης της στερόλης (Leroux *et al.*, 1999). Απομονώσεις του *Botrytis cinerea* που εμφανίζουν μειωμένη ευσαισθησία στα DMIs έχουν βρεθεί σε διάφορες καλλιέργειες σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες και στο Ισραήλ (Elad, 1992; Stehmann and De Waard, 1995).

Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης της εργοστερόλης παρεμποδίζουν το βιοσυνθετικό μονοπάτι της εργοστερόλης. Τα σπόρια του *Botrytis cinerea* μπορούν να συνθέτουν στερόλες αμέσως μετά την έναρξη της διαδικασίας βλάστησης, όταν οι βλαστικοί σωλήνες δεν έχουν ακόμη εμφανιστεί. Η παρουσία των τριαζολών προκαλεί έντονη παρεμπόδιση στη σύνθεση των στερολών στα σπόρια που βλαστάνουν. Υπάρχει όμως πάντα ένα χρονικό διάστημα από την εμφάνιση της παρεμπόδισης των ενζύμων και την έναρξη της παρεμπόδισης της επιμήκυνσης του βλαστικού σωλήνα που εξαρτάται από το ρυθμό σύνθεσης των στερολών, το ρυθμό αποδόμησης των στερολών και τα αποθέματα στερολών στα σπόρια. Έτσι η βλάστηση των σπορίων συχνά δεν παρεμποδίζεται από τα τριαζολικά μυκητοκτόνα (Pontzen and Scheinpfug, 1989).

Παράγωγα των υδροξανιλιδινών -Fenhexamid

Από τα παράγωγα των υδροξανιλιδινών, το fenhexamid (KBR 2738) είναι ένα υποσχόμενο βοτρυδιοκτόνο του οποίου ο τρόπος δράσης δεν έχει γίνει ακόμη γνωστός. Δεν φαίνεται να επιδρά στη βιοσύνθεση των λιπιδίων και στα ανθεκτικά στελέχη αποτοξικοποιείται πολύ γρήγορα. Σύμφωνα με τον Leroux *et al.*, (1999), στελέχη που εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία *in vitro* στο fenhexamid έχουν βρεθεί σε φυσικούς πληθυσμούς του *Botrytis cinerea* που δεν είχαν ποτέ εκτεθεί στο μυκητοκτόνο αλλά ο Suty *et al.*, το 1997, διαπιστώνει ότι τέτοια στελέχη φαίνεται να αντιμετωπίζονται καλά στον αγρό.

Σε δοκιμές *in vitro* διαπιστώθηκε μειωμένη ευαισθησία σε ορισμένους παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης όπως π.χ το fenpropimorph (παρεμποδιστές της Δ^{14} αναγωγή της στερόλης) και μένει να αποδειχθεί αν αυτή η αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα του fenhexamid και αυτής της ομάδας των SBIs μπορεί να έχει σχέση με τη διαδικασία της βιοσύνθεσης της στερόλης (Leroux *et al.*, 1999).

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

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

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

Γενικές αρχές στα προγράμματα παρακολούθησης της ευαισθησίας των μυκήτων στα μυκητοκτόνα

Σε όλα τα προγράμματα παρακολούθησης της ευαισθησίας των μυκήτων πρέπει να ακολουθούνται κάποιες γενικές αρχές (FAO, 1982; Staub and Sozzi, 1984).

Καθώς η ανίχνευση ανθεκτικότητας βασίζεται στην αναγνώριση της διαφοράς στην ευαισθησία στα μυκητοκτόνα, είναι σημαντικό σε κάθε περίπτωση να επιλέγεται η πιο κατάλληλη μέθοδος για τον ακριβή προσδιορισμό της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα εξαρτάται από το παθογόνο, τον ξενιστή, το βαθμό της εκτιμώμενης

απώλειας αποτελεσματικότητας, τη διαθεσιμότητα εργαστηρίου και άλλους παράγοντες. Παρότι οι μέθοδοι για την ανίχνευση και τη μέτρηση της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με το συνδυασμό μύκητα-μυκητοκτόνου, εν τούτοις οι βασικές αρχές είναι οι ίδιες. Η αναγνώριση των ανθεκτικών στελεχών πρέπει να γίνεται σε σύγκριση με τα ευαίσθητα στελέχη. Έτσι είναι στοιχειώδες να έχει καταγραφεί η ευαισθησία των πληθυσμών αγριού τύπου για το συνδυασμό μύκητα-μυκητοκτόνου που μας ενδιαφέρει. Επίσης, επειδή η μυκητοξικότητα ποικίλει ανάλογα με τον τύπο και τη δοκιμή που θα επιλεγεί, τη θερμοκρασία, το pH κ.α., τα στελέχη που υποπτευόμαστε ότι είναι ανθεκτικά πρέπει να μελετώνται με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για να αποκτηθούν τα δεδομένα της ευαισθησίας του αγριού πληθυσμού και αυστηρά κάτω από τις ίδιες συνθήκες (FAO, 1982).

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

Για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων είναι σημαντικό να δοθεί προσοχή στη σωστή μέθοδο δειγματοληψίας, το μέγεθος, τον αριθμό και την κατανομή των δειγμάτων. Η δειγματοληψία μπορεί να είναι εκτεταμένη ή επιλεκτική. Ο αριθμός των δειγμάτων που συλλέγονται μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το σκοπό της εργασίας. Συχνά για εκτεταμένη έρευνα είναι καλό να γίνεται αρχικά μια γενικευμένη δειγματοληψία και να ακολουθείται από εντατικές μελέτες αν είναι απαραίτητο. Αν φανούν τα πρώτα συμπτώματα ανθεκτικότητας τότε χρειάζεται ένα μεγαλύτερο δείγμα για να αποκαλυφθούν σπάνιες ανθεκτικές μορφές. Για να προσδιορισθεί το ποσοστό των ανθεκτικών οργανισμών σε ένα πληθυσμό ή διαφορές στην ευαισθησία, τότε μικρότερα δείγματα είναι καλύτερα (Brent, 1991). Για ναδειχθεί ότι η μη αποτελεσματική αντιμετώπιση της ασθένειας οφείλεται σε ανθεκτικότητα, συλλέγονται ένα ή δύο σύνθετα δείγματα από διάφορα όργανα του φυτού από τις περισσότερο προσβεβλημένες περιοχές του αγρού που έχουν ψεκαστεί. Για να προσδιορισθεί η προηγούμενα άγνωστη ευαισθησία του παθογόνου σε ένα μυκητοκτόνο ή για τη μελέτη της δυναμικής του πληθυσμού, το μέγεθος των δειγμάτων θα πρέπει να αυξηθεί σε 10 –100 και να προέρχεται από ένα ευρύ φάσμα της περιοχής που ελέγχεται (FAO, 1982).

Τα δείγματα μπορεί να είναι φύλλα, καρποί ή βλαστοί που δείχνουν τα συμπτώματα της ασθένειας. Δείγματα με φρέσκα παραγόμενα σπόρια είναι καλύτερα για απομονώσεις χωρίς επιμολύνσεις. Το υλικό που συλλέγεται, τοποθετείται σε πλαστικές σακούλες πολυαιθυλενίου, μεταφέρεται στο εργαστήριο και διατηρείται στο ψυγείο στους 1-5 ° C, καθώς παρατεταμένες περίοδοι υψηλών θερμοκρασιών μπορεί να μειώσουν τη βιωσιμότητα των σπορίων. Αν το φρέσκο υλικό δεν χρησιμοποιηθεί μέσα σε μια δύο μέρες, πρέπει να διατηρηθεί στους 1° C για να μην αλλοιωθεί. Προτείνεται να πλένονται τα φύλλα σχολαστικά με νερό βρύσης ώστε να απομακρύνονται υπολείμματα μυκητοκτόνων ή γηρασμένα σπόρια (FAO, 1982). Τα

δείγματα πρέπει να ελέγχονται όσο πιο φρέσκα γίνεται και να κρατούνται υποκαλλιέργειες. Απ' την άλλη θα πρέπει να γίνεται επανέλεγχος των δειγμάτων μετά από υποκαλλιέργεια για να ελέγχεται η σταθερότητα της απομόνωσης στην αντίδραση στο μυκητοκτόνο (Brent, 1991).

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα είναι κατάλληλα για υποστρώματα ανάπτυξης του μύκητα, τόσο φτωχά όσο και πλούσια σε θρεπτικά τεχνητά μέσα. Το κλασικό potato dextrose agar (PDA) που ετοιμάζεται από έτοιμα σκευάσματα ή φρέσκιες πατάτες είναι ένα ικανοποιητικό μέσο ανάπτυξης. Το agar 2% σε νερό, μπορεί να υποκαταστήσει τα άλλα θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης σε δοκιμές ελέγχου σποριών γιατί επιτρέπει πιο ξεκάθαρες δοκιμές καθώς υπάρχουν λιγότερα τροφικά ερεθίσματα στα σπόρια και λιγότερη αλληλεπίδραση από οργανισμούς που τυχόν έχουν επιμολύνει το μέσο (FAO, 1982).

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

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

Τρόποι μέτρησης της ευαισθησίας των μυκήτων στα μυκητοκτόνα

Στην πράξη οι μύκητες αναπτύσσονται παρουσία μυκητοκτόνων σε ένα εύρος από συγκεντρώσεις και γι' αυτό το λόγο, όπως και για μεγαλύτερη ακρίβεια είναι καλύτερο να χρησιμοποιείται ένα εύρος από συγκεντρώσεις στις βιοδοκιμές, παρά μια προκαθορισμένη δόση που να διακρίνει τους βιότυπους για την ευαισθησία τους στο εφαρμοζόμενο μυκητοκτόνο. Παρόλα αυτά για πρωταρχικές, μεγάλης κλίμακας έρευνες ανθεκτικότητας η χρήση μιας μόνο δόσης μπορεί να δώσει κάποιες αρχικές ενδείξεις.

Όταν χρησιμοποιείται στις δοκιμές ένα εύρος από συγκεντρώσεις, οι διάφοροι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει σαν τιμή προσδιορισμού της ευαισθησίας του μύκητα στο εφαρμοζόμενο μυκητοκτόνο α) την υψηλότερη συγκέντρωση που επιτρέπει κάποιο βαθμό ανάπτυξης του μύκητα, β) την ελάχιστη συγκέντρωση που να δίνει πλήρη καταπολέμηση (minimum inhibitory concentration, MIC), γ) τον υπολογισμό της ED₅₀, τη συγκέντρωση δηλαδή του μυκητοκτόνου που προκαλεί 50 % παρεμπόδιση στην μυκηλιακή ανάπτυξη ή τη βλάστηση σπορίων του μύκητα σε σχέση με το μάρτυρα δ) το άθροισμα των βαθμών ελέγχου που δίνεται σε κάθε συγκέντρωση που δοκιμάζεται. Επίσης η ευαισθησία μπορεί να προσδιορισθεί μετρώντας το ποσοστό ανάπτυξης της αποικίας ή τη διάμετρο της αποικίας σε άγαρ ή την αύξηση του ξηρού βάρους σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα.

Η τιμή ED₅₀ είναι ο πιο κοινός τύπος καταγραφής της ευαισθησίας του μύκητα στο μυκητοκτόνο και προτείνεται ως ο καταλληλότερος να εφαρμόζεται, όπου αυτό είναι δυνατό. Η διαφορά στην ευαισθησία μεταξύ ανθεκτικών απομονώσεων και απομονώσεων αγρίου τύπου παρουσιάζεται με καμπύλες δόσης μυκητοκτόνου-παρεμπόδισης ανάπτυξης του μύκητα χρησιμοποιώντας λογαριθμική 'probit analysis'. Στη λογαριθμική κλίμακα του διαγράμματος παρατίθεται ο λογάριθμος της συγκέντρωσης του μυκητοκτόνου σε μgml^{-1} ενώ στην κλίμακα των 'probits' παρατίθεται το ποσοστό παρεμπόδισης που προκαλεί το μυκητοκτόνο στη συγκεκριμένη συγκέντρωση. Στη συνέχεια προσδιορίζονται οι τιμές ED₅₀ ή και ED₉₅. Συχνά αναφέρεται ότι η τιμή ED₉₅ (συγκέντρωση του μυκητοκτόνου που προκαλεί παρεμπόδιση στην ανάπτυξη κατά 95% σε σχέση με αυτή του μάρτυρα) είναι πιο κοντά στον πρακτικό βαθμό καταπολέμησης της ασθένειας που επιθυμούμε, αλλά αυτή είναι γενικά πιο δύσκολο να μετρηθεί με ακρίβεια (Brent, 1991).

Σε πειράματα με φυτά, οι μεταχειρίσεις προσδιορίζονται περίπου δυο βδομάδες μετά την μόλυνση. Ένας απλός τρόπος καταγραφής που χρησιμοποιείται είναι ο προσδιορισμός των ασθενών φυλλικών δίσκων με σπορίωση ανά συγκέντρωση. Για μεγαλύτερη ακρίβεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα κατάλογος έντασης της ασθένειας π.χ. 0= όχι ορατά συμπτώματα, 1, 2, 3, = μικρή, ενδιάμεση και εκτεταμένη σπορίωση (FAO, 1982). Μετρείται ο αριθμός των μολυσματικών μονάδων στα σημειωμένα φύλλα και στα επόμενα δυο παλαιότερα φύλλα και υπολογίζεται το ποσοστό ελέγχου για κάθε μεταχείριση, για κάθε απομόνωση σε σχέση με τον αριθμό των μολυσματικών μονάδων στα φυτά που δεν έχουν ψεκαστεί. Οι διαφορές στην καταπολέμηση της ασθένειας μπορεί να εκφραστούν σαν το ποσοστό παρεμπόδισης ανά δόση ή προσδιορίζοντας τις τιμές ED₅₀ ή ED₉₅. Η ένταση της σπορίωσης μπορεί να διαβαθμιστεί οπτικά ή μπορεί να μετρηθεί ο αριθμός των σπορίων στο μικροσκόπιο, αφού αποκολληθούν τα σπόρια από τα φύλλα ψεκάζοντας τα με νερό. Η σπορίωση είναι πολύ σημαντική στον προσδιορισμό της ευαισθησίας στους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης (FAO, 1982).

Ανίχνευση ανθεκτικότητας

Για παρακολούθηση ρουτίνας για την ανίχνευση της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών σε ένα φυσικό πληθυσμό του παθογόνου, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί μια διαγνωστική συγκέντρωση του μυκητοκτόνου. Αυτή μπορεί να είναι η MIC όπως υπολογίστηκε από τα δεδομένα ευαισθησίας του αγρίου πληθυσμού. Δεν υπάρχει απόλυτο κριτήριο ως προς τον αριθμό των δειγμάτων που θα χρειαστούν (FAO, 1982). Ο αριθμός δεν θα πρέπει να είναι πολύ μικρός και τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται από ένα αριθμό φυτών από όλο τον αγρό ή την περιοχή. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των δειγμάτων τόσο μεγαλύτερη η

πιθανότητα ανίχνευσης ανάπτυξης ενός ανθεκτικού πληθυσμού του παθογόνου σε αρχικά στάδια. Για την ανίχνευση ανθεκτικότητας πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο διακριτές συγκεντρώσεις μαζί με ένα μάρτυρα. Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι μία ακριβώς κάτω από το επίπεδο της ED₅₀ των ευαίσθητων στελεχών και μία που ξεκάθαρα δεν επιτρέπει καμία ανάπτυξη του μύκητα. Για έγκαιρη ανίχνευση ανθεκτικότητας, χρειάζεται ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων που προέρχονται από διαφορετικά φυτά, αγρούς και άλλες περιοχές. Το επίπεδο ανθεκτικότητας (resistance factor, RL) καταγράφεται ως ο λόγος της τιμής ED₅₀ της απομόνωσης που ελέγχεται προς την τιμή ED₅₀ του ευαίσθητου πληθυσμού. Το επίπεδο ανθεκτικότητας μπορεί να διαφέρει από πολύ χαμηλό όπως στο dodine και σε μέλη της ομάδας των αρωματικών υδρογονανθράκων (RL=2-4), όπου χρειάζεται να γίνουν πιο προσεκτικές δοκιμές για να ανιχνευθεί ανθεκτικότητα, ως πολύ υψηλό όπως στα βενζιμιδαζολικά και στις ακυλαντανίνες (RL=100-1000), όπου επιτρέπεται η εύκολη ανίχνευση της ανθεκτικότητας (FAO, 1982).

Τεχνικές παρακολούθησης της ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά

Στην παρακολούθηση για ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, τρεις γενικά τύποι δοκιμών έχουν χρησιμοποιηθεί: οι δοκιμές βλάστησης των σπορίων σε υπόστρωμα άγαρ εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο, οι δοκιμές ελέγχου της ακτινωτής ανάπτυξης του μυκηλίου σε υπόστρωμα άγαρ εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο και οι δοκιμές σε φυτά που έχουν μεταχειριστεί με βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα.

Η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα παρέχει μια ακριβή προσέγγιση της ευαισθησίας της απομόνωσης εξαιτίας του τρόπου δράσης των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων. Τα σπόρια των ευαίσθητων απομονώσεων που τοποθετούνται σε τρυβλία με άγαρ εμπλουτισμένα με βενζιμιδαζολικό μυκητοκτόνο θα βλαστήσουν, αλλά οι βλαστικοί σωλήνες που αναπτύσσονται είναι διογκωμένοι και παραμορφωμένοι. Η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα μπορεί να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο συνήθως μετά από 16- 20 ώρες. Αυτή η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι παρέχει μια γρήγορη ένδειξη για την αντίδραση ακόμη και των μυκήτων που έχουν αργή ανάπτυξη. Το μειονέκτημα είναι ότι χρησιμοποιώντας το μικροσκόπιο για την εξέταση πολλών δειγμάτων μπορεί να είναι κουραστικό (Trivellas, 1994).

