

ΠΑΠΑΚΟΥ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ & ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
Αριθ. Πρωτοκ. 87
Ημερομηνία 30-6-1998

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ
ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ *BOTRYTIS CINEREA*



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΕΤΑΙ ΣΤΟ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΒΟΛΟΣ 1998

ΘΕΜΑ:

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ
ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ *BOTRYTIS CINEREA*



ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ:
ΠΑΠΑΚΟΥ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:
ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: Α.Χ. ΠΑΠΠΑΣ (ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)
ΜΕΛΗ: Ι. ΤΣΙΤΣΙΠΗΣ (ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)
Σ. ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΥ (ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ)



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

Αριθ. Εισ.: 30/Δ
Ημερ. Εισ.: 05-08-2003
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΓΦΖΠ
1998
ΠΑΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070087

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	7
A. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
2. ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ - ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	11
3. ΞΕΝΙΣΤΕΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ.....	13
4. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ.....	16
4.1. Κονιδιοφόροι και κονίδια.....	16
4.2. Χλαμυδοσπόρια.....	17
4.3. Απρεσσόρια.....	17
4.4. Σκληρώτια.....	17
5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....	18
5.1. Ρυθμιστές ανάπτυξης.....	18
5.2. Θερμοκρασία.....	18
5.3. Σχετική υγρασία.....	19
5.4. Φως.....	19
5.5. ΡΗ.....	20
5.6. Ηλικία και διατροφή.....	20
5.7. Ατμοσφαιρικά αέρια και ρυπαντές.....	20
5.8. Ατμοσφαιρική πίεση.....	21
6. ΜΟΛΥΝΣΗ.....	22
6.1. Από κονίδια.....	22
6.2. Από μυκήλιο.....	23
7. ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ.....	24
7.1. Πληγές.....	24
7.2. Φυτικά υπολείμματα.....	24
7.3. Φως.....	25
7.4. Υδατάνθρακες.....	25
7.5. Μικροοργανισμοί.....	25
7.6. Θερμοκρασία.....	25
7.7. Υγρασία.....	26
7.8. Πτητικοί μεταβολίτες.....	26
7.9. Άλλα παρασιτοκτόνα.....	26
8. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ.....	27
8.1. Ένζυμα.....	27
8.2. Τοξίνες.....	28
8.3. Κηλίδες «φάντασμα» (ghost spot).....	28
8.4. Οσμωτικές πιέσεις.....	29
8.5. Επιδράσεις στον μεταβολισμό των ξενιστών.....	29

9. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ.....	30
10. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	33
11. ΑΜΥΝΑ ΞΕΝΙΣΤΩΝ.....	36
11.1. Μηχανική άμυνα.....	36
11.2. Χημική άμυνα.....	36
12. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.....	37
12.1. Καλλιεργητικές μέθοδοι.....	37
12.2. Βιολογικές μέθοδοι.....	37
12.3. Χημικές μέθοδοι.....	39
13. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ.....	40
14. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ.....	43
14.1. Βενζιμιδαζολικά.....	43
14.1.1. Μηχανισμός δράσης των βενζιμιδαζολικών.....	45
14.1.2. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας.....	46
14.1.2.1. Διαφοροποιημένη συγγένεια της tubulin με τα βενζιμιδαζολικά.....	46
14.1.2.2. Αλλαγμένη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων.....	47
14.1.2.3. Δευτερεύουσες μεταλλάξεις σε γονίδια tubulin.....	47
14.1.2.4. Αλλαγές αμινοξέων στην b-tubulin.....	48
14.2. Φαινυλοκαρβαμιδικά.....	49
14.2.1. Μηχανισμός δράσης των φαινυλοκαρβαμιδικών.....	50
14.3. Δικαρβοξιμιδικά.....	50
14.3.1. Μηχανισμός δράσης των δικαρβοξιμιδικών.....	51
14.3.2. Ανθεκτικότητα του <i>B.cinerea</i> στα δικαρβοξιμιδικά.....	52
14.4. Σουλφίδια.....	52
14.4.1. Μηχανισμός δράσης των σουλφιδίων.....	53
14.5. Εμπειρία στον αγρό.....	54
14.6. Διασταυρωτή ανθεκτικότητα.....	55
14.7. Προσαρμοστικότητα ανθεκτικών στελεχών.....	57
14.8. Μορφολογικές και φυσιολογικές ιδιότητες.....	58
14.9. Παθογόνος ικανότητα.....	59
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	63
15. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	65
15.1. Αναγνώριση ανθεκτικών στελεχών.....	65
15.2. Κατάταξη απομονώσεων <i>B.cinerea</i> βάση του επιπέδου ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά , δικαρβοξιμιδικά , σουλφίδια και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα.....	67
15.3. Έλεγχος παθογόνου ικανότητας.....	68
15.4. Παραγωγή σπορίων.....	70
15.5. Σχηματισμός σκληρωτίων.....	70
15.6. Έλεγχος εμφάνισης ανθεκτικών θυγατρικών απομονώσεων.....	71
15.7. Έλεγχος ανθεκτικότητας μονόσπορων απομονώσεων <i>B.cinerea</i> από διάφορες περιοχές και καλλιέργειες.....	72
15.8. Παραγωγή σπορίων και σκληρωτίων μονόσπορων απομονώσεων.....	73
16. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	74
16.1. Αναγνώριση ανθεκτικών στελεχών.....	74

16.2. Κατάταξη απομονώσεων <i>B.cinerea</i> βάση του επιπέδου ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά , δικαρβοξιμιδικά, σουλφίδια και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα.....	74
16.3. Έλεγχος παθογόνου ικανότητας ανθεκτικών απομονώσεων.....	75
16.4. Παραγωγή σπορίων.....	75
16.5. Παραγωγή σκληρωτίων.....	76
16.6. Έλεγχος εμφάνισης ανθεκτικών θυγατρικών απομονώσεων.....	78
16.7. Έλεγχος ανθεκτικότητας μονόσπορων απομονώσεων <i>B. cinerea</i> από διάφορες περιοχές και καλλιέργειες.....	78
16.8. Κατάταξη διάφορων απομονώσεων <i>B.cinera</i> βάση του επιπέδου ανθεκτικότητας στις διάφορες κατηγορίες φαρμάκων.....	79
16.9. Παραγωγή σπορίων και σκληρωτίων διαφόρων απομονώσεων <i>B. cinerea</i>	79
17. ΣΗΖΗΤΗΣΗ.....	80
Γ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ (Πίνακες - Διαγράμματα).....	86
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	106

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Ευχαριστώ επίσης τους : Γεωπόνο Χριστόπουλο Κ. , τις συμφοιτήτριές μου Κεφαλογιάννη Θ. και Σακελλάρη Μ. καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα Μαργαριτόπουλο Ι. για την βοήθεια στην στατιστική ανάλυση .

ΜΕΡΟΣ Α

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην παρούσα μελέτη έγινε έλεγχος παθογόνου ικανότητας και φαινοτυπικής σταθερότητας ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα στελεχών του *Botrytis cinerea*

Η μελέτη αποτελείται από το βιβλιογραφικό, το πειραματικό μέρος και το παράρτημα

Στο βιβλιογραφικό μέρος γίνεται μια προσπάθεια ανασκόπησης της ελληνικής και ξένης βιβλιογραφίας πάνω στην ταξινόμηση τη βιολογία του παθογόνου και την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του *B.cinerea* στα διάφορα μυκητοκτόνα που κυκλοφορούν στο εμπόριο και ανήκουν στις κατηγορίες των βενζιμιδαζολικών, σουλφιδίων, φαινυλοκαρβαμιδικών, δικαρβοξιμιδικών.

Σ' αυτό το τμήμα της εργασίας δίνεται μια περιγραφή της φυσιολογίας του παθογόνου, των κατάλληλων συνθηκών πρόκλησης μόλυνσης και ανάπτυξης (θερμοκρασία, υγρασία, φως κ.α). Γίνεται αναφορά στα συμπτώματα που εμφανίζονται στα διάφορα φυτικά όργανα μετά την εγκατάσταση του παθογόνου και δίνονται στοιχεία σχετικά με την παθογενέση, την επιδημιολογία του μύκητα και την άμυνα των ξενιστών. Τέλος δίνονται στοιχεία για την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου στα μέσα χημικής καταπολέμησης που διαθέτουμε.

Στο πειραματικό μέρος έγινε κατάταξη απομονώσεων *B.cinerea* βάση του επιπέδου ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμιδικά, σουλφίδια και φαινυλοκρβαμιδικά μυκητοκτόνα.

Απομονώσεις που αναπτύχθηκαν επάνω σε εμπλουτισμένο υπόστρωμα με συγκεντρώσεις από 1 έως 100 $\mu\text{g/ml}$ των ανωτέρω μυκητοκτόνων χαρακτηρίσθηκαν σαν ευαίσθητες, μετρίως ανθεκτικές και ανθεκτικές αντίστοιχα.

Η παθογόνος ικανότητα των απομονώσεων, εξετάσθηκε πάνω σε πέταλα τριανταφυλλιάς τα οποία μολύνθηκαν με σπόρια παθογόνων απομονώσεων *B.cinerea*. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές της παθογόνου ικανότητας μεταξύ των ανθεκτικών και των ευαίσθητων απομονώσεων. Ακόμη έγινε έλεγχος φαινοτυπικής σταθερότητας ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα απομονώσεων κατόπιν ανάπτυξης

θυγατρικών απομονώσεων (Reisolations) από τις μητρικές με τις οποίες μολύνθηκαν τα πέταλα τριανταφυλλιάς. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια τάση υπεροχής των ανθεκτικών φαινοτύπων έναντι των ευαίσθητων.

Έγινε εκτίμηση της ικανότητας παραγωγής σπορίων και σκληρωτίων των απομονώσεων από όπου τα άγρια στελέχη έδωσαν μεγαλύτερη παραγωγή σκληρωτίων όπως και τα μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά, ενώ μεγαλύτερη παραγωγή σπορίων είχαν οι μέτριας ανθεκτικότητας απομονώσεις στα δικαρβοξιμιδικά.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι οι ανθεκτικές και άγριου τύπου απομονώσεις παρουσιάζουν καλή προσαρμοστικότητα.

Στο πειραματικό μέρος περιλαμβάνεται η συζήτηση των αποτελεσμάτων στην οποία γίνεται μια σύνοψη των συμπερασμάτων που εξήχθησαν από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν. Ακόμη γίνεται αναφορά στα δεδομένα από πρόσφατες σχετικές μελέτες ερευνητών, που αναφέρονται στο βιβλιογραφικό μέρος. Βασικό συμπέρασμα της όλης εργασίας είναι ότι η συνεχής χρήση των μυκητοκτόνων στον αγρό επιλέγει ανθεκτικά στελέχη τα οποία στη συνέχεια αναπτύσσουν υψηλή προσαρμοστικότητα και παθογόνο ικανότητα. Δίνεται έμφαση στην επείγουσα χρήση νέων χημικών ενώσεων διαφορετικού τρόπου δράσης, καλλιεργητικών πρακτικών και χρήση βιολογικών μεθόδων καταπολέμησης για μείωση της ανθεκτικότητας και ολοκληρωμένης αντιμετώπισης του βοτρώτη σε συνθήκες αγρού.

Στο παράρτημα ,που αποτελεί το τρίτο μέρος της εργασίας,δίνονται τα αποτελέσματα του πειραματικού μέρους σε πίνακες και διαγράμματα, που είναι απαραίτητα για την ολοκλήρωση και τεκμηρίωση των συμπερασμάτων που εξήχθησαν μετά το τέλος της μελέτης.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γένος *Botrytis* (συστάθηκε το 1729), περιέχει ένα μεγάλο αριθμό ειδικευμένων παθογόνων (π.χ. *B. fabae* στα κουκιά *B. aclada* στο κρεμμύδι, *B. tulipae* στην τουλίπα) και προσβάλλει ένα μεγάλο αριθμό φυτών.

Η τεφρά σήψη (grey mold) που οφείλεται στο μύκητα *Botrytis cinerea* έχει παγκόσμια εξάπλωση. Προσβάλλει υπαίθριες καλλιέργειες όπως αμπέλια, αλλά είναι επίσης σημαντική ασθένεια σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες λαχανικών, λουλουδιών και φρούτων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της μεταφοράς. Εξαιτίας του ευρέως φάσματος προσβολών ο *Botrytis cinerea* προξένησε το μεγαλύτερο ενδιαφέρον από ότι κάθε άλλο ειδικευμένο είδος. Είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η προκαλούμενη ζημιά σε πολλές καλλιέργειες εξαρτώμενες από τον καιρό που επικρατεί κάθε φορά, ενώ οι οικονομικές απώλειες που συμβαίνουν είναι πάνω από 50%. Στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες οι απώλειες οφείλονται επίσης σε μεγάλη έκταση στο μικροκλίμα του θερμοκηπίου αν και οι επικρατούσες κλιματικές συνθήκες μπορούν να μεταβληθούν σε κάποιο βαθμό.

Ο παθογόνος μύκητας αναπτύσσεται επί υγιών, γηρασμένων, εξασθενημένων ή νεκρών φυτικών ιστών, προσβάλλει φυτά κάθε ηλικίας, όλα σχεδόν τα φυτικά όργανα και προκαλεί αναλόγως του είδους και ηλικίας των ιστών και των συνθηκών του περιβάλλοντος, συμπτώματα διαφόρων τύπων (κηλιδώσεις φύλλων, ανθέων και καρπών, έλκη βλαστών, σήψεις καρπών, ανθέων, κονδύλων, φυταρίων).

Κάτω από συνθήκες υψηλής υγρασίας ο μύκητας παράγει αγενώς καρποφορίες καθώς τα προσβλημένα όργανα καλύπτονται από τη χαρακτηριστική τεφρά εξάνθηση του παρασίτου που αποτελείται από τους κονιδιοφόρους και τα κονίδια του μύκητα. Αυτό είναι το πιο χαρακτηριστικό σύμπτωμα της προσβολής του παθογόνου.

Η ανάπτυξη του μύκητα ευνοείται από συνθήκες υψηλής υγρασίας 90 – 95% και θερμοκρασίες 17-23°C με αποτέλεσμα να αναπτύσσεται πολύ γρήγορα το μυκήλιο του παρασίτου και να σχηματίζονται άφθονοι

κονιδιοφόροι με τεράστιο αριθμό κονιδίων και κατά συνέπεια οι ζημιές να είναι τεράστιες όταν επικρατούν οι παραπάνω συνθήκες.

Η αντιμετώπιση της τεφράς σήψης συνίσταται στη λήψη όλων εκείνων των απαραίτητων μέτρων τα οποία συντελούν στη δημιουργία συνθηκών τέτοιων που δεν ευνοούν την ανάπτυξη και εξάπλωση της ασθένειας (καλός αερισμός θερμοκηπίων, αφαίρεση και απομάκρυνση των προσβλημένων καρπών, ανθέων, φύλλων, στελεχών, ολόκληρων φυτών κλπ). Αντιμετωπίζεται με βιολογική καταπολέμηση όπως χρήση βιολογικών σκευασμάτων (*Trichodex*) με βάση στελέχη του μύκητα *Trichoderma harzianum* (φυλή no 39) κάπως και με εφαρμογή σωστής χημικής καταπολέμησης. Τα μυκητοκτόνα που συνιστώνται για την καταπολέμηση της ασθένειας ανήκουν στις κατηγορίες των οργανικών μυκητοκτόνων ευρέως φάσματος δράσεως διασυστηματικών της ομάδας των βενζιμιδαζολικών και ειδικής δράσεως της ομάδας των δικαρβοξιμιδικών (Παναγόπουλος, 1995).

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

Μετά από έρευνες διαπιστώθηκε επαναδραστηριοποίηση των βενζιμιδαζολικών σε μίγματά τους με μυκητοκτόνα της ομάδας των φαινυλοκαρβαμιδικών. Η επαναδραστηριοποίηση αυτή οφείλεται στο φαινόμενο της αρνητικής διασταύρωσης ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν κυρίως τα φαινυλοκαρβαμιδικά παράγωγα με τα βενζιμιδαζολικά.

Ο σκοπός της μελέτης αυτής, είναι ο έλεγχος της παθογόνου ικανότητας και φαινοτυπικής σταθερότητας ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα στελεχών του *Botrytis cinerea*. Επίσης εξετάζεται η προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών σε σχέση με τα στελέχη αγρίου τύπου.

Επί του αντικειμένου στο πρώτο μέρος της διατριβής γίνεται μια ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, σχετικά με την ταξινόμηση, την μορφολογία και τη φυσιολογία του παθογόνου, τη συμπτωματολογία, την παθογένεση και επιδημιολογία της ασθένειας, καθώς επίσης και τα προβλήματα που εμφανίζει η εφαρμογή της χημικής καταπολέμησης στην πράξη.

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : Ζιώγας (1981), Μπούρμπος και Σκουντριάκης (1987), Παναγόπουλος (1993), Παππάς (1992), Verhoeff (1992).

2. ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ – ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Ο *Botrytis cinerea* είναι παθογόνος μύκητας που προκαλεί την ασθένεια που είναι γνωστή σαν τεφρά σήψη ή σαπίλα ή γκρίζα μούχλα (grey mould) που προσβάλλει ένα μεγάλο αριθμό φρούτων, λαχανικών και καλωπιστικών φυτών. Ο μύκητας *Botrytis cinerea* ανήκει στους Hyphomycetes των Αδηλομυκήτων. Αυτή είναι η ατελής του μορφή ενώ η τέλεια μορφή (εγγενής καρποφορία) του παρασίτου ονομάζεται *Botryotinia fuckeliana* (*Sclerotinia fuckeliana*). Ο *Botryotinia fuckeliana* είναι η τέλεια μορφή του *Botrytis cinerea*. Παράγει εγγενώς (ασκοσπόρια) με μείωση ετερόζυγων διπλοειδών πυρήνων.

Ανήκει στην τάξη Helotiales των δισκομυκήτων και σχηματίζεται από τα σκληρώτια του μύκητα τα οποία υπό ειδικές συνθήκες, παράγουν αποθήκια. Η τέλεια μορφή του παθογόνου εμφανίζεται στη φύση πολύ σπάνια.

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

Το γένος *Botryotinia* ο Whetzel (1945) το κατατάσσει στην οικογένεια Sclerotiniaceae, που δημιούργησε ο ίδιος, τα γένη της οποίας διαχώρισε, χρησιμοποιώντας σαν βασικό κριτήριο την ανατομία του.

Με βάση την ατελή ή κονιδιακή μορφή του παθογόνου αιτίου της τεφράς σήψης έχουμε την ακόλουθη συστηματική κατάταξη:

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

Ταξινομώντας με βάση την τέλεια μορφή έχουμε την παρακάτω συστηματική κατάταξη.

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

Σύμφωνα με τον Γεωργόπουλο (1984), οι ατελείς μύκητες των οποίων είναι γνωστή η εγγενής αναπαραγωγή, θα πρέπει να αναφέρονται με το όνομα της τέλει μορφής σύμφωνα με το Διεθνές Κώδικα Ονοματολογίας. Εν τούτοις επειδή πολλών μυκήτων η ατελής μορφή είναι η πιο συχνή και εκείνη, που βρίσκουμε συνήθως πάνω στα προσβλημένα φυτά, επιτρέπεται και η χρήση του ονόματος της ατελούς μορφής.

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : Γεωργόπουλος (1984), Jarvis (1977), Faretra and Grindle (1992), Παναγόπουλος (1995).

3. ΞΕΝΙΣΤΕΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Στις παρασιτικές ασθένειες και ο ξενιστής και το παθογόνο δεν κάνουν τίποτα άλλο από το να αγωνίζονται για την επιβίωσή τους. Το φυτό, ήδη κάτω από τον ανταγωνισμό άλλων φυτών για χώρο, φως, νερό και θρεπτικά συστατικά από το έδαφος, έχει το πρόσθετο βάρος να συντηρήσει έναν άλλο οργανισμό, ένα παράσιτο. Οι επιπτώσεις μπορεί να ποικίλλουν από ασήμαντες μέχρι θάνατο του φυτού πριν την παραγωγή απογόνων, πράγμα που συνεπάγεται τεράστιες οικονομικές ζημιές αλλά και κίνδυνο ως προς τη διατήρηση του είδους του φυτού. Πρέπει, συνεπώς, το φυτό να αναπτύξει μηχανισμούς ώστε το παθογόνο να του είναι, κατά το δυνατόν, λιγότερο καταστρεπτικό. Το παθογόνο, εξ' άλλου, πρέπει να παράγει ένα μεγάλο αριθμό απογόνων, ώστε μερικοί τουλάχιστον να έχουν καλή πιθανότητα να συναντήσουν κατάλληλο ξενιστή σε κατάλληλη κατάσταση βλάστησης με συνθήκες περιβάλλοντος κατάλληλες για τη μόλυνση.

Στη φύση υπάρχει μια ισορροπία, μια συνύπαρξη ξενιστών και παθογόνων χωρίς ούτε οι μεν ούτε τα δε να διατρέχουν άμεσο κίνδυνο αφανισμού. Αυτή όμως την ισορροπία έρχεται να διαταράξει ο άνθρωπος με την καλλιέργεια μεγάλων πολλών φορές εκτάσεων με ένα μόνο είδος φυτού ή και με μια μόνο ποικιλία. Δημιουργεί με αυτό τον τρόπο ιδιαίτερα ευνοϊκές συνθήκες για την επικράτηση ενός παρασίτου ή ενός μικρού αριθμού παρασίτων και την πρόκληση μεγάλων ζημιών.

Η τεφρά σήψη που οφείλεται στο μύκητα *Botrytis cinerea* είναι μια από τις πλέον διαδεδομένες και μεγάλης οικονομικής σημασίας ασθένειες των φυτών στις περιοχές που επικρατούν συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας τόσο σε θερμοκηπιακές, όσο και σε υπαίθριες καλλιέργειες. Στη χώρα μας αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες κηπευτικών και ανθέων κατά τη χειμερινή περίοδο, λόγω εντόνων προσβολών και δυσχεριών στην αντιμετώπισή του.

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* είναι ένα πολύ διαδεδομένο παθογόνο το οποίο μπορεί να ζει τόσο σαπροφυτικά όσο και παρασιτικά ή ημιπα-

σιτικά. Αν και είναι παράσιτο περισσότερο αδυναμίας μπορεί να προξενήσει τεράστιες ζημιές κάτω από ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης.

Η τεφρά σήψη προξενεί μεγάλες ζημιές ιδιαίτερα στα κηπευτικά κυρίως μετά από βροχή, δροσιά, ή πυκνή ομίχλη πριν την συγκομιδή και δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στις εξαγωγές αλλά και στην εγχώρια αγορά λόγω υποβάθμισης της ποιότητας των προϊόντων. Στις καλλιέργειες θερμοκηπίου (αγγούρι, πιπεριά, μελιτζάνα, τομάτα, φράουλα, κ.α.) όπου δημιουργούνται ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας για την ανάπτυξη του μύκητα η βοτρυτίδα προσβάλλει τα στελέχη, τα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς όπου προκαλεί χαρακτηριστικές κηλίδες σήψεως και ολοκληρωτική εξασθένηση των φυτών με αποτέλεσμα τη σοβαρή μείωση της παραγωγής.

Ο μύκητας σε θερμοκρασίες μικρότερες των 10°C προσβάλλει τα σπορόφυτα βολβωδών λαχανικών (κρεμμύδι, πράσο κ.α.) στην περιοχή του λαιμού καθώς τα φύλλα εξέρχονται από το έδαφος και τα ξηραίνει. Με υψηλότερες όμως θερμοκρασίες (>10°C) τα φυτά γίνονται ανθεκτικότερα και το φύλλωμα επιβιώνει και αναπτύσσεται.

Τα φυλλώδη λαχανικά (μαρούλι, αγκινάρα, ραδίκι, τεύτλα) προσβάλλονται σε όλα τα στάδια της ανάπτυξής τους. Στο μαρούλι το παθογόνο προκαλεί κυρίως μαλακή σήψη των κεφαλών και στην αγκινάρα προσβάλλει τα βράκτια, τις ανθοκεφαλές, τα στελέχη των φυτών και τα φύλλα.

Η τεφρά σήψη προσβάλλει τα υπέργεια μέρη (στελέχη, άνθη, μίσχους και λοβούς) των ψυχανθών και προκαλεί τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της ασθένειας και την εμφάνιση της χαρακτηριστικής τεφράς εξανθήσεως του παρασίτου πάνω στις προσβεβλημένες περιοχές. Η ασθένεια προκαλεί και μετασυλλεκτικές σήψεις στους λοβούς. Αναφέρεται ότι η έλλειψη καλίου καθιστά τους λοβούς του μπιζελιού περισσότερο ευπαθείς στις μολύνσεις του παθογόνου. Τα κουκιά εκτός από τον *Botrytis cinerea* προσβάλλονται και από τον *Botrytis fabae* του οποίου η τέλεια μορφή δεν είναι γνωστή.

Στη φράουλα η μόλυνση αρχίζει κατά την περίοδο της άνθησης και στη συνέχεια προκαλείται σήψη καρπών και σημαντική μείωση της παραγωγής. Στις καλλιέργειες τεύτλων σποροπαραγωγής, παρατηρούνται προσβολές στις ταξιανθίες από την άνθηση μέχρι την ωρίμανση.

Σε παγκόσμια κλίμακα, η βοτρυτίδα στο αμπέλι προξενεί σοβαρές ζημιές που επιφέρουν μείωση της παραγωγής που κυμαίνεται από 10% έως 50%. Η ασθένεια αποτελεί σοβαρό πρόβλημα για την αμπελοκαλλιέργεια στις περιοχές των χωρών εκείνων που επικρατούν συνθήκες υ-

ψηλής (Γαλλία, Ισπανία, Ιταλία, Καλιφόρνια κ.α.). Στη χώρα μας η οποία χαρακτηρίζεται από ξηροθερμικό κλίμα, η ένταση προσβολής των αμπέλων από τη βοτρυτίδα εξαρτάται από την ένταση και τη συχνότητα των βροχών κυρίως κατά τη φθινοπωρινή περίοδο. Ιδιαίτερα μεγάλες ζημιές μπορεί ακόμη να προκαλέσει κατά την αποθήκευση και μεταφορά των επιτραπέζιων σταφυλιών.

Η έντονη προσβολή των ραγών στο αμπέλι συντελεί σε υποβάθμιση της ποιότητας των επιτραπέζιων σταφυλιών και του παραγόμενου γλεύκους. Ωστόσο η προσβολή του βοτρυτή στα ώριμα σταφύλια ορισμένων ποικιλιών, κάτω από ειδικές κλιματολογικές και εδαφικές συνθήκες, οδηγεί στην καλούμενη «ευγενή σήψη» (noble) η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή γλεύκους με υψηλή συγκέντρωση σακχάρου (30 – 40 %) χωρίς την παράλληλη αύξηση της ολικής οξύτητας. Ο οίνος που παράγεται από τέτοιο γλεύκος είναι πολύ αρωματικός και υψηλής ποιότητας. Η ευγενής σήψη παρατηρείται σε μερικές περιοχές της Ευρώπης (ιδίως στη Γαλλία) και είναι ιδιαίτερα επιθυμητή στην οινοποιία. Με τον τρόπο αυτό παράγονται τα ονομαστά κρασιά Auslese, Beerenauslese και Trockenbeerenauslese της Γερμανίας.

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

Σημαντικής οικονομικής σημασίας είναι επίσης οι μετασυλλεκτικές σήψεις καρπών και ανθέων (ακτινίδια, φράουλα, μήλα, σταφύλια, τριαντάφυλλα), κατά τη μεταφορά ή αποθήκευσή εντός ψυκτικών θαλάμων. Επάνω στους καρπούς ή τα άνθη, παρατηρείται μαλακή σήψη που χαρακτηρίζεται από στρογγυλές καστανές κηλίδες που εξελίσσονται σε νεκρωτικές. Η μόλυνση στους καρπούς αυτούς γίνεται από πληγές ή νύγματα εντόμων και μεταδίδεται εύκολα λόγω της επαφής των ανθέων με τους υγιείς καρπούς.

Πολύ ευαίσθητα στην προσβολή είναι επίσης τα μοσχεύματα ή νεαρά φυτάρια διαφόρων ξενιστών κατά το στάδιο της ριζοβολίας και της πρώτης ανάπτυξης.

Τέλος προσβολές παρατηρούνται σε καρποφόρα δέντρα (αμυγδαλιά, ροδακινιά, αχλαδιά, δαμασκηνιά, κερασιά) όταν επικρατούν μέτριες θερμοκρασίες και υψηλά επίπεδα υγρασίας κατά την περίοδο της άνθησης. Η μόλυνση γίνεται από τον κάλυκα και οι ζημιές είναι μεγαλύτερες σε πυκνές ταξιανθίες.

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό πόσο σημαντική είναι η μείωση των ζημιών. Αυτό επιτυγχάνεται με την καταπολέμηση η οποία απαι-

τεί την μείωση στον επιθυμητό βαθμό του τελικού ποσού ασθένειας σε μια φυτεία ή μια περιοχή.

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : Γεωργόπουλος - Ζιώγας (1992), Ζιώγας (1981), Παναγόπουλος (1993), Παναγόπουλος (1995), Παππας (1992), Ρούμπος (1994, 3^η έκδοση).

4. ΑΝΑΤΟΜΙΑ – ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Η τέλεια μορφή του βοτρύτη (*Botrytis cinerea*) όπως και αρκετοί άλλοι ανώτεροι μύκητες, που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη διαφραγμάτων στις υφές και έχουν την ικανότητα εγγενούς αναπαραγωγής σχηματίζοντας ασκούς, ταξινομείται στην κλάση των Ασκομυκήτων. Στα κυτταρικά τοιχώματα όλων των Ασκομυκήτων είναι χαρακτηριστική η παρουσία της χιτίνης με απουσία κυτταρίνης. Απαραίτητη δε για τη δόμηση κανονικών μεμβρανωδών σχηματισμών είναι η εργοστερόλη.

Η ατελής μορφή *Botrytis cinerea* που ανήκει στην κλάση των αδηλομυκήτων και κατατάσσεται στην τάξη των Moniliales χαρακτηρίζεται από την παραγωγή κονιδίων σε κονidioφόρους που αποτελούνται από ένα άξονα καστανού χρώματος ο οποίος φέρει στην κορυφή επί μικρών διακλαδώσεων υαλώδη μονοκύτταρα κονίδια σε μορφή βότρυος.

Το μυκήλιο είναι γενικά κυλινδρικό και μεγάλης διαμέτρου με πολυάριθμα διαφράγματα (septa), ενδοκυττάριο ή επιφανειακό. Τα διαφράγματα φέρουν έναν απλό πόρο. Συχνά παρατηρούνται αναστομώσεις μεταξύ των υφών. Τα κύτταρα των υφών με ελάχιστες εξαιρέσεις είναι πολυπύρρηνα, ετεροκαρυωτικά. Η ετεροκαρυωτική κατάσταση αποτελεί μια πηγή ποικιλομορφίας (γενετικού ανασυνδυασμού) στην ατελή μορφή του μύκητα.

4.1. Κονιδοφόροι και κονίδια

Οι κονιδιοφόροι του *Botrytis cinerea* είναι όρθιοι, αρχικά απλοί, στη συνέχεια διακλαδιζόμενοι ακανόνιστα ή με διχοτόμηση. Στη βάση έχουν ένα σφαιρικό κύτταρο. Στην κορυφή κάθε κονιδιοφόρου παράγεται ένας αριθμός βραχέων, φαιόχρωμων διαχωρισμένων με διαφράγματα

βραχιόνων. Κάθε βραχίονας καταλήγει σε μια αμπούλα, επάνω στην οποία και σε βραχεία στηρίγματα αναπτύσσονται κονίδια.

Τα κονίδια είναι υαλώδη ή ανοικτού καστανού χρώματος, απιοειδή ή σφαιρικά, λεία, διαστάσεων $9,7 - 11,1 \times 7,3 - 8,00 \mu\text{m}$, (Hennebert, 1973).

4.2. Χλαμυδοσπόρια

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

4.3. Απρεσσόρια

Τα απρεσσόρια (appresorium) ή πλάκες συγκράτησης, είναι ουσιώδεις δομές μόλυνσης που σχηματίζονται μετά τη βλάστηση του σπορίου στο άκρο του βλαστικού σωλήνα (ή βλαστικής υφής). Ο ρόλος του οργάνου αυτού δεν είναι απόλυτα γνωστός αλλά γίνεται παραδεκτό ότι με το appressorium ο μύκητας κολλάει πάνω στον ξενιστή. Στην κάτω επιφάνεια του appressorium, αυτή που βρίσκεται σε επαφή με το φυτό, δημιουργείται μια λεπτή εκβλάστηση, το ράμφος εισόδου ή ράμφος μόλυνσεως (infection peg).

Καθώς το appressorium δεν μπορεί να ξεκολλήσει από την επιφάνεια του φυτού και να απομακρυνθεί, η λεπτή άκρη του ράμφους κατορθώνει να αυξηθεί περνώντας προφανώς με χαλάρωμα των μακρομορίων μέσα από την εφυμενίδα και το κυτταρικό τοίχωμα. Μετά το πέρας των στρωμάτων αυτών η υφή αποκτά το κανονικό πάχος και η προχωρεί στα γειτονικά κύτταρα ή σχηματίζει μυζητήρα, (Jarvis, 1977).

4.4. Σκληρώτια

Όλα τα είδη *Botrytis* σχηματίζουν σκληρώτια σταθερά προσκολλημένα στο υπόστρωμα και η μορφολογία τους συμβάλλει στην ταξινόμηση. Η εξωτερική επιφάνεια του σκληρωτίου του *Botrytis cinerea* συντίθεται από κλειστά διασκευασμένες, λεπτού τοιχώματος υφές που οι άκρες τους προβάλλουν προς τα έξω. Το σκληρώτιο αποτελείται εσωτερικά από ψευδοπαρέγχυμα ενώ μια λεπτή στρώση χρωστικής το καλύπτει εξωτερικά στη μεγαλύτερη επιφάνεια (Willets, 1969). Τα σκληρώτια είναι μεγά-

λα, σκληρά, πολυκύτταρα και επιτρέπουν στο μύκητα να επιβιώσει σε αντίξοες συνθήκες.

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : Γεωργόπουλος (1984), Jarvis (1977).

5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ

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

5.1. Ρυθμιστές ανάπτυξης

Από πειράματα που έγιναν χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεκριμένες φυτικών ρυθμιστών αύξησης όπως N – m tolyphtalamic acid, etherphon γιββερλικό οξύ, 4 CPA, Na – Salts βγήκε το συμπέρασμα ότι το γιββερλικό οξύ δεν έχει καμιά επίδραση στην ανάπτυξη του μυκηλίου ή στο σχηματισμό κονιδίων του *Botrytis cinerea*, όπως οι Ozbek και Delen (1989), ανέφεραν ότι το γιββερλικό οξύ υποβοηθούσε την ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα στη *in vitro* καλλιέργεια.

Οι Brecbuhler and Pearson (1982), όμως ισχυρίστηκαν ότι εφαρμογές με γιββερλικό οξύ σε αμπέλια μείωσαν τις μολύνσεις από βοτρυτή. Πειράματα που έγιναν τα φυτά που ψεκάστηκαν με τις συνιστώμενες συγκεκριμένες ρυθμιστών ανάπτυξης έδειξαν παρόμοια επίπεδα ασθένειας με τον μάρτυρα.

Ωστόσο οι ρυθμιστές ανάπτυξης μπορεί να μειώνουν ή να αυξάνουν την ευπάθεια διαφορετικών φυτικών ειδών και καλλιεργειών στο *Botrytis cinerea*.

5.2. Θερμοκρασία

Το μυκήλιο μπορεί να αναπτυχθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες. Καλύτερος ρυθμός ανάπτυξης σημειώνεται στους 20°C – 22°C, και μειώνεται πάνω από τους 25°C. Η θερμοκρασία επώασης επιδρά τόσο στην εξέλιξη της μόλυνσης όσο και στην παραγωγή σπορίων. Μόλυνση που

πραγματοποιήθηκε σε πληγωμένους ιστούς σε θερμοκρασίες από 5°C – 26°C μεγιστοποιήθηκε στους 15°C αλλά δεν πραγματοποιήθηκε καθόλου παραγωγή σπόρων στους 5°C των 26°C μετά το τέλος του χρόνου επώασης. Θερμοκρασίες που ευνοούν την παραγωγή μυκηλίου βρέθηκε ότι παρεμποδίζουν το σχηματισμό σκληρωτίων και αντίστροφα (Kublitskaya and Ryabtera, 1972). Οι Morotchkovski και Vitas (1936), έδωσαν τους 11°C – 13°C σαν άριστο επίπεδο θερμοκρασίας για το σχηματισμό σκληρωτίων του 12°C – 22°C για παραγωγή σπορίων και τους 27°C – 28°C για σχηματισμό απρεσσορίων. Οι O'Neill, Shtienberg και Elad (1997), έδωσαν σαν άριστες θερμοκρασίες για τη μόλυνση λουλουδιών, φρούτων και φύλλων τους 10°C και 20°C αλλά η μόλυνση μπορεί να γίνει ακόμα και στους 2°C αλλά και πάνω από τους 25°C.

5.3. Σχετική υγρασία

Ο Snow (1949), συμπέρανε ότι τα κονίδια του *Botrytis cinerea* απαιτούν υψηλά επίπεδα υγρασίας (93-100%) για να βλαστήσουν. Ο Sirry (1957), βρήκε ότι στους 21°C τα κονίδια του *Botrytis cinerea* βλαστάνουν σε σχετική υγρασία 100% αλλά όχι σε 95%. Τα σκληρώτια αναπτύσσονται καλύτερα σε υψηλή σχετική υγρασία. Οι Sosa – Alvarez κ.α (1952) από πειράματα στη φράουλα βρήκαν ότι ο συνολικός αριθμός ωρών έλλειψης υγρασίας και η διάρκεια ξεχωριστών υγρών περιόδων είχε τη μεγαλύτερη επίδραση στην παραγωγή σπορίων που παράγονται από το βοτρυτί στις θερμοκρασίες των 15°C – 22°C.

5.4. Φως

Όλα τα είδη *Botrytis* είναι ικανά να βλαστήσουν και να αναπτυχθούν στο σκοτάδι. Η ανάπτυξη μυκηλίου είναι καλύτερη στο σκοτάδι απ' ό τι στο φως (Sato ,1959). Το κόκκινο φως παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μυκηλίου του *Botrytis cinerea* ενώ στο υπεριώδες γίνεται συνεχής. Αντίθετα το πορτοκαλί διεγείρει τη βλάστηση των σπορίων του (Zemlijanuklin, 1973). Ο Leach κ.α. (1972) βρήκαν ότι ακτινοβολία κοντά στο υπεριώδες 3000 – 4000 Å διεγείρει την παραγωγή σπορίων σε καλλιέργειες *Botrytis cinerea* ενώ ακτινοβολία με μήκος κύματος 2000 – 3000 Å παρεμποδίζει την ανάπτυξη. Έτσι καθιερώθηκε μια σταθερή πρακτική, για τη διέγερση της παραγωγής σπορίων όλων των ειδών.

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

5.5. PH

Ο Webb (1921), βρήκε ότι το άριστο επίπεδο pH για τη βλάστηση των σπορίων είναι μεταξύ 3 και 7. Το άριστο pH για την ανάπτυξη του μυκηλίου είναι μεταξύ 3 και 5. Τα σκληρώτια σχηματίζονται καλύτερα σε pH 4 και καθόλου στα αλκαλικά υποστρώματα.

5.6. Ηλικία και διατροφή

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

Αναφέρεται επίσης ότι η βλάστηση σπορίων και η ανάπτυξη των βλαστικών υφών αυξάνεται με την προσθήκη παραγόντων ανάπτυξης όπως βιοτίνη, θειαμίνη, L-serine, D-glucose και οξικό νάτριο. Ο Chou (1972), βρήκε ότι τα σπόρια βλαστάνουν σε διαλύματα σακχαρόζης, γλυκόζης, φρουκτόζης, συγκεντρώσεως μεγαλύτερης των 100 mg / lt.

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

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας στη βλάστηση των σπορίων που βρέθηκε από τον Scutt (1971), είναι η συγκέντρωση των κονιδίων στα αιωρήματά τους που πρέπει να είναι της τάξης του 10^5 .

Ο σχηματισμός σκληρωτίων ευνοείται από υψηλή σχέση C/N στα θρεπτικά υποστρώματα. Αναπτύσσονται καλύτερα σε πλούσια θρεπτικά υποστρώματα (Pieris, 1947).

5.7. Ατμοσφαιρικά αέρια και ρυπαντές

Ο Adair (1971), βρήκε ότι οι συγκεντρώσεις O_2 κάτω από 1,7% μειώνουν το ρυθμό ανάπτυξης του μυκηλίου του *Botrytis cinerea* σε υπόστρωμα άγαρ. Βρήκε επίσης ότι η τεφρά σήψη στα αποθηκευμένα λαχανικά ελέγχεται με ατμόσφαιρα συγκέντρωσης 1,4 % σε O_2 . Οι Niklis, Thanassouloropoulos και Sfakiotakis (1992) μελέτησαν τις επιδράσεις της θερμοκρασίας και της χαμηλής συγκέντρωσης O_2 στην ανάπτυξη της τεφράς σήψης καις στην παραγωγή αιθυλενίου στο ακτινίδιο.

Ακτινίδια που αποθηκεύτηκαν στους $0^{\circ}C$, $5^{\circ}C$ και $10^{\circ}C$ παρήγαγαν σημαντικά ποσά αιθυλενίου 20-30 ημέρες μετά τη μόλυνση από τον *Botrytis cinerea* αλλά μόνο ίχνη αιθυλενίου ανιχνεύθηκαν σε υγιείς καρ-

πούς (μάρτυρες). Σε ένα άλλο πείραμα στο οποίο τα φρούτα μολύνθηκαν με *Botrytis cinerea* και εκτέθηκαν σε μια σειρά θερμοκρασιών (-2°C , -1°C , 0°C , 10°C , 20°C , 30°C) οι χαμηλές θερμοκρασίες μείωσαν την παραγωγή αιθυλενίου και την αποσύνθεση της σάρκας. Η μόλυνση καθυστέρησε για 24-48 ημέρες και ο ρυθμός ανάπτυξης του μύκητα μειώθηκε στους 0°C – 1°C και -2°C συγκρινόμενος με τις υψηλότερες θερμοκρασίες. Αποθήκευση μολυσμένων ακτινιδίων σε χαμηλή συγκέντρωση O_2 (1%) και 0°C μείωσε δραστικά το ρυθμό ανάπτυξης του μύκητα και την παραγωγή αιθυλενίου. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ο μύκητας μπορεί να χρησιμοποιήσει το CO_2 σαν θρεπτικό υλικό πράγμα που τον μεταφέρει από τους ετερότροφους στους αυτότροφους οργανισμούς. Εντούτοις όταν η περιεκτικότητα υπερβεί το 23% σταματά η ανάπτυξη του μύκητα. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη χρησιμοποίηση του CO_2 για τη διατήρηση των επιτραπέζιων σταφυλιών με διαμετακόμιση σε ατμόσφαιρα με CO_2 πάνω από 25% ώστε να παρεμποδιστεί η βλάστηση των σπορίων.

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

5.8. Ατμοσφαιρική πίεση

Οι Hausbeck και Pennypacker (1991), εργαζόμενοι σε ιστούς γερανιού βρήκαν ότι όσο περισσότερο τα φυτά διατηρούνταν σε περιβάλλον με υψηλή ατμοσφαιρική πίεση πριν τη μόλυνση και δροσερό χώρο, τόσο χαμηλότερη ήταν η επίπτωση στους ιστούς από την τεφρά σήψη. Σε αντίθεση με το γεράνι όπου η μόλυνση προχώρησε σημαντικά σε χαμηλή ατμοσφαιρική πίεση στην τομάτα η ασθένεια προχώρησε σε υψηλή ατμοσφαιρική πίεση. Οι O'Neill, Shtienberg, and Elad (1997), βρήκαν ότι επώαση σε υψηλή σχετική υγρασία η οποία ακολουθείται από μόλυνση με ατμοσφαιρική πίεση $< 0,2 \text{ KPa}$ δεν αύξησε τις επιπτώσεις της μόλυνσης ή της αποσύνθεσης των ιστών, συγκρινόμενοι με επώαση σε πίεση $> 1,3 \text{ KPa}$. Παρ' όλα αυτά επώαση σε χαμηλή πίεση αύξησε την ένταση της παραγωγής σπορίων.

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : O'Neill, Shtienberg, Elad (1997), Jarvis (1977), Niklis, Thanassouloupoulos, Sfakiotakis (1992), Benlioglu and Yilmaz (1992).

6. ΜΟΛΥΝΣΗ

6.1. Από κονίδια

Ο *Botrytis cinerea* επιβιώνει επί νεκρών φυτικών ιστών σαπροφυτικά, επί προσβλημένων καλλιεργούμενων και αυτοφυών φυτών καθώς επίσης και με τα σκληρώτιά του.