Η ακτινωτή ανάπτυξη του μυκηλίου χρησιμοποιείται επίσης για τη δοκιμή της ευαισθησίας ή της ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, ειδικά σε μύκητες που αναπτύσσονται γρήγορα. Η τεχνική των διαχωρισμένων τρυβλίων (split plate technique) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των τιμών ED₅₀. Μία συγκέντρωση μυκητοκτόνου στο υπόστρωμα της τάξης του 1 mgml⁻¹ χρησιμοποιείται γενικά σαν όριο τόσο για τις δοκιμές ανάπτυξης του βλαστικού σωλήνα όσο και για τις μελέτες ακτινωτής ανάπτυξης. Οι τιμές ED₅₀ κάθε απομόνωσης θα πρέπει να προσδιορίζονται πάνω ή κάτω από αυτή την οριακή συγκέντρωση. Παρότι η ακτινωτή ανάπτυξη είναι πιο εύκολο να μετρηθεί σε σχέση με την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα των σπορίων, χρειάζεται πέντε ως επτά μέρες για να γίνουν οι μετρήσεις (Trivellas, 1994).

Η τρίτη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αντίδρασης των απομονώσεων των μυκήτων στα βενζιμιδαζολικά εφαρμόζεται κυρίως για τα υποχρεωτικά παράσιτα όπως τα ωΐδια. Σε αυτήν την περίπτωση φυτά ψεκάζονται με ένα εύρος από συγκεντρώσεις, επωάζονται συνήθως εγκλεισμένα μέσα σε σακούλες από σελοφάν ώστε να αποφευχθεί επιμόλυνση μεταξύ των απομονώσεων και στη συνέχεια η αποτελεσματικότητα της καταπολέμησης καταγράφεται μετά από το απαραίτητο διάστημα επώασης. Οι συγκεντρώσεις του benomyl που χρειάζονται για

να παράσχουν αποτελεσματική καταπολέμηση στα μικρά φυτά (όπως και στα φυτά στον αγρό) είναι πάντα υψηλότερες από αυτές που παρέχουν *in vitro* παρεμπόδιση. Αυτή η μέθοδος είναι η περισσότερο απαιτητική σε δουλειά εργαστηρίου αλλά αυτή ή παρόμοιες τεχνικές πρέπει να χρησιμοποιούνται στην περίπτωση των υποχρεωτικών παράσιτων (Trivellas, 1994).

Στις παραπάνω τεχνικές σημεία κλειδιά που επηρεάζουν την ακρίβεια και την αποτελεσματικότητα της μελέτης είναι α) η συλλογή επαρκών ποσοτήτων του προσβεβλημένου ιστού που έχει συλλεχθεί τυχαία από μια περιοχή που παρακολουθείται ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες να αποκτηθούν διαφορετικές απομονώσεις. Ο αριθμός των απομονώσεων ποικίλει ανάλογα με το σκοπό της έρευνας αλλά για την ανίχνευση ανθεκτικών απομονώσεων που εμφανίζονται σε χαμηλές συχνότητες χρειάζεται ο έλεγχος περισσότερων από 100 απομονώσεων. Για μια μελέτη ανίχνευσης ανθεκτικότητας συνήθως χρειάζεται λιγότερη ακρίβεια από ότι μελέτες δυναμικής του πληθυσμού β) η χρήση αντιβιοτικών που δεν παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των μυκήτων και γ) η σύγκριση των τιμών ED₅₀ των απομονώσεων που δοκιμάζονται με γνωστές απομονώσεις αναφοράς του ίδιου παθογόνου καθώς όλα τα παθογόνα δεν αντιδρούν το ίδιο στην ίδια συγκέντρωση. Για παράδειγμα ευαίσθητες στο benomyl απομονώσεις του μύκητα *Venturia inaequalis* τυπικά παρεμποδίζονται *in vitro* σε συγκέντρωση 0.1 – 0.5 μgml⁻¹ benomyl ενώ ευαίσθητες απομονώσεις του *Pyricularia oryzae* παρεμποδίζονται σε συγκέντρωση 1 μgml⁻¹ benomyl.

Τεχνικές παρακολούθησης της ανθεκτικότητας για τα δικαρβοξιμιδικά

Ο μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην παρακολούθηση της ανθεκτικότητας για τα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα περιλαμβάνουν τον έλεγχο ανάπτυξης μυκηλίου σε θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο και τις δοκιμές βλάστησης σπορίων.

Η πρώτη μέθοδος περιλαμβάνει τη συλλογή δειγμάτων και τη διατήρησή τους σε υγρό θάλαμο για να προκληθεί σπορίωση. Στη συνέχεια απλοί κονιδιοφόροι ή σπόρια απομακρύνονται από το αναπτυσσόμενο μυκήλιο και μεταφέρονται σε κατάλληλο μέσο καλλιέργειας εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο. Το μυκήλιο αναπτύσσεται πολύ γρήγορα και μπορεί να ελεγχθεί για την αντίδρασή του στα δικαρβοξιμιδικά σχετικά γρήγορα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί εφαρμόζοντας μια κρίσιμη δόση του μυκητοκτόνου που επιτρέπει την ξεκάθαρη διάκριση μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών απομονώσεων με τη σύγκριση της ανάπτυξης μεταξύ καλλιεργειών που δεν έχουν μεταχειριστεί με μυκητοκτόνο και αυτών που αναπτύσσονται κάτω από την επίδραση του μυκητοκτόνου. Τέτοια διάκριση μπορεί να επιτευχθεί για τα χρησιμοποιούμενα δικαρβοξιμιδικά εφαρμόζοντας μια συγκέντρωση 10 μgml⁻¹ δραστικής ουσίας. Τα επίπεδα ανθεκτικότητας των ανθεκτικών στελεχών μπορούν να προσδιορισθούν μεταφέροντας μάζες μυκηλίου σε ένα εύρος συγκεντρώσεων μυκητοκτόνου χρησιμοποιώντας άγαρ εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο (Logenz, 1994).

Με τις δοκιμές βλάστησης σπορίων για την παρακολούθηση της ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά ελέγχεται η βλάστηση και ο τρόπος βλάστησης των σπορίων παρουσία του δικαρβοξιμιδικού μυκητοκτόνου. Τα δικαρβοξιμιδικά παρεμποδίζουν τη βλάστηση ή την διαμόρφωση του βλαστικού σωλήνα διαδικασία που εύκολα μπορεί να διακριθεί στο μικροσκόπιο διερχόμενου φωτισμού και έτσι να χαρακτηρισθούν οι απομονώσεις ως προς την ευαισθησία τους στα δικαρβοξιμιδικά. Ξεκινώντας από ασθενές φυτικό υλικό που σποροποιεί δημιουργείται ένα αιώρημα

σπορίων από ένα αριθμό μολυσμένων επιφανειών από όσο το δυνατό περισσότερα φυτά. Αυτό το αιώρημα στη συνέχεια διασπείρεται στην επιφάνεια ενός τρυβλίου άγαρ που περιέχει μυκητοκτόνο. Οι καλλιέργειες μπορούν να εκτιμηθούν μετά από 16- 18 ώρες επώασης (Lorenz, 1994).

Παρακολούθηση της ευαισθησίας στο dichlofluanid

Το dichlofluanid είναι ένας ισχυρός παρεμποδιστής της βλάστησης των σπορίων αλλά δείχνει περιορισμένη δραστηριότητα στη μυκηλιακή ανάπτυξη (Pollastro *et al.*, 1996). Έτσι για την ανίχνευση ανθεκτικότητας χρησιμοποιούνται κυρίως δοκιμές βλάστησης των σπορίων.

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μεθόδων

Το πλεονέκτημα της βλάστησης των σπορίων είναι ότι είναι μια γρήγορη τεχνική και υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου μεγάλου αριθμού απομονώσεων. Πριν όμως μια δοκιμή βλάστησης σπορίων εφαρμοστεί σαν δοκιμή ρουτίνας για την ανίχνευση ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα θα πρέπει να ξεκαθαριστεί αν τα αποτελέσματα από τις δοκιμές βλάστησης σπορίων είναι αντιπροσωπευτικά και συγκρίσιμα με αυτά που λαμβάνονται από τις δοκιμές ακτινωτής ανάπτυξης ή κατάλληλες *in vivo* δοκιμές χρησιμοποιώντας τον ανάλογο συνδυασμό φυτού-παθογόνου. Επίσης θα πρέπει να αποδειχθεί αν ο στόχος δράσης του μυκητοκτόνου είναι παρών και ενεργός στο σπόριο του μύκητα που βλαστάνει, ειδικά στην περίπτωση των μυκητοκτόνων που έχουν εξειδικευμένη δράση. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να αποκτηθεί επιπλέον πληροφορία για τη δράση των μυκητοκτόνων στη βλάστηση των σπορίων και τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων ευαισθησίας που αποκτώνται στο εργαστήριο με τα αποτελέσματα ευαισθησίας που εμφανίζει το παθογόνο στον αγρό (Pontzen and Scheinpflug, 1989). Το μειονεκτήματα της βλάστησης των σπορίων είναι η σχετικά μικρή περίοδος κατά την οποία ο μύκητας αναπτύσσεται. Γενικά, όταν χρησιμοποιούνται *in vitro* μέθοδοι είναι καλό να γίνεται κάποια *in vivo* σύγκριση των αποτελεσμάτων ώστε να ελεγχθεί αν οι διαφορές που ανιχνεύονται στην αντίδραση των μυκήτων στα μυκητοκτόνα εκφράζονται επίσης και σε συνθήκες ασθένειας πάνω στα ψεκασμένα φυτά (Brent, 1991).

Εφαρμογές των αποτελεσμάτων παρακολούθησης για ανθεκτικότητα

Τα αποτελέσματα από την παρακολούθηση για ανθεκτικότητα μπορούν να καθοδηγήσουν τη χρήση των μυκητοκτόνων. Απομονώσεις από συγκεκριμένους αγρούς που εμφανίζουν μειωμένη αποτελεσματικότητα στη χημική καταπολέμηση χαρακτηρίζονται ως προς την αντίδρασή τους στα μυκητοκτόνα. Μια τέτοια δειγματοληψία μπορεί να καθορίσει αν περιπτώσεις μειωμένης αποτελεσματικότητας στην καταπολέμηση οφείλονται σε ανθεκτικότητα ή σε άλλους παράγοντες όπως κακή εφαρμογή του μυκητοκτόνου. Αυτή η πληροφορία μπορεί να αθροιστεί κατά περιοχή ώστε να δηλωθεί η κατάσταση των διαφόρων πληθυσμών και να καθοδηγηθεί η χρήση ή η διακοπή εφαρμογής του μυκητοκτόνου. Ένας τρίτος τύπος παρακολούθησης είναι η προσπάθεια πρόβλεψης της δυνητικής ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε συνθήκες αγρού. Πάντως η παρακολούθηση από μόνη της δεν είναι παρά ένα ακόμη εργαλείο που χρησιμοποιείται στη μελέτη της ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα. Ο τρόπος που εφαρμόζεται ποικίλει όχι μόνο από το σκοπό της

μελέτης αλλά και από τη συχνότητα εμφάνισης της ανθεκτικότητας στο πληθυσμό που μελετάται (Trivellas, 1994).

Μεγάλη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών στο εργαστήριο ή το θερμοκήπιο κατευθείαν σε όρους πρόβλεψης ανθεκτικότητας στον αγρό. Συχνά μυκητοκτόνα που δίνουν αποτελεσματική καταπολέμηση όταν ψεκάζονται προσεκτικά σε μικρά φυτά στο θερμοκήπιο σε δόσεις 1- 10 μgml^{-1} , χρειάζονται να ψεκαστούν με 50 -500 μgml^{-1} για να δώσουν αποτελεσματική καταπολέμηση της ίδιας ασθένειας στον αγρό (Staub & Sozzi, 1984). Παρόμοια, δεδομένα βλάστησης σπορίων δεν έχουν μεγάλη σημασία ως ένδειξη ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα που παρεμποδίζουν πρωταρχικά τη μυκηλιακή ανάπτυξη και είναι λιγότερο δραστικά στην βλάστηση των σπορίων π.χ. μερικά προϊόντα DMI (Staub and Sozzi, 1984). Επίσης ενδείξεις ανθεκτικότητας από δεδομένα παρεμπόδισης μυκηλιακής ανάπτυξης δεν έχουν ιδιαίτερη βαρύτητα για μυκητοκτόνα που κυρίως παρεμποδίζουν τη βλάστηση σπορίων και είναι λιγότερο δραστικά στη μυκηλιακή ανάπτυξη όπως π.χ. το dichlofluanid.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ *Botrytis cinerea*

Χαρακτηρισμός φαινοτύπων ανθεκτικότητας με βάση τον τρόπο βλάστησης των σπορίων.

Η παρακολούθηση της ανθεκτικότητας είναι ιδιαίτερα σημαντική γι' αυτούς τους μύκητες που αναπτύσσουν εύκολα ανθεκτικότητα όπως ο *Botrytis cinerea*. Σε τέτοιες περιπτώσεις η παρακολούθηση ανήκει στα μέτρα ρουτίνας (Lorenz, 1994). Η συχνότερη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την καταγραφή των ανθεκτικών παθογόνων των φυτών είναι η μέτρηση της παρεμπόδισης της ακτινωτής ανάπτυξης του μύκητα σε μέσο εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο (Georgopoulos and Dekker, 1982). Καθώς οι δοκιμές ακτινωτής ανάπτυξης δεν μπορούν να εφαρμοστούν καθόλου στα υποχρεωτικά παράσιτα και καθώς είναι πολύ χρονοβόρες για παθογόνα που αναπτύσσονται αργά *in vitro* η δοκιμή βλάστησης των σπορίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν εναλλακτική μέθοδος (Pontzen and Scheinpflug, 1989).

Στους μύκητες που παράγουν ικανοποιητικό αριθμό σπορίων (π.χ. *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* ή *Monilinia* spp.), μεγάλος αριθμός σπορίων μπορεί να αναλυθεί μέσα σε λίγες μέρες, επιτρέποντας την ανίχνευση χαμηλών επιπέδων ευαισθησίας σε πληθυσμούς κυρίως ευαίσθητους. Ο *Botrytis cinerea* ανήκει γενικά στην ομάδα των μυκήτων που είναι σχετικά εύκολοι στο χειρισμό. Στον αγρό σε ευνοϊκές συνθήκες είναι κανονικά παρών και είναι εύκολο να απομονωθεί ενώ η ταυτοποίησή του πρακτικά δεν είναι δύσκολη. Τόσο η απομόνωσή του μύκητα από ασθενές φυτικό υλικό όσο και η παραπέρα καλλιέργειά του στο εργαστήριο δεν παρουσιάζουν προβλήματα. Απλά μέσα σε άγαρ όπως 2% εκχύλισμα βύνης σε άγαρ (malt extract agar) είναι επαρκή για γρήγορη ανάπτυξη και καλή παραγωγή σπορίων. Παρόμοια η μόλυνση υγιών φυτών ή φυτικών μερών ή καρπών δεν παρουσιάζει προβλήματα, όταν παρέχονται οι κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας (Lorenz, 1994). Γενικά οι περισσότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία είναι κατάλληλοι για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα αυτού του μύκητα (FAO, 1982; Staub and Sozzi, 1984).

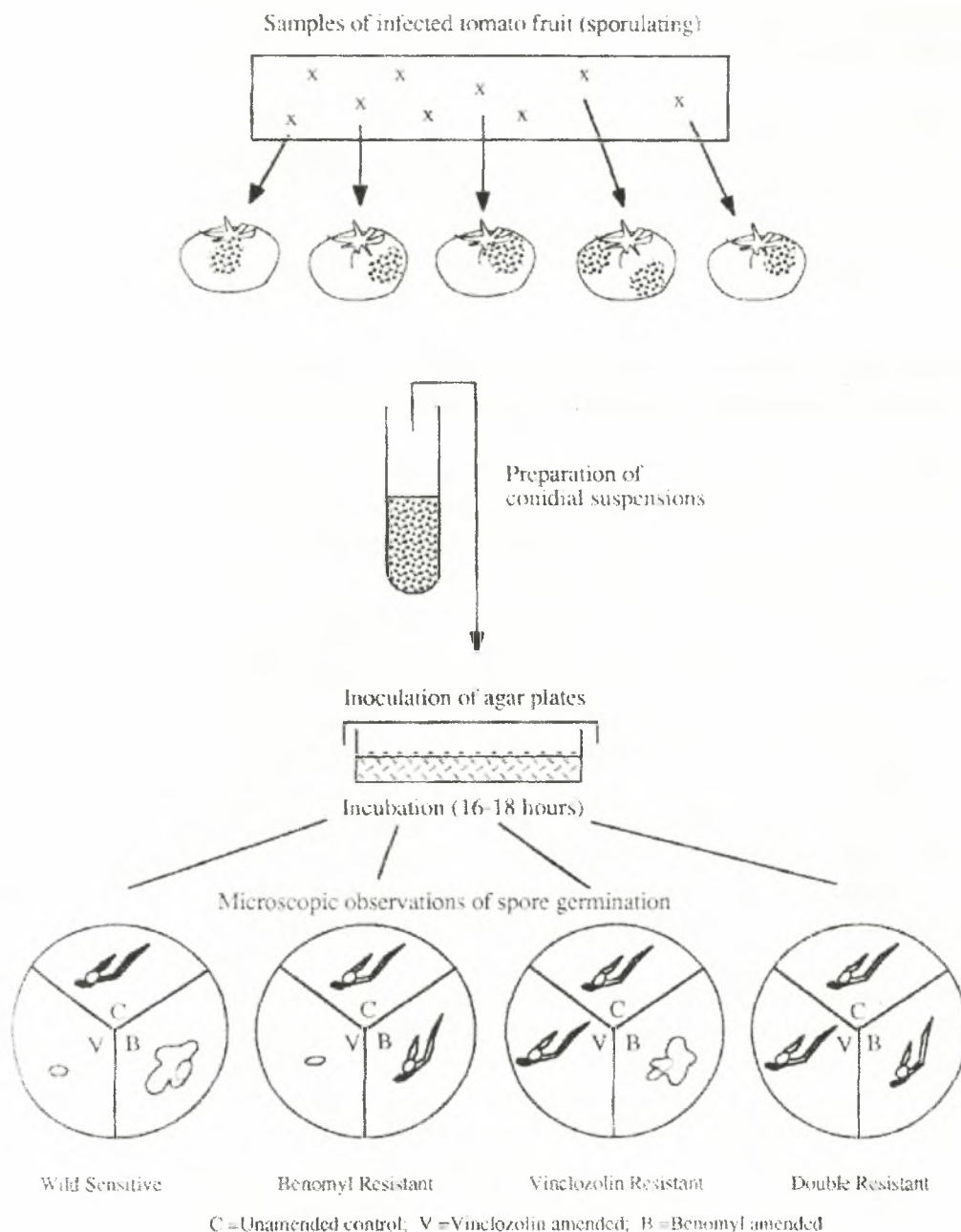
Μια πολύ γρήγορη και συχνά, όπου εφαρμόζεται, προτιμώμενη τεχνική για τον προσδιορισμό ανθεκτικών στελεχών είναι η δοκιμή βλάστησης σπορίων σε άγαρ. Με τις δοκιμές βλάστησης σπορίων σε άγαρ εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο προσομοιάζεται η παρεμπόδιση που προκαλεί το μυκητοκτόνο στην εγκατάσταση των πρωταρχικών μολυσμάτων του μύκητα, σε θέσεις όπου υπάρχει το μυκητοκτόνο.