Απαραίτητες συνθήκες για να γίνει η μόλυνση και να αναπτυχθεί η ασθένεια είναι η υψηλή σχετική υγρασία του περιβάλλοντος και ο σχετικά ψυχρός καιρός. Όταν επικρατούν τέτοιες συνθήκες σε συνδυασμό με τον άνεμο ο οποίος μεταφέρει και διασπείρει τα κονίδια (ξηροσπόρια) μπορούμε να έχουμε μόλυνση. Διασπορά των μολυσμάτων (κονιδίων) γίνεται ακόμη με τις ψεκάδες του νερού, καθώς επίσης με τα χέρια, τα ρούχα και τα εργαλεία των εργατών κατά την εκτέλεση των καλλιεργητικών φροντίδων ιδιαίτερα μέσα στα θερμοκήπια. Τα κονίδια βλαστάνουν ταχύτατα στις σταγόνες του νερού και προκαλούν μόλυνση με απευθείας διάτρηση της εφυμενίδας πάνω στην οποία εγκαθίστανται και προσκολλώνται με τη βοήθεια μιας κολλώδους ουσίας που περιβάλλει τη βλαστική υφή. Συχνά η διείσδυση γίνεται από την άκρη της βλαστικής υφής, αλλά κάποιες φορές σχηματίζεται πρώτα η πλάκα συγκρατήσεως. Στην επιφάνεια επαφής μεταξύ της άκρης της βλαστικής υφής και της εφυμενίδας του ξενιστή, μια μικρή ακίδα, το ράμφος μολύνσεως που αναπτύσσεται εξωτερικά, διεισδύει στην εφυμενίδα, διαμέσου μιας ελάχιστης επιφάνειας διαμέτρου 0,2 mm (Mc Keen, 1974), ασκώντας μηχανική πίεση.

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

Εκτός από την εφυμενίδα οι βλαστικές υφές του *B. cinerea* μπορούν να διεισδύσουν και από την περιστοματική περιοχή αλλά σπάνια διά μέσου των ίδιων των στοματίων. Πριν την διείσδυση της εφυμενίδας ο μύκητας συμπεριφέρεται πάνω στην επιφάνεια της περιστοματικής περιοχής σαν σαπρόφυτο.

6.2. Από μυκήλιο

Εκτός από τα κονίδια οι μολύνσεις γίνονται συνηθέστερα με σαπροφυτικό μυκήλιο το οποίο αναπτυσσόμενο επί νεκρών ή εξασθενημένων φυτικών ιστών, εξαπλώνεται εύκολα στους συνεχόμενους ή εφαιπόμενους υγιείς φυτικούς ιστούς. Στην περίπτωση ορισμένων καρπών ο μύκητας εισέρχεται διά των νεκρών ή γηρασμένων υπολλειμάτων του ανθους. Η παρουσία πληγών διευκολύνει την είσοδο του παρασίτου. Η διαδικασία μόλυνσης από μυκήλιο είναι στην ουσία η ίδια με αυτή των βλαστικών υφών που προέρχονται από τη βλάστηση των κονιδίων. Επισημαίνεται ότι το μυκήλιο έχει σχεδόν πάντα, μια σαπροφυτική βάση προμήθειας μολύσματος (Bessis, 1972). Για το λόγο αυτό, το μολυσματικό δυναμικό του μυκηλίου είναι μεγαλύτερο, από αυτό των βλαστανόντων κονιδίων και επίσης λιγότερο εξαρτημένο από το εξωτερικό περιβάλλον π.χ. ο Jarvis (1962), βρήκε ότι μόνο το 1% περίπου των μολύνσεων, σε ώριμες φράουλες, γίνεται από κονίδια. Το υπόλοιπο των μολύνσεων πραγματοποιείται από σαπροφυτικό μυκήλιο.

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : Jarvis (1977), Παναγόπουλος (1995).

7. ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ

Μολυσματικότητα ή μολυσματική ικανότητα, ονομάζεται η ικανότητα ενός μικροοργανισμού ή ιού να μολύνει τα φυτά ξενιστές και κατά συνέπεια να προκαλεί ασθένεια.

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

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

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

Στη συνέχεια ακολουθούν οι κυριότεροι παράγοντες και συνθήκες, που επιδρούν ή σχετίζονται με τη μολυσματικότητα του *Botrytis cinerea*.

7.1. Πληγές

Κάθε παράγοντας που προκαλεί μηχανική ζημία στους ιστούς ενός φυτού, μπορεί να διευκολύνει την είσοδο του *Botrytis cinerea* (Harper & Will, 1968). Μετά από ζημίες που προκλήθηκαν από άνεμο, σαλιγκάρια ή έντομα, ακολούθησε προσβολή από *Botrytis cinerea*, (Mallet, 1973). Το ίδιο συνέβη όταν προηγήθηκε προσβολή από άλλον μύκητα, όπως στην περίπτωση του *Uncinula necator* στα σταφύλια (Vaner, 1962).

7.2. Φυτικά υπολλείματα

Ο De Bary (1886) και ο Brooks (1908), αρκετά νωρίς παρατήρησαν ότι προσβολές φυτών από *Botrytis cinerea*, συχνά συνδέονταν με μια πρόδρομη αποίκιση νεκρών φυτικών ιστών από το μύκητα. Ο Thomas (1921), παρατήρησε ότι φυτά τομάτας ψεκασμένα με αιώρημα κονιδίων

Botrytis cinerea και σε περιβάλλον με υψηλή σχεστική υγρασία, παρέμειναν υγιή για δύο εβδομάδες. Όταν όμως είχαν χρησιμοποιηθεί σαν μόλυσμα, κομμάτια από ασθενείς ιστούς, οι κηλίδες μόλυνσης εμφανίζονταν πιο γρήγορα.

7.3. Φως

Το φως επηρεάζει το επίπεδο υδατανθράκων στα φυτά καθώς και άλλες μεταβολικές διεργασίες τόσο του ξενιστή όσο και του παθογόνου. Στο φως της ημέρας έχει παρατηρηθεί πιο εκτεταμένη μόλυνση ανθέων φράουλας σε σχέση με το σκοτάδι (Borecka, κ.α., 1969).

7.4. Υδατάνθρακες

Οι Horsfall and Dismond (1957), κατέταξαν τα είδη του γένους *Botrytis* σαν υψηλών σακχάρων παθογόνα. Προσβάλλουν δηλαδή, ιστούς με υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και ειδικότερα με ανηγμένα σάκχαρα. Πολλά μυκητοκτόνα, εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα επηρεάζουν το μεταβολισμό των ξενιστών και κατά συνέπεια αλλάζουν την ευαισθησία τους.

7.5. Μικροοργανισμοί

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

7.6. Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία παίζει καθοριστικό ρόλο στην προδιάθεση τόσο του παθογόνου όσο και του ξενιστή. Διάφορες θερμοκρασίες, μπορούν να επιδράσουν διαφορετικά στη μολυσματική διαδικασία του παρασίτου, όσο και στη διαδικασία άμυνας του ξενιστή. Ο Krantz (1959), παρατήρησε ότι η αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες 3°C αλλά όχι σε ψύξη, κονδύλων πατάτας, τους προδιέθετε για μόλυνση από τον *Botrytis cinerea*. Κόνδυλοι που διατηρήθηκαν σε θερμοκρασίες 15°C και 20°C παρέμειναν υγιείς.

7.7. Υγρασία

Ο Tonchev (1972), διερεύνησε το ρόλο της άρδευσης στο φούσκωμα και στο σχίσσιμο των καρπών σταφυλιού και συνεπώς, στην προδιάθεση προσβολής τους από τον *Botrytis cinerea*. Για ένα διάστημα εννέα ετών, μελέτησε τις σχέσεις μεταξύ του σχισίματος των καρπών, της συχνότητας εμφάνισης της τεφράς σήψης και των καιρικών συνθηκών κατά τη διάρκεια της περιόδου προκλήθηκαν σήψεις. Σε ξηροθερμικές χρονικές περιόδους η άρδευση δεν προκάλεσε σχίσσιμο στους καρπούς ή προσβολή τους από *Botrytis cinerea*. Τις υγραθερμικές χρονικές περιόδους όμως προσθετη άρδευση προκάλεσε το σχίσσιμο των καρπών ιδιαίτερα όσων είχαν λεπτότερη επιδερμίδα και τη μόλυνσή τους.

7.8. Πτητικοί μεταβολίτες

Ο Nichols (1964), βρήκε ότι το αιθυλένιο σε συγκέντρωση της τάξης των 0,06 mg / lt προδιέθετε τα άνθη σε μόλυνση από *Botrytis cinerea*.

7.9. Άλλα παρασιτοκτόνα

Ο Mc Whoter (1939), παρατήρησε ότι μετά από εφαρμογές εντομοκτόνων για τον έλεγχο των θριπών στο *Antirrhinum maius*, εμφανίστηκαν προσβολές οφειλόμενες σε χημική ή μηχανική βλάβη, ή σε συγκράτηση νερού στη φυτική επιφάνεια.

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : Jarvis (1977).

8. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ

Στο κεφάλαιο αυτό θα εξετάσουμε πως εξελίσσεται η παρασιτική σχέση του παθογόνου με τον ξενιστή και πως ολοκληρώνεται η εμφάνιση της ασθένειας της τεφράς σήψης που ξεκινά με απλή επαφή του παθογόνου με τον ξενιστή.

Ο *Botrytis cinerea* για να αποδομήσει τα κυτταρικά τοιχώματα εκκρίνει διάφορα ένζυμα μεταξύ αυτών και πηκτινολυτικά, με αποτέλεσμα φυτικά κύτταρα του ξενιστή να νεκρώνονται και οι υφές του μύκητα να εισέρχονται διαμέσου των μολυσμένων ιστών (Brown, 1965).

Σύμφωνα με τον Jarvis (1977), εφ' όσον ο μύκητας κατορθώσει να εισέλθει στον ξενιστή, ζει σαπροφυτικά στο νεκρό παρεγχυματικό ιστό και συνεχίζει να αποικίζει ιστούς από την άκρη της πληγής. Οι υγιείς ιστοί όμως δεν παρασιτούνται από τις υφές. Οι απολήξεις των υφών βρίσκονται μέσα στους αποθνήσκοντες ιστούς και πίσω από τα απεκκρινόμενα ένζυμα και τις τοξίνες. Με την παραπάνω διαδικασία ο μύκητας συνθέτει ένα σαπροφυτικά βασισμένο μολυσματικό δυναμικό, έτσι ώστε να συνεχίσει την αποίκιση και την παραγωγή σποριών.

Στη συνέχεια ακολουθούν οι παράγοντες καθώς και οι συνθήκες που επηρεάζουν την παθογένεση.

8.1. Ένζυμα

Οι Verhoeff and Warren (1972), βρήκαν ότι η ενζυματική δραστηριότητα του *Botrytis cinerea* πάνω σε προσβλημένα φυτά τομάτας, παρουσίαζε διαφορές. Στους μίσχους και τους καρπούς παρατηρήθηκε η δραστηριότητα της πηκτινομεθυλεστεράσης της ένδο και έξω – πολυγαλακτουρονάσης ενώ η κυτταρινάση παρατηρήθηκε μόνο σε εκείνα τα μέρη που μαλακώναν από τη μολυσματική διείσδυση του μύκητα. Η πολυγαλακτουρονάση βρέθηκε σε μαλακωμένα μόνο φυτικά μέρη, υπολειμμάτων μίσχων. Οι παραπάνω ερευνητές θεώρησαν ότι ο *Botrytis cinerea* παρήγαγε όλα τα αναγκαία ένζυμα για την παθογένεση στην τομάτα.

Η σημασία της πολυγαλκτουρονάσης στην παθογένεση του βοτρυ-
τη μελετήθηκε από τον Leone (1992), σύμφωνα με τον οποίο κατά τη
διάρκεια μόλυνσης φυτών ο *Botrytis cinerea* παρήγαγε διαφορετικά είδη
ενζύμων συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων της πολυγαλκτουρονάσης
(PGs). Η σημασία του ρόλου των PGs στη μόλυνση, και τη σημασία της
συνολικής παραγωγής PG από το μύκητα προσδιορίστηκε από τη δρα-
στηριότητα ενός απλού ενζύμου, PG2. Η πρωταρχική σημασία της επα-
κόλουθης συνολικής παραγωγής PG σχετίζεται με την αφομοίωση ενός
τμήματος πηκτικής από τα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα.

Οι φυσιολογικές και βιοχημικές αναλογίες PG2 δείχνουν ότι αυτό
το ένζυμο έχει ένα διπλό ρόλο. Αφ' ενός να υποβοηθά στη διατήρηση
των αρχικών κυτταρικών τοιχωμάτων και αφ' ετέρου στην «επίθεση» των
αλυσίδων παραγωγής άλλων ισοενζύμων που σχετίζονται με τον καταβο-
λισμό πηκτινών.

8.2. Τοξίνες

Ο Jamart και Kamonen (1972), αναφέρουν ότι το κυτόπλασμα των
κυττάρων νεκρώνεται από τη δράση τοξινών που παράγει ο *Botrytis
cinerea*, πριν προχωρήσουν οι υφές. Οι ίδιοι βρήκαν κιτρικό και οξαλικό
οξύ ταυτόχρονα, σε χυμό φύλλων βιγόνιας που περιείχαν κονίδια. Το κι-
τρικό οξύ ενοπίστηκε επίσης και σε κιτρινισμένους ιστούς μολυσμένων
φύλλων, στην περιοχή που υπήρχαν απολήξεις υφών.

8.3. Κηλίδες «φάντασμα» (ghost spot)

Στους καρπούς της τομάτας και στα άνθη της τριανταφυλλιάς η
προσβολή μπορεί να εκδηλωθεί και με τη μορφή κηλίδας «φάντασμα»
(ghost spot) δηλαδή με την εμφάνιση στην επιφάνεια των καρπών ή πετά-
λων (περίπτωση τριανταφυλλιάς) μικρών δακτυλιοειδών κηλίδων, διαμέ-
τρου 3 – 8 mm, υπόλευκου αρώματος με νεκρωτικό στίγμα στο κέντρο.
Αυτή η φάση της ασθένειας προκαλείται μετά από βλάστηση σπορίων του
παθογόνου στην επιφάνεια του καρπού, την είσοδο του βλαστικού σωλή-
να και τον εν συνεχεία θάνατο του μυκηλίου, Ferrer and Owen (1959).
Αναφέρεται ότι η μόλυνση γίνεται όταν ο καρπός έχει διάμετρο 1,5 – 3
cm, αλλά η πλήρης έκφραση της μορφής αυτής της ασθένειας πραγματο-
ποιείται κατά το στάδιο της τελικής αναπτύξεως του πράσινου καρπού.
Ουδέποτε όμως η κηλίδωση «φάντασμα» εξελίσσεται σε σήψη των ιστών
αλλά μειώνει σοβαρά την εμφάνιση και την ποιότητα των καρπών.

Προσπάθειες πολλών ετών για την απομόνωση κάποιου μύκητα α-
πό τις κηλίδες ήταν ανεπιτυχείς. Οι Owen and Ferrer (1959), απέδειξαν

πρώτοι την παρουσία του *Botrytis cinerea* στις κηλίδες αλλά μόνο ο Verhoeff (1970), κατόρθωσε να απομονώσει το μύκητα. Εξετάζοντας τέτοιες κηλίδες βρήκε ότι στην πραγματικότητα δεν συνέβαινε η διείσδυση. Στα νεκρωμένα κύτταρα δεν μπορούσε να υπάρχει μυκήλιο. Όταν χρησιμοποίησε σαν μόλυσμα λίγα στεγνά κονίδια, πήρε τις κηλίδες «φάντασμα». Όταν όμως χρησιμοποίησε πυκνό αιώρημα κονιδίων και σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας οι καρποί σχημάτισαν μεγάλες διογκώσεις πριν ακόμα ο μύκητας διαδοθεί στο παρέγχυμα. Με τις ίδιες προϋποθέσεις αλλά σε συνθήκες χαμηλής σχετικής υγρασίας, εμφανίστηκαν νεκρωτικές περιοχές.

Με βάση τα παραπάνω ο Verhoeff υπέθεσε πως στην πρώτη περίπτωση η μεριστωματική δραστηριότητα του καρπού περιόρισε την ανάπτυξη και την ενζυματική δραστηριότητα του μύκητα. Στη δεύτερη περίπτωση υπέθεσε ότι το ισοζύγιο του αυξημένου μολυσματικού δυναμικού και των ευνοικών συνθηκών (υψηλή σχετική υγρασία) υπερίσχυσε της γρήγορης ανάπτυξης του καρπού. Τελικά κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι κηλίδες «φάντασμα» είναι ένα παράδειγμα αργοπορίας της εξάπλωσης του παθογόνου.

8.4. Οσμωτικές πιέσεις

Πολλοί ερευνητές συμφωνούν ότι ο *Botrytis cinerea* μπορεί να αντέξει σε υψηλές οσμωτικές πιέσεις. Ο Thatcher (1942), θεώρησε ότι η διαφορά οσμωτικής πίεσης, μπορούσε να ερμηνεύσει τη μεταφορά νερού και θρεπτικών υλικών από τα κύτταρα του ξενιστή στον παθογόνο μύκητα.

8.5. Επιδράσεις στον μεταβολισμό των ξενιστών

Οι Harrison and Horwood (1969), παρατήρησαν μια ενδιαφέρουσα επίδραση στη φυσιολογία των λουλουδιών του *Antirrhinum maius* όταν μολύνθηκαν από *Botrytis cinerea*. Μια γενετικά παρεμποδιζόμενη ανθοκυανίνη απελευθερώθηκε και έδωσε ένα στικτό χρωματισμό στα πέταλα.

Ο Smith, κ.α. (1964), βρήκε ότι γαρύφαλλα μολυσμένα από *Botrytis cinerea*, παρήγαγαν περισσότερο αιθυλένιο, το οποίο προδιέθετε και τα υγιή άνθη να προσβληθούν από το παθογόνο.

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : Jarvis (1977), Leone (1992), Παναγόπουλος (1995).

9. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Ο *Botrytis cinerea* αναπτύσσεται σε υγιείς, εξασθενημένους ή νεκρούς φυτικούς ιστούς. Προσβάλλει φυτά όλων των ηλικιών και σχεδόν όλα τα μέρη τους (άνθη, φύλλα, στελέχη, ρίζες, καρπούς), προκαλώντας συμπτώματα διαφόρων τύπων. Στον αγρό, συχνά οι μολύνσεις των ανθέων προηγούνται και οδηγούν σε σήψεις καρπών και βλαστών. Ο μύκητας εγκαθίσταται στα πέταλα του άνθους τα οποία είναι μερικώς ευαίσθητα όταν αρχίζουν να γερνούν και εκεί παράγει άφθονο μυκήλιο και κηλιδώσεις. Το μυκήλιο διεισδύει και στα υπόλοιπα μέρη του άνθους, αναπτύσσεται και τα καλύπτει με μια άσπρη, σταχτιά ή ανοιχτή καστανή αραχνοειδή μούχλα. Τα άνθη στη συνέχεια μαραίνονται και τελικά νεκρώνονται. Ο μύκητας στη συνέχεια μολύνει την περιοχή του ποδίσκου τον οποίο σαπίζει με αποτέλεσμα να πέσουν τα μπουμπούκια και τα άνθη. Εάν κάποιος καρπός έχει αναπτυχθεί, ο μύκητας κινείται από τα πέταλα στον πράσινο ή ώριμο καρπό και προκαλεί στην άκρη του κάλυκα σήψη που προχωρά και μπορεί να καταστρέψει μέρος ή ολόκληρο τον καρπό. Επίσης, μπορεί μεταδοθεί και σε άλλους καρπούς που εφάπτονται με τον μολυσμένο.

Οι μολυσμένοι καρποί και οι τρυφεροί χυμώδεις βλαστοί, γίνονται μαλακοί υδαρείς και καλύπτονται από την εξάνθιση των καρποφοριών του παθογόνου. Αρχικά η προσβεβλημένη περιοχή έχει ανοικτό πράσινο χρώμα και αργότερα οι ιστοί γίνονται χρώματος καφέ (π.χ. τομάτα, πιπεριά, μελιτζάνα, κ.α.). Καθώς ο ιστός σαπίζει η επιδερμίδα σχίζεται και ο μύκητας καρποφορεί με ταχύ ρυθμό. Έπειτα οι ιστοί ζαρώνουν, ξηραίνονται, ενώ πλατιά μαύρα σκληρώτια μπορεί να εμφανιστούν πάνω στην επιφάνεια ή να είναι βυθισμένα μέσα στον ιστό. Στη φράουλα η μόλυνση αρχίζει κατά την περίοδο της άνθησης και στη συνέχεια προκαλείται σήψη των καρπών. Στους καρπούς της τομάτας, η προσβολή μπορεί να εκδηλωθεί στην επιφάνεια του καρπού και με μορφή δακτυλιοειδών κηλίδων, ανοιχτού χρώματος με κέντρο χρώματος σταχτί. Στο μαρούλι η προσβολή εκδηλώνεται σαν καστανέρυθρη σήψη του λαιμού και των

φύλλων της βάσης. Μολύνσεις με μορφή υγρής σήψης εμφανίζονται στις ρίζες διαφόρων κονδυλόριζων φυτών (π.χ. καρότο).

Στους καρπούς που διατηρούνται μέσα στα ψυγεία εμφανίζονται καστανές κηλίδες που προχωρούν σε μαλακή σήψη με υδαρείς ιστούς. Οι προσβλημένοι καρποί έχουν ευχάριστη οσμή ζύμωσης. Οι μολύνσεις γίνονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των καρπών πάνω στο δέντρο, ή από πληγές κατά τη συγκομιδή και συσκευασία των καρπών. Ακόμη μολύνσεις μπορούν να γίνουν και από τα φακίδια.

Στο έλασμα των φύλλων η προσβολή εμφανίζεται με το σχηματισμό κηλιδώσεων (π.χ. τομάτα, μελιτζάνα, κολοκύθια). Στα γλαδίολο, τουλίπα και κρεμμύδια αρχικά οι κηλίδες είναι μικρές και κιτρινωπές, αργότερα γίνονται μεγαλύτερες άσπρου – σταχτί χρώματος ή μαύρου βαθουλωμένες, ενωμένες και συχνά καλύπτουν ολόκληρο το φύλλο. Στο γεράνι είναι καστανές και υδατώδεις που τελικά νεκρώνονται και πάνω σ' αυτές σχηματίζονται τεφροκάστανες εξανθήσεις (μάζες κονιδιοφόρων και κονιδίων).

Πολλοί ερευνητές ισχυρίζονται ότι η μόλυνση του φυλλώματος γίνεται μόνο αφού ο μύκητας έχει αναπτυχθεί σε νεκρά τμήματα των φυτών ή πάνω σε σήπτοντα υλικά στο έδαφος και μετά έρθει σε επαφή με τα υγιή φύλλα. Μετά την προσβολή το φύλλο ξηραίνεται, ενώ η προσβολή μέσω του μίσχου φθάνει στο στέλεχος, στο οποίο αρχικά σχηματίζεται μικρό, ανοιχτού καστανού ή καστανού χρώματος, έλκος. Έλκη βλαστών συνήθως εμφανίζονται σε χυμώδεις βλαστούς ή μίσχους και μπορεί να είναι είτε σκοτεινά, βυθισμένα, επιμηκυνόμενα έλκη με ένα προσδιορισμένο περιθώριο ή μπορεί να περιβάλλουν το στέλεχος. Στην τελευταία περίπτωση, το μέρος του φυτού πάνω από το σημείο της προσβολής γίνεται χλωρωτικό, μαραίνεται, ξηραίνεται και μπορεί να σπάσει στο σημείο μόλυνσης, όπως συμβαίνει στην τουλίπα και την τριανταφυλλιά. Οι προσβεβλημένοι μίσχοι ή βλαστοί με υγρό καιρό καλύπτονται από ένα σταχτί καφέ βελούδινο στρώμα σποριών του μύκητα. Επίσης στους μολυσμένους βλαστούς μπορεί να παραχθούν και σκληρώτια.