Αυτή η μέθοδος ταιριάζει ιδανικά σε μύκητες όπως ο *Botrytis cinerea* που παράγουν ικανό αριθμό σπορίων στο ασθενές φυτικό υλικό. Για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου είναι απαραίτητο τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται να παρεμποδίζουν τη βλάστηση ή μια α κανονική ή β κανονική διαδικασία βλάστησης κάτω από την επίδραση του μυκητοκτόνου η οποία μπορεί εύκολα να διακριθεί στο μικροσκόπιο διερχόμενου φωτισμού (Lorenz, 1994). Έτσι μπορεί να δημιουργηθούν πρότυπα βλάστησης σπορίων ανθεκτικών φαινοτύπων, τα οποία θα μας καθοδηγούν στην εκτίμηση της ανθεκτικότητας της απομόνωσης που ελέγχεται από τον τρόπο

βλάστησης των σπορίων. Για παράδειγμα η διάκριση μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών βασίζεται στην παρατήρηση στο μικροσκόπιο διερχόμενου φωτισμού του τρόπου βλάστησης των σπορίων σε μέσο εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο και μπορεί εύκολα να γίνει σε θρεπτικό ΜΕΑ ή PDA ή σε άγαρ με νερό που περιέχει $1 \mu\text{gml}^{-1}$ και $0.1 \mu\text{gml}^{-1}$ benomyl αντίστοιχα. Τα ευαίσθητα σπόρια μπορεί να βλαστάνουν αλλά οι βλαστικοί σωλήνες βλαστάνουν μόνο κατά ένα ή μερικά κύτταρα σε μήκος, παραμορφώνονται, διογκώνονται και συχνά διαρρηγνύονται. Αντίθετα οι βλαστικοί σωλήνες των ανθεκτικών σπορίων δεν παρεμποδίζονται στην ανάπτυξή τους και δε διακρίνονται από αυτούς που παράγονται στο ίδιο μέσο χωρίς μυκητοκτόνο. Αν τα σπόρια έχουν τοποθετηθεί σε προσημειωμένες θέσεις στα τρυβλία άγαρ ώστε να μπορούν να ελεγχθούν κάτω από το μικροσκόπιο διερχόμενου φωτισμού, τότε η δυνατότητα διάκρισης ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών είναι αρκετά εύκολη μέσα σε 16-20 ώρες. Αν δεν χρειάζεται να γίνει γρήγορος προσδιορισμός, τα τρυβλία επωάζονται για λίγες μέρες και εξετάζονται μικροσκοπικά. Η διάκριση είναι προφανής καθώς ακόμη και μετά από παρατεταμένη επώαση τα ευαίσθητα στελέχη δε δίνουν ενδείξεις ανάπτυξης ενώ τα ανθεκτικά στελέχη σχηματίζουν κανονικές αποικίες (FAO, 1982).

Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι η μέθοδος που προτείνεται από τους Gullino and Garibaldi (1986) για την παρακολούθηση της ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα στελεχών του *Botrytis cinerea* και βασίζεται στον έλεγχο βλάστησης των σπορίων. Οι διαδικασίες που ακολουθούνται στη μέθοδο αυτή φαίνονται στην εικόνα Εικόνα 1.1. Ξεκινώντας από ασθενές φυτικό υλικό που σποροποιεί (sporulate) ετοιμάζεται ένα αιώρημα σπορίων σταθερής συγκέντρωσης από ένα αριθμό μολυσμένων επιφανειών από όσο το δυνατό περισσότερα φυτά. Τα σπόρια μπορεί να απομακρυνθούν από τους προσβεβλημένους ιστούς ψεκάζοντας με αποστειρωμένο νερό και συλλέγοντας το νερό σε γυάλινα τρυβλία ή σε ειδικές αντικειμενοφόρους. Τα σπόρια μπορεί επίσης να αποκτηθούν τοποθετώντας μερικές σταγόνες με μία πιπέτα στο μολυσμένο ιστό, στη συνέχεια σύροντας μαλακά με την άκρη της πιπέτας και αναροφώντας το νερό. Αν οι ιστοί έχουν μεταχειριστεί με άλλα παρασιτοκτόνα θα πρέπει πρώτα να πλυθούν καλά και στη συνέχεια να αφεθούν να σποροποιήσουν. Εναλλακτικά τα σπόρια μπορεί να ξεπλυθούν μια δύο φορές με φυγοκέντρηση σε νερό ώστε να γίνει δυνατή η βλάστησή τους. Περίπου 50000 σπόρια / ml νερού χρησιμοποιούνται για μολύνσεις ξενιστών και 1000 σπόρια / ml για μελέτες σε θρεπτικό υπόστρωμα με άγαρ. Τα αιωρήματα σπορίων σε νερό πρέπει να αναδεύονται συνεχώς για να αποφευχθεί η καθίζησή τους πριν μεταφερθούν στο μέσο δοκιμής. Επίσης θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν όσο πιο σύντομα γίνεται μετά την παρασκευή τους για να αποφευχθεί η προβλάστηση (FAO, 1982).

Σταγόνες από αιώρημα σπορίων τοποθετούνται στο άγαρ και στη συνέχεια απλώνονται με μια αποστειρωμένη βελόνα σε τεθλασμένες γραμμές στην επιφάνεια του άγαρ. Τα σπόρια μπορεί επίσης να τοποθετηθούν στο υπόστρωμα ανάπτυξης σύροντας ένα ιστό με καρποφορίες πρώτα σε υπόστρωμα χωρίς μυκητοκτόνο και στη συνέχεια σε αυξανόμενες δόσεις μυκητοκτόνου. Η τελευταία μέθοδος έχει αποδειχθεί πολύ χρήσιμη για τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα (FAO, 1982). Οι καλλιέργειες μπορούν να εκτιμηθούν μετά από 16-20 ώρες επώασης. Επίσης δοκιμές για τη βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα γίνονται σε υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης και δίνουν ιδιαίτερα γρήγορα αποτελέσματα. Όλες οι δοκιμές γίνονται σε θερμοκρασία 18- 22° C.



Εικόνα 1.1. Διαδικασίες για την παρακολούθηση της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα του *Botrytis cinerea* με βάση τον τρόπο βλάστησης των σπορίων. Πηγή: Lorenz, 1994.

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

μεθόδου είναι ότι μπορεί να δοκιμασθεί ένας μεγάλος αριθμός συγκεντρώσεων των μυκητοκτόνων, ενώ ο έλεγχος μπορεί να γίνει σε ένα μόνο τρυβλίο Petri (Lorenz, 1994).

Όταν τα στελέχη έχουν ταξινομηθεί ως ευαίσθητα ή ανθεκτικά με την παραπάνω μέθοδο ο βαθμός ανθεκτικότητας για κάθε στέλεχος μπορεί να αποκτηθεί μεταφέροντας τα σε μέσο που περιέχει μια σειρά από συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου. Η ευαισθησία μπορεί να προσδιορισθεί μετρώντας το ποσοστό σχηματισμού αποικίας ή τη διάμετρο των αποικιών σε υπόστρωμα ανάπτυξης με άγαρ ή την αύξηση του ξηρού βάρους σε υγρό θρεπτικό μέσο (FAO, 1982).

Περιπτώσεις που δεν μπορεί να εφαρμοστεί η τεχνική βλάστησης των σπορίων στον προσδιορισμό της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα

Ορισμένα μυκητοκτόνα δεν παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων, ενώ πολλοί μύκητες δεν παράγουν ικανοποιητικό αριθμό σπορίων. Γι αυτούς τους λόγους ο προσδιορισμός του επιπέδου ευαισθησίας μπορεί να γίνει με τον προσδιορισμό της ακτινωτής ανάπτυξης μυκηλιακής μάζας που μεταφέρθηκε σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο. Καθαρές καλλιέργειες μπορεί να εκτιμηθούν μετρώντας την παρεμπόδιση της ακτινωτής ανάπτυξης μυκηλίου που προκύπτει όταν δίσκοι μυκηλίου από καθαρές καλλιέργειες τοποθετηθούν σε μέσο εμπλουτισμένο με άγαρ. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιηθούν δίσκοι μυκηλίου από καθαρές καλλιέργειες η ανάπτυξη πρέπει να δοκιμασθεί σε πέντε μέρες καθώς μεγαλύτερο διάστημα επώασης θα έχει ως αποτέλεσμα να έχουμε μυκηλιακή ανάπτυξη και σε αυτές τις καλλιέργειες, στις οποίες δεν είχε παρατηρηθεί προηγούμενα καμία ανάπτυξη. Γνωστές ευαίσθητες ή ανθεκτικές απομονώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν πρότυπα σε αυτές τις δοκιμές. Αυτή η μέθοδος δεν είναι εφαρμόσιμη για δοκιμές ρουτίνας μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε απομονώσεις αγρού (FAO, 1982).

Μερικά μυκητοκτόνα όπως οι ακυλαλανίνες δεν παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων καθόλου. Επιπρόσθετα η παρεμπόδιση *in vitro* της μυκηλιακής ανάπτυξης δείχνει μικρή συσχέτιση σε σχέση με την *in vivo* δραστηριότητα (Staub *et al.*, 1979). Σε αυτές τις περιπτώσεις μέθοδοι *in vivo* σε δίσκους φύλλων ή ολόκληρων φυτών πρέπει να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο ευαισθησίας. Τα νεαρότερα φύλλα ξενιστή που εμφανίζει καλή ανάπτυξη σημειώνονται με μικρές ταμπέλες. Τρία ως πέντε φυτά για κάθε μεταχείριση ψεκάζονται μέχρι απορροής με το μυκητοκτόνο και αφού στεγνώσει το ψεκαστικό υγρό, τα φυτά μολύνονται με αιώρημα σπορίων και επωάζονται στους 16- 24 °C για 24- 48 ώρες με διαρκή ύγρανση των φύλλων ακολουθούμενη από επώαση στο θερμοκήπιο μέχρι την εμφάνιση κηλίδων τουλάχιστον στον μάρτυρα (FAO,1982).

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΤΗ ΒΛΑΣΤΗΣΗ ΤΩΝ ΣΠΟΡΙΩΝ ΤΟΥ *Botrytis cinerea*

Η επίδραση στη βλάστηση ή τη μορφολογία του σπορίου που βλαστάνει επηρεάζεται κυρίως από το μηχανισμό δράσης των μυκητοκτόνων στη φυσιολογία του μύκητα. Έτσι ανάλογα με το μηχανισμό δράσης του μυκητοκτόνου προκαλείται διαφορετική αλλά αναγνωρίσιμη κάθε φορά τροποποίηση στη δυνατότητα βλάστησης του σπορίου ή την κανονική ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα.

Βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα

Οι επιδράσεις των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων στους μύκητες προσδιορίζονται σε δοκιμές βλάστησης σπορίων, σε δοκιμές ακτινωτής ανάπτυξης του μυκηλίου καθώς και σε φυτά που έχουν μεταχειριστεί με βενζιμιδαζολικό μυκητοκτόνο. Τα μυκητοκτόνα αυτά δεν παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων. Όμως η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα παρέχει μια ακριβή προσέγγιση της ευαισθησίας της απομόνωσης εξαιτίας του τρόπου δράσης των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων. Τα βενζιμιδαζολικά συνδέονται με την τουμπουλίνη και παρεμποδίζουν τη μίτωση και τελικά τη διαίρεση του κυττάρου αλλά και προκαλούν σύγχυση στη λειτουργία των μικροσωληνίσκων του κυτταροπλάσματος. Κατά τη βλάστηση των σπορίων, ευαίσθητες απομονώσεις στα βενζιμιδαζολικά σχηματίζουν κοντούς, διογκωμένους και παραμορφωμένους βλαστικούς σωλήνες σε υπόστρωμα ΜΕΑ εμπλουτισμένο με carbendazim σε συγκεντρώση $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Beever *et al.*, 1989). Έτσι τα σπόρια των ευαίσθητων απομονώσεων που τοποθετούνται σε τρυβλία με άγαρ εμπλουτισμένο με βενζιμιδαζολικό μυκητοκτόνο θα βλαστήσουν, αλλά τα κυτταρικά τοιχώματα δεν θα σχηματιστούν στους βλαστικούς σωλήνες και η ανάπτυξη θα σταματήσει. Οι βλαστικοί σωλήνες που αναπτύσσονται είναι διογκωμένοι, παραμορφωμένοι και η απουσία κυτταρικών τοιχωμάτων είναι τότε παρατηρήσιμη (Trivellas, 1994). Μεταφέροντας σπόρια από την ίδια μολυσματική κηλίδα σε μέσο που περιέχει βενζιμιδαζολικό μυκητοκτόνο και σε μέσο που δεν περιέχει μυκητοκτόνο μπορεί να προσδιοριστεί η αντίδραση της απομόνωσης στη δεδομένη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου. Η ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα στα δύο μέσα μπορεί να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο συνήθως μετά από 16 -20 ώρες. Αυτή η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι παρέχει μια γρήγορη ένδειξη για την αντίδραση ακόμη και των μυκήτων που έχουν αργή ανάπτυξη (Trivellas, 1994).

Δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα

Τα δικαρβοξιμιδικά παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων όπως και την ανάπτυξη του μυκηλίου. Σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις προκαλούν διόγκωση και διάρρηξη του βλαστικού σωλήνα και των κυττάρων των υφών συνοδευόμενη από απελευθέρωση του κυτταροπλάσματος. Τα δικαρβοξιμιδικά (iprodione) παρεμποδίζουν την βλάστηση των σπορίων σε ευαίσθητους μύκητες σε συγκέντρωση

3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ενώ σε στελέχη μετρίως ανθεκτικά τα σπόρια βλαστάνουν σε συγκέντρωση 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$, αλλά σε συγκέντρωση 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ το iprodione παρεμποδίζει τη διαμόρφωση του βλαστικού σωλήνα δίνοντας ένα κοντό, διογκωμένο βλαστικό σωλήνα. Δοκιμές που έγιναν από τον Leroux *et al.*, (1999) σε σπόρια από στελέχη άγριου τύπου, έδειξαν ότι τα iprodione, procymidone και vinclozolin μπορούσαν να παρεμποδίσουν τόσο τη βλάστηση των σπορίων όσο και την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα.

Φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα

Σε ελέγχους βλάστησης σπορίων στελεχών υψηλά ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά, τα φαινυλοκαρβαμιδικά προκαλούσαν αλλαγές, παρόμοιες με εκείνες που προκαλεί το carbendazim σε άγρια στελέχη. Τέτοιες παρατηρήσεις υποθέτουν ότι τα φαινυλοκαρβαμιδικά μπορούν επίσης να επηρεάζουν τη λειτουργία των μικροσωληνίσκων στα κύτταρα των μυκήτων (Leroux, 1996). Το diethofencarb προκαλούσε μορφολογικές ανωμαλίες σε στελέχη του *Botrytis cinerea* υψηλά ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. Οι βλαστικοί σωλήνες ήταν παραμορφωμένοι και διογκωμένοι και δεν παρατηρούνταν παραπέρα επέκταση των υφών. Αυτές οι μορφολογικές ανωμαλίες ήταν παρόμοιες με αυτές των στελεχών άγριου τύπου που μεταχειρίζονταν με βενζιμιδαζολικά. Η μεταχείριση βλαστανόντων σπορίων των ανθεκτικών στελεχών με diethofencarb είχε σαν συνέπεια την απώλεια του καλά καθορισμένου πυρήνα, μέσα στον οποίο η χρωματίνη ήταν διασκορπισμένη, αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που εμφανίζονται στα ευαίσθητα σπόρια που μεταχειρίζονταν με βενζιμιδαζολικά (Kato, 1994). Σαν συμπέρασμα το diethofencarb έδειχνε πολύ περισσότερο δραστικό εναντίον των υψηλά ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά από ότι εναντίον των ευαίσθητων στελεχών του μύκητα. Θεωρήθηκε ότι αυτά τα συστατικά επηρέαζαν την τουμπουλίνη των ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών και παρεμπόδιζαν τη μίτωση (Kato, 1994).