Η μόλυνση τμημάτων που βρίσκονται κάτω από το έδαφος, όπως βολβοί και ριζώματα μπορεί να αρχίσει όταν τα όργανα αυτά είναι ακόμη μέσα στο έδαφος ή έχουν συλλεχθεί. Έλκη μπορεί να αναπτυχθούν σε κάθε σημείο της επιφάνειάς τους, αλλά κυρίως στο λαιμό ή τη βάση αυτών. Οι μολυσμένοι ιστοί συνήθως εμφανίζονται μαλακοί και υδαρείς, αλλά καθώς προχωρεί η μόλυνση, οι μολυσμένες περιοχές μεγεθύνονται, μεταχρωματίζονται καφέ και τελικά σκούρο καφέ και αποβαίνουν σπογγώδεις ή φελλώδεις και τα προσβλημένα όργανα γίνονται ελαφρά στο βάρος. Δέσμες μυκηλίου μπορεί να αναπτυχθούν μεταξύ χωρισμάτων των

βολβών και από τα κενά των σηπογενών ριζωμάτων ή στην επιφάνεια των ελκών.

Σε σπορεία όπου η υγρασία είναι υψηλή των νεαρών φυταρίων που οφείλονται στον *Botrytis cinerea*. Τήξεις παρατηρούνται και στον αγρό όταν ο σπόρος είναι αναμειγμένος με σκληρώτια του μύκητα ή μυκήλιο ή τα σκληρώτια βρίσκονται στο έδαφος.

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : Ζιώγας (1981), Μπούρμπος και Σκουντριδάκης (1977, 1993), Παναγόπουλος (1992,1993, 1995), Παππάς (1992).

10. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Επιδημία η επιφυτία είναι η γρήγορη αύξηση του ποσού της ασθένειας σε σχέση με το χρόνο. Στις φυσικές φυτοκοινωνίες οι επιδημίες είναι σπάνιες σε αντίθεση με τις γεωργικές εκμεταλλεύσεις φυτών μεγάλης καλλιέργειας. Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν αρκεί η ύπαρξη ευαίσθητων φυτών και αφθονίας μολύσματος ενός ισχυρού παθογόνου, για να ξεκινήσει και να εξαπλωθεί η ασθένεια. Χρειάζονται και κατάλληλες συνθήκες περιβάλλοντος. Για να αναπτυχθεί μια ασθένεια σε καταστρεπτικό βαθμό για τη γεωργία πρέπει:

- Ο ξενιστής να είναι γονοτυπικά ευαίσθητος, να βρίσκεται σε κατάλληλη κατάσταση βλαστήσεως και σε πυκνότητα πληθυσμού στο χώρο και στο χρόνο.
- Το παθογόνο να έχει υψηλή γονοτυπική παθογόνο δύναμη και ικανότητα για παραγωγή μεγάλου αριθμού μολυσμάτων.
- Το περιβάλλον να αυξάνει την ευαισθησία του ξενιστή να μειώνει το χρόνο αναπαραγωγής του παθογόνου, να εξασφαλίζει μεταφορά των μολυσμάτων, μακρά διατήρηση των μολυσμάτων αυτών αλλά γρήγορη βλάστηση και μόλυνση.

Στην περίπτωση του *Botrytis cinerea* που ζει σαν σαπρόφυτο υπό μορφή μυκηλίου ή σκληρωτίων πάνω σε εξασθενημένους φυτικούς ιστούς και υπολείμματα, οι υγιείς ιστοί προσβάλλονται μόνο όταν υπάρχει μεγάλη πίεση μολύσματος ή όταν έλθουν σε επαφή με εστίες σαπροφυτικής ανάπτυξης. Σε κάποια είδη καρπών (φράουλα, ακτινίδιο, μήλο) ο μύκητας εγκαθίσταται στον κάλυκα του άνθους χωρίς να εμφανίσει συμπτώματα και όταν οι συνθήκες υγρασίας είναι ευνοϊκές, εκδηλώνεται σήψη του καρπού κατά το στάδιο της ωρίμανσης (λανθάνουσα προσβολή).

Κύρια πηγή μόλυνσης είναι οι προσβλημένοι ιστοί πάνω στους οποίους παράγονται άφθονα κονίδια τα οποία μεταφέρονται με τα ρεύματα του αέρα ή με τη βροχή. Διασπορά κονιδίων καθώς και μεταφορά τους στα υγιή φυτά γίνεται επίσης με τα χέρια, τα ρούχα και τα εργαλεία των

εργατών κατά την εκτέλεση των καλλιεργητικών φροντίδων ιδιαίτερα μέσα στα θερμοκήπια. Τα κονίδια μπορούν να επιβιώσουν για 1-3 μήνες αν ο καιρός παραμείνει υγρός και ψυχρός. Αν η μόλυνση εγκατασταθεί, τα επίπεδα υγρασίας και θερμοκρασίας είναι λιγότερο σημαντικά για την επιβίωση του μύκητα.

Φυτικά υπολείμματα πάνω στα οποία αναπτύσσεται ο μύκητας σαπροφυτικά, μεταφέρονται με τον άνεμο και προσκολλούνται πάνω σε υγιείς ιστούς τους οποίους μολύνουν εξ' επαφής (π.χ. ράγες σταφυλιών). Τα ασκοσπόρια του μύκητα παράγονται πολύ σπάνια και δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση της ασθένειας (σχήμα 1).

Ο βοτρυτής εξαρτάται άμεσα από τις καιρικές συνθήκες. Για την παραγωγή κονιδίων απαιτείται ατμοσφαιρική υγρασία 65-90% και θερμοκρασία 15⁰ - 25⁰C. Πέρα από τα όρια αυτά η ασθένεια δεν ευνοείται. Για να γίνει η μόλυνση απαιτείται επιπλέον η διατήρηση ενός λεπτού στρώματος νερού στους φυτικούς ιστούς για 15 ώρες τουλάχιστον. Ιδανικές συνθήκες για ανάπτυξη επιδημίας επικρατούν κατά την περίοδο χειμώνας – αρχές άνοιξης στις μη θερμαινόμενες καλλιέργειες κηπευτικών υπό κάλυψη. Από 9 έως 14 ημέρες πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων, φυτά προεκτέθηκαν στην ασθένεια σε χαμηλές (<9⁰C) και υψηλές (>24⁰C) θερμοκρασίες και σε συνθήκες ξηρότητας. Η μόλυνση επετεύχθει 7-8 ημέρες πριν γίνουν ορατά τα πρώτα συμπτώματα και ενισχύθηκε με σχετική υγρασία >91% και θερμοκρασίες μεταξύ 9⁰ και 24⁰C. Μετά την επίτευξη της μόλυνσης το μυκήλιο προστατεύονταν σχετικά από τους ιστούς των φυτών ενώ η θερμοκρασία και οι απαιτήσεις σε σχετική υγρασία ήταν λιγότερο αυστηρές. Οι δύο σημαντικές παράμετροι που σχετίζονται με την έναρξη των επιδημιών ήταν η διάρκεια που παρέμεινε υγρό το φύλλωμα και η διάρκεια των νυχτερινών θερμοκρασιών μεταξύ 9⁰C και 21⁰C. Οι ημερήσιοι ρυθμοί για τα πρώτα στάδια ήταν 7 ώρες ανά ημέρα για την υγρή περίοδο και 9,5 ώρες ανά ημέρα για την περίοδο των συγκεκριμένων ανωτέρω θερμοκρασιών.

Η κατάσταση θρέψης και η συγκέντρωση ορμονικών ουσιών στα φυτά επηρεάζουν επίσης την ευαισθησία τους στην ανάπτυξη επιδημιών από βοτρυτή. Η υψηλή υγρασία περιορίζει την κίνηση του ασβεστίου στα ανώτερα φυτικά μέρη και ο εμπλουτισμός με ασβέστιο του πλήθους των ιστών μειώνει την ευπάθεια φυτών όπως η τομάτα, το πιπεριά και η μελιτζάνα στην τεφρά σήψη. Από πειράματα μολύνσεων φυτών ζερμπερας και τριαντάφυλλου βρέθηκε ότι την άνοιξη και νωρίς το καλοκαίρι λίγες βλάβες (αλλοιώσεις) παρατηρήθηκαν σε σχέση με τις άλλες εποχές που σημειώθηκαν αρκετές αλλοιώσεις.

Ο ρόλος των κηρωδών στρωμάτων και της εφυμενίδας των φυτών στην ευπάθεια δεν είναι ξεκάθαρος. Καμιά σχέση δεν βρέθηκε μεταξύ του ποσού κηρών και εφυμενίδας ανά cm^2 και του αριθμού αλλοιώσεων σε άνθη τριανταφύλλου και ζέρμπερας.

Η χρήση παραμέτρων που σχετίζονται με την ανάπτυξη «μοντέλων» που θα μειώσουν ή θα καθυστερήσουν επιδημίες τέφρας σήψης σε φρούτα και ιστούς θα μειώσουν την ανάγκη για επεμβάσεις με μυκητοκτόνα. Μελλοντική εργασία στον τομέα της πρόβλεψης των επιδημιών βοτρύτη θα πρέπει να στοχεύει στην ανάπτυξη «μοντέλων» για καλλιέργειες σε θερμαινόμενα και μη θερμαινόμενα θερμοκήπια όπως είναι οι τομάτες.

Τα επίπεδα θρέψης στα φυτά, τα οποία επηρεάζουν την φυσιολογική ισορροπία των ιστών και την ευπάθειά τους στην τεφρά σήψη θα έπρεπε να μελετηθούν εκτενέστερα έτσι ώστε να σχηματιστεί μια ολοκληρωμένη άποψη του διαφορετικού ρόλου σημαντικών στοιχείων του όλου συστήματος.

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : Elad, Stienberg, Yunis and Mahrer (1992), Γεωργόπουλος (1984), Kerssies (1992), Παναγόπουλος (1995).

11. ΑΜΥΝΑ ΞΕΝΙΣΤΩΝ

11.1. Μηχανική άμυνα

Η εφυμενίδα των φυτών είναι ένα στρώμα αδιαπέραστο από τα βλαστώνοντα σπόρια του παθογόνου στην προσπάθειά του για απευθείας μόλυνση μέσω μηχανικής διάτρησης, σε αντίθεση με το σαπροφυτικό μυκήλιο το οποίο διαπερνά την εφυμενίδα εύκολα. Στο σταφύλι η άθικτη εφυμενίδα, είναι σχετικά ανθεκτική στην προσβολή του *Botrytis cinerea* και η μόλυνση εξαρτάται αποκλειστικά από τις πληγές που προκαλούνται σ' αυτή, από υπερβολικά υψηλές συνθήκες υγρασίας, από χρήση μυκητοκτόνων που επιδρούν δυσμενώς στην αντοχή της εφυμενίδας και από νύγματα εντόμων (Bessis, 1972).

11.2. Χημική άμυνα

Η σύνθεση της εφυμενίδας είναι τέτοια που απαγορεύει την είσοδο των παθογόνων. Οι Blakeman & Szejnberg (1973), βρήκαν ότι η βλάστηση κονιδίων του *Botrytis cinerea* παρεμποδίστηκε από τον επιφανειακό κηρό των φύλλων των ζαχαρτεύτλων. Ο Stalder (1955), θεώρησε ότι η ανθεκτικότητα ορισμένων ποικιλιών σταφυλιών στο *Botrytis cinerea*, δεν είχε σχέση με μηχανικές ιδιότητες των ιστών των ξενιστών και με κάποια επαγωγική αλληλεπίδραση, αλλά με τη χημική σύνθεση του κυτταρικού χυμού. Από άλλες έρευνες που έγιναν, στις αντιδράσεις των φυτών συμπεριλαμβάνεται η παραγωγή χημικών ουσιών, όπως βενζοϊκή αλδεύδη, υψηλή συγκέντρωση ταννίνης και ανηγμένα φαινολικά παράγωγα.

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : Jarvis (1977).

12. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Η αντιμετώπιση του *Botrytis cinerea* είναι δύσκολη, ιδιαίτερα όταν δεν ακολουθείται μια στρατηγική ολοκληρωμένη και ορθολογική κατά-πολέμησης. Μια τέτοια στρατηγική προϋποθέτει το συνδυασμό καλλιεργητικών, χημικών και βιολογικών μεθόδων. Μια τέτοια αντιμετώπιση είναι απαραίτητη εξαιτίας της ανθεκτικότητας που εμφανίζουν ορισμένα στελέχη σε πολλές κατηγορίες μυκητοκτόνων με αποτέλεσμα να περιορίζεται η αποτελεσματικότητα των χημικών επεμβάσεων.

12. 1. Καλλιεργητικές μέθοδοι.

Απαιτείται μείωση της υγρασίας η οποία στον αγρό επιτυγχάνεται με αραιή φύτευση, με φύτευση σε γραμμές κατευθυνόμενες από βορρά προς νότο ώστε καμμία πλευρά του φυτού να ευρίσκεται συνέχεια σε σκιά. Στα θερμοκήπια πρέπει να αποφεύγονται οι μεγάλες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, οι οποίες συντελούν στη συμπύκνωση των υδρατμών και στην επικάθηση σταγονιδίων νερού στα φυτά. Οι χώροι αυτοί θα πρέπει να αερίζονται καλά, τα φυτά να είναι κατά το δυνατό αραιοφυτευμένα και σε σχήματα μονοστέλεχα, οι αρδεύσεις να γίνονται τις πρωινές ώρες ώστε να γίνεται γρήγορη εξάτμιση του νερού από την επιφάνεια των φυτών. Στην αποτελεσματική αντιμετώπιση του *Botrytis cinerea* συντελεί και η τήρηση της καλής υγιεινής. Αυτή επιτυγχάνεται με αφαίρεση και καταστροφή των προσβλημένων φυτών ή φυτικών οργάνων. Οι καλλιέργειες πρέπει να είναι απαλλαγμένες κατά το δυνατό από νεκρούς φυτικούς ιστούς και υπολλείμματα φυτών διότι αυτά αποτελούν εστίες μόλυνσεως αλλά και σημεία εισόδου του παθογόνου. Αναφέρεται ότι η ασβέστωση των όξινων εδαφών και η δημιουργία σχέσεως ασβεστίου προς φώσφορο στους ιστούς του μίσχου των φύλλων ίση με 2 ή μεγαλύτερη μειώνει την ευπάθεια των φυτών στην ασθένεια. (Stall et al, 1965).

12.2. Βιολογικές μέθοδοι

Στην αρχή της δεκαετίας του 1950 θεωρήθηκε ότι μύκητες, βακτήρια και ακτινομύκητες ήταν σε θέση να περιορίσουν τη μόλυνση από

Botrytis cinerea σε φύλλα μαρουλιού αλλά δεν κατέστη δυνατό μέχρι τη δεκαετία του 1970, ο βιολογικός έλεγχος σε αμπέλι, μηλιά και φράουλα χρησιμοποιώντας *Trichoderma spp.* Τα πρώτα βήματα στο βιολογικό έλεγχο έγιναν από τον Wood (1951), ο οποίος μόλυνε γηρασμένα φύλλα μαρουλιού με ανταγωνιστικούς μύκητες για να εμποδίσει την πρόιμη εγκατάσταση του *Botrytis cinerea*. Τα θετικά αποτελέσματα έδωσαν τη δυνατότητα για τον έλεγχο της ασθένειας κάτω από ψυχρές συνθήκες.

Ο Newhook (1957), κατόρθωσε να περιορίσει την τεφρά σήψη σε τομάτες ανεπτυγμένες σε θερμοκήπιο, ψεκάζοντας μια ποσότητα σπορίων *Cladosporium herbarum* και *Penicillium sp.* Οι Bhatt και Vaughan (1962), πέτυχαν μείωση της ασθένειας περίπου 40% στη φράουλα με εφαρμογές *C. herbarum* σε γηρασμένα άνθη και συνθήκες θερμοκηπίου. Οι Tronsmo και Dubos (1982), παρουσίασαν τα πρώτα αποτελέσματα σχετικά με τον έλεγχο ξηράς σήψης των μήλων και της τεφράς σήψης των σταφυλιών με απομονώσεις του *Trichoderma*.

Οι Kohl και Schlosser (1989), επέλεξαν απομονώσεις του γένους *Trichoderma* ικανές να καταστρέψουν τα σκληρώτια του *Botrytis cinerea* σε χαμηλές θερμοκρασίες με προοπτική να καταστρέψουν το παθογόνο κατά τη διάρκεια της φάσης διαχείμανσης.

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

Ερευνητές εκμεταλλευόμενοι το φαινόμενο της αλληλοπάθειας διαπίστωσαν πως η L – αλανοσίνη, που παράγεται από τους *Streptomyces spp.* και το αιθέριο έλαιο του *Salvia pomifera* (φασκομηλιά) σε πολύ μικρές δόσεις ελέγχουν το βοτρύτη. Επίσης έρευνες γίνονται με μικροβιακά στελέχη, ανταγωνιστικά του *Botrytis cinerea* που απομονώθηκαν από *Brassica sp.*

Ο *Botrytis cinerea*, μπορεί να ελεγχθεί από το μύκητα *Myrothecium sp.* ο οποίος δρα, εκκρίνοντας θερμοσταθερές τοξίνες.

Πολλές μελέτες ως προς τον βιολογικό έλεγχο του *Botrytis cinerea* έχουν γίνει και ορισμένες από αυτές έδωσαν καλά αποτελέσματα σε διακοσμητικά φυτά όπως η πετούνια. Μια απομόνωση του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* κατάφερε να ελέγξει το βοτρύτη σε πετούνιες μειώνοντας τις επιπτώσεις της ασθένειας κατά μέσο όρο 77%. Τέτοια αποτελέσματα ενθαρρύνουν τη χρήση βιολογικών παραγόντων για τον έλεγχο της τεφράς σήψης στην πετούνια σε άλλα καλλωπιστικά φυτά αλλά και γενικότερα σε λαχανοκομικά είδη.

12.3. Χημικές μέθοδοι

Για την προστασία των φυτών χρησιμοποιούνται μυκητοκτόνα ευρέως φάσματος όπως captan, thiram, dichlofluanid, chlorothalonil, dichloran, difolatan. Εκτός από τα παραπάνω φάρμακα μπορεί να χρησιμοποιηθούν διασυστηματικά μυκητοκτόνα που διακρίνονται στην κατηγορία των βενζιμιδαζολικών η οποία περιλαμβάνει τα benomyl, carbendazim, thiophanate methyl και στην κατηγορία των δικαρβοξιμιδικών που περιλαμβάνει τα iprodione, procymidone, vinclozine.

Επίσης χρησιμοποιούνται πρόσφατα και το iminoctadine, triacetate (Befran) και μίγμα diethofencarb + carbendazim (Sumico). Το pyrimethanil είναι ένα μυκητοκτόνο της ομάδας των ανιλινο-πυριμιδινών που όπως διαπιστώθηκε πρόσφατα είναι αποτελεσματικό εναντίον του *Botrytis cinerea* στην τομάτα και άλλες καλλιέργειες (φράουλα, άμπελος), (Παπαγεωργίου κ.α., 1994).

Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες η καλύτερη καταπολέμηση του *Botrytis cinerea* σε καλλιέργειες με πληθυσμούς ανθεκτικούς και ευαίσθητους σε μυκητοκτόνα, επιτυγχάνεται με μίγμα βενζιμιδαζολικού + diethofencarb, που χρησιμοποιείται μόνο του ή με εναλλαγή με ένα δικαρβοξιμιδικό. Η χρησιμοποίηση μόνο βενζιμιδαζολικών ή δικαρβοξιμιδικού δεν καταπολεμούν την ασθένεια (Garibaldi, Aloï & gullino, 1989).

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : Ζιώγας (1981), Dubos (1992), Gould, Kobayshi, Bergen (1996), Μπούρμπος και Σκουντριδάκης (1993), Παναγόπουλος (1995), Παππάς (1992).

13. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

Όταν ο πληθυσμός ενός μύκητα εκτίθεται σε μια μυκοτοξική ουσία, η σύστασή του μπορεί να μεταβληθεί, ώστε ο πληθυσμός σαν σύνολο, να προσαρμοσθεί στο τροποποιημένο περιβάλλον. Η μέχρι τώρα πείρα έχει αποδείξει ότι το πόσο επιτυχής θα είναι η προσαρμογή αυτή εξαρτάται από το ποιο μυκητοκτόνο θα χρησιμοποιήσουμε μάλλον, παρά από το ποιο είδος μύκητα θα εκτεθεί στην επίδρασή του. Η προσαρμογή αυτή των παθογόνων στα μυκητοκτόνα ήταν ένας από τους κυριώτερους παράγοντες αποτυχίας στην καταπολέμηση των μυκητολογικών ασθενειών με χημικές ουσίες. Έτσι αν μειωθεί σημαντικά η ευαισθησία σε μια ένωση που χρησιμοποιούμε για καταπολέμηση θα προκύψει ένα ανθεκτικό στέλεχος, που συνεχώς θα επιλέγεται από την εφαρμογή του φαρμάκου μέχρι που να επικρατήσει.

Το πρόβλημα αυτό προέκυψε τη δεκαετία του 1960 και συνέπεσε με την εμφάνιση των πρώτων διασυστηματικών ουσιών, γνωστών και σαν μυκητοκτόνων «τρίτης γενεάς». Τα μυκητοκτόνα αυτά έχουν κατά κανόνα υψηλή εκλεκτική δράση εναντίον ενός περιορισμένου αριθμού συγγενών ειδών μυκήτων. Συνήθως δρουν σαν εξειδικευμένοι παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης ορισμένων απαραίτητων συστατικών για την ομαλή λειτουργία του κυττάρου. Η έλλειψη διασυστηματικής ικανότητας μιας χημικής ουσίας δεν αποκλείει τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας, εφόσον βέβαια, η βιοχημική δράση αυτής είναι εκλεκτική. Σ' αυτή την τελευταία κατηγορία ανήκουν μυκητοκτόνα της ομάδας των δικαρβοξιμιδικών. Αντίθετα οι χημικές ουσίες των προηγούμενων «γενεών» γνωστές και σαν προστατευτικά ή συμβατικά μυκητοκτόνα, στερούνται εκλεκτικής βιοχημικής δράσης και κατά συνέπεια δεν υφίστανται τον κίνδυνο της εμφάνισης ανθεκτικότητας. Επιπλέον χαρακτηρίζονται για το ευρύ φάσμα δράσης κατά διαφόρων ειδών παθογόνων. Όμως η συγκριτικά καλύτερη προστατευτική και σε ορισμένες περιπτώσεις θεραπευτική και διασυστηματική δράση των εκλεκτικών παρεμποδιστών, με συνεχή και αποκλειστική χρησιμοποίηση από τους παραγωγούς, είχε σαν αποτέλεσμα την απώλεια του ελέγχου των ασθενειών λόγω της επικράτησης ανθεκτικών στελεχών των παθογόνων.