Ομάδα φθαλιμιδίων και συγγενών Σουλφιδίων

Η ομάδα αυτή μυκητοκτόνων, περιλαμβάνει μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος δράσης (π.χ. captan, folpet, captafol, dichlofluanid, tolyfluanid). Τα περισσότερα από αυτά είναι ασθενή βοτρυδιοκτόνα και η προστατευτική τους δράση σχετίζεται με την αναστολή πολλών ενζύμων που συμμετέχουν στην κυτταρική αναπνοή των σπορίων. Το dichlofluanid δρα προστατευτικά και δεν επιτρέπει την βλάστηση των σπορίων (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Παρουσία του dichlofluanid, τα ευαίσθητα σπόρια δεν βλαστάνουν σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Τα σπόρια των στελεχών που παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία βλαστάνουν σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ με βλαστικό σωλήνα κοντό και παραμορφωμένο αλλά παρεμποδίζονται να βλαστήσουν σε συγκεντρώσεις dichlofluanid 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Pappas, 1997). Αύξηση των δόσεων έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση στο ποσοστό των σπορίων που παρεμποδίζονται να βλαστήσουν.

Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης

Τα μυκητοκτόνα που ανήκουν στις τριαζόλες (παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης) όπως το tebuconazole και το bitertanol παρεμποδίζουν ελάχιστα τη βλάστηση των σπορίων αλλά οι βλαστικοί σωλήνες των σπορίων που μεταχειρίζονται

με μυκητοκτόνο είναι συχνά κοντότεροι, διογκωμένοι ή παραμορφωμένοι. Η βλάστηση των σπορίων του *Botrytis cinerea* δεν επηρεάζεται από την παρουσία tebuconazole σε συγκέντρωση $1\mu\text{gml}^{-1}$ μέσα στις πρώτες 7-8 ώρες. Αργότερα όταν οι βλαστικοί σωλήνες φτάσουν σε μήκος 30 ως 40 μm , η περαιτέρω ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα παρεμποδίζεται πλήρως και οι βλαστικοί σωλήνες γίνονται κοντοί, χοντροί και διογκώνονται. Δεδομένου ότι η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης εργοστερόλης σχετίζεται με την παρεμπόδιση της επιμήκυνσης του βλαστικού σωλήνα, η δοκιμή βλάστησης των σπορίων είναι μια χρήσιμη βιοδοκιμή για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας των τριαζολικών μυκητοκτόνων τουλάχιστον από βιοχημική άποψη (Pontzen and Scheinpfug, 1989).

Ανυλινοπυριμιδίνες

Όταν το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης του μύκητα έχει εμπλουτιστεί με ανυλινοπυριμιδίνες παρεμποδίζεται η επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα και η ανάπτυξη του μυκηλίου των στελεχών αγρίου τύπου σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Καθώς όμως τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από προηγούμενες μελέτες με δοκιμές βλάστησης σπορίων είναι ποικίλα και δείχνουν μικρή συσχέτιση σε σχέση με την *in vivo* δραστηριότητα (Staub *et al.*, 1979), αυτό το στάδιο ανάπτυξης του μύκητα δεν λαμβάνεται υπόψη για έρευνες που περιλαμβάνουν στελέχη ανθεκτικά στις ανυλινοπυριμιδίνες (Leroux *et al.*, 1999).

Παράγωγα των υδροξανιλιδινών -Fenhexamid

Το fenhexamid δεν επηρεάζει τη βλάστηση των σπορίων αλλά παρεμποδίζει την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα όπως και τη μυκηλιακή ανάπτυξη σε χαμηλές συγκεντρώσεις ($\text{ED}_{50} < 0.1 \mu\text{gml}^{-1}$). Οι βλαστικοί σωλήνες των σπορίων του *Botrytis cinerea* που παράγονται κατά τη βλάστηση σε μέσο άγαρ εμπλουτισμένο με fenhexamid είναι σχετικά κοντοί, χοντροί και διογκωμένοι και μοιάζουν με αυτούς που προκαλούνται από τους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης. Αυτές οι μορφολογικές τροποποιήσεις ήταν διαφορετικές από αυτές που παρατηρούνταν στα βενζιμιδαζολικά, τα δικαρβοξιμιδικά ή τις φαινυλπυρόλες (Leroux *et al.*, 1999).

Πρότυπα βλάστησης σπορίων στους διαφόρους φαινοτύπους ανθεκτικότητας στον *Botrytis cinerea*

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται κυρίως στη χημική καταπολέμηση του βοτρυτή προκαλούν αλλαγές τόσο στη βλάστηση όσο και στη μορφολογία των βλαστανόντων σπορίων οι οποίες εύκολα μπορούν να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο διερχόμενου φωτισμού. Έτσι παρέχεται η δυνατότητα ανάπτυξης μιας γρήγορης τεχνικής με την οποία θα ανιχνεύεται γρήγορα και αξιόπιστα η παρουσία ανθεκτικών στελεχών σε πληθυσμούς του μύκητα. Με βάση τις μορφολογικές αλλαγές που προκαλούνται στη βλάστηση ή τη διαμόρφωση του βλαστικού σωλήνα μπορεί να κατασκευαστούν ειδικοί πίνακες στους οποίους θα απεικονίζονται οι αλλαγές που προκαλούνται στη βλάστηση των σπορίων ή τη διαμόρφωση του βλαστικού σωλήνα παρουσία του μυκητοκτόνου και θα μπορούν να μας καθοδηγήσουν στη μελέτη και καταγραφή φαινοτύπων ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα. Τέτοιοι πίνακες υπάρχουν διαθέσιμοι και παρέχουν πρότυπα των αλλαγών στη μορφολογία των βλαστανόντων σπορίων. Στους πίνακες αυτούς καταγράφεται η βλάστηση ή μη των σπορίων, η κανονική διαμόρφωση του

βλαστικού σωλήνα και οι παραμορφώσεις, οι ανωμαλίες και οι ιδιαιτερότητες στη διαμόρφωση του σε δεδομένες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων. Από τους πίνακες αυτούς γίνεται προσδιορισμός και καταγραφή του ανάλογου φαινοτύπου που αντιστοιχεί στην απομόνωση που δοκιμάζεται (Πίνακας 2.1), επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση και καταγραφή φαινοτύπων ανθεκτικότητας σε προγράμματα παρακολούθησης της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα, σε πληθυσμούς του *Botrytis cinerea*.

Μέρος Β': Πειραματικό Μέρος

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια ενός προγράμματος παρακολούθησης της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα σε διάφορα θερμοκήπια με καλλιέργειες τομάτας στην περιοχή Τυμπακίου Κρήτης, συλλέχθηκαν περισσότερα από 60 δείγματα που εμφάνιζαν συμπτώματα τεφράς σήψης, από τα οποία αποκτήθηκαν καθαρές καλλιέργειες του *Botrytis cinerea*. Αυτές οι απομονώσεις αγρού ελέγχθηκαν ως προς την ευαισθησία τους στα δικαρβοξιμιδικά, βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, στο dichlofluanid και στο μίγμα carbendazim + diethofencarb. Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα έγινε με βάση τον τρόπο βλάστησης των σπορίων σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων. Τα μυκητοκτόνα αυτά είτε παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων είτε επάγουν μορφολογικές τροποποιήσεις στην κανονική ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα διακριτές στο μικροσκόπιο διερχόμενου φωτισμού, επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα φαινοτύπων σε διάστημα 16-20 ωρών. Από την μελέτη διαπιστώθηκε η παρουσία τριών φαινοτύπων ανθεκτικότητας στον πληθυσμό του *Botrytis cinerea*. Ο φαινότυπος Ben HR με υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά (κανονική βλάστηση σπορίων σε $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ carbendazim) και ευαισθησία στα φαινυλοκαρβαμιδικά, τα δικαρβοξιμιδικά, το dichlofluanid και το μίγμα, με συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό σε ποσοστό 55%, ο φαινότυπος Dic MR BenHR, με μέτρια ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά και υψηλή στα βενζιμιδαζολικά (κανονική βλάστηση σπορίων σε $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ iprodione και $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ carbendazim) και ευαισθησία στα φαινυλοκαρβαμιδικά, το dichlofluanid και το μίγμα, με συχνότητα εμφάνισης 9% και ο φαινότυπος Dic MR, με μέτρια ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά (κανονική βλάστηση σπορίων σε $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ iprodione) και ανθεκτικότητα αγρίου τύπου στα φαινυλοκαρβαμιδικά (κανονική βλάστηση σπορίων σε $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ diethofencarb), με συχνότητα εμφάνισης 2%. Το υπόλοιπο 34% του πληθυσμού ήταν στελέχη αγρίου τύπου, με ανθεκτικότητα αγρίου τύπου στα φαινυλοκαρβαμιδικά (κανονική ανάπτυξη σε $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ diethofencarb) και ευαισθησία σε όλα τα άλλα μυκητοκτόνα. Δεν διαπιστώθηκαν στελέχη ανθεκτικά στο dichlofluanid και στο μίγμα carbendazim + diethofencarb.

Από τα δεδομένα της εργασίας αυτής προκύπτει η δυνατότητα ταυτοποίησης σε μικρό χρονικό διάστημα των διαφόρων φαινοτύπων ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα του *Botrytis cinerea* με μία εύχρηστη και ευαίσθητη βιοδοκιμή που βασίζεται στον τρόπο βλάστησης των σπορίων.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο βοτρύτης αποτελεί μια από τις πιο κοινές ασθένειες των καλλιεργειών θερμοκηπίου που είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν με χημικά μέσα. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ιδιαίτερη ικανότητα του παθογόνου αιτίου της ασθένειας, του μύκητα *Botrytis cinerea*, να αναπτύσσει γρήγορα ανθεκτικά στελέχη στα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμησή του. Η χημική καταπολέμηση είναι σήμερα ο κύριος τρόπος καταπολέμησης του βοτρύτη. Τα μυκητοκτόνα που συνιστώνται για την καταπολέμηση της ασθένειας ανήκουν στα οργανικά μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος δράσης όπως dichlofluanid, chlorothalonil, captan, thiram, τα διασυστηματικά της ομάδας των βενζιμιδαζολικών όπως benomyl, carbendazim, thiophanate methyl και ειδικής δράσης της ομάδας των δικαρβοξιμιδικών όπως procymidone, vinclozolin, iprodione, chlozolate (Παναγόπουλος 1997). Επίσης στη χημική καταπολέμηση του βοτρύτη χρησιμοποιούνται νέες οικογένειες βοτρυδιοκτόνων όπως οι ανυλινοπυριμιδίνες και οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης καθώς και μίγματα βενζιμιδαζολικών και φαινυλοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων (Leroux *et al.*, 1999).

Η εμφάνιση των βενζιμιδαζολικών, των πρώτων διασυστηματικών μυκητοκτόνων στα τέλη της δεκαετίας του '60, αποτέλεσε σταθμό στη χημική καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών, αφού οι ενώσεις αυτές ήταν αποτελεσματικές στην καταπολέμηση σε εξαιρετικά μικρές συγκεντρώσεις, είχαν μεγάλη διάρκεια δράσης στο εσωτερικό του φυτού και μηδαμινή οξεία τοξικότητα για τα ανώτερα φυτά και ανώτερα ζώα. Σήμερα η εικόνα εμφανίζεται λιγότερο αισιόδοξη κυρίως λόγω της ευκολίας με την οποία στους ευαίσθητους μύκητες παράγονται με μεταλλαγές στελέχη ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα στον αγρό (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992). Ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα σε στελέχη του *Botrytis cinerea*, ανακαλύφθηκε πολύ σύντομα μετά την πρώτη εφαρμογή τους το 1970, μέσα σε θερμοκήπια κυκλάμινων στην Ολλανδία (Bollen and Scholten, 1971). Από τότε το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και σε άλλες καλλιέργειες και σε άλλους μύκητες. Μετά την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά στη δεκαετία του '70, στη χημική καταπολέμηση του βοτρύτη χρησιμοποιήθηκαν κυρίως τα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα. Παρόλα αυτά, μέχρι το 1981, στελέχη του *Botrytis cinerea* που εμφάνιζαν μερική ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά iprodione, vinclozolin, procymidone και / ή υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά (benomyl, carbendazim, thiophanate methyl) ανακαλύφθηκαν σε διάφορες καλλιέργειες θερμοκηπίου και περιοχές της Ελλάδας (Pappas, 1982). Εξαιτίας της ανθεκτικότητας αυτής, μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος όπως το dichlofluanid, εφαρμόζονταν σε μίγματα ή σε εναλλακτικούς ψεκασμούς με τα δικαρβοξιμιδικά, πρακτική αποτελεσματική εναντίον της τεφράς σήψης (Pappas and Elena, 1992). Το dichlofluanid, είναι ένα προστατευτικό μυκητοκτόνο ευρέως φάσματος με ασθενή βοτρυδιοκτόνο δράση. Κατά καιρούς έχουν δημοσιευθεί αναφορές που υποστηρίζουν ότι στελέχη του *Botrytis cinerea* εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο dichlofluanid, αλλά το αν υφίσταται στην πραγματικότητα

ανθεκτικότητα στο dichlofluanid έχει αμφισβητηθεί, εξαιτίας της μεγάλης παραλλακτικότητας στην ευαισθησία που παρατηρείται στο μυκητοκτόνο μεταξύ των απομονώσεων αγρίου τύπου του παθογόνου (Pollastro *et al.*, 1996). Το χειμώνα του 1989, ένα μίγμα από carbendazim 25% δ.ο και diethofencarb 25% δ.ο., με το εμπορικό όνομα Sumico κυκλοφόρησε στην αγορά αγροχημικών προϊόντων στην Ελλάδα αντικαθιστώντας τα περισσότερα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνταν πριν εναντίον του βοτρυτή. Παρόλα αυτά, η αποτελεσματικότητα αυτού του μυκητοκτόνου μίγματος δεν θεωρήθηκε ποτέ ικανοποιητική από τους παραγωγούς στην Ελλάδα (Pappas, 1997). Στελέχη του *Botrytis cinerea* με πολλαπλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμιδικά και στο μίγμα carbendazim+diethofencarb εντοπίστηκαν σε θερμοκήπια όπου είχαν γίνει ψεκασμοί με το μίγμα στην Ισπανία το 1992 (Raposo *et al.*, 1994) και το Ισραήλ το 1988 (Katan *et al.*, 1989), ενώ στην Ελλάδα τέτοια στελέχη εμφανίζονταν περιστασιακά αρχίζοντας από το 1994 σε καλλιέργειες θερμοκηπίου στις περιοχές Τριφυλίας Μεσσηνίας στη Δυτική Πελοπόννησο και Μαραθώνα Αττικής (Λάσκαρης κ.α., 1994). Στελέχη του *Botrytis cinerea* υψηλά ανθεκτικά στις ανυλνοπυριμιδίνες έχουν ανιχνευθεί σε πολλούς Ευρωπαϊκούς αμπελώνες (Hilber and Hilber- Bodmer, 1998), ενώ απομονώσεις του *Botrytis cinerea* που εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία στους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης έχουν βρεθεί σε διάφορες καλλιέργειες σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες και στο Ισραήλ (Elad, 1992; Stehmann and De Waard, 1995).

Η ανάπτυξη μεθόδων έγκαιρης επισήμανσης των ανθεκτικών στελεχών αναμφίβολα θα συμβάλλουν στον καλύτερο προγραμματισμό των χημικών επεμβάσεων για την αντιμετώπιση της ασθένειας στην πράξη. Γενικές αναφορές στις τεχνικές έλεγχου της ευαισθησίας των μυκήτων στα μυκητοκτόνα υπάρχουν διαθέσιμες στη βιβλιογραφία (Georgopoulos, 1982; Ogawa *et al.*, 1979), ενώ διεθνείς τυποποιημένες μέθοδοι σε ένα αριθμό παθογόνων έχουν δημοσιευθεί από διεθνείς οργανισμούς (FAO, 1982; FRAC, 1991). Η τεχνική που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ευαισθησίας εξαρτάται από τον σκοπό της καταγραφής και το συνδυασμό μύκητα / μυκητοκτόνου. Τα υποχρεωτικά παράσιτα δοκιμάζονται για την ευαισθησία τους στα μυκητοκτόνα συνήθως *in vivo* είτε πάνω σε επιμολυσμένα μικρά φυτά στα οποία το μυκητοκτόνο ψεκάζεται ή εφαρμόζεται από το έδαφος ή σε δίσκους από φύλλα ή σε αποκομμένα τμήματα του φυτού που επιπλέουν σε διαλύματα του μυκητοκτόνου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα προαιρετικά παράσιτα δοκιμάζονται κυρίως *in vitro*, γενικά μετρώντας την ανάπτυξή τους σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου (Brent, 1991). Σαν μολύσματα έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο τα σπόρια όσο και το μυκήλιο. Γενικά δίνουν παρόμοια αποτελέσματα. Απλές, γρήγορες τεχνικές, όπως οι δοκιμές βλάστησης σπορίων σε άγαρ είναι ιδανικές σε πολλές περιπτώσεις μυκήτων που παράγουν ικανοποιητικό αριθμό σπορίων (π.χ. *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* ή *Monilinia* spp.), όπου μεγάλος αριθμός σπορίων μπορεί να αναλυθεί μέσα σε λίγες μέρες (Staub & Sozzi, 1984). Η δυνατότητα διάκρισης ανθεκτικών φαινοτύπων στα μυκητοκτόνα ανάλογα με τον τρόπο βλάστησης των σπορίων βασίζεται στην παρατήρηση στο μικροσκόπιο διερχόμενου φωτισμού του τρόπου βλάστησης των σπορίων σε μέσο εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνα. Πολλά μυκητοκτόνα προκαλούν τέτοιες βιοχημικές επιδράσεις στη φυσιολογία του μύκητα οι οποίες μπορούν να παρατηρηθούν σε πολύ έγκαιρα στάδια ανάπτυξης όπως το στάδιο βλάστησης των σπορίων ή το στάδιο της ανάπτυξης και επιμήκυνσης του βλαστικού σωλήνα. Οι βιοχημικές αυτές επιδράσεις σχετίζονται κυρίως με το μηχανισμό δράσης των μυκητοκτόνων και στο κατά πόσο ο μηχανισμός αυτός είναι παρόν στο σπόριο του



μύκητα που βλαστάνει, προϋπόθεση πολύ σημαντική ειδικά για τα μυκητοκτόνα εξειδικευμένης δράσης (Pontzen and Sheinpfug, 1989). Έτσι πολλά μυκητοκτόνα αναστέλλουν τη βλάστηση των σπορίων όπως το dichlofluanid, ενώ άλλα επιτρέπουν μεν τη βλάστηση των σπορίων αλλά προκαλούν μορφολογικές τροποποιήσεις στην κανονική ανάπτυξη και επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα όπως τα βενζιμιδαζολικά (Legoux *et al.*, 1999). Οι διαφοροποιήσεις αυτές από το κανονικό μπορούν να γίνουν εύκολα ορατές μετά από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο διερχόμενου φωτισμού, των σπορίων που βλαστάνουν σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνο σε διάφορες συγκεντρώσεις (Gullino and Garibaldi, 1986). Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές βλάστησης των σπορίων *in vitro*, για μερικά μυκητοκτόνα δείχνουν καλή συσχέτιση με τη συμπεριφορά του μυκητοκτόνου στον αγρό και έτσι παρέχεται ένα ασφαλές και γρήγορο μέσο ανίχνευσης ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα στελεχών του μύκητα (Staub & Sozzi, 1984). Στον *Botrytis cinerea* καλή συσχέτιση υπάρχει για τα βενζιμιδαζολικά, τα φαινυλοκαρβαμιδικά, το dichlofluanid, το iprodione και το μίγμα carbendazim + diethofencarb, ενώ με τις ανυλινοπυριμιδίνες τα αποτελέσματα από τις δοκιμές βλάστησης των σπορίων δεν συσχετίζονται με την πραγματική συμπεριφορά του μυκητοκτόνου στον αγρό (Staub & Sozzi, 1984). Με ορισμένα εκλεκτικά μυκητοκτόνα όπως τα βενζιμιδαζολικά, τα καρβοξαμιδικά και τις ακυλαανίνες υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην ευαισθησία μεταξύ στελεχών αγρίου τύπου και ανθεκτικών και η ανίχνευση της ανθεκτικότητας είναι εύκολη, ενώ με ορισμένα άλλα μυκητοκτόνα όπως π.χ. το dodine και μέλη της ομάδας των αρωματικών υδρογονανθράκων, οι διαφορές μπορεί να είναι μικρές και δύσκολο να προσδιορισθούν και ακόμη και η ανίχνευση της ανθεκτικότητας χρειάζεται προσεκτικές δοκιμές (FAO, 1982). Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας του μύκητα στο εφαρμοζόμενο μυκητοκτόνο χρησιμοποιούνται κυρίως η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση στη βλάστηση των σπορίων ή την ανάπτυξη του μύκητα (τιμές MIC) και η τιμή ED₅₀, η συγκέντρωση δηλαδή του μυκητοκτόνου που προκαλεί 50 % παρεμπόδιση στην μυκηλιακή ανάπτυξη ή τη βλάστηση σπορίων του μύκητα σε σχέση με το μάρτυρα (FAO, 1982). Η τιμή ED₅₀ είναι ο πιο κοινός τύπος καταγραφής της ευαισθησίας του μύκητα στο μυκητοκτόνο και προτείνεται ως ο καταλληλότερος να εφαρμόζεται όπου αυτό είναι δυνατό (Brent, 1991).

Στην παρούσα εργασία έγινε προσδιορισμός της ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα με βάση τον τρόπο βλάστησης των σπορίων, σε στελέχη του *Botrytis cinerea* που απομονώθηκαν από δείγματα αγρού στη διάρκεια προγράμματος παρακολούθησης της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα στην περιοχή Τυμπακίου Κρήτης. Έγινε ανίχνευση της ευαισθησίας του πληθυσμού του μύκητα στα βενζιμιδαζολικά, φαινυλοκαρβαμιδικά, δικαρβοξυμιδικά μυκητοκτόνα, το dichlofluanid και το μίγμα carbendazim + diethofencarb και προσδιορίστηκε η παρουσία φαινοτύπων ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα στον πληθυσμό του *Botrytis cinerea* που ελέγχθηκε.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υπόστρωμα ανάπτυξης του μύκητα

Στα πειράματα που έγιναν, όλες οι απομονώσεις διατηρήθηκαν και αναλύθηκαν σε υπόστρωμα ανάπτυξης, malt extract agar (MEA, Oxoid, UK). Για την παρασκευή του, διαλύθηκαν 40 gr σκόνης MEA σε 1 lt δις - απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα θερμάνθηκε για να γίνει πλήρης διάλυση της σκόνης, τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες (περίπου 3 ml ανά σωλήνα) και κάθε σωλήνας τοποθετήθηκε σε κεκλιμένο επίπεδο για να δημιουργηθεί κλίση agar. Μέρος του υλικού τοποθετήθηκε σε ειδικές φιάλες των 100 ml με πεπλατυσμένα τοιχώματα (medicine bottles). Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν από 3 ml δις- απεσταγμένο νερό που χρειάστηκαν στη διάρκεια του πειράματος. Όλα τα υλικά αποστειρώθηκαν σε κλίβανο στους 121° C για 15 min.

Απομονώσεις του *Botrytis cinerea*

Κατά την διάρκεια προγράμματος παρακολούθησης της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα πληθυσμών του *Botrytis cinerea* σε καλλιέργειες τομάτας σε θερμοκήπια της περιοχής Τυμπακίου Κρήτης συλλέχθηκαν δείγματα από καρπούς τομάτας με συμπτώματα τεφράς σήψης. Η περιοχή δειγματοληψίας είχε χωρισθεί σε τέσσερις υποπεριοχές σε κάθε μία από τις οποίες συλλέχθηκαν 15 δείγματα. Τα δείγματα (συνολικά 60) μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο ξεχωριστά σε σακούλες πολυαιθυλενίου και μετά την εργαστηριακή επιβεβαίωση ότι το παθογόνο αίτιο της ασθένειας ήταν ο *Botrytis cinerea* αποκτήθηκαν καθαρές καλλιέργειες. Οι καλλιέργειες ονομάστηκαν ανάλογα με την περιοχή συλλογής και τον αριθμό του δείγματος (π.χ. A1, B2 κτλ). Οι απομονώσεις διατηρήθηκαν στο εργαστήριο σε σωλήνες με MEA στους -20 °C. Υποκαλλιέργειες γίνονταν με τη μεταφορά μυκηλιακών δίσκων σε τρυβλία με MEA για να αποκτηθούν μολύσματα για τη μέτρηση της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα.

Μυκητοκτόνα

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

Για την απόκτηση των επιθυμητών συγκεντρώσεων μυκητοκτόνου στο μέσο ανάπτυξης του μύκητα (μg δραστικής ουσίας ανά ml μέσου ανάπτυξης), κατάλληλες ποσότητες από πυκνά διαλύματα (1000 μg ml⁻¹) carbendazim, diethofencarb, carbendazim + diethofencarb σε διαλύτη dimethyl sulfoxide (DMSO) και dichlofluanid και iprodione σε διαλύτη ακετόνη, προστέθηκαν σε αποστειρωμένο μέσο ανάπτυξης MEA σε ειδικά φιαλίδια με πεπλατυσμένα πλευρά (medicine bottles) σε θερμοκρασία περίπου 45 °C. Η τελική

συγκέντρωση του dimethyl sulfoxide (DMSO) ή της ακετόνης στο υλικό δεν ξεπερνούσε το 1%.

Τα πυκνά διαλύματα των μυκητοκτόνων παρασκευάστηκαν ως εξής:
 carbendazim 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$: Διάλυση 200 mg Derozal 50% σε 100 ml DMSO
 diethofencarb 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$: Διάλυση 400 mg Diethofencarb 25% σε 100 ml DMSO
 carbendazim + diethofencarb 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$: Διάλυση 400 mg Sumico 25% + 25% σε 100 ml DMSO
 dichlofluanid 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$: Διάλυση 200 mg Euparen 50% σε 100 ml ακετόνη
 iprodione 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$: Διάλυση 200 mg Rovral 50% σε 100 ml ακετόνη.
 carbendazim 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$: Προσθήκη 1 ml carbendazim 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ σε 9 ml DMSO.
 diethofencarb 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$: Προσθήκη 1 ml diethofencarb 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ σε 9ml DMSO.
 carbendazim + diethofencarb 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$: Προσθήκη 1ml διαλύματος 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ σε 9ml DMSO
 dichlofluanid 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$: Προσθήκη 1 ml dichlofluanid 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ σε 9 ml ακετόνη
 iprodione 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$: Προσθήκη 1ml iprodione 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ σε 9 ml ακετόνη.

Θρεπτικά υποστρώματα εμπλουτισμένα με μυκητοκτόνα σε διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση ανθεκτικότητας και για τον υπολογισμό των τιμών MIC, παρασκευάστηκαν προσθέτοντας σε ρευστοποιημένο (μετά από θέρμανση) υπόστρωμα MEA που περιέχονταν σε ειδικές φιάλες με πεπλατυσμένα τοιχώματα (medicine bottles) των 100 ml, τις ακόλουθες ποσότητες από τις αρχικές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων:

Μυκητοκτόνα	Τελική συγκέντρωση	Από το πυκνό διάλυμα	ποσότητα	Σε ποσότητα υποστρώματος (ml)
dichlofluanid	1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	100 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1 ml	100
	3 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0.3 ml	100
iprodione	3 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0.3 ml	100
	10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1 ml	100
carbendazim	1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	100 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1 ml	100
	100 $\mu\text{g ml}^{-1}$		20 mg Derozal 50%	100
diethofencarb	1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	100 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1 ml	100
	100 $\mu\text{g ml}^{-1}$		40 mg Diethofencarb 25%	100
carbendazim + diethofencarb	1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	100 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1 ml	100
	100 $\mu\text{g ml}^{-1}$		40 mg Sumico 25% + 25%	100

Στη συνέχεια το υλικό μεταφέρθηκε σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm (10 ml σε κάθε τρυβλίο) και αφέθηκε να στερεοποιηθεί. Σε όλες τις περιπτώσεις η συγκέντρωση του διαλύτη δεν ξεπερνούσε το 1%.

Ανίχνευση ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα

Για την ανίχνευση ανθεκτικότητας των στελεχών του *Botrytis cinerea* στα μυκητοκτόνα έγιναν δοκιμές βλάστησης των σπορίων του μύκητα, σε υλικό ανάπτυξης εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνα. Για κάθε μυκητοκτόνο χρησιμοποιήθηκαν δύο διακριτές συγκεντρώσεις, μια που να εμποδίζει τη βλάστηση των σπορίων των ευαίσθητων στελεχών και μια μέγιστη που να επιτρέπει τη βλάστηση των ανθεκτικών. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων αυτών για κάθε μυκητοκτόνο χωριστά, έγινε σε προηγούμενες μελέτες

προσδιορισμού της ελάχιστης παρεμποδιστικής συγκέντρωσης για τη βλάστηση των σπορίων (MIC) σε στελέχη του *Botrytis cinerea*. Έτσι οι απομονώσεις δοκιμάστηκαν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με iprodione σε συγκεντρώσεις 3 και 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, carbendazim 1 και 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, diethofencarb 1 και 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, dichlofluanid 1 και 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ και carbendazim + diethofencarb 1 και 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Τρυβλία χωρίς μυκητοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Μέτρηση ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα

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

Οι συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 3 και 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ iprodione, 1 και 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ carbendazim, 1 και 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ diethofencarb, 1 και 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ dichlofluanid και 1 και 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ carbendazim + diethofencarb. Τρυβλία χωρίς μυκητοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες.

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας των απομονώσεων του *B. cinerea* στα μυκητοκτόνα, ανάλογα με τον τρόπο βλάστησης των σπορίων, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδός της σημειακής μόλυνσης (Point inoculation method, κατά Λάσκαρη κ.α., 1994). Στα τρυβλία σημειώθηκαν στην κάτω επιφάνεια και περιφερειακά 15 ισαπέχοντα σημεία, τα οποία και αριθμήθηκαν. Πάνω από κάθε αριθμημένο σημείο, τοποθετήθηκε μόλυσμα σπορίων τόσων, όσων μπορεί να μεταφέρει η άκρη αποστειρωμένης βελόνας, με μια απλή επαφή στις καρποφορίες του μύκητα. Μετά από 16-20 ώρες επώασης στο σκοτάδι στους 22°C, τα τρυβλία ελέγχθηκαν σε μικροσκόπιο διερχόμενου φωτισμού σε μεγέθυνση x10 για να προσδιοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση που παρεμποδίζει τη βλάστηση των σπορίων ή την τυπική διαμόρφωση του βλαστικού σωλήνα.

Στατιστική επεξεργασία

Ο έλεγχος σημαντικότητας της παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε στις συχνότητες εμφάνισης των τριών φαινοτύπων ανθεκτικότητας που προέκυψαν από τη μελέτη (Μεταχειρίσεις), στις τέσσερις υποπεριοχές (Α, Β, Γ, Δ) στις οποίες είχε χωρισθεί η περιοχή δειγματοληψίας (Επαναληψεις), έγινε με τη δοκιμή σημαντικότητας με το F κριτήριο (ανάλυση παραλλακτικότητας, ANOVA) με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Excel '97. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η ελάχιστη σημαντική διαφορά για πιθανότητα σφάλματος 5% ($E\text{Σ}\Delta_{05}$), για να διαπιστωθεί ποιες τιμές εμφάνιζαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών του *B. cinerea* στα μυκητοκτονα ανάλογα με τον τρόπο βλάστησης των σπορίων

Μετά από επώαση 16- 20 ώρες στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 22 °C τα τρυβλία παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο διερχόμενου φωτισμού σε μεγέθυνση x10 για την αναζήτηση σπορίων που τυχόν έχουν βλαστήσει και του τρόπου με τον οποίο έχουν βλαστήσει.

Για τον προσδιορισμό του τρόπου ανάπτυξης και διαμόρφωσης του βλαστικού σωλήνα του σπορίου χρησιμοποιήθηκε ο Πίνακας 2.1. Καταγράφηκε η ευαισθησία στα μυκητοκτόνα μόνο εκείνων των απομονώσεων που αναπτύσσονταν κανονικά στο μάρτυρα (θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς μυκητοκτόνο). Από ορισμένα δείγματα δεν απομονώθηκαν καλλιέργειες του μύκητα, ενώ ορισμένες απομονώσεις δεν αναπτύχθηκαν στο μάρτυρα για διάφορους λόγους. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν τελικά τα αποτελέσματα της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα από 49 απομονώσεις, τα οποία φαίνονται στον Πίνακα 2.3 .

Μέτρηση της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα

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

Πίνακας 2.1. Προσδιορισμός φαινότυπων ανθεκτικότητας απομονώσεων του *B. cinerea* ανάλογα με τον τρόπο βλάστησης των σπορίων (Προσαρμογή από Μπέσα, 1995).

Μυκητοκτόνα	Μαρτυρας	dichlofluanid	ipro dione	carben dazim	dietho fencarb
Συγκέντρωση (mg/l)		1 3	3 10	1 100	1 100
Φαινότυπος					
W (Pcm HR)					
Dic MR					
Ben HR					
DicMR BenHR					

W (PcmHR): αγρίου τύπου (ανθεκτικότητα αγρίου τύπου στα φαινυλοκαρβαμιδικά) BenHR: υψηλά

Πίνακας 2.2. Επιδράσεις των μυκητοκτόνων στη βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα στους φαινότυπους ανθεκτικότητας απομονώσεων του *Botrytis cinerea* (Προσαρμογή από Pappas, 1997).