Θεωρητικά η ευαισθησία σε τοξική ουσία, μπορεί να μεταβληθεί με μεταλλαγή χρωματοσωμικού ή εξωχρωματοσωματικού γόνου. Στις περισσότερες περιπτώσεις περισσότεροι από ένας γόνοι ελέγχουν την ευαισθησία στο ίδιο μυκητοκτόνο. Το επίπεδο της ανθεκτικότητας μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το ποιος γόνος έχει υποστεί μεταλλαγή. Όταν στο ίδιο απλοειδές κύτταρο του μύκητα μεταλλάξουν περισσότεροι από ένας γόνοι για την ανθεκτικότητα στο ίδιο μυκητοκτόνο, το επίπεδο αντοχής μπορεί ν' ανέβει πολύ. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα, με συνεχή χρήση του μυκητοκτόνου, να εμφανιστούν στελέχη με πολύ μικρή ευαισθησία.

Στα διπλοειδή κύτταρα του μύκητα το ανθεκτικό αλληλόμορφο μπορεί να συμπεριφέρεται σαν κυρίαρχο ή ημικυρίαρχο ή υποτελές. Αυτό εξαρτάται περισσότερο από το γόνο που μελετάμε και λιγότερο από το μυκητοκτόνο που χρησιμοποιούμε.

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

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι είναι πολύ δύσκολο να αναπτυχθεί ανθεκτικότητα σε ένα προστατευτικό μυκητοκτόνο που δρα σαν μη εξειδικευμένος παρεμποδιστής σε πολλά συστατικά του κυττάρου, τουλάχιστον με αυτόν το μηχανισμό της αλλαγής στις ευαίσθητες θέσεις.

Στην περίπτωση όμως των τοξικών ενώσεων υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί δημιουργίας ανθεκτικότητας γι' αυτό και έχουμε περιπτώσεις αποτυχίας προστατευτικών (μη εξειδικευμένης δράσης) μυκητοκτόνων, έστω και αν οι περιπτώσεις αυτές είναι σχετικά σπάνιες.

Ένας από τους μηχανισμούς αυτούς είναι η μείωση της περατότητας της κυττοπλασματικής μεμβράνης στο τοξικό μόριο. Ένας άλλος μηχανισμός αντοχής είναι και ο μηχανισμός της αποτοξικοποίησης (detoxification).

Ο χρόνος από την εμφάνιση των πρώτων ανθεκτικών στελεχών μέχρι τη διαπίστωση μειωμένης αποτελεσματικότητας του φαρμάκου, εξαρτάται από τη διαφορά ευαισθησίας μεταξύ αρχικού (ευαίσθητου) πληθυσμού και ανθεκτικών στελεχών. Η ταχύτητα επιλογής εξαρτάται επίσης από την υπολειμματική δράση του φαρμάκου και τη συχνότητα των επεμβάσεων με το ίδιο φάρμακο. Τέλος, η σταθερότητα της ανθεκτικότητας εξαρτάται από την προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη παθογόνο δύναμη, μειωμένη παραγωγή σπορίων κλπ. Οι ιδιότητες αυτές μπορεί να επηρεάζονται σε συγκεκριμένο το-

ξικό μόριο. Σε πολλές όμως περιπτώσεις οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας δεν επηρεάζουν την προσαρμοστικότητα και ο πληθυσμός του παθογόνου μπορεί να παραμείνει ανθεκτικός για πολλά χρόνια μετά τη διακοπή χρήσεως του μυκητοκτόνου.

Ο *Botrytis cinerea* μετά από συνεχείς επεμβάσεις με ορισμένα μυκητοκτόνα δημιουργεί στελέχη ανθεκτικά στα εφαρμοζόμενα φάρμακα.

Η καταπολέμηση του βοτρύτη με τα προστατευτικά μυκητοκτόνα, captan, folpet, zineb, thiram κ.α., χαρακτηρίζεται μετρίως αποτελεσματική. Με την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών η αποτελεσματικότητα πέφτει κατά 50%.

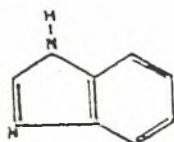
Με την εμφάνιση των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων δόθηκε η δυνατότητα ελέγχου του βοτρύτη. Με την εντατική όμως χρήση τους βρέθηκε ότι επιλογή από στελέχη παθογόνα ανθεκτικά, μπορούν να καταστήσουν αυτά τα μυκητοκτόνα εντελώς αναποτελεσματικά. Στην περίπτωση του βοτρύτη αντικατάσταση των βενζιμιδαζολικών από τα δικαρβοξιμιδικά έδωσε μόνο προσωρινή λύση στο πρόβλημα ελέγχου της ασθένειας, γιατί και αυτά επίσης επιλέγουν ανθεκτικά στελέχη. Βάση του φαινομένου της αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν τα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, χρησιμοποιήθηκε μίγμα αυτών για τον έλεγχο στελεχών *Botrytis cinerea* τα οποία ήταν ευαίσθητα στα βενζιμιδαζολικά και ανθεκτικά στα φαινυλοκαρβαμιδικά ή και το αντίθετο.

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : Γεωργόπουλος (1984), Γεωργόπουλος και Ζιώγας (1992), Ζιώγας (1993), Παππάς (1992).

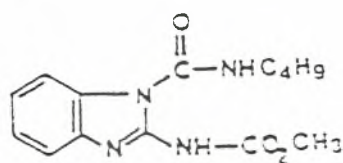
14. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ

14. 1. Βενζιμιδαζολικά

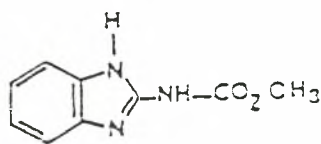
Στην ομάδα αυτή υπάγονται τα μυκητοξικά παράγωγα της βενζιμιδαζόλης (benzimidazole): που δεν είναι η ίδια σημαντικά τοξική στους μύκητες.



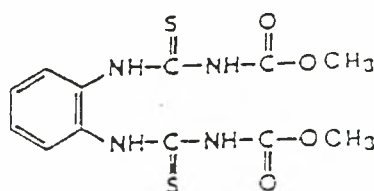
Το πρώτο μυκητοκτόνο της ομάδας που έγινε γνωστό, είναι το benomyl και ακολούθησαν τα carbendazim (MBC) και thiophanate methyl των οποίων οι συντακτικοί τύποι είναι:



benomyl



carbendazim



thiophanate methyl

Το benomyl, που ανακαλύφθηκε το 1968 από τους Delp και Kloring είναι μυκητοξικό σε εξαιρετικά μικρές συγκεντρώσεις (π.χ. 0,1 mg/l). Είναι διασυστηματικό και μπορεί να καταπολεμήσει τις κυριότερες μυκητολογικές ασθένειες. Τριάντα χρόνια μετά την εμφάνισή του εξακολουθεί να είναι ένα σημαντικό μυκητοκτόνο αλλά η εικόνα εμφανίζεται λιγότερο αισιόδοξη από ότι τα πρώτα χρόνια μετά την ανακάλυψή του. Οι

λόγοι είναι δύο. Η ευκολία με την οποία στους ευαίσθητους μύκητες παράγονται, με μεταλλάγες στελέχη ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα στον αγρό και η γενετική δραστηριότητα των μυκητοκτόνων αυτών. Σε υδατικό διάλυμα το benomyl μετατρέπεται γρήγορα στον μεθυλεστέρα του βενζιμιδαζολοκαρβαμιδικού οξέος, γνωστός με το όνομα carbendazim. Το thiophanate – methyl, είναι διασυστηματικό και μοιάζει σε βιολογική δράση με τα προηγούμενα.

Τα βενζιμιδαζολικά προσλαμβάνονται, από τις ρίζες αλλά και τα υπέργεια τμήματα των φυτών και μετακινούνται. Όμως, υπάρχουν ιδιαιτερότητες μεταξύ φυτών έναντι αυτής της διασυστηματικότητας των βενζιμιδαζολικών. Για παράδειγμα στα εσπεριδοειδή δεν παρατηρήθηκε μετακίνηση του benomyl από τα φύλλα προς τους καρπούς ενώ υπολείμματα του carbendazim βρέθηκαν στο φλοιό και χυμό πορτοκαλιών μια ημέρα μετά την εφαρμογή του benomyl.

Τα βενζιμιδαζολικά εφαρμοζόμενα στο έδαφος δεν μετακινούνται. Το pH του εδάφους επηρεάζει την ταχύτητα πρόσληψης και την περίοδο διαθεσιμότητας του carbendazim. Σε εδάφη με αλκαλικό pH το carbendazim είναι πιο ευκολοδιαθέσιμο αλλά μεταβολίζεται πιο γρήγορα ενώ σε χαμηλότερα pH η πρόσληψη γίνεται με αργότερο ρυθμό αλλά είναι διαθέσιμο για μακρότερο χρονικό διάστημα.

Πριν την εμφάνιση των βενζιμιδαζολικών δεν υπήρχε άλλο μέσο για τον αποτελεσματικό έλεγχο της τεφράς σήψης. Όταν εμφανίστηκε το benomyl το 1971 η αποτελεσματική του δράση είχε σαν συνέπεια την ευρεία και αποκλειστική χρήση του. Όμως μέσα σε δύο χρόνια, η απώλεια του ελέγχου στις βόρειες περιοχές παραγωγής σταφυλιών, έδωσε ενδείξεις προβλημάτων ανθεκτικότητας. Αυτό συνέβη σε περιοχές με πολύ υψηλές πιέσεις ασθένειας και πολύ εντατική χρήση μυκητοκτόνων. Μεταγενέστερες παρατηρήσεις επιβεβαίωσαν τα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας. Από το 1974 έως το 1978 τα βενζιμιδαζολικά έπαψαν να χρησιμοποιούνται στη βόρεια Γαλλία. (Ehrenhardt et al, 1973, Fehrman, 1976, Leroux and Clerjean, 1985, Leroux and Beetz, 1978, Schuepp and Lauber, 1977, Staub and Diriwaechter, 1986).

Σε αντίθεση με τις βόρειες περιοχές η εμφάνιση ανθεκτικότητας στις νότιες περιοχές έγινε πιο αργά και σε μικρότερη συχνότητα. Αυτή η κλίση βορράς – νότος της ανθεκτικότητας, ακολουθεί το επίπεδο της πίεσης ασθένειας και της χρήσης των μυκητοκτόνων. (Leroux and Clerjean, 1985, Staub and Diriwaechter, 1986).

Η ανθεκτικότητα του *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά είναι σταθερή. Αυτό είναι αποτέλεσμα της ικανότητας των ανθεκτικών στελεχών τα οποία συναγωνίζονται ικανοποιητικά τους ευαίσθητους πληθυ-

σμούς στη φύση. Η σταθερότητα της ανθεκτικότητας του *Botrytis cinerea* αποδείχθηκε από τους Schuerp και Kung (1981), οι οποίοι σύγκριναν διάφορα επίπεδα ανθεκτικότητας απομονώσεων βοτρυτή από την Ελβετία που συλλέχθηκαν το 1974 όταν η χρήση των βενζιμιδαζολικών είχε διακοπεί και απομόνωσαν για 4 χρόνια το επίπεδο ανθεκτικότητας κυμάνθηκε στο 50-60%. Παρομοίως πληθυσμοί στη βόρεια Γαλλία ήταν 50-90% ανθεκτικοί 6 χρόνια μετά την παύση εφαρμογής των βενζιμιδαζολικών. (Leroux και Clerjean, 1985).

Η κατάσταση της ανθεκτικότητας σε σταφύλια προσβεβλημένα από βοτρυτή έχει αρκετά χαρακτηριστικά που εμφανίζονται και στην ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά.

14.1.1. Μηχανισμός δράσης των βενζιμιδαζολικών

Τα βενζιμιδαζόλια θεωρούνται αναστολείς της μιτώσεως διότι παρεμβαίνουν στον πολυμερισμό της τουμπουλίνης και συνεπώς εμποδίζουν το σχηματισμό της ατράκτου. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τουμπουλίνης και βενζιμιδαζολίων δεν έχουν πλήρως διευκρινισθεί. Είναι όμως πλέον αποδεδειγμένο ότι το μόριο του carbendazim εισερχόμενο στον πυρήνα του κυττάρου προσκολλάται επάνω στην β- υπομονάδα της τουμπουλίνης, και με τον τρόπο αυτό εμποδίζει το διμερισμό των υπομονάδων α – και β- για το σχηματισμό μιας λειτουργικής μονάδας της τουμπουλίνης. Ανθεκτικά στελέχη μυκήτων στα βενζιμιδαζόλια βρέθηκε ότι έχουν μεταλλαγμένες β – υπομονάδες της τουμπουλίνης οι οποίες έχουν μειωμένη πλέον έλξη προς τα βενζιμιδαζόλια. Μετάλλαξη σε ένα γονίδιο είναι υπεύθυνη για τη δομική αλλαγή της τουμπουλίνης που οδηγεί στη μειωμένη συγγένεια προς τα βενζιμιδαζόλια. Σε ορισμένους μύκητες η αντοχή οφείλεται στη μετάλλαξη δύο γονιδίων.

Σχετικά με τον τρόπο δράσεως των βενζιμιδαζολίων είχαν προταθεί και άλλες θεωρίες όπως εκείνη των Clemons και Sisler σχετικά με την παρεμβολή των βενζιμιδαζολίων στη βιοσύνθεση του DNA λόγω ομοιότητας αυτών με τις βάσεις αδερίνη και γουανίνη. Ενδείξεις υπέρ της θεωρίας αυτής προέρχονται από πειράματα όπου η προσθήκη αδερίνης και γουανίνης μειώνει την τοξικότητα του benomyl και του thiabendazole στο μύκητα *Fusarium oxysporum*.

Αναφέρεται ακόμη ότι ο τρόπος δράσεως του benomyl σε περιορισμένο αριθμό μυκήτων είναι διαφορετικός από εκείνον του carbendazim. Σε διαλύματα το benomyl διασπάται προς carbendazim και ένα πτητικό συστατικό, εκλεκτικά μυκητοτοξικό, το βούτυλο – ισοκυάνιο. Το τελευταίο είναι ισχυρός αναστολέας της οξειδώσεως της γλυκόζης. Καθόσον η

ουσία αυτή είναι δραστική σε συγκεντρώσεις μικρότερες από εκείνες του carbendazim υποστηρίζεται ότι η δράση της θα είναι σημαντική.

Το benomyl καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας έχουν μεταλλαξογόνες ιδιότητες και στο γεγονός αυτό αποδίδεται η σχετικά ταχεία ανάπτυξη ανθεκτικότητας πολλών μυκήτων. Ήδη η χρήση των βενζιμιδαζολίων στη μετασσυλλεκτική προστασία φρούτων έχει περιορισθεί λόγω αναπτύξεως ανθεκτικότητας πολλών φυτοπαθογόνων. Τερατογόνες δράσεις του benomyl, λόγω προκλήσεως μεταλλάξεων, έχουν αναφερθεί σε διάφορους οργανισμούς.

14.1.2. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας.

Μηχανισμοί ανθεκτικότητας έχουν μελετηθεί κυρίως σε εργαστηριακές μεταλλάξεις από μύκητα "πρότυπο" και περιλαμβάνουν διαφοροποιημένη συγγένεια της tubulin με τα βενζιμιδαζολικά, αλλαγμένη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων, δευτερεύουσες μεταλλάξεις σε μη απαραίτητα γονίδια tubulin και αλλαγές αμινοξέων στην tubulin. Τα περιορισμένα στοιχεία πάνω στους μηχανισμούς ανάπτυξης ανθεκτικότητας στους φυτοπαθογόνους μύκητες, δείχνουν σαν βάση ανθεκτικότητας την αλλαγμένη συγγένεια της ευαίσθητης θέσης που αντιδρά με το μυκητοκτόνο (Davidse, 1987).

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

14.1.2.1. Διαφοροποιημένη συγγένεια της tubulin με τα βενζιμιδαζολικά.

Μελέτες για τον μηχανισμό της ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά στενά συνδεδεμένες με αυτές του τρόπου δράσης τους διευκολύνθηκαν πολύ από την διαθεσιμότητα γενετικής ανθεκτικότητας απομονώσεων *A. nidulans*.

Σ' αυτό το μύκητα τρεις απομονώσεις benA, ben B, και ben C σχετίζονται με την ανθεκτικότητα (Van Tuyl, 1977).

Μεταλλάξεις του *ben A* έδωσαν τα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας. Πρόσφατες εργασίες έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα στο *carben-dazim* δεν οφειλόταν σε μια μειωμένη παραλαβή ή μια αυξημένη μεταβολική μετατροπή (Davidse, 1976).

Έγιναν έρευνες πάνω στη γενετική βάση της ανθεκτικότητας, στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, απομονώσεων από αγρό του μύκητα *Botryotinia fuckeliana*. Σ' αυτόν το μύκητα το γονίδιο *Mbc1* με τα αλληλόμορφα *Mbc1LR* και *Mbc 1HR*, είναι υπεύθυνο για χαμηλή και υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά. Το *Mbc 1HR* αλληλόμορφο, επίσης είναι υπεύθυνο για την ευαισθησία στα φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, ενώ το αλληλόμορφο *Mbc 1S* είναι υπεύθυνο για την ευαισθησία στα βενζιμιδαζολικά (Faretra and Pollastro, 1993).

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

14.1.2.2. Αλλαγμένη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων

Πολλές μεταλλάξεις στο γονίδιο *ben A* και αποδίδει ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, έχουν ποικίλλα παρεμποδιστικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη σε υψηλή θερμοκρασία (*ts⁻ mutants*) και / ή σε χαμηλή θερμοκρασία (*cs⁻ mutants*) και στην ευαισθησία σε άλλους παράγοντες που επηρεάζουν τους μικροσωληνίσκους όπως *griseofulvin* και *p - fluorophenylalanine* (Oakley and Morris, 1981). Μια τέτοια μετάλλαξη *ben A33* προκαλεί υπέρ-σταθερότητα των μικροσωληνίσκων. Στελέχη που φέρουν το μεταλλαγμένο *ben A33* μπλοκάρονται κατά τη μίτωση, αν και σχηματίζεται μιτωτική άτρακτος. Λόγω της μεγαλύτερης τους σταθερότητας οι μικροσωληνίσκοι αντιστέκονται προφανώς και στη διασκόρπισή τους που προκαλείται από τα βενζιμιδαζολικά. Η υπερ-σταθερότητα των μικροσωληνίσκων που προκαλείται από τη μετάλλαξη *ben A33* μπορεί να εξουδετερωθεί από επιπλέον μεταλλάξεις στο γονίδιο *ben A*.

14.1.2.3. Δευτερεύουσες μεταλλάξεις σε γονίδια *tubulin*.

Οι μεταλλάξεις στη γονιδιακή θέση *ben A* προκαλούν ανθεκτικότητα, μόνο κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης. Το στάδιο παραγωγής σπορίων είναι ακόμα ευαίσθητο στα βενζιμιδαζολικά. Δευτερεύουσες μεταλλάξεις στο γονίδιο *tub C* (υπεύθυνο για το σχηματισμό της α_2 - *tubulin*) προκαλούν ανθεκτικότητα στο στάδιο παραγωγής σπορίων σε στελέχη που φέρουν *ben A* μεταλλάξεις. Τέτοια μεταλλαγμένα στελέχη, θα

μπορούσαν να προκύψουν μετά από έκθεση σε UV – ακτινοβολία ή από ολοκληρωτική διαφοροποίηση σε μια συγκεκριμένη θέση (Weatherbee, κ.α., 1985).

Δευτερεύουσες μεταλλάξεις σε ένα από τα γονίδια της tubulin, προκαλεί αυξημένη ευαισθησία στα βενζιμιδαζολικά. Αν και δεν είναι σημαντικά για την ανάπτυξη των στελεχών τα παράγωγα αυτών των γονιδίων, συμμετέχουν προφανώς στο σχηματισμό των μικροσωληνίσκων. Μειωμένη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων ή αυξημένη συγγένεια της tubulin στα βενζιμιδαζολικά λόγω της έλλειψης ενός από τους τύπους α – tubulin μπορεί να προκαλέσουν την τροποποιημένη ευαισθησία των δευτερευόντως μεταλλαγμένων στελεχών (Adachi, κ.α. 1986).

14.1.2.4. Αλλαγές αμινοξέων στην b-tubulin.

Η μετατροπή της αλληλουχίας στο DNA των ben A4, ben A31 και ben A33, τα οποία παρέχουν ανθεκτικότητα στο carbendazim και thiabendazole, αφορά, το κωδικόνιο 6 το οποίο εμπλέκεται στην αλλαγή του αμινοξέως ιστιδίνης σε τυροσίνη, το κωδικόνιο 50 (για την αλλαγή της τυροσίνης σε σερίνη) και το κωδικόνιο 134 (για την αλλαγή της γλουταμίνης σε λυσίνη). Τα ben A16 και ben A19 τα οποία παρέχουν ανθεκτικότητα στο thiabendazole αλλά αυξάνουν την ευαισθησία στο carbendazim, εντοπίζονται και τα δύο στο κωδικόνιο 165 και έχουν ως συνέπεια την αλλαγή της αλανίνης σε βαλίνη.

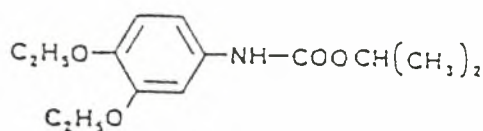
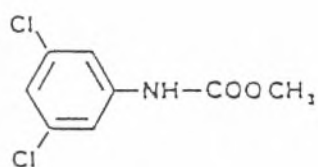
Σε μια απομόνωση του *N. crassa* εξετάστηκε μια αλλαγή του ζεύγους βάσεων τυροσίνη – αλανίνη στη δεύτερη βάση του κωδικονίου 167 που είχε σαν αποτέλεσμα την αλλαγή του αμινοξέος φαινυλαλανίνη σε τυροσίνη με άμεσο αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά.

Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το γονίδιο της b – tubulin μπορεί να μεταλλαχθεί σε περιορισμένες περιπτώσεις, προκαλώντας ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά. Σε τελευταία ανάλυση αυτές οι μεταλλάξεις θα φανούν χρήσιμες στον προσδιορισμό της δομής της θέσης συνένωσης. Οι θέσεις των αμινοξέων 165 – 167 αναμφίβολα συσχετίζονται με τη συνένωση, από όταν οι μεταλλάξεις σε μια απομόνωση του *A. nidulans* και σε μια απομόνωση του *N. crassa* χαρτογραφούνται στην περιοχή ανταπόκρισης του DNA. Επίσης η διαφορετική αντίδραση στο thiabendazole και στο carbendazim προκαλείται από τις μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 165 το οποίο δείχνει ότι αυτή η περιοχή σχετίζεται με την ένωση της αλυσίδας των βενζιμιδαζολικών με την οποία το thiabendazole διαφέρει από το carbendazim.