Φαινότυπος ^α	Μάρτυρας	Συγκέντρωση μυκητοκτόνου (μg ml ⁻¹)									
		dichlofluamid		iprodione		carbendazim		diethofencarb		carbendazim + diethofencarb	
	0	1	3	3	10	1	100	1	100	1	100
W (Pcm HR)	A ^β	Δ	Δ	Δ	Δ	Γ	Γ	A	A	Γ	Γ
BenHR	A	-	-	-	-	A	A	Γ	Γ	Γ	Γ
DicMR	A	-	-	A	B	Γ	Γ	A	A	Γ	Γ
DicMR BenHR	A	-	-	A	B	A	A	Γ	Γ	Γ	Γ

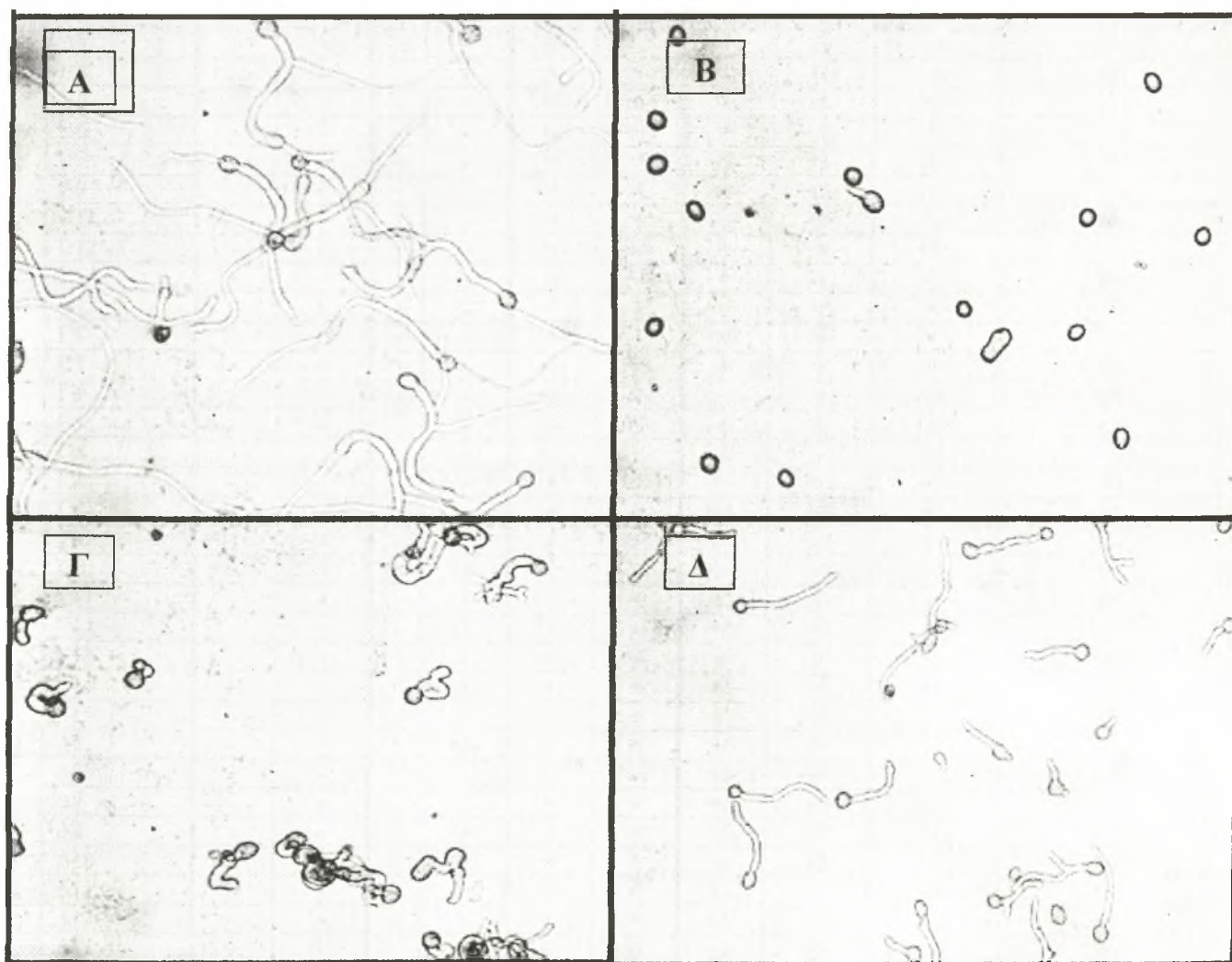
^αW (PcmHR) : αγρίου τύπου (ανθεκτικότητα αγρίου τύπου στα φαινυλοκαρβαμιδικά).

BenHR: υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, DicMR: μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά

^β (A): κανονική βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα, (B): κοντός βλαστικός σωλήνας,

(Γ): παραμορφωμένος βλαστικός σωλήνας, (Δ): σπόρια δεν βλαστάνουν.

Εικόνα 2.1 : A: κανονική βλάστηση σπορίων (π.χ. χωρίς μυκητοκτόνο). B: σπόρια που δεν βλαστάνουν (π.χ. στέλεχος Dic S σε 3 μgml⁻¹). Γ: παραμορφωμένος βλαστικός σωλήνας (π.χ. στέλεχος Pcm HR σε 1 μgml⁻¹ carbendazim). Δ: κοντός βλαστικός σωλήνας (π.χ. στέλεχος DicMR σε 10μgml⁻¹ iprodione).



Πίνακας 2.3. Παρατήρηση σπορίων του *Botrytis cinerea* σε μικροσκόπιο διερχόμενου φωτισμού (x10) για τον προσδιορισμό του τρόπου με τον οποίο έχουν βλαστήσει σε ΜΕΑ εμπλουτισμένο με μυκητοκτόνα ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

Απομόνωση	Συγκέντρωση μυκητοκτόνου ($\mu\text{g ml}^{-1}$)									
	dichlofluamid		iprodione		carbendazim		diethofencarb		carbendazim + diethofencarb	
	1	3	3	10	1	100	1	100	1	100
A1	-	-	-	-	+	+			+/-	+/-
A2	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
A3	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
A4	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
A5	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
A6	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
A7	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
A8	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
A9	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
A10	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
A11	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
A12	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
A13	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
A14	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
A15	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
B1	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
B3	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
B4	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
B5	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
B6	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
B7	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
B9	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
B11	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
B12	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
B13	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
B15	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Γ1	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Γ3	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
Γ4	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
Γ5	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
Γ6	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
Γ7	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Γ8	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Γ9	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Γ10	-	-	+	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Γ11	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Γ12	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Γ13	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
Γ14	-	-	+	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Γ15	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Δ2	-	-	+	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Δ6	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Δ7	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Δ8	-	-	+	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Δ10	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Δ11	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Δ12	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Δ13	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Δ15	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-

(+) κανονική βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη βλαστικού σωλήνα, (+/-) βλάστηση σπορίων με κοντό ή παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα, (-) μη βλάστηση σπορίων.

Στελέχη αγρίου τύπου

Τα στελέχη αγρίου τύπου (W), ήταν ανθεκτικά στο diethofencarb καθώς σε μέσο που περιείχε $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ diethofencarb η βλάστηση των σπορίων γίνονταν κανονικά (Εικόνα 2.1. Α). Τα στελέχη αυτά ήταν ευαίσθητα στο carbendazim και το μίγμα carbendazim + diethofencarb καθώς εμφάνιζαν παραμορφώσεις του βλαστικού σωλήνα (Εικόνα 2.1.Γ) σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Επίσης εμφάνιζαν ευαισθησία στο iprodione το οποίο μπορούσε να παρεμποδίσει τη βλάστηση των σπορίων (Εικόνα 2.1. Β).

Ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα

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

Οι βλαστικοί σωλήνες που δημιουργούνται από στελέχη Ben S τα οποία είχαν μεταχειριστεί με carbendazim, ήταν κοντοί, παραμορφωμένοι και συστρεμμένοι. (Εικόνα 2.1Γ, Πίνακας 2.2 και 2.3). Τα στελέχη αυτά εμφάνιζαν ταυτόχρονα ανθεκτικότητα αγρίου τύπου στο diethofencarb (Πίνακας 2.3).

Στα στελέχη υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά (Ben HR), η βλάστηση των σπορίων και η κανονική ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα δεν επηρεαζόταν ούτε σε μέσο που περιείχε $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ carbendazim (Εικόνα 2.1 Α). Τα στελέχη αυτά εμφάνιζαν ευαισθησία στο diethofencarb και στο μίγμα carbendazim + diethofencarb σε συγκεντρώσεις $0.05 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Πίνακας 2.2 και 2.3). Τα στελέχη BenHR που είχαν μεταχειριστεί με diethofencarb εμφάνιζαν παρόμοιες μορφολογικές ανωμαλίες στην ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα με τα ευαίσθητα στελέχη (Εικόνα 2.1 Γ).

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

Ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά

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

Οι δοκιμές που έγιναν σε σπόρια από στελέχη αγρίου τύπου, έδειξαν ότι το iprodione, μπορούσε να παρεμποδίσει τόσο τη βλάστηση των σπορίων όσο και την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα σε συγκέντρωση $3 \mu\text{gml}^{-1}$ (Πίνακες 2.2 και 2.3, Εικόνα 2.1.Β).

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

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

Ανθεκτικότητα στο μίγμα carbendazim + diethofencarb

Ανάλογα με την *in vitro* ευαισθησία τους στο μίγμα carbendazim + diethofencarb οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως αγρίου τύπου (ευαίσθητες, Ben+PcmS). Ευαίσθητα στο μίγμα είναι τα στελέχη αγρίου τύπου και τα στελέχη με υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, τα σπόρια των οποίων βλαστάνουν μεν αλλά ο βλαστικός σωλήνας που

αναπτύσσεται είναι πιο κοντός και παραμορφωμένος, σε συγκεντρώσεις του μίγματος $0.05 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Πίνακας 2.2 και 2.3, Εικόνα 2.1 Γ).

Στελέχη με μέτρια ή υψηλή ανθεκτικότητα στο μίγμα carbendazim + diethofencarb δεν βρέθηκαν σε αυτό το πείραμα.

Ευαισθησία στο dichlofluanid

Ανάλογα με την *in vitro* ευαισθησία τους στο dichlofluanid οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως αγρίου τύπου (ευαίσθητες, DichS). Στις απομονώσεις αυτές η βλάστηση των спорίων παρεμποδίζονταν σε μέσο που περιείχε συγκέντρωση dichlofluanid $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Εικόνα 2.1B, Πίνακες 2.2 και 2.3).

Στελέχη με μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid δεν βρέθηκαν σε αυτό το πείραμα.

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

Από τα αποτελέσματα της καταγραφής του τρόπου βλάστησης των спорίων των απομονώσεων του *Botrytis cinerea* σε μέσο εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων, υπολογίστηκε η τιμή MIC (minimum inhibitory concentration) για τη βλάστηση των спорίων ή την κανονική ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα. Με βάση την τιμή MIC, κάθε απομόνωση ταξινομήθηκε στον φαινότυπο που αντιστοιχεί στην ευαισθησία της στα μυκητοκτόνα (Πίνακας 2.4).

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

Φαινότυπος	MIC για τη βλάστηση των спорίων ($\mu\text{g ml}^{-1}$)				
	dichlofluanid	iprodione	carbendazim	diethofencarb	carbendazim + diethofencarb
Wild ^a (Pcm HR)	<1	<3	<1	>100	<1
DicMR	<1	10	<1	>100	<1
BenHR	<1	<3	>100	<1	<1
DicMR BenHR	<1	10	>100	<1	<1

^aW (PcmHR) : αγρίου τύπου (ανθεκτικότητα αγρίου τύπου στα φανυλοκαρβαμικά),

BenHR: υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, DicMR: μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμικά

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

Το diethofencarb δεν είχε καμία επίδραση στα στελέχη αγρίου τύπου, τα οποία ήταν υψηλά ανθεκτικά στο diethofencarb (PcmHR) με τιμές MIC μεγαλύτερες από $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, ενώ ήταν πολύ δραστικό στα στελέχη Ben HR με τιμές MIC μικρότερες από $1 \mu\text{g ml}^{-1}$.

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

Στο dichlofluamid όλες οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως αγρίου τύπου (ευαίσθητες), με τιμές MIC μικρότερες από 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Στο μίγμα carbendazim + diethofencarb, όλες οι απομονώσεις χαρακτηρίστηκαν ως αγρίου τύπου (ευαίσθητες). Τα στελέχη BenHR PcmS και BenS PcmHR ήταν όλα ευαίσθητα στο μίγμα (αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα) με τιμές MIC κάτω από 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Κατανομή στελεχών ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα στον πληθυσμό του *B. cinerea*

Η κατανομή των ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά και των ανθεκτικών στα δικαρβοξιμιδικά στελεχών του *Botrytis cinerea* στον πληθυσμό που ελέγχθηκε φαίνεται στα διαγράμματα 2.1 και 2.2 αντίστοιχα. Η συχνότητα εμφάνισης των φαινοτύπων ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και τα δικαρβοξιμιδικά και των φαινοτύπων με διπλή ανθεκτικότητα και στα δύο μυκητοκτόνα φαίνεται στο διάγραμμα 2.3.

Ο έλεγχος σημαντικότητας της παραλλακτικότητας που παρατηρήθηκε στη συχνότητα εμφάνισης των τριών φαινοτύπων ανθεκτικότητας στις τέσσερις υποπεριοχές (Επαναλήψεις) στις οποίες είχε χωρισθεί η περιοχή δειγματοληψίας, έγινε με το F κριτήριο (Πίνακας 2.5α) και έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποπεριοχών αλλά υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των φαινοτύπων. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η ΕΣΔ_{0.05} για κάθε φαινότυπο και προσδιορίστηκαν οι τιμές που διαφέρουν στατιστικά, ενώ υπολογίστηκε και η ΕΣΔ_{0.05} των μέσων όρων της συχνότητας εμφάνισης των φαινοτύπων στον πληθυσμό και προσδιορίστηκε ποιοι μέσοι όροι διαφέρουν. Τα αποτελέσματα του ελέγχου με την ελάχιστη σημαντική διαφορά φαίνονται στον Πίνακα 2.5.β

Πίνακας 2.5. Συχνότητα προσβολών από ανθεκτικά στα μυκητοκτόνα στελέχη του *Botrytis cinerea* σε τέσσερις διαφορετικές υποπεριοχές δειγματοληψίας σε θερμοκήπια τομάτας στην περιοχή Τυμπακίου Κρήτης

α. Έλεγχος σημαντικότητας της παραλλακτικότητας με το κριτήριο F

Ανάλυση Διακύμανσης

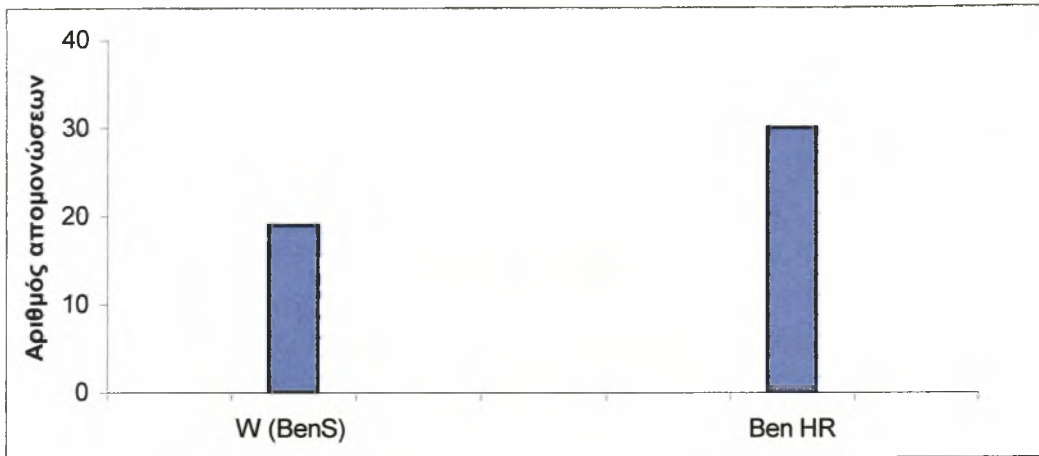
Προέλευση διακύμανσης	Βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Περιοχές	3	547	182,3333	1,924362	0,226895	4,757055
Φαινότυποι	2	6658,166667	3329,083	35,13544	0,000487	5,143249
Σφάλμα	6	568,5	94,75			
Σύνολο	11	7773,666667				

β. Έλεγχος στατιστικά σημαντικών διαφορών με τη δοκιμή της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς

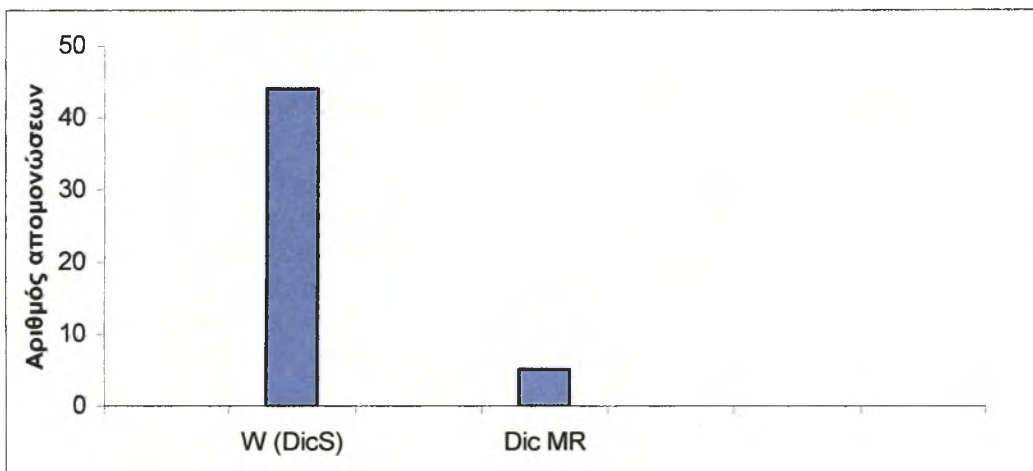
Περιοχή	Συχνότητα εμφάνισης (%) ανθεκτικών στελεχών ^α			ΕΣΔ _{0.05} =16
	DicMR	DicMR BenHR	BenHR	
A	0 a ^α	0 a	47 a	
B	9 a	0 a	46 a	
Γ	0 a	14 ab	50 a	
Δ	0 a	22 b	78 b	
M.O	2,25 α	9 α	55,25 β	
ΕΣΔ _{0.05}	9	17	26	

^α BenHR υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, DicMR μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά

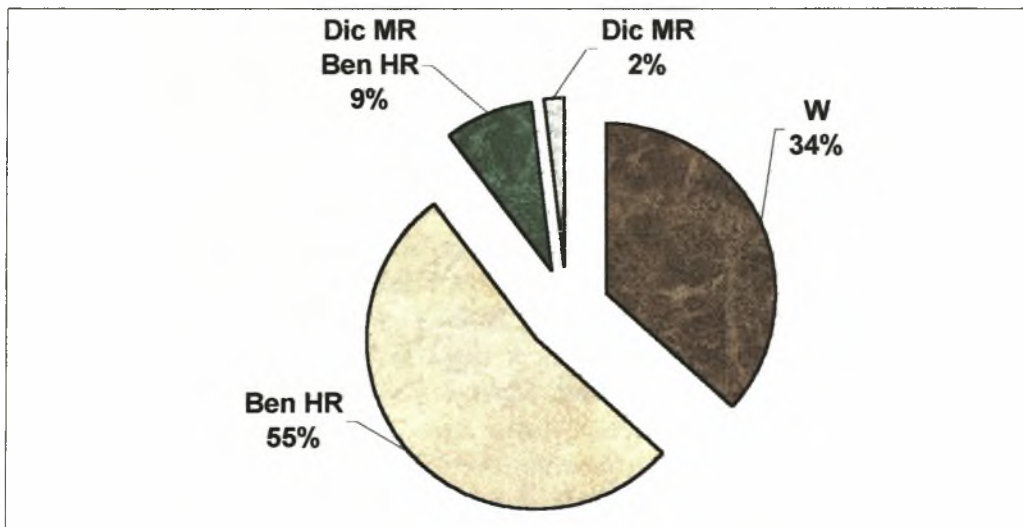
^β οι αριθμοί στις στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν, σύμφωνα με τη δοκιμή ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (ΕΣΔ) για $p=0.05$.



Διάγραμμα 2.1. Κατανομή ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών στον πληθυσμό του *B. cinerea*



Διάγραμμα 2.2. Κατανομή ανθεκτικών στα δικαρβοξιμιδικά στελεχών στον πληθυσμό του *B. cinerea*



Διάγραμμα 2.3. Συχνότητα εμφάνισης φαινοτύπων ανθεκτικότητας στον πληθυσμό του *Botrytis cinerea*

^a W αγρίου τύπου - ευαισθησία στα βενζιμιδαζολικά (BenS) και τα δικαρβοξιμιδικά (DicS)

Dic MR : μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά

BenHR: υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια προγράμματος παρακολούθησης της ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα στην περιοχή Τυμπακίου Κρήτης, συλλέχθηκαν απομονώσεις του *Botrytis cinerea* από διάφορα θερμοκήπια με καλλιέργειες τομάτας και ταξινομήθηκαν σε διάφορους φαινότυπους με βάση την ευαισθησία τους στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμιδικά, φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, στο μίγμα carbendazim + diethofencarb και στο dichlofluanid. Οι απομονώσεις του *Botrytis cinerea* μπορούν να ταξινομηθούν με βάση το επίπεδο ευαισθησίας / ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, τα φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα και στο μίγμα τους ως ευαίσθητες (S) ή αγρίου τύπου και υψηλά ανθεκτικές (HR), στα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα ως αγρίου τύπου και μετρίως ανθεκτικές (MR) και στο dichlofluanid ως αγρίου τύπου.

Στο πειραματικό μέρος της μελέτης, έγινε ανίχνευση ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, φαινυλοκαρβαμιδικά και δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα καθώς και στο dichlofluanid και στο μίγμα carbendazim + diethofencarb, σε στελέχη του *Botrytis cinerea*. Ο έλεγχος της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα έγινε με βάση τον τρόπο βλάστησης των σπορίων σε θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμένο με τα παραπάνω μυκητοκτόνα, εφαρμόζοντας μια κρίσιμη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου που να επιτρέπει την ξεκάθαρη διάκριση μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών. Στη συνέχεια οι απομονώσεις κατατάχθηκαν σε φαινότυπους ανθεκτικότητας με βάση την ελάχιστη συγκέντρωση που προκαλεί παρεμπόδιση στη βλάστηση των σπορίων ή την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα (MIC).

Στις απομονώσεις του *B. cinerea* που ελέγχθηκαν, ανιχνεύθηκαν δύο φαινότυποι ως προς την ευαισθησία στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. Ο πρώτος φαινότυπος εμφάνιζε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο carbendazim και ταυτόχρονα ήταν περισσότερο ευαίσθητος στο diethofencarb, ενώ εμφάνιζε ευαισθησία στο μίγμα carbendazim + diethofencarb. Ο φαινότυπος αυτός χαρακτηρίστηκε ως BenHR. Η συχνότητα εμφάνισης του φαινότυπου στον πληθυσμό ήταν 55%. Ο δεύτερος φαινότυπος ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, εμφάνιζε διπλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και τα δικαρβοξιμιδικά, με υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και μέτρια ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά, ενώ ήταν ευαίσθητος στο μίγμα carbendazim + diethofencarb. Ο φαινότυπος αυτός χαρακτηρίστηκε ως DicMR BenHR και η συχνότητα εμφάνισής του στον πληθυσμό ήταν 9%. Επίσης διαπιστώθηκε η παρουσία στελεχών που εμφάνιζαν μέτρια ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά και διατηρούσαν την ανθεκτικότητα αγρίου τύπου στα φαινυλοκαρβαμιδικά, ενώ ταυτόχρονα ήταν ευαίσθητα στο μίγμα carbendazim + diethofencarb. Οι απομονώσεις αυτές χαρακτηρίστηκαν ως Dic MR και η συχνότητά τους στον πληθυσμό ήταν 2%. Το υπόλοιπο 34% του πληθυσμού ήταν στελέχη αγρίου τύπου, τα οποία ήταν υψηλά ανθεκτικά στα φαινυλοκαρβαμιδικά (κανονική βλάστηση σπορίων σε 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ diethofencarb), ενώ ήταν ευαίσθητα στα βενζιμιδαζολικά, τα δικαρβοξιμιδικά, το dichlofluanid και το μίγμα carbendazim + diethofencarb. Από την κατανομή των φαινότυπων στον πληθυσμό του *Botrytis cinerea* που ελέγχθηκε φαίνεται ότι υπάρχει πρόβλημα ανθεκτικότητας στην περίπτωση των βενζιμιδαζολικών. Για τα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική μείωση της αποτελεσματικότητά τους, αλλά η παρουσία ανθεκτικών στελεχών στον πληθυσμό, επιβάλλει την προσεκτικότερη

χρησιμοποίησή τους, τόσο ως προς τη συχνότητα όσο και ως προς τον τρόπο εφαρμογής τους. Τέλος το μίγμα carbendazim + diethofencarb φαίνεται ότι είναι πλήρως αποτελεσματικό στο συγκεκριμένο πληθυσμό. Πάντως τα παραδείγματα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα δύο τελευταία μυκητοκτόνα επιβάλλουν την ορθολογική τους χρήση σε ένα πρόγραμμα ψεκασμών ώστε να συντηρήσουν όσο το δυνατό περισσότερο την αποτελεσματικότητά τους στην καταπολέμηση του βοτρυτή. Έτσι συνιστάται στην περιοχή η εφαρμογή του μίγματος carbendazim + diethofencarb, μόνο του ή σε μίγμα με ένα μυκητοκτόνο ευρέως φάσματος όπως το dichlofluanid, σε εναλλαγή με ένα δικαρβοξιμιδικό.

Στις περισσότερες περιπτώσεις η ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά αναπτύχθηκε ταχύτερα σε πληθυσμούς του *B. cinerea* και οδήγησε σε αποτυχία τα προγράμματα χημικής καταπολέμησης με benomyl. Μέχρι την εμφάνιση των βενζιμιδαζολικών δεν υπήρχε άλλο τόσο υψηλά αποτελεσματικό μυκητοκτόνο. Επακόλουθα η επαναλαμβανόμενη και αποκλειστική χρήση των βενζιμιδαζολικών είχε ως αποτέλεσμα να αναπτυχθεί γρήγορα ανθεκτικότητα, περιορίζοντας έτσι την ωφελιμότητά τους μέσα σε δύο ως τέσσερα χρόνια (Delp, 1994). Η ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά εμφανίζεται στον αγρό με υψηλά επίπεδα και συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών προκαλώντας έντονη μείωση στην αποτελεσματικότητα της χημικής καταπολέμησης του βοτρυτή με τα βενζιμιδαζολικά. Το γεγονός ότι η πλειονότητα των απομονώσεων αγρού του *B. cinerea* που είναι ανθεκτικά στα δικαρβοξιμιδικά είναι ταυτόχρονα ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά (διπλή ανθεκτικότητα), οφείλεται στο γεγονός ότι σε όλες τις περιπτώσεις τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν για την καταπολέμηση του βοτρυτή πριν τα δικαρβοξιμιδικά. Η διασταυρωτή ανθεκτικότητα μελετήθηκε με ιδιαίτερη λεπτομέρεια για τον *B. cinerea*. Σαν κανόνας η διασταυρωτή ανθεκτικότητα καλύπτει όλα τα δικαρβοξιμιδικά ενώ εκτείνεται και σε μυκητοκτόνα από την ομάδα των αρωματικών υδρογονανθράκων. Καμμία διασταυρωτή ανθεκτικότητα δεν υπάρχει με τα βενζιμιδαζολικά, καθώς η ανθεκτικότητα στα δύο μυκητοκτόνα είναι το αποτέλεσμα ανεξάρτητων γεγονότων μεταλλάξεων σε διαφορετικά γονίδια, που προκαλούνται από διακριτές δυνάμεις επιλογής από τις μεταχειρίσεις με τα μυκητοκτόνα (Pollastro *et al.*, 1996).

Σύμφωνα με τους Farettra and Pollastro (1991, 1993), η ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και στους δύο φαινοτύπους καθορίζεται από αλληλόμορφα του ίδιου γονιδίου που το ονόμασαν *Mbc1*, ενώ μετά από γενετικές μελέτες που έγιναν σε απομονώσεις αγρού και εργαστηριακά μεταλλαγμένα στελέχη, οι ίδιοι συγγραφείς έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά κωδικοποιείται από ένα μόνο πολυμορφικό επικρατές γονίδιο, που το ονόμασαν *Daf1*, με πολλές κατηγορίες αλληλομόρφων που είναι υπεύθυνα για ανάλογους φαινοτύπους στα μυκητοκτόνα. Στήν περίπτωση των δικαρβοξιμιδικών παρατηρείται μια αντίθετη σχέση μεταξύ βαθμού ανθεκτικότητας και προσαρμοστικότητας. Έτσι στην πράξη επικρατούν στελέχη με μέτρια μάλλον ανθεκτικότητα. Με μια αύξηση στη δόση ή τη συχνότητα των επεμβάσεων μπορούμε να έχουμε και πάλι ικανοποιητικά αποτελέσματα στη χημική καταπολέμηση (Hewitt, 1998). Αντίθετα τα ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά στελέχη προσαρμόζονται εύκολα καθώς ανταγωνίζονται με επιτυχία τους ευαίσθητους πληθυσμούς στη φύση και η ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά είναι σταθερή στο χρόνο (Smith, 1994). Κατά τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονώσεων του *B. cinerea* δεν διαπιστώθηκε η παρουσία στελεχών του μύκητα με υψηλή ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά. Αυτοί οι φαινότυποι γενικά δείχνουν υπερευαισθησία στην υψηλή οσμωτική πίεση, η οποία σε συνδυασμό με την μειωμένη παθογένεια αυτών των στελεχών ίσως εξηγούν την σπανιότητά τους στον αγρό (Leroux *et al.*, 1999). Πάντως η υψηλή ευαισθησία στην οσμωτική πίεση που πιθανώς επηρεάζει την παθογένεια και την προσαρμοστικότητα των στελεχών Dic HR δεν φαίνεται να ισχύει για τα στελέχη Dic MR ή τα ετεροκάρυα που περιέχουν μεγάλη αναλογία πυρήνων από στελέχη DicS (Farettra and Pollastro, 1993). Σε επιδημιολογικές μελέτες που έγιναν στην Ελλάδα

(Pappas, 1997), μολύνσεις που προκλήθηκαν από απομονώσεις Dic MR ή Dic MR Ben HR, ήταν ασυνήθιστες στην αρχή της καλλιεργητικής περιόδου. Παρόλα αυτά, τόσο η εμφάνιση όσο και η συχνότητα των μολύνσεων από τέτοιες απομονώσεις αυξάνονταν σταθερά με την πρόοδο της καλλιεργητικής περιόδου και στη συνέχεια μειώνονταν μετά τη λήξη των ψεκασμών με δικαρβοξυμιδικό μυκητοκτόνο. Σε αντίθεση, προσβολές που προκαλούνταν από απομονώσεις που έδειχναν υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά αλλά ευαίσθησια στα δικαρβοξυμιδικά, ήταν συχνές σε όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (Pappas, 1997).

Σε πολλούς μύκητες, συμπεριλαμβανομένου και του *B. cinerea*, έχει δείχθει ότι η πρόσδεση του carbendazim στην τουμπουλίνη των στελεχών που είναι ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά ήταν ασθενέστερη σε σύγκριση με τα στελέχη αγρίου τύπου. Αυτό το φαινόμενο που σχετίζεται πιθανόν με την ποικιλία στην αλληλουχία των αμινοξέων της β-τουμπουλίνης ίσως προκαλεί τροποποίηση στη θέση πρόσδεσης των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων στην τουμπουλίνη. Μεταλλαγές στο κωδικόνιο 198 στο δομικό γονίδιο της β-τουμπουλίνης θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αυξημένη πρόσδεση στην τουμπουλίνη συστατικών που εμφανίζουν αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά όπως για παράδειγμα το diethofencarb (Yarden and Katan, 1993). Το φαινόμενο της αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας των υψηλά ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών, επεκτείνεται και σε άλλα *N*-φαινυλκαρβαμίδια (barban, chlorpropham, MDPC) και σε διάφορα ζιζανιοκτόνα των οποίων ο πρωταρχικός στόχος δράσης δεν είναι οι μικροσωληνίσκοι (Legoux and Gredt, 1989). Η ύπαρξη στελεχών στον άγριο πληθυσμό του *B. cinerea* με αλληλόμορφα *Mbc1R* που καθορίζουν ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά αλλά δεν καταλήγουν σε ευαίσθησια στα φαινυλοκαρβαμικά, δείχνει ότι στρατηγικές προστασίας των καλλιεργειών που περιλαμβάνουν το μίγμα carbendazim + diethfencarb, μπορεί να χάσουν την αποτελεσματικότητά τους μακροπρόθεσμα, μετά από υψηλή πίεση επιλογής που ευνοεί την επικράτηση στελεχών που δεν είναι ευαίσθητα σε κανένα από τα δύο μυκητοκτόνα (Farettra and Pollastro, 1993). Από τα ανωτέρω φαίνεται ότι η συνεχής χρήση του μίγματος carbendazim + diethofencarb στον αγρό, αν και δίνει επί του παρόντος ικανοποιητικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση του βοτρυτή εκεί που επικρατούν ανθεκτικά στελέχη στα βενζιμιδαζολικά, εντούτοις επιλέγει στελέχη διπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμικά.