14.2. Φαινυλοκαρβαμιδικά.

Όπως προαναφέρθηκε το κύριο πρόβλημα των βενζιμιδαζολικών είναι η συχνή εμφάνιση και επικράτηση στον αγρό ανθεκτικών στελεχών. Οι Leroux και Gredt (1979), παρατήρησαν πρώτοι ότι στελέχη του *Botrytis cinerea* και του *Penicillium expansum*, ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά, παρουσίαζαν μεγάλη ευαισθησία στα φαινυλοκαρβομιδικά (N-phenylcarbamates). Ενώσεις της κατηγορίας αυτής είχαν εμφανισθεί σαν ζιζανιοκτόνα, τα οποία παρεμβάλλονται στη λειτουργία της μιτωτικής ατράκτου, που έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της κυτταρικής διαίρεσης φυτικών κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό της αρνητικής συσχέτισης στην διασταυρωτή ανθεκτικότητα (negatively correlated cross – resistance), παρατηρήθηκε στη συνέχεια και σε άλλους μύκητες.

Από τις παρατηρήσεις αυτές ξεκίνησε έτσι μια προσπάθεια για την αποκάλυψη φαινυλοκαρβαμιδικών ενώσεων, που να μην φυτοτοξικές και να είναι κατάλληλες για την καταπολέμηση των ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών του *Botrytis cinerea*. Τέτοιες ενώσεις, που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα, είναι:



MDPC [N-(3-5-dichlorophenyl) carbamate]

diethofencarb

Το MDPC χρησιμοποιήθηκε κατά τον *Botrytis cinerea* σε αγγούρι ο οποίος εμφάνισε ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά. Το μίγμα αποδείχθηκε παρεμποδιστικό όπως και θεραπευτικό της τεφράς σήψης. Το diethfencarb ήταν περισσότερο αποτελεσματικό στον έλεγχο της τεφράς σήψης από το MDPC και εμφάνισε παρόμοια χαρακτηριστικά με το MDPC.

Το diethofencarb σε συνδυασμό με το carbendazim κατάφερε να μειώσει την ανθεκτικότητα σε ένα πληθυσμό *Botrytis cinerea* κατεξοχήν ανθεκτικό στα βενζιμιδαζολικά σε λαχανικά και σταφύλια. Επιπλέον το diethofencarb δεν έδειξε καμιά φυτοτοξικότητα σε μια σειρά καλλιεργειών όπως τομάτα, αγγούρι, φράουλα, μελιτζάνα και σταφύλι.

14.2.1. Μηχανισμός δράσης των φαινυλοκαρβαμιδικών.

Ως προς τον μηχανισμό δράσης, τα φαινυλοκαρβαμιδικά φαίνεται ότι προσκολλώνται στη b-tubulin και εμποδίζουν έτσι τη λειτουργία των μικροσωληνίσκων και την οργάνωση της μιτωτικής ατράκτου στους μύκητες. Αλλαγές στη θέση προσκόλλησης, που μειώνουν τη συγγένεια (affinity) για τα βενζιμιδαζολικά μπορεί ν' αυξήσουν τη συγγένεια για τα φαινυλοκαρβαμιδικά. Ανάλυση αμινοξέων της b-tubulin από ευαίσθητα και ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά στελέχη του ασκομύκητα *neurospora crassa*, έδειξε ότι αλλαγή σ' ένα μόνο αμινοξύ είναι υπεύθυνη για την αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ βενζιμιδαζολικών και φαινυλοκαρβαμιδικών. Η αρνητική αυτή συσχέτιση όμως δεν είναι κανόνας χωρίς εξαίρεση και γι' αυτό τα φαινυλοκαρβαμιδικά δεν έδωσαν λύση στο πρόβλημα της ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά.

Το MDPC και το diethofencarb προκάλεσαν μορφολογικές ανωμαλίες σε απομονώσεις *Botrytis cinerea* ανθεκτικές στα βενζιμιδαζολικά. Οι βλαστικές υφές των σπορίων παραμορφώθηκαν και αυξήθηκαν σε μέγεθος και δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω ανάπτυξη του μυκηλίου. Αυτές οι μορφολογικές ανωμαλίες ήταν παρόμοιες με αυτές που παρουσιάστηκαν σε απομονώσεις ευαίσθητες στη χρήση βενζιμιδαζολικών. Η μεταχείριση βλασταίνοντων κονιδίων από ανθεκτικές απομονώσεις με MDPC ή diethofencarb είχε σαν αποτέλεσμα το διασκορπισμό της χρωματίνης και την απώλεια ενός πυρήνα. Παρόμοια αποτελέσματα πάρθηκαν από τη χρήση βενζιμιδαζολικών σε ευαίσθητα κονίδια αλλά διαφορετικές μορφολογικές αλλαγές παρατηρήθηκαν σε κονίδια στα οποία δεν έγινε καμιά επέμβαση.

14.3. Δικαρβοξιμιδικά.

Ο περιορισμός της χρήσεως των βενζιμιδοζολίων λόγω αναπτύξεως ανοχής των μυκήτων έδωσε την ώθηση για την εξεύρεση νέων ομάδων μυκητοκτόνων και ειδικά για την αντιμετώπιση του *Botrytis cinerea* αναπτύχθηκαν τα δικαρβοξιμίδια iprodione procymidone και vinclozolin. Όλα έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό (μερικά mg /lt) και είναι σταθερά σε ουδέτερα και ελαφρώς όξινα διαλύματα.

Είναι αποτελεσματικά εναντίον του *Botrytis cinerea* και είδη από *Sclerotinia*, *Monilia* και *Alternaria* καλλιεργουμένων φυτών και αποθηκευμένων προϊόντων.

Το procymidone εφαρμοζόμενο στο έδαφος προσλαμβάνεται από φυτά φράουλας και παρέχει άριστη προστασία στα φύλλα και άνθη έναντι του *Botrytis cinerea*. Η διασυστηματική μετακίνηση του procymi-

done από το έδαφος προς τα υπέργεια τμήματα έχει αποδειχθεί και σε φυτά αγγουριάς και φασολιάς. Το procymidone όμως εφαρμοζόμενο στα φύλλα δεν παρέχει πλήρη προστασία στα άνθη έναντι του *Botrytis spp.* Το iprodione και vinclozolin αναφέρονται ως επικαλυπτικά σπόρων. Σε εδάφη πλούσια σε οργανική ύλη αυτή η διασυστηματική δράση είναι πολύ περιορισμένη.

Η ταχύτητα καταβολισμού του iprodione και του vinclozolin στο έδαφος είναι αυξημένη σε εδάφη που έχει γίνει επανειλημμένη χρήση των μυκητοκτόνων αυτών. Για το iprodione βρέθηκε ότι το 90% διασπάται σε 5 ημέρες σε εδάφη που έχουν εκτεθεί προηγουμένως στο μυκητοκτόνο αυτό, ενώ διαφορετικά απαιτούνται πάνω από 90 ημέρες για τον καταβολισμό του 90% της εφαρμοζόμενης δόσης. Το γεγονός αυτό εξηγεί τη μείωση της αποτελεσματικότητας του iprodione εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων.

14.3.1. Μηχανισμός δράσης των δικαρβοξιμιδικών.

Όλα τα δικαρβοξιμίδια αναστέλλουν την ανάπτυξη μυκηλίων και τη βλάστηση σπορίων των μυκήτων. Η επίδραση όμως στα μυκήλια είναι ισχυρότερη. Αναφέρεται ότι αναστέλλουν τη σύνθεση της χιτίνης αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις, μεγαλύτερες από εκείνες που απαιτούνται για να επέλθει αναστολή στην ανάπτυξη των μυκηλίων ή στη βλάστηση των σπορίων. Είναι γεγονός ότι μεταβάλλουν τη σύσταση των λιπών των μυκήτων και ειδικά το vinclozolin και το procymidone αναστέλλουν την παραγωγή τριγλυκεριδίων. Το iprodione ενώ δεν έχει επίδραση στη σύνθεση των τριγλυκεριδίων αναφέρεται ότι αναστέλλει τη βιοσύνθεση στερολών και του DNA. Μέχρι σήμερα δεν αναφέρθηκε κοινό σημείο δράσεως όλων αυτών των δικαρβοξιμιδικών. Γεγονός όμως είναι ότι όλα προκαλούν θραύσεις χρωμοσωμάτων και εμποδίζουν το διαχωρισμό χρωματιδίων (non – disjunction) στο μύκητα *Aspergillus nidulans* είτε διά παρεμβολής στη λειτουργία της ατράκτου ή απευθείας δράσης επί των χρωμοσωμάτων. Αποτέλεσμα των δράσεων αυτών είναι η πρόκληση μεταλλάξεων, η αδυναμία πυρηνοδιαίρεσης και κυτταροδιαίρεσης, η διόγκωση και θραύση κυττάρων, η ελάττωση του μήκους και η διόγκωση των βλαστικών σωλήνων καθώς και η πρόκληση μορφολογικών μεταβολών στις υφές των μυκηλίων.

Τη μυκητοξική δράση του iprodione στο μύκητα *Botrytis cinerea* ανταγωνίζεται η παρουσία αναστολέων (πιπερονύλο βουτοξείδιο, MGK – 264) της κυττοχρωμικής –P-450 οξειδάσης μικτής δράσεως. Πιθανολογείται ότι η μυκητοξικότητα του iprodione εξαρτάται από ένα μηχανισμό ε-

νεργοποίησεως που καταλύεται από την κυττοχρωμική P-450 οξειδάση μικτής δράσεως.

14.3.2. Ανθεκτικότητα του *Botrytis cinerea* στα δικαρβοξιμιδικά.

Είναι προφανές ότι ανθεκτικά στελέχη μπορούν εύκολα να συλλεχθούν έπειτα από επαναλαμβανόμενες επεμβάσεις. Οι ανθεκτικές απομονώσεις που βρέθηκαν στον αγρό έχουν γενικά ένα μέσο επίπεδο ανθεκτικότητας. Αλλά η ετεροκαρύωση η οποία είναι κοινή σε ένα αριθμό μυκήτων όπως ο *Botrytis cinerea* επιτρέπει τον πυρήνα με τους γόνους ανθεκτικότητας να διατηρηθεί μέσα σε μυκήλιο και έτσι αυξάνεται η πιθανότητα επανεμφάνισης, ενός ανθεκτικού φαινοτύπου στην παρουσία δικαρβοξιμιδικών. Η αρχική αναλογία των ανθεκτικών στελεχών σε ένα πληθυσμό στην αρχή της εποχής των επεμβάσεων έχει μεγάλη επίδραση στην εξέλιξη του μεταχειριζόμενου πληθυσμού. Είναι δύσκολο να συσχετισθεί η τελική συχνότητα των ανθεκτικών στελεχών ενός πληθυσμού, μετά από μια εποχή επεμβάσεων, με την αποτελεσματικότητα των επεμβάσεων.

Οι πρακτικές που τείνουν να μειώσουν τη συχνότητα των ανθεκτικών στελεχών είναι:

- α) Προσωρινή διακοπή του προγράμματος των επεμβάσεων.
- β) Μείωση του αριθμού των επεμβάσεων και
- γ) Γνώση του χρόνου ανάπτυξης επιδημίας

Ένα μίγμα δικαρβοξιμιδικού με ένα μυκητοκτόνο όπως το thiram ή το chlorothalonil όπως περιγράφεται από τους Katan και Oradia (1985), Locher κ.α. (1987) βελτιώνει την αποτελεσματικότητα των επεμβάσεων σε περίπτωση ανθεκτικότητας αλλά η τελική αναλογία των ανθεκτικών απομονώσεων δεν μειώνεται πάντα.

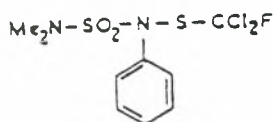
Μια άλλη προσέγγιση θα ήταν να αντικατασταθούν τα συμβατικά μυκητοκτόνα με τα δικαρβοξιμιδικά.

Όλες αυτές οι στρατηγικές θα έπρεπε να συμβάλουν στη συνεχή χρήση των δικαρβοξιμιδικών. Όμως είναι απαραίτητα να παραχθούν ουσίες με καινούργιες μεθόδους δράσης έτσι ώστε να εξασφαλισθεί ο έλεγχος των παθογενών πληθυσμών.

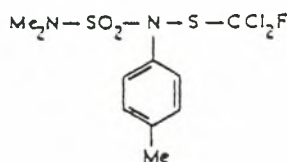
14.4. Σουλφίδια

Τα προστατευτικά αυτά μυκητοκτόνα, από άποψη γεωργικής σημασίας, έρχονται αμέσως μετά τα διθειοκαρβαμιδικά. Από χημική άποψη

είναι παράγωγα φθαλιμιδίων ή φαινυλοσουλφαμιδίων, που χαρακτηρίζονται από ένα πολυαλογονωμένο ενωμένο με θείο. Το πολυαλογονωμένο αυτό αλκύλιο είναι και υπεύθυνο για τη μυκητοτοξικότητα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα μυκητοκτόνα captan, folpet, captafol, tolyfluanid και dichlofluanid.



dichlofluanid



tolylfluanid

Τα dichlofluanid και tolyfluanid είναι πολύτιμα εναντίον του *Botrytis spp.* Το dichlofluanid είναι μυκητοκτόνο επιφανείας με προστατευτική και θεραπευτική δράση, φωτοευαίσθητο, όχι όμως πιο φωτοευαίσθητο από το captan και διασπάται από ισχυρά αλκάλια.

14.4.1. Μηχανισμός δράσης των σουλφιδίων

Δεν υπάρχει απόλυτη συμφωνία των ειδικών στο θέμα του μηχανισμού τοξικής δράσης των μυκητοκτόνων της κατηγορίας αυτής. Στους ευαίσθητους μύκητες η αναπνοή παρεμποδίζεται, πιθανότατα από αντίδραση του μυκητοκτόνου με ένζυμα, που έχουν σουλφυδρυλική ομάδα (-SH) στο ενεργό κέντρο, και από αντίδραση με το συνένζυμο Q (CoQ), που επίσης έχει τέτοια ομάδα. Η τοξικότητα μειώνεται αν αυξηθεί η ποσότητα των -SH στο υλικό καλλιέργειας, πριν από την προσθήκη του μυκητόνου. Όμως in vitro μελέτες έδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές παρεμποδίζουν και ένζυμα που δεν έχουν σουλφυδρυλικές ομάδες. Η ικανότητά τους δε να αντιδρούν με τις ιστόνες ίσως εξηγεί τη γενετική δραστηριότητά τους. Φαίνεται ότι μειώνουν την ικανότητα των ιστογόνων να σταθεροποιούν τη δομή του DNA και τα χρωματοσώματα μένουν ακάλυπτα στη δράση των νουκλεασών, με αποτέλεσμα αυξημένη συχνότητα θραύσεων.

Το dichlofluanid από πλευράς κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας ανήκει στην ομάδα χαμηλού κινδύνου. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται μυκητοκτόνα μη εξειδικευμένης βιοχημικής δράσης με ευρύ φάσμα δράσης κατά διαφόρων παθογόνων. Η ευαισθησία του αγρίου πληθυσμού των παθογόνων εμφανίζει μεγάλη παραλλακτικότητα χωρίς όμως αυτό να έχει δημιουργήσει προβλήματα καταπολέμησης στην πράξη (Παππάς, 1978, Γεωργόπουλος, 1987).

Παρά τη χρησιμοποίηση των ουσιών χαμηλού κινδύνου για δεκαετίες δεν υπάρχουν επαρκή πειραματικά δεδομένα που να αποδεικνύουν την τάση μετακίνησης της καμπύλης ευαισθησίας του πληθυσμού προς τα δεξιά. Από πρόσφατες εργασίες διαπιστώθηκε πάντως η αύξηση της συχνότητας προσβολών από στελέχη μειωμένης ευαισθησίας στο dichlofluanid του *Botrytis cinerea* σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες κηπευτικών και ανθέων στην Κρήτη και άλλες περιοχές της Ελλάδας. Το επίπεδο μειωμένης ευαισθησίας των στελεχών αυτών φαίνεται να είναι στα ανώτερα όρια της καμπύλης παραλλακτικότητας του άγριου πληθυσμού του παθογόνου.

Παλαιότερα επικρατούσε η άποψη ότι η μειωμένη ευαισθησία στα μυκητοκτόνα χαμηλού κινδύνου δεν ελέγχεται γενετικά από μείζονες ή υπολειπόμενους γόνους (Γεωργόπουλος, 1985, Γεωργόπουλος και Σκυλακάκης, 1986). Παρόλα αυτά, ανθεκτικότητα σε παρεμποδιστές πολλαπλών θέσεων δράσεως μπορεί να επέλθει είτε με ανάπτυξη μηχανισμών αποτοξικοποίησης είτε με αλλαγή της περατότητας των μεμβρανών ή τέλος με δέσμευση της δραστικής ουσίας από κυτταρικά συστατικά μη απολύτως απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία του οργανισμού (Dekker, 1984). Τελευταία, εργασίες γενετικής ανάλυσης έδειξαν όμως ότι η μειωμένη ευαισθησία του *Botrytis cinerea* στο dichlofluanid κληρονομείται και φαίνεται να ελέγχεται από ένα κυρίαρχο γόνο. Η επιβίωση όμως τέτοιων στελεχών στον αγρό εμφανίζεται περιορισμένη όταν παύει η πίεση επιλογής (Παππάς, 1992).

14.5. Εμπειρία στον αγρό

Ανθεκτικά στελέχη στις διάφορες κατηγορίες των μυκητοκτόνων έχουν βρεθεί στον αγρό και στο εργαστήριο.

Από το φθινόπωρο του 1970, οι Bollen και Scolten, παρατήρησαν για πρώτη φορά στην Ολλανδία ανθεκτικότητα του μύκητα *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά, μέσα σε θερμοκήπια κυκλάμινων. Από το 1972 και μετά το ίδιο φαινόμενο αναφέρεται και στο αμπέλι. Σε αμπελώνες στη Νέα Ζηλανδία το 1985 βρέθηκαν στελέχη *Botrytis cinerea* με μέση συχνότητα ανθεκτικότητας 8 – 40% στα βενζιμιδαζολικά (Beerer, κ.α., 1989).

Το 1992 στην Ισπανία, εντοπίστηκαν στελέχη *Botrytis cinerea* με πολλαπλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά δικαρβοξιμιδικά και στο μίγμα carbendazim + diethofencarb (Sumico) σε θερμοκήπια όπου είχαν γίνει ψεκασμοί με το τελευταίο (Raposo, κ.α., 1994). Στελέχη πολλαπλής ανθεκτικότητας εντοπίστηκαν και στο Ισραήλ το 1988 δύο χρόνια μετά

την χρήση του μίγματος σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες αγγουριού (Katan, κ.α., 1989).

Μετά από τέσσερα χρόνια εφαρμογής του carbendazim + diethofencarb σε αμπελώνες στη Γαλλία, η μέση συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών ήταν 43,7 %.

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

14.6. Διασταυρωτή ανθεκτικότητα.

Κανονικά μειωμένη ευαισθησία μιας απομόνωσης ενός μύκητα σε ένα μίγμα Α παρουσιάζεται επίσης και σε ένα άλλο μίγμα Β εάν η ανθεκτικότητα οφείλεται στον ίδιο γενετικό παράγοντα ή εάν οι ουσίες Α και Β αναμιχθούν στην ίδια θέση της μεταβολικής οδού του μύκητα. Αυτό το φαινόμενο καλείται θετική διασταυρωτή ανθεκτικότητα και συμβαίνει σε μια κατηγορία α χημικών παρόμοιας δομής όπως για παράδειγμα συμβαίνει με τα βενζιμιδαζολικά benomyl και thiophanate – methyl και με τα δικαρβοξιμινικά iprodione και vinclozolin.

Όταν η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε ένα μυκητοκτόνο, συμπίπτει με αυξημένη ευαισθησία σε μια άλλη χημική ένωση, μπορεί να είναι μία περίπτωση αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας. Πολύ λίγα παραδείγματα υπάρχουν τα οποία δείχνουν αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ συσχετιζόμενων μορίων των βενζιμιδαζολικών και των φαινυλοκαρβαμιδικών ή διπλή ανθεκτικότητα μεταξύ δύο μιγμάτων θα έπρεπε να προσδιοριστεί από τις καμπύλες δόσης φαρμάκων και των δύο μιγμάτων εναντίον πολλών ευαίσθητων και ανθεκτικών απομονώσεων και θα έπρεπε να υπολογιστούν για τιμές EC_{50} ή EC_{90} .

Η διασταυρωτή ανθεκτικότητα είναι πάντα αμοιβαία. Τα δύο μίγματα δεν μπορούν να αντικαταστήσουν το ένα το άλλο εάν ένα από αυτά αποτύχει να ελέγξει τον ανθεκτικό υποπληθυσμό. Από την άλλη πλευρά τα δύο μίγματα μπορεί να επιβάλλουν μια διαφορετική πίεση επιλογής σε ένα πληθυσμό εξαρτώμενο από τη συνολική βιολογική λειτουργία και τις στρατηγικές χρήσης των μιγμάτων. Υπάρχουν παραδείγματα ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα που σχετίζονται με αλλαγές στη θέση δράσης του μυκητοκτόνου (π.χ. φαινυλαμίδια), όμως υπάρχουν και άλλα όπως τα DMI (demethylation inhibitors) όπου η ανθεκτικότητα σχετίζεται πιθανό-

τατα με τις αλλαγές στην ισορροπία πρόσληψης – εξαγωγής (uptake – export) του μυκητοκτόνου.

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

Θεωρείται γενικά ότι η αντίσταση στα βενζιμιδαζολικά παρέχει μια μειωμένη συγγένεια προσκόλλησης με αυτά τα μυκητοκτόνα. Τέτοιου είδους αλλαγές μπορούν να οδηγήσουν σε μια αυξημένη συγγένεια προσκόλλησης της tubulin με τα μυκητοκτόνα που αφορούν την αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα ανθεκτικά στελέχη. Σύμφωνα με τον Davidse (1986) αυτό το φαινόμενο της αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας μπορεί να αποδοθεί στην αλλαγμένη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων περισσότερο, παρά σε αλλαγές της συγγένειας της tubulin με αυτά τα διάφορα τοξικά.