Κατά τον έλεγχο της ευαισθησίας των στελεχών στο dichlofluanid με τη δοκιμή βλάστησης των σπορίων δεν διαπιστώθηκαν φαινότυποι με μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid. Απομονώσεις με μειωμένη ευαισθησία *in vitro* στο dichlofluanid (Dich MS) διαπιστώθηκαν σε διάφορες έρευνες (Ελένα και Παππάς, 1989; Polastro *et al.*, 1996; Pappas, 1997) και η βλάστηση των σπορίων των απομονώσεων αυτών παρεμποδίζεται σε μέσο που περιέχει περισσότερο από 3 μg dichlofluanid ml^{-1} (MIC). Αυτή η μικρή διαφοροποίηση στην παρεμποδιστική συγκέντρωση *in vitro* των φαινοτύπων DichMS δεν φαίνεται να έχει σημαντική πρακτική σημασία για τον έλεγχο της ασθένειας στον αγρό, πιθανόν γιατί οι συνήθως εφαρμοζόμενες δόσεις του μυκητοκτόνου στον αγρό (0.1% δ.ο. ή και μεγαλύτερες) είναι πολύ μεγαλύτερες από τις απαιτούμενες παρεμποδιστικές συγκεντρώσεις για τη βλάστηση σπορίων των στελεχών Dich MS που καταγράφονται *in vitro* (Pappas, 1997). Ανάλογα ο Polastro *et al.* (1996) διαπιστώνει ότι οι δόσεις του μυκητοκτόνου, πρέπει να είναι ακόμη αποτελεσματικές στην πρόληψη προσβολών από σπόρια, καθώς η βλάστησή τους παρεμποδίζεται με συγκεντρώσεις μικρότερες από 1 μg ml^{-1} ακόμη και για υψηλά ανθεκτικά στελέχη. Αυτό ίσως εξηγεί γιατί στην πράξη, σε αντίθεση με τα βενζιμιδαζολικά και τα δικαρβοξυμιδικά, η παρουσία ανθεκτικών στο dichlofluanid απομονώσεων έχει χρεωθεί για αποτυχίες στην καταπολέμηση μόνο σε λίγες περιπτώσεις (Malathrakis, 1989), ενώ δεν υπάρχουν αναφορές μειωμένης αποτελεσματικότητας στην καταπολέμηση του βοτρυτή με το dichlofluanid σε άλλες περιοχές της Ελλάδας (Pappas and

Elena, 1992) και σε χώρες στις οποίες εφαρμόζεται το μυκητοκτόνο στην καταπολέμηση του Βοτρύτη για πολλά χρόνια (Legoux *et al.*, 1999). Ο Pollastro *et al.*, (1996), προτείνει ότι η ανθεκτικότητα στο dichlofluanid ελέγχεται από τουλάχιστον 2 επικρατή γονίδια που ονομάστηκαν *Dic1* και *Dic2* με αλληλόμορφα που κωδικοποιούν για ευαισθησία, μέτρια ανθεκτικότητα και υψηλή ανθεκτικότητα. Τα γονίδια αυτά κληρονομούνται με Μενδελικό τρόπο κληρονομικότητας σε απογόνους φυλετικών διασταυρώσεων. Το πώς τα γονίδια ανθεκτικότητας λειτουργούν παραμένει άγνωστο. Η ανθεκτικότητα σε ένα ευρέως φάσματος μυκητοκτόνο σαν το dichlofluanid δεν μπορεί να προκαλείται από τροποποίηση των θέσεων δράσης αλλά είναι πιθανόν να οφείλεται σε τροποποιημένη απορρόφηση της ουσίας από το κύτταρο ή αποτοξικοποίηση της. Ο Pollastro *et al.*, (1996) προτείνει ότι τα γονίδια ανθεκτικότητας μπορεί να εμπλέκονται σε μηχανισμούς αποτοξικοποίησης και πιθανόν στη ρύθμιση παραγωγής θειόλης. Σε μελέτη των ιδιοτήτων των ανθεκτικών στο dichlofluanid στελεχών, ο Rewal *et al.* (1991) διαπιστώνει έλλειψη προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών στο dichlofluanid στελεχών σε σύγκριση με τα ευαίσθητα στελέχη, ενώ υποστηρίζει ότι η ανθεκτικότητα στο dichlofluanid σε απομονώσεις αγρού εξαφανίστηκε μετά από 12 βδομάδες απουσίας του μυκητοκτόνου. Επίσης διαπιστώνει μειωμένη ικανότητα των σπορίων από ανθεκτικές απομονώσεις να μολύνουν φυτά παρουσία των ευαίσθητων στελεχών. Παρότι το μόλυσμα του μυκηλίου μπορούσε με επιτυχία να μολύνει φυτά εντούτοις σημαντικά για την επιδημιολογία της ασθένειας είναι τα σπόρια και όχι το μυκήλιο.

Από τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η ανθεκτικότητα στο carbendazim, ανιχνεύεται πολύ εύκολα σε δοκιμές βλάστησης σπορίων. Σε δοκιμές που γίνονται σε τεχνητά μέσα που περιέχουν carbendazim, οι απομονώσεις ταξινομούνται ανάλογα με την ελάχιστη δόση που παρεμποδίζει την κανονική βλάστηση και τη διαμόρφωση του βλαστικού σωλήνα (MIC). Η βλάστηση των σπορίων πραγματοποιείται μετά από 16-20 ώρες. Παρουσία του carbendazim σε συγκεντρώσεις $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$, τα ευαίσθητα σπόρια βλαστάνουν αλλά παράγουν κοντούς βλαστικούς σωλήνες που αναπτύσσονται σε μήκος ένα, δύο ή λίγα κύτταρα, αλλά στη συνέχεια παραμορφώνονται, διογκώνονται και συχνά διαρρηγνύονται. Σε αντίθεση οι βλαστικοί σωλήνες των ανθεκτικών στελεχών αναπτύσσονται κανονικά σε συγκέντρωση $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ και δεν διακρίνονται από αυτά που βλαστάνουν σε μέσο χωρίς μυκητοκτόνο. Γενικά, υπάρχει καλή συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ των *in vitro* δοκιμών και της συμπεριφοράς του carbendazim στον αγρό (Staub & Sozzi, 1984).

Με αντίστοιχη ευκολία διαπιστώνεται η ανθεκτικότητα στελεχών στο diethofencarb. Το diethofencarb προκαλεί μορφολογικές ανωμαλίες σε στελέχη του *Botrytis cinerea* ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα σε συγκέντρωση $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$. Οι βλαστικοί σωλήνες παραμορφώνονται και διογκώνονται και δεν παρατηρείται παραπέρα επέκταση των υφών. Αυτές οι μορφολογικές ανωμαλίες είναι παρόμοιες με αυτές των στελεχών άγριου τύπου που μεταχειρίζονται με βενζιμιδαζολικά.

Η ανθεκτικότητα στο μίγμα carbendazim + diethofencarb μπορεί επίσης να διαπιστωθεί με τις δοκιμές βλάστησης σπορίων, καθώς τόσο στους φαινότυπους Ben HR Pcm S όσο και στους Ben S Pcm HR τα σπόρια βλαστάνουν αλλά οι βλαστικοί σωλήνες που δημιουργούνται αυξάνονται σε μήκος ένα ως λίγα κύτταρα αλλά είναι διογκωμένοι και παραμορφωμένοι.

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

Με το dichlofluanid, τα ευαίσθητα σπόρια δεν βλαστάνουν σε συγκέντρωση του μυκητοκτόνου $1 \mu\text{g ml}^{-1}$, ενώ τα σπόρια των στελεχών που παρουσιάζουν μειωμένη

ευαισθησία βλαστάνουν σε συγκέντρωση $1 \mu\text{g ml}^{-1}$, αλλά παρεμποδίζονται να βλαστήσουν σε συγκέντρωση $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ dichlofluanid. Πάντως στην ταξινόμηση των απομονώσεων ως προς την ευαισθησία τους στο dichlofluanid με τη δοκιμή βλάστησης των σπορίων τόσο Hunter *et al.*, (1988) όσο και ο Pollastro *et al.*, (1996) συμφωνούν ότι είναι καθοριστικές, τόσο η προσεκτική τυποποίηση των πειραματικών συνθηκών, όσο και η συγκέντρωση των σπορίων κατά τη δοκιμή. Όταν η πυκνότητα των σπορίων που χρησιμοποιούνται ήταν μεγαλύτερη, τα σπόρια βλάσταναν και ανέπτυσαν κανονικούς βλαστικούς σωλήνες ακόμη και σε συγκέντρωση $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ σε DA (dextrose agar), ανεξάρτητα από το φαινότυπο ανθεκτικότητας (Pollastro *et al.*, 1996).

Με τις δοκιμές βλάστησης των σπορίων παρουσία μυκητοκτόνου, δίνεται η δυνατότητα γρήγορης ανίχνευσης μεγάλου αριθμού απομονώσεων μυκήτων όπως ο *Botrytis cinerea* που αναπτύσσονται εύκολα *in vitro* και παράγουν μεγάλο αριθμό σπορίων (Lorenz, 1994). Χρονοβόρα είναι η διαδικασία προετοιμασίας των υλικών ανάπτυξης, ενώ απαιτείται εργαστηριακός εξοπλισμός και εμπειρία. Επίσης πρόβλημα μπορεί να προκύψει στις δοκιμές ανίχνευσης ευαισθησίας με τη βλάστηση των σπορίων σε περιπτώσεις απομονώσεων, ιδιαίτερα μερικών ανθεκτικών, που παρουσιάζουν αργή ανάπτυξη ή παράγουν μικρό αριθμό σπορίων. Πάντως η μέθοδος ελέγχου της βλάστησης των σπορίων παρουσία μυκητοκτόνου, θεωρείται αξιόπιστη για την καταγραφή προσβολών στον αγρό που προκαλούνται από απομονώσεις του *Botrytis cinerea* ανθεκτικές στα μυκητοκτόνα (Pappas, 1997).

Μέρος Γ': Βιβλιογραφία

- 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.
- Bollen, G.J. and Scholten, G. (1971) Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **77**, 83-90.
- Brent, K.J. (1991) Monitoring fungicide resistance: Purposes, Procedure and Progress. In *Resistance 91 – Achievement and developments in combating Pesticide Resistance*, pp.1-18, eds. Denholm, I., Devonshire, A. and Hollomon, D., SCI.
- Γεωργόπουλος, Σ. Γ. και Ζιώγας, Β.Ν. (1992) Εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών. *Αρχές και Μέθοδοι Καταπολέμησης των Ασθενειών των Φυτών*, σελ. 195-204, Αθήνα.
- Davidse, L.C. and Ishii, T. (1995) Biochemical and molecular aspects of benzimidazoles, *N*- phenylcarbamates and *N*- phenylformamidoxines and the mechanisms of resistance to these compounds in fungi. In *Modern Selective Fungicides*, pp. 305-322, Editor, Lyr, H., Gustav Fisher, Jena, Germany.
- Delp, C.J. (1994) Resistant management strategies for benzimidazoles. In *Fungicide resistance in North America*, pp.41- 43, Editor, Delp, C.J., APS Press.
- Elad, Y. (1992) Reduced sensitivity of *Botrytis cinerea* to two sterol- biosynthesis inhibiting fungicides: fenetrazole and fenethanil. *Plant Pathology* **41**, 47 –54.
- Ελενα, Κ. και Παππάς, Α.Χ. (1989) Ευαισθησία απομονώσεων του *Botrytis cinerea* Pers. στο dichlofluanid, chlorothalonil και captan. *5^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο*, Θεσ/νίκη, 47.
- FAO (1982) Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides—Detection and measurement of fungicide resistance 1982: FAO Method Nos. 24-30. *FAO Plant Protection Bulletin* **30**, 36-71.
- Faretra, F. and Pollastro, S. (1991) Genetic basis of resistance to benzimidazoles and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research* **95**, 943-951.
- Faretra, F. and Pollastro, S. (1993) Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) from nine countries. *Plant Pathology* **42**, 48 – 57.
- Foster, B. and Staub, T. (1996) Basis for use strategies of anilinopyrimidine and phenylpyrrole fungicides against *Botrytis cinerea*. *Crop Protection* **15**, 529 –537.
- FRAC, (1991) FRAC methods for monitoring fungicide resistance. *EPPO Bulletin*, 1991, **2**, 292-354.
- Georgopoulos, S. G. (1982) Detection and measurement of fungicide resistance. In *Fungicide resistance in Crop Protection*, pp. 24 –31, eds. Deker, J. and Georgopoulos, S.G., PUDOC, Wageningen, The Netherlands.
- Georgopoulos, S.G. and Dekker, J. (1982) Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. *FAO Plant Protection Bulletin* **30**, 39- 42.
- Groves, J.D. and Fox, R.T.V. (1988) Tubulin from *Botrytis cinerea* and the potential for development of an immunodiagnostic for bendimidazole resistance.

- Proceedings of Brighton Crop protection Conference – Pests and Diseases-1988*, 415-420, British Crop Protection Council, Surrey, UK.
- Gullino, M.L. and Garibaldi, A. (1986) Fungicide resistance monitoring as an aid to tomato grey mould management. *Proceedings of Brighton Crop protection Conference – Pests and Diseases- 1986*, **2**, 499- 505, British Crop Protection Council, Surrey, UK.
- Hewitt, H.G. (1998) Fungicide performance. In *Fungicides in Crop Protection*, Editor Hewitt, H.G., CAB International .
- Hilber, V.W. and Hilber-Bodmer, M. (1998) A reliable method for testing the sensitivity of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidines *in vitro*. *Pesticide Science* **47**, 241-247.
- Hollomon, D.W. (1991) Molecular Biology and diagnostics in disease control. In *Resistance 91 – Achievement and developments in combating Pesticide Resistance*, pp.262- 271, eds. Denholm, I., Devonshire, A. and Hollomon, D., SCI.
- Hunter, T., Locke, T. and Carter, T. (1988) Influence of test medium and age of inoculum on the sensitivity of *Botrytis cinerea* to dichlofluanid in laboratory assays. *ISPP Chemical Control Newsletter* **10**, 30-31.
- Kato, T. (1994) Negative cross – resistance activity of MDPC and diethofencarb against benzimidazole –resistant fungi. In *Fungicide resistance in North America*, p. 40, Editor, Delp, C.J., APS Press.
- Λάσκαρης, Δ., Παππάς, Α.Χ. και Κυριακόπουλος, Χ.Κ.(1994) Εμφάνιση στελεχών του *Botrytis cinerea* Pers. με διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα σε καλλιέργειες θερμοκηπίου. 7^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Αθήνα.
- Leroux, P. and Gredt, M. (1979) Negative cross resistance phenomena in *B. cinerea* Pers., between benzimidazole fungicides and carbamate herbicides. *Phytiatrie-Phytopharmacie* **28**, 79-86.
- Leroux, P. and Gredt, M. (1989) Negative cross- resistance of benzimidazole – resistant strains of *Botrytis cinerea*, *Fusarium nivale* and *Pseudocercospora herpotrichoides* to various pesticides. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **99** (S1), 121- 127.
- Leroux, P. (1996) Recent developments in the mode of action of fungicides. *Pesticide Science* **47**, 191-197.
- Leroux, P. and Descotes, A. (1996) Resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides and strategies for its control in the Champagne vineyards. *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference- Pests and Diseases- 1996*, pp.131-136, British Crop Protection Council, Surrey, UK.
- Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., Gredt M. (1999) Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* **18**, 687-697.
- Lorenz, G. (1994) Dicarboximide fungicides: History of resistance development and monitoring methods. In *Fungicide resistance in North America*, pp.45- 51, Editor Delp, C.J., APS Press.
- Malathrakis, N.E. (1989) Resistance of *Botrytis cinerea* to dichlofluanid in greenhouse vegetables. *Plant Disease* **73**, 138-141.
- Μπέσα Α. Π. (1995) Βιολογικές ιδιότητες στελεχών του *Botrytis cinerea* με ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα. Πτυχιακή μελέτη, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Γεωπονίας Ζωικής και Φυτικής Παραγωγής, 1995.

- Ogawa, J. M., Manjii, B.T., Heaton, C.R., Petrie, J. and Sonoda, R. M. (1979) Methods for detecting and monitoring the resistance of plant pathogens to chemicals. In *Pest Resistance to fungicides*, pp. 117 – 162, eds. Georghiou, G.P. and Saito, T., Plenum Press, New York.
- Παναγόπουλος Χ.Γ. (1995) Ασθένειες Τομάτας, Μελιτζάνας, Πιπεριάς και Μπάμιας. *Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών*, σελ. 76-87, Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα.
- Παναγόπουλος Χ.Γ. (1997) Ασθένειες της αμπέλου. *Ασθένειες καρποφόρων δέντρων και Αμπέλου* σελ. 387-392. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα.
- Pappas, A.C. and Fisher, D.J. (1979) A comparison of the mechanisms of action of vinclozolin, procymidone, iprodione and prochloraz against *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science* **10**, 239-246.
- Pappas, A.C. (1982) Inadequate control of grey mould on cyclamen by dicarboximide fungicides in Greece. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **89**, 52- 58.
- Pappas, A.C. and Elena, K. (1992) Effect on gray mould of presence of *Botrytis cinerea* strains showing reduced sensitivity to dichlofluanid. 10th International Botrytis Symposium, 5- 10 April 1992, Heraklion, Crete, Greece. In *Recent advances Botrytis Research*, pp. 252- 256, eds. Verhoeff, K., Malathrakis, N.E. and Williamson, B., PUDOC Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Pappas, A.C. (1997) Evolution of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in protected crops in Greece. *Crop Protection* **16**, 257-263.
- Pollastro, S., Faretra, F., Di Canio, V. and De Guido, A. (1996) Characterization and genetic analysis of field isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to dichlofluanid. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 607-613.
- Pontzen, R. and Scheinpflug, H. (1989) Effects of triazole fungicides on sterol biosynthesis during spore germination of *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* and *Puccinia graminis* f. sp. tritici. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **95** (S1), 151- 160.
- Raposo, R., Delcan, J., Melgarejo, P. and Gomez, V. (1994) Multiple fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from commercial green houses in southeastern Spain. *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference- Pests and diseases- 1994*, pp. 493 –498, British Crop Protection Council, Surrey, UK.
- Rewal, N., Coley-Smith, J.R. and Sealy – Lewis, H.M. (1991) Studies on resistance to dichlofluanid and other fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* **40**, 554-560.
- Sisler, H.D. (1994) Dicarboximide Fungicides Mechanisms of action and Resistance. In *Fungicide resistance in North America*, p. 52, Editor Delp, C.J., APS Press.
- Smith, C.M. (1994) History of benzimidazole use and resistance. In *Fungicide resistance in North America*, pp.23-24, Editor Delp, C.J., APS Press.
- Staub, T., Dahmen, H., Urech, P. A., Schwinn, F. (1979) Failure to select for *in vivo* resistance in *Phytophthora infestans* to acylalanine fungicides. *Plant Disease Reports* **64**, 385-389.
- Staub, T. and Sozzi D. (1984) Fungicide resistance: a continuing challenge. *Plant disease* **68**, 1026-1031.
- Steel, C.C. and Nair, N. G. (1993) The physiological basis of resistance to the dicarboximide fungicide iprodione in *Botrytis cinerea*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **47**, 60-68.

- Stehmann, C. and De Waard, M. (1995) Accumulation of tebuconazole by isolates of *Botrytis cinerea* differing in sensitivity to sterol demethylation inhibiting fungicides. *Pesticide Science* **45**, 311-318.
- Trivellas, A. E. (1994) Benzimidazole resistance monitoring techniques and the use of monitoring studies to guide benomyl marketing. In *Fungicide resistance in North America*, pp.28-30, Editor Delp, C.J., APS Press.
- Yarden, O. and Katan, T. (1993) Mutation leading to substitutions at aminoacids 198 and 200 of beta tubulin that correlated with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **83**, 1478-1483.