Στα περισσότερα είδη μυκήτων κάποιοι φαινότυποι ανθεκτικοί στα βενζιμιδαζολικά εκδηλώνουν αρνητική διασταυρωτή συσχέτιση με τα φαινυλοκαρβαμιδικά. Αυτό το φαινόμενο αφορά τις απομονώσεις υψηλής ανθεκτικότητας, ενώ στελέχη μέτριας και μικρής ανθεκτικότητας παραμένουν ανεπηρέαστα από τα φαινυλοκαρβαμιδικά. Διάφορες έρευνες δείχνουν ότι αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ MDRC και MBC, όχι μόνο στη μυκητοτοξικότητα αλλά επίσης και στις επιδράσεις στη μορφολογία των μυκήτων και στη μίτωση. Η αποτελεσματικότητα του diethofencarb, του carbendazim και του μίγματός των, συγκρίθηκε *in vitro* σε επιλεχθέντα στελέχη *Botrytis cinerea*. Όλες οι ανθεκτικές απομονώσεις στο carbendazim, παρουσίασαν αρνητική σχετιζόμενη διασταυρωτή ανθεκτικότητα στο diethofencarb ($EC < 0,05 \text{ mg / lt}$ για παρεμποδιστική επίδραση σε ευαίσθητες απομονώσεις στο carbendazim. Το μίγμα (MBC + NPC) εξ' ίσου παρεμπόδισε την μυκηλιακή ανάπτυξη και από τους δυο τύπους στελεχών ($EC < 0,1 + 0,1 \text{ mg / lt}$) ενώ, ήταν λίγο πιο αποτελεσματικό στη βλάστηση σπορίων των ανθεκτικών στο MBC απομονώσεων (Pappas και Elena, 1989).



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

Απομονώσεις ανθεκτικές στα βενζιμιδαζολικά είχαν τιμές EC_{50} για ανάπτυξη μυκηλίου μεταξύ 105 – 324 mg / lt, ενώ ευαίσθητες στα βενζιμιδαζολικά είχαν τιμές EC_{50} μεταξύ 0,04 – 0,07 mg / lt.

Όλες οι ευαίσθητες απομονώσεις για το μίγμα carbendazim + diethofencarb είχαν τιμές EC_{50} μεταξύ 0,01 – 0,15 mg / lt carbendazim και 0,01 – 0,15 ml / lt diethofencarb και οι ανθεκτικές είχαν τιμές LD50 μεταξύ 15 – 26 mg / lt carbendazim και 95 – 130 mg / lt diethofencarb (Raposso, κ.α. 1994).

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

14.7. Προσαρμοστικότητα ανθεκτικών στελεχών

Η προσαρμοστικότητα είναι μια έννοια που σχετίζεται με την ικανότητα ενός γενοτύπου να αναπαραχθεί ή να επιβιώσει περισσότερο ή λιγότερο επιτυχώς, σε σύγκριση με κάποιον άλλο γενότυπο, κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Μετά από έρευνες φαίνεται ότι τα στελέχη *Botrytis cinerea* που είναι ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά έχουν ίδια προσαρμοστικότητα με τα ευαίσθητα στα βενζιμιδαζολικά στελέχη (Beever, κ.α., 1989).

Η παρουσία των ανθεκτικών στελεχών *Botrytis cinerea*, στα βενζιμιδαζολικά σε θερμοκήπια για περισσότερο από 10 χρόνια μετά τη διακοπή της χρήσης του benomyl, δείχνει ότι η ανθεκτικότητα στο benomyl πιθανώς δεν επηρεάζει την προσαρμοστικότητα του πληθυσμού *Botrytis* (Faretta και Pollastro, 1989). Μετά από έκθεση 18 μηνών στον αγρό, σκληρωτών, ανθεκτικών στελεχών *Botrytis cinerea* σε μυκητοκτόνα, παρατηρήθηκε ότι η ανθεκτικότητα είχε παραμείνει (Hsiang και Chastagner, 1992).

Αναφέρεται ότι πληθυσμοί *Botrytis cinerea* ανθεκτικοί τα βενζιμιδαζολικά βρέθηκαν σε αμπελώνες 2 χρόνια μετά την τελευταία εφαρμογή με βενζιμιδαζολικά (Fukaya, κ.α., 1979).

14.8. Μορφολογικές και φυσιολογικές ιδιότητες.

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

Ο Beever κ.α. (1989), παρατήρησε ότι μέσα επίπεδα ανάπτυξης ήταν παρόμοια για στελέχη ανθεκτικά ή ευαίσθητα στα βενζιμιδαζολικά. Οι μόνες διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν στην αντίδρασή τους στα μυκητοκτόνα.

Απομονώσεις που χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικές στο benomyl και στο diethofencarb έδειξαν κανονικό επίπεδο ανάπτυξης, σχήμα αποικίας και παραγωγή σπορίων, σε υπόστρωμα PDA, στους 22°C (Katan, κ.α., 1989). Οι Hsiang και Chastanger (1991), υποστήριξαν ότι η ανθεκτικότητα του *Botrytis cinerea*, ήταν γενικά συνδυασμένη με μικρότερη ανάπτυξη και μειωμένη μολυσματικότητα.

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

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

Η Raposo κ.α. (1994), παρατήρησε ότι ευαίσθητες απομονώσεις αναπτύχθηκαν με βραδύτερο ρυθμό σε PDA, από ότι οι ανθεκτικές, αλλά η παραγωγή σπορίων (στους 22°C), το ποσοστό βλάστησης των σπορίων και η επιμήκυνση των βλαστικών υφών ήταν παρόμοια σε όλες τις απομονώσεις. Επίσης οι ανθεκτικές στα βενζιμιδαζολικά σχημάτισαν τα μεγαλύτερα σε μέγεθος σκληρώτια, ενώ οι διπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και δικαρβοξιμιδικά σχημάτισαν το μεγαλύτερο αριθμό σκληρωτίων ανά cm² αποικίας, σε υπόστρωμα PDA και είχαν μόνο τη μισή παραγωγή σπορίων από αυτή των ευαίσθητων απομονώσεων.

Το μέγεθος και ο αριθμός σκληρωτίων έχουν επιπτώσεις στην επιβίωση και τη βιοσιμότητα των στελεχών. Τέλος συγκρίνοντας τη γραμμική ανάπτυξη του μυκηλίου φάνηκε ότι απομονώσεις τριπλής ανθεκτικό-

τητας στα βενζιμιδαζολικά δικαρβοξιμιδικά και στο μίγμα carbendazim + diethofencarb παρουσιάζουν τη μικρότερη προσαρμοστικότητα σε σχέση με όλες τις άλλες.

Μετά από παρατηρήσεις προσβολής σε καρπούς τομάτας από *Botrytis cinerea* στο Τυμπάκι οι 80 από τις 150 προσβολές που οφείλονταν σε απομονώσεις *Botrytis cinerea* έδειξαν μειωμένη ευαισθησία στο dichlofluanid. Τα σπορια αυτών των απομονώσεων βλάστησαν σε υπόστρωμα που περιείχε 1 mg / ml του μυκητοκτόνου. Όμως το μήκος του βλαστικού σωλήνα ήταν μικρότερο από τη διπλάσια διάμετρο των σπορίων και η βλάστηση δεν σημειώθηκε καθόλου σε συγκεντρώσεις των 3 mg / ml. (Pappas and Elena, 1992).

Σπόρια απομονώσεων ευαίσθητων στα βενζιμιδαζολικά βλάστησαν με κοντούς βλαστικούς σωλήνες από ότι τα σπόρια απομονώσεων υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, σε υπόστρωμα που περιείχε μίγμα carbendazim - diethofencarb. Διαφορές μεταξύ απομονώσεων ευαίσθητων και υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά φάνηκαν όταν επωάσθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε (1 mg carbendazim + 1 mg diethofencarb ανά ml, 24 ώρες μετά τη βλάστηση κονιδίων στο μάρτυρα. Μικροσκοπική παρατήρηση που έγινε σε διάστημα 24 ωρών έδειξε ότι οι βλαστικοί σωλήνες των κονιδίων όλων των ευαίσθητων στα βενζιμιδαζολικά απομονώσεων συρρικνώθηκαν σχεδόν αμέσως μετά την προσθήκη του μυκητοκτόνου και καμιά περαιτέρω ανάπτυξη μυκηλίου δεν παρατηρήθηκε.

Σε αντίθεση απομονώσεις υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά συνέχισαν να αναπτύσσονται αργά στο υπόστρωμα με το μίγμα των μυκητοκτόνων παράγοντας διακλαδιζόμενο μυκήλιο και τελικά κονidioφόρους με κονίδια (Παππάς, 1997).

14.9. Παθογόνος ικανότητα

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

Σε πείραμα σύγκρισης, μεταξύ μεταλλαγμένου στελέχους ανθεκτικού στα βενζιμιδαζολικά και στο diethofencarb και του αντίστοιχου αγρίου στελέχους όταν εκτιμήθηκε η παθογόνος ικανότητα πάνω σε φυτά αγ-

γουριού στο στάδιο των κοτυληδόνων, στα οποία νωρίτερα είχε γίνει ή όχι εφαρμογή με benomyl (Ziogas and Girgis, 1993).

Τεχνητές μολύνσεις που έγιναν με δίσκους μυκηλίου ανθεκτικού και ευαίσθητων στελεχών *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά, φαινυλοκαρβαμιδικά και στο μίγμα carbendazim + diethofencarb, πάνω σε κομμένες κοτυληδόνες φυτών αγγουριού, έδειξαν ότι ανθεκτικά στελέχη στο μίγμα μηκητοκτόνων, είχαν ανάλογη παθογόνο ικανότητα με τα ευαίσθητα στελέχη.

Υψηλά επίπεδα μόλυνσης από όλα τα ανθεκτικά στο μίγμα στελέχη, παρατηρήθηκε πάνω σε κοτυληδόνες στις οποίες είχε γίνει νωρίτερα εφαρμογή με carbendazim με ή χωρίς diethofencarb. Στελέχη ευαίσθητα στο carbendazim και ανθεκτικά στο diethofencarb και στελέχη ανθεκτικά στο carbendazim και ευαίσθητα στο diethofencarb δεν μόλυναν κοτυληδόνες, στις οποίες νωρίτερα είχε γίνει εφαρμογή με το μίγμα carbendazim + diethofencarb. Στην ίδια εργασία βρέθηκε ότι στελέχη τριπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, φαινυλοκαρβαμιδικά και δικαρβοξιμιδικά ήταν παθογενή σε κοτυληδόνες στις οποίες νωρίτερα είχε γίνει εφαρμογή με carbendazim iprodione ή carbendazim + diethofencarb (Elad, κ.α., 1992).

Σε έλεγχο παθογόνου ικανότητας πάνω σε φυτά αγγουριού στο στάδιο των κοτυληδόνων, παρατηρήθηκε ότι μεταλλαγμένα στελέχη με:

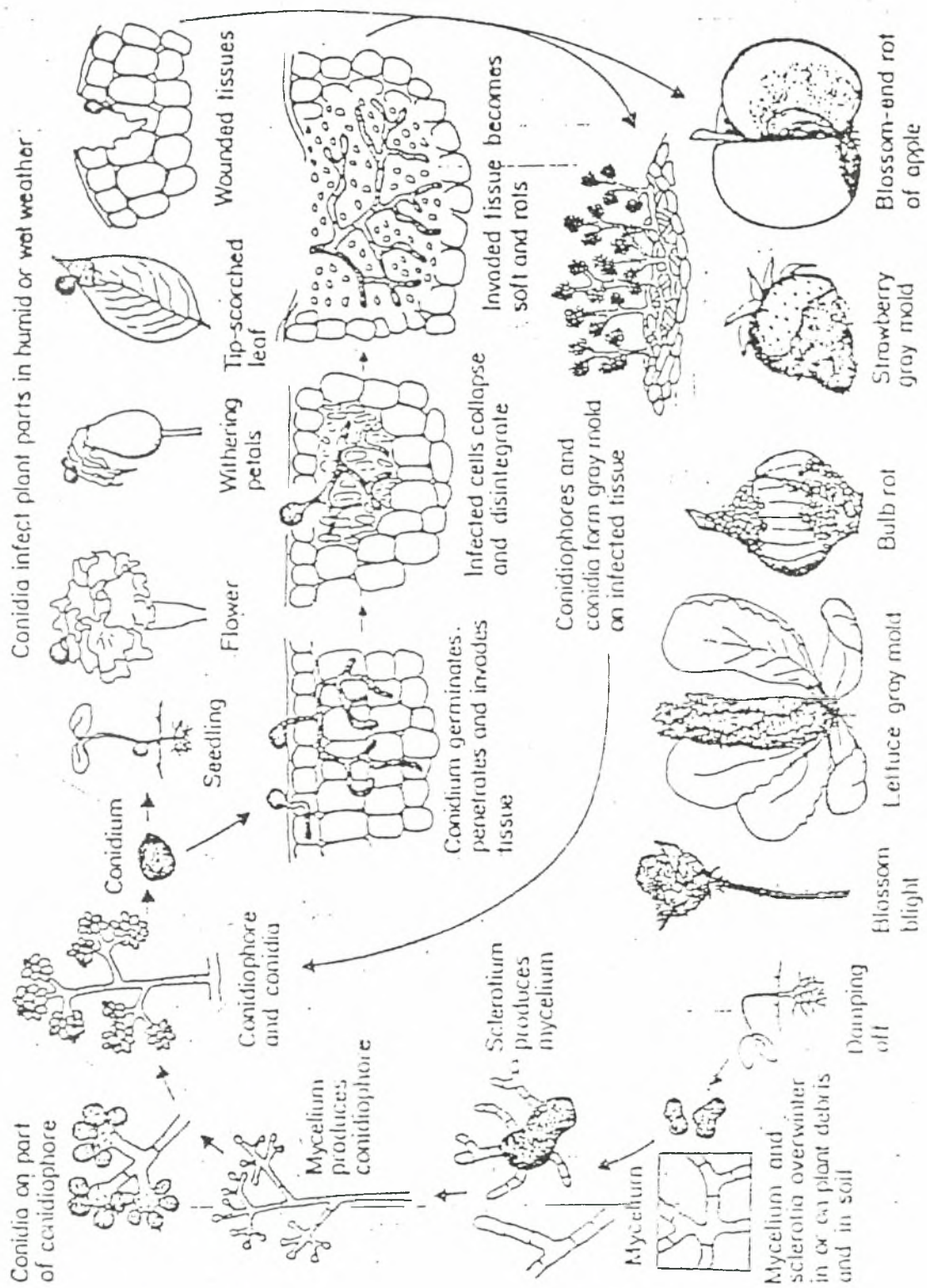
α) ευαισθησία στο benomyl και ανθεκτικότητα στο diethofencarb.

β) ανθεκτικότητα στο benomyl και ευαισθησία στο diethofencarb και

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

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

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : Beever κ.α.(1989), Davidse (1987), Faretra & Pollastro (1993), Γεωργόπουλος και Ζιώγας (1992), Gouot (1994), Gisi & Staehle-Csech (1994), Hsiang and Chastanger (1992), Ziogas and Girgis (1993), Katan κ.α. (1989), Λάσκαρης κ.α. (1994), Leroux (1992), Pappas και Elena (1988), Pappas (1992, 1997), Raposo κ.α. (1994).



Σχήμα 1 : Αποικισμός παλιντατικής γαρυφαλιάς από *Botrytis cinerea* (κατά Αβρίος, 1978)

ΜΕΡΟΣ Β

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

Στην εργασία που πραγματοποιήθηκε μελετήθηκε η παθογόνος ικανότητα και φαινοτυπική σταθερότητα ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα απομονώσεων του *Botrytis cinerea*.

Αρχικά έγινε ανίχνευση ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα από στελέχη που απομονώθηκαν από προσβολές *Botrytis cinerea* σε καλλιέργειες τομάτας θερμοκηπίου στην Κρήτη. Επίσης έγινε κατάταξη των απομονώσεων του *Botrytis cinerea* με βάση την ανθεκτικότητά τους σε διάφορες κατηγορίες μυκητοκτόνων, η οποία εκτιμήθηκε από τον τρόπο βλάστησης των σπορίων των απομονώσεων παρουσία των μυκητοκτόνων σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος της παθογόνου ικανότητας των απομονώσεων *Botrytis cinerea* πάνω σε πέταλα τριανταφυλλιάς που βρισκόταν σε επαφή με διάφορες συγκεντρώσεις του μίγματος carbendazim + diethofencarb.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην ικανότητα μόλυνσης καθώς και στην επέκταση της προσβολής των ανθεκτικών απομονώσεων συγκριτικά με τα ευαίσθητα.

Η παραγωγή σπορίων πάνω σε μολυσμένους φυτικούς ιστούς δεν παρουσίασε μεγάλες διαφορές μεταξύ των απομονώσεων, όπως και ο σχηματισμός σκληρωτίων δεν παρουσίασε σημαντικές διακυμάνσεις.

Ακόμη έγινε έλεγχος εμφάνισης ανθεκτικών θυγατρικών, απομονώσεων λαμβάνοντας σπόρια από τα μολυσμένα πέταλα τριανταφυλλιάς και επωάζοντας σε θερμοκρασία 22⁰ C.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ στην πρώτη επαφή με το μίγμα carbendazim + diethofencarb δεν εμφανίστηκε ανθεκτικότητα, στη δεύτερη επαφή εμφανίστηκε ανθεκτικότητα. Αυτό σημαίνει ότι εμφανίστηκαν πιθανώς νέες ανθεκτικές απομονώσεις. Επίσης εμφανίστηκε ανθεκτικότητα στο dichlofluanid με το οποίο οι θυγατρικές απομονώσεις δεν είχαν έρθει σε επαφή.

Ακόμη έγινε έλεγχος φαινοτυπικών ιδιοτήτων 34 απομονώσεων *Botrytis cinerea* και κατάταξη αυτών σε 7 φαινοτύπους. Τέλος έγινε μέτρηση της παραγωγής σπορίων και σκληρωτίων σε μονόσπορες καλλιέργειες που προέκυψαν από τις αρχικές.

15. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σε όλα τα πειράματα σαν υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε potato dextrose agar (PDA : εκχύλισμα πατάτας, σάκχαρο dextrose, άγαρ). Για την παρασκευή του διαλύθηκαν 50gr σκόνης PDA σε 1 λίτρο δις-απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα θερμάνθηκε για να γίνει πλήρης διάλυση και τήξη της σκόνης και τοποθετήθηκε σε φιάλες των 200 ml.

Για την παγίδευση των απομονώσεων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 1 λίτρου δις-απεσταγμένου νερού το οποίο περιείχε : 1gr NaNO_3 , 1.2gr K_2HPO_4 , 0.2gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15gr KCl , 20gr γλυκόζη και 25gr άγαρ.

Το παραπάνω διάλυμα θερμάνθηκε για να γίνει πλήρης διάλυση και τήξη του υλικού, αναδεύοντας κατά διαστήματα. Στη συνέχεια μέρος του διαλύματος τοποθετήθηκε σε 50 δοκιμαστικούς σωλήνες, βάζοντας μισή δόση και το υπόλοιπο διάλυμα τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες, βάζοντας μια δόση.

Τα φιαλίδια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες καθώς και φιάλες των 100ml με δις-απεσταγμένο νερό που χρειάστηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, αποστειρώθηκαν σε ειδικό κλίβανο για 15min στις 1.2Atm και 121°C .

15.1. Αναγνώριση ανθεκτικών απομονώσεων

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

Υλικά : Σαν υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε PDA εμπλουτισμένο με carbendazim (50% wp) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 1 και 100 mg/l, με diethofencarb (25% wp) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 1 και 100 mg/l, με iprodione (50% wp) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 3 και 10 mg/l, με «Sumico» (25% MBC + 25%

diethofencarb) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 1 και 100mg/l και τέλος με dichlofluanid (50% wp) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 1 και 3 mg/l.

Μέθοδος : Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της «τοπικής» μόλυνσης με λίγα σπόρια σε υποστρώματα εκχυλίσματος βύνης, άγαρ (MEA), εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων (Pappas, 1982).

Για την παρασκευή τελικής συγκέντρωσης 100 mg/l δραστικής ουσίας (δ.ο.) προσθέτονταν στα 100 ml ρευστοποιημένου θρεπτικού υλικού 20 mg carbendazim, 40 mg diethofencarb ή 40 mg (MBC+ diethofencarb) αντίστοιχα.

Για την παρασκευή τελικής συγκέντρωσης 1, 3 και 10 mg/l δ.ο. μυκητοκτόνου ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία :

Για κάθε μυκητοκτόνο παρασκευάστηκε ένα βασικό διάλυμα σε οργανικό διαλύτη συγκέντρωσης 1000 mg/l δ.ο. σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml.

Για το carbendazim, το diethofencarb και το μίγμα (MBC+ diethofencarb), χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), ενώ για τα iprodione και dichlofluanid η ακετόνη. Από το βασικό διάλυμα με πιπέτα 1ml μεταφέρονταν στα 100 ml ρευστοποιημένου θρεπτικού υλικού 0.1 , 0.3 και 1 ml για την παρασκευή της τελικής συγκέντρωσης 1, 3 και 10 mg/l αντίστοιχα. Μετά την προσθήκη του διαλύματος μυκητοκτόνου ακολουθούσε ομογενοποίηση του υλικού δια κυκλικών ανακινήσεων των φιαλιδίων που περιείχαν το ρευστοποιημένο υλικό και γινόταν ισόποση κατανομή σε 10 πλαστικά τρυβλία Petri.

Στη συνέχεια σημειώθηκαν στην κάτω επιφάνεια και περιφερειακά 10 ισαπέχοντα σημεία τα οποία αριθμήθηκαν και άλλα 7 σημεία σε άλλη σειρά τρυβλίων. Πάνω σε κάθε αριθμημένο σημείο, τοποθετήθηκε μόλυσμα κονιδίων, τόσων όσων μπορεί να μεταφέρει η άκρη βελόνας, με μια απλή επαφή στις καρποφορίες που δημιουργήθηκαν από τις 17 απομονώσεις του *Botrytis cinerea*. Έτσι συνολικά δοκιμάστηκαν 17 απομονώσεις.

Μετά από επώαση 18 ωρών σε σκοτάδι και θερμοκρασία 22⁰ C τα τρυβλία παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Τα σημεία όπου τα σπόρια είχαν βλαστήσει δημιουργώντας κανονικές βλαστικές υφές, όπως φαίνεται στον πίνακα 1, επισημάνθηκαν με ένα κύκλο.

15.2. Κατάταξη απομονώσεων *Botrytis cinerea* βάση του επιπέδου ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, σουλφίδια, δικαρβοξιμιδικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα.

Έγινε πείραμα κατάταξης 17 απομονώσεων *Botrytis cinerea* που προέρχονταν από θερμοκηπιακές καλλιέργειες τομάτας (Τυμπάκι Κρήτης), μελιτζάνας (Κυπαρισσία Μεσσηνίας), αγγουριού (Ισραήλ) επίσης συμπεριελήφθηκε και μια απομόνωση από αμπέλι (Γαλλία). Η κατάταξη έγινε με βάση τον τρόπο βλάστησης των σπορίων των 17 απομονώσεων στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις βενζιμιδαζολικών, δικαρβοξιμιδικών, σουλφιδίων και φαινυλοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων.

Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω απομονώσεις :

από τομάτα 3/94	από τομάτα 5/96
από τομάτα 1/96	από τομάτα 6/96
από τομάτα 6/94	από τομάτα 7/96
από τομάτα 11/93	από τομάτα 8/96
από τομάτα 4/94	από τομάτα 9/96
από τομάτα La 221	από τομάτα 2/96
από τομάτα La 238	από τομάτα 3/96
από αμπέλι Le 2	από τομάτα 4/96
από αγγούρι C5	

15.3. Έλεγχος παθογόνου ικανότητας

Από τις αρχικές απομονώσεις έγιναν υποκαλλιέργειες μεταφυτεύοντας σε τρυβλία με PDA μυκήλιο ή κονίδια σε στείρες συνθήκες. Έπειτα από 3 ημέρες επώασης μεταφέρθηκαν δίσκοι διαμέτρου 5mm σε τρυβλία με PDA. Οι δίσκοι κόπηκαν με φελοτρυπητή από την περιφέρεια της κάθε αποικίας.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε αιώρημα σπορίων που ελήφθη από καλλιέργειες 7 ημερών σε PDA που επώασθηκαν στους 22°C στο σκοτάδι. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης αποστειρωμένο νερό στο αιώρημα σπορίων, ύφασμα μουσελίνας, χωνί, αιματοκυτόμετρο, δίσκοι τριαντάφυλλου διαμέτρου 20mm και μετρητής χεριού για τη μέτρηση των σπορίων. Σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν 10ml αποστειρωμένο νερό και με τη βοήθεια κεκαμένης γυάλινης ράβδου αναδεύουμε και κατόπιν διύθησης το αιώρημα των σπορίων τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για όλες τις απομονώσεις.

Στη συνέχεια με τη βοήθεια αναδευτήρα, αιματοκυτομέτρου και μικροσκοπίου μετρήθηκε η πυκνότητα του αιωρήματος και προέκυψε ο ακόλουθος πίνακας :

για το 3/94 30000 σπόρια/ml	για το 5/96 300000 σπόρια/ml
για το 1/96 200000 σπόρια/ml	για το 6/96 250000 σπόρια/ml
για το 6/94 25000 σπόρια/ml	για το 7/96 760000 σπόρια/ml
για το 11/93 960000 σπόρια/ml	για το 8/96 660000 σπόρια/ml
για το 4/94 40000 σπόρια/ml	για το 9/96 540000 σπόρια/ml
για το La 221 200000 σπόρια/ml	για το 2/96 300000 σπόρια/ml
για το Le 2 10000 σπόρια/ml	για το 3/96 300000 σπόρια/ml
για το C 5 920000 σπόρια/ml	για το 4/96 300000 σπόρια/ml

Η απομόνωση La 238 έδωσε ελάχιστο αριθμό σπορίων.

Επειδή ορισμένα από τα παραπάνω αιωρήματα είναι πολύ πυκνά κάνουμε αραιώση, όπου χρειάζεται και δημιουργούμε αιωρήματα πυκνότητας 50000 σπορίων/ml. Από δοκιμαστικό σωλήνα με 10ml αποστειρωμένο νερό αφαιρέθηκαν 0.7ml από αυτό και αντικαταστάθηκαν με 0.7ml από το αιώρημα των 760000 σπορίων/ml

της απομόνωσης 7/96. Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε για όλα τα πυκνά αιωρήματα. Παράλληλα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε dextrose τελικής συγκέντρωσης 0.1%.

Ο έλεγχος της παθογόνου ικανότητας των απομονώσεων του *Botrytis cinerea* έγινε σε πέταλα τριανταφύλλου που επέπλεαν σε υδατικά διαλύματα μυκητοκτόνων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μίγμα MBC + diethofencarb (Sumico) σε συγκεντρώσεις 1mg/l και 10mg/l. Για την δημιουργία των παραπάνω συγκεντρώσεων 50mg μίγματος MBC + diethofencarb αραιώθηκαν σε 10ml για να γίνει το διάλυμα των 100mg/l, ενώ 500mg μίγματος MBC + diethofencarb αραιώθηκαν σε 10ml για να γίνει το διάλυμα των 1000ppm. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 170 τρυβλία και 510 δίσκοι πετάλων τριανταφυλλιάς διαμέτρου 20mm σε δύο επαναλήψεις για την κάθε απομόνωση. Τα πέταλα τριανταφυλλιάς ανά 3 τοποθετήθηκαν στα τρυβλία τα οποία περιείχαν 20ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια σε 34 τρυβλία τοποθετήθηκαν 0.2ml του διαλύματος (carbendazim + diethofencarb) συγκέντρωσης 100mg/l ενώ σε άλλα 34 τρυβλία τοποθετήθηκαν 0.2ml του διαλύματος (carbendazim + diethofencarb) συγκέντρωσης 1000mg/l για τη δημιουργία των τελικών συγκεντρώσεων 1mg/l και 10mg/l αντίστοιχα.

Σε 34 τρυβλία δεν προστέθηκε μυκητοκτόνο και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Στα υπόλοιπα 68 τρυβλία επίσης δεν προστέθηκε μυκητοκτόνο για τις επόμενες 24 ώρες. Κατόπιν έγινε η μόλυνση των πετάλων τριανταφυλλιάς με τη βοήθεια πιπετών Paster. Σε κάθε ροδοπέταλο τοποθετήθηκε μία σταγόνα μόλυνσης διαμέτρου 3mm. 24 ώρες μετά τη μόλυνση τοποθετήθηκαν στα 34 από τα 68 τρυβλία χωρίς μυκητοκτόνο, 0.2ml διαλύματος (carbendazim + diethofencarb) συγκέντρωσης 100mg/l και στα υπόλοιπα 34 τοποθετήθηκαν 0.2ml διαλύματος (carbendazim + diethofencarb) συγκέντρωσης 1000mg/l.

Μετά την παρέλευση 18 ωρών, παρατηρήθηκε καστανός μεταχρωματισμός των ιστών, που ήλθαν σε επαφή με τη σταγόνα μόλυνσης, διαμέτρου 3mm όσο και η διάμετρος της σταγόνας. Με τη βοήθεια του μικροσκοπίου παρατηρήθηκαν τα σπόρια και οι μυκηλιακές υφές που αναπτύχθηκαν.

Μετά τη μόλυνση και για τις επόμενες 72 ώρες πάρθηκαν μετρήσεις των διαμέτρων των κηλίδων προσβολής, για κάθε ροδοπέταλο.

15.4. Παραγωγή σπορίων των 17 απομονώσεων *B. cinerea*

Μετά το τέλος των μετρήσεων της διαμέτρου των κηλίδων προσβολής τα πέταλα τριανταφυλλιάς τοποθετήθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν αποστειρωμένο στιπόχαρτο και βαμβάκι εμποτισμένο σε αποστειρωμένο νερό. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν συνολικά και τα έξι ροδοπέταλα των δύο επαναλήψεων για την κάθε επέμβαση.

Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε πλαστικές διαφανείς σακούλες και στη συνέχεια σε θάλαμο επώασης στους 16°C , διατηρώντας την υγρασία σε ικανοποιητικά επίπεδα προσθέτοντας σε τακτά χρονικά διαστήματα, την απαραίτητη ποσότητα αποστειρωμένου νερού.

Μετά την παρέλευση 15 ημερών στο θάλαμο επώασης, έγινε μέτρηση του αριθμού σπορίων, της κάθε απομόνωσης, πάνω στα πέταλα τριανταφυλλιάς. Για τη μέτρηση των σπορίων χρησιμοποιήθηκαν 3 δίσκοι από κάθε τρυβλίο. Κάθε δίσκος τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 10ml αποστειρωμένο νερό. Ο σωλήνας αναταράχθηκε στον αναδευτήρα, για να αποκολληθούν τα σπόρια από την επιφάνεια του δίσκου. Το αιώρημα διηθήθηκε από διπλό στρώμα μουσελίνας και σε δοκιμαστικό σωλήνα ελήφθη σχετικά καθαρό αιώρημα σπορίων. Ο δοκιμαστικός σωλήνας αναταράχθηκε, στον αναδευτήρα, για να γίνει ομογενοποίηση του αιωρήματος των σπορίων. Στη συνέχεια με πιπέτα Paster τοποθετήθηκαν δύο σταγόνες στο αιματοκυτόμετρο και μετρήθηκαν τα σπόρια στο μικροσκόπιο, με τη βοήθεια του μηχανικού μετρητή χεριού. Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε και για τους τρεις δίσκους της κάθε απομόνωσης. Ο αριθμός σπορίων ανά ml, ισούται με το ημιάθροισμα των αριθμών, που έδωσε η καταμέτρηση σπορίων στα τετράγωνα του αιματοκυτόμετρου, που φαίνονται στο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου στη μεγέθυνση $\times 40$, επί 10000.

15.5. Σχηματισμός σκληρωτίων των 17 απομονώσεων *B. cinerea*

Από τα παραπάνω τρυβλία, εκείνα με τους υπόλοιπους τρεις δίσκους ροδοπετάλων, τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 5°C για 25 ημέρες σε σκοτάδι, για το σχηματισμό σκληρωτίων. Ο σχηματισμός

σκληρωτίων εκτιμήθηκε με την απαρίθμησή τους για την κάθε απομόνωση.

15.6. Έλεγχος εμφάνισης ανθεκτικών θυγατρικών απομονώσεων

Σε όσα, από τα μολυσμένα με τις 17 απομονώσεις *Botrytis cinerea*, ροδοπέταλα σχηματίστηκαν σπόρια, ελάχιστη ποσότητα αυτών πάρθηκε με τη βοήθεια βελόνας, υπό ασηπτικές συνθήκες και μεταφέρθηκε σε ισάριθμους δοκιμαστικούς σωλήνες, που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μετά την παρέλευση 72 ωρών μεταφέρθηκαν σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες και επώαστηκαν στους 20-22°C για άλλες 72 ώρες. Δημιουργήθηκαν έτσι οι θυγατρικές απομονώσεις (Reisolations).

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της τοπικής μόλυνσης με λίγα σπόρια (Pappas, 1982). Η προετοιμασία των τρυβλίων έγινε όπως περιγράφεται προηγουμένως (βλέπε σελ.66).

Το υλικό χύθηκε στα τρυβλία (10ml σε κάθε τρυβλίο). Στα έτοιμα τρυβλία σημειώθηκαν στην κάτω επιφάνεια και περιφερειακά έξι ισαπέχοντα σημεία τα οποία αριθμήθηκαν. Τα αριθμημένα τρυβλία ομαδοποιήθηκαν σε πέντε ομάδες οι οποίες ήταν οι εξής : Control (τρυβλία χωρίς φάρμακο), S1 [τρυβλία με επέμβαση μίγματος MBC+diethofencarb (1+1μg/ml) που προστέθηκε κατά τη διάρκεια της μόλυνσης], S10 [τρυβλία με επέμβαση μίγματος MBC+diethofencarb (10+10μg/ml) που προστέθηκε κατά τη διάρκεια της μόλυνσης], S1-24h [τρυβλία με επέμβαση μίγματος MBC+diethofencarb (1+1μg/ml) που προστέθηκε 24 ώρες μετά τη μόλυνση], S10-24h [τρυβλία με επέμβαση μίγματος MBC+diethofencarb (10+10μg/ml) που προστέθηκε 24 ώρες μετά τη μόλυνση]. Στα αριθμημένα σημεία, των τρυβλίων, της κάθε ομάδας, τοποθετήθηκε μόλυσμα κονιδίων τόσων, όσων μπορεί να μεταφέρει η άκρη βελόνας, με μια απλή επαφή στις καρποφορίες που είχαν δημιουργηθεί στους αντίστοιχους κάθε φορά δοκιμαστικούς σωλήνες, των θυγατρικών Reisolations (επανααπομονώσεων).

Μετά από επώαση 24 ωρών σε σκοτάδι και σε θερμοκρασία 22°C, τα τρυβλία παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Τα σημεία όπου

τα σπόρια είχαν βλαστήσει δημιουργώντας κανονικές βλαστικές υφές, όπως φαίνεται στον πίνακα 1, επισημάνθηκαν με ένα κύκλο.

15.7. Έλεγχος ανθεκτικότητας μονόσπορων απομονώσεων *Botrytis cinerea* από διάφορες περιοχές και καλλιέργειες.

Πραγματοποιήθηκε πείραμα αναγνώρισης φαινοτυπικών ιδιοτήτων 34 μονόσπορων απομονώσεων του *Botrytis cinerea*. Σε τρυβλία που περιείχαν PDA μεταφέρθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες ένα βλαστών κονίδιο από κάθε απομόνωση και δημιουργήθηκαν έτσι 34 μονόσπορες καλλιέργειες. Μετά την παρέλευση 5 ημερών οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στο black light για 24 ώρες, για την παραγωγή σπορίων.

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα PDA εμπλουτισμένο με carbendazim (50% wp) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 1 και 100 mg/l, με diethofencarb (25% wp) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 1 και 100 mg/l, με iprodione (50% wp) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 3 και 10 mg/l, με Sumico (25% MBC + 25% diethofencarb) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 1 και 100mg/l και τέλος με dichlofluanid (50% wp) σε συγκεντρώσεις δραστικού συστατικού 1 και 3 mg/l. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της τοπικής μόλυνσης με λίγα σπόρια (Pappas, 1982). Η προετοιμασία των τρυβλίων έγινε όπως περιγράφεται στη σελίδα 66.

Με το παραπάνω «test» ευαισθησίας/ανθεκτικότητας, έγινε κατάταξη των 34 απομονώσεων *Botrytis cinerea*, με βάση τον τρόπο βλάστησης των σπορίων σε διάφορες συγκεντρώσεις βενζιμιδαζολικών, δικαρβοξιμιδικών, σουλφιδίων και φαινυλοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων. Από τις απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν διακρίθηκαν οι ακόλουθοι φαινότυποι :

W (άγριου τύπου), DicMR (μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά), BenHR (υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά), BenHR PcmHR (υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και υψηλής ανθεκτικότητας στα φαινυλοκαρβαμιδικά), DicMR BenHR (μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά και υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά), DicMR BenMR(μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά και μέτριας ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά), DichMS DicMR

BenMR (ευαίσθητο στο dichlofluanid μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξυμιδικά και μέτριας ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά),.

15.8. Παραγωγή σπορίων και σκληρωτίων μονόσπορων απομονώσεων *B. cinerea*.

Τα τρυβλία με τις μονόσπορες καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης για 15 ημέρες, στο σκοτάδι, στους 22°C. Στη συνέχεια έγινε μέτρηση του αριθμού σπορίων της κάθε απομόνωσης. Σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν 10ml αποστειρωμένο νερό και μια σταγόνα 3μl/10cm³ επιφανειοτασικού step wet X9836 για την εξουδετέρωση της επιφανειακής τάσης των σπορίων και για την καλύτερη διάβρεξη αυτών. Έπειτα με τη βοήθεια κεκαμένης γυάλινης ράβδου αναδεύουμε και κατόπιν δύνθησης από διπλό στρώμα μουσελίνας το αιώρημα των σπορίων τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας αναταράχθηκε, στον αναδευτήρα, για να γίνει ομογενοποίηση του αιωρήματος των σπορίων. Στη συνέχεια με πιπέτα Paster τοποθετήθηκαν δύο σταγόνες στο αιματοκυτόμετρο και μετρήθηκαν τα σπόρια στο μικροσκόπιο, με τη βοήθεια του μηχανικού μετρητή χεριού. Ο αριθμός σπορίων ανά ml, ισούται με το ημιάθροισμα των αριθμών, που έδωσε η καταμέτρηση σπορίων στα τετράγωνα του αιματοκυτόμετρου, που φαίνονται στο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου στη μεγέθυνση x40, επί 10000. Ο σχηματισμός σκληρωτίων εκτιμήθηκε με την απαρίθμησή τους για κάθε απομόνωση.

16. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

16.1. Αναγνώριση ανθεκτικών απομονώσεων *Botrytis cinerea*

Ο έλεγχος ανθεκτικότητας των 17 απομονώσεων του *B. cinerea* έγινε βάση του τρόπου βλάστησης των σπορίων τους. Έγινε χρήση του πίνακα 1. Απομονώσεις των οποίων τα σπόρια βλάστησαν και σχημάτισαν κανονικούς βλαστικούς σωλήνες και παριστάνονται με (+), θεωρήθηκαν ανθεκτικά. Απομονώσεις των οποίων τα σπόρια δεν βλάστησαν (-) ή βλάστησαν με παραμορφωμένους βλαστικούς σωλήνες (+/-), θεωρήθηκαν ευαίσθητες. Τα αποτελέσματα για κάθε απομόνωση φαίνονται στον πίνακα 3.

Οι απομονώσεις που δοκιμάστηκαν ήταν υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητας στο diethofencarb εκτός από τα 6/94 και 4/94, μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά, μέτριας ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά εκτός από τα 6/94, 4/94 και C5 τα οποία ήταν υψηλής ανθεκτικότητας. Όλες οι απομονώσεις ήταν υψηλής ανθεκτικότητας στο μίγμα MBC+diethofencarb εκτός από τις 9/94, La221 και Le2 που ήταν μέτριας ανθεκτικότητας.

Στο dichlofluanid η Le2 ήταν υψηλής ανθεκτικότητας ενώ η C₅ μέτριας ανθεκτικότητας. Παρατηρήθηκε το φαινόμενο της αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των βενζιμιδαζολικών και φαινυλοκαρβαμιδικών ενώσεων.

16.2. Κατάταξη απομονώσεων *B. cinerea* βάση του επιπέδου ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, σουλφίδια, δικαρβοξιμιδικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου της βλάστησης των σπορίων των απομονώσεων φαίνονται στον πίνακα 3. Η κατάταξη των απομονώσεων ως προς την ανθεκτικότητά τους στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμιδικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα, έγινε βάση του τρόπου βλάστησης των σπορίων τους και χρησιμοποιήθηκε ο πίνακας 1. Απομονώσεις των οποίων τα σπόρια βλάστησαν και σχημάτισαν κανονικούς βλαστικούς σωλήνες θεωρήθηκαν ανθεκτικά στην αντίστοιχη συγκέντρωση. Απομονώσεις των οποίων τα σπόρια δεν βλάστησαν ή βλάστησαν με παραμορφωμένους βλαστικούς σωλήνες θεωρήθηκαν ευαίσθητα στην αντίστοιχη συγκέντρωση μυκητοκτόνου.

Με βάση την ανθεκτικότητα που δείχνουν οι απομονώσεις στις διάφορες συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων, μπορούμε να χαρακτηρίσουμε την κάθε απομόνωση όπως φαίνεται από τον πίνακα 12. Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτουν οι ακόλουθες ομάδες φαινοτύπων : W, DicMR, BenHR, BenHR PCRHR, DicMR BenHR, DichMS DicMR BenMR PCRHR, DicMR BenMR PCRHR.

16.3. Έλεγχος παθογόνου ικανότητας ανθεκτικών απομονώσεων.

Ο έλεγχος της παθογόνου ικανότητας των απομονώσεων του *B. cinerea* έγινε με βάση την ανάπτυξη της κηλίδας προσβολής πάνω σε ροδοπέταλα τα οποία είχαν δεχθεί διάφορες επεμβάσεις μίγματος MBC+diethofencarb. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων κατά την διάρκεια 72h φαίνονται στον πίνακα 2. Η απομόνωση La 238 δεν προκάλεσε μόλυνση και στις μετρήσεις της διαμέτρου καταγράφηκε η μηδενική τιμή. Στα υπόλοιπα είδη μετρήσεων δεν λήφθηκε υπόψη.

Από τα αποτελέσματα του πειράματος δεν παρατηρούνται διαφορές στην παθογόνο ικανότητα μεταξύ των ανθεκτικών και των ευαίσθητων απομονώσεων στα διάφορα μυκητοκτόνα.

Από τον πίνακα 2 παρατηρούμε ότι η παθογένεια των απομονώσεων 3/94, 11/93, 4/94, Le2 και ιδιαίτερα της La221 ήταν συγκριτικά μεγαλύτερη των υπολοίπων απομονώσεων.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των διαφόρων επεμβάσεων μίγματος MBC+diethofencarb στην ανάπτυξη της κηλίδας προσβολής σε πέταλα τριανταφυλλιάς φαίνονται στο διάγραμμα 2, *B. cinerea*. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 2 δεν παρατηρούνται σημαντικές όπου διακρίνονται 6 διαφορετικοί φαινότυποι των απομονώσεων διαφορές στην ανάπτυξη της κηλίδας προσβολής μεταξύ των φαινοτύπων.

Από τη στατιστική ανάλυση της παραλλακτικότητας (ANOVA) και τη μέθοδο του ελαχίστου σημαντικού εύρους (κριτήριο Duncan) για πιθανότητα 5%, παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των απομονώσεων αλλά και των διαφόρων επεμβάσεων κατά τη διάρκεια των 48h και 72h που διήρκτησε η λήψη των μετρήσεων της ανάπτυξης της κηλίδας προσβολής στα ροδοπέταλα. Πίνακες 8, 9, 10, 11.

Από τον πίνακα 8 και για τη διάρκεια 48h με (*) παριστάνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των υπολοίπων επεμβάσεων, μεταξύ της επέμβασης S1 με το μάρτυρα και την S10-24h, μεταξύ της S1-24h με το μάρτυρα και την S10-24h, μεταξύ του S10 με το μάρτυρα και την S10-24h και τέλος μεταξύ της S10-24h με όλες τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

Από τον πίνακα 9 για τη διάρκεια των 48h με (*) παριστάνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκρινόμενων απομονώσεων.

Από του πίνακες 10 και 11 φαίνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων και των απομονώσεων αντίστοιχα κατά τη διάρκεια των 72h.

16.4. Παραγωγή σπορίων

Μετά την παρέλευση 15 ημερών στο θάλαμο επώασης έγινε μέτρηση των παραγόμενων σπορίων της κάθε απομόνωσης. Οι μετρήσεις παραγόμενων σπορίων/cm³X10⁴ των μολυσμένων ροδοπετάλων παρουσιάζονται στον πίνακα 5 όπου σε κάθε επέμβαση υπάρχουν τρεις τιμές που αντιστοιχούν στα τρία ροδοπέταλα στα οποία έγιναν μετρήσεις.

Ο μέσος αριθμός παραγωγής σπορίων των απομονώσεων *B. cinerea* στα ροδοπέταλα που δέχθηκαν διάφορες επεμβάσεις μίγματος

MBC+diethofencarb, φαίνεται στο διάγραμμα 1. Από το διάγραμμα παρατηρούμε ότι στο μάρτυραμεγαλύτερη παραγωγή είχε η απομόνωση 5/96 (DicMR), με την 9/96 (DicMR) να ακολουθεί. Οι υπόλοιπες είχαν σχετικά μικρότερη παραγωγή σπορίων.

Στα τρυβλία όπου είχε γίνει επέμβαση μίγματος MBC+diethofencarb κατά τη διάρκεια της μόλυνσης μεγαλύτερη παραγωγή σπορίων είχε η απομόνωση Le2 (DichMS, DicMR, BenMR PCRHR) στη συγκέντρωση (1+1μg/ml), ενώ η απομόνωση 3/94 (W) είχε μεγαλύτερη παραγωγή στη συγκέντρωση (10+10μg/ml). Το αντίστροφο φαινόμενο παρατηρήθηκε στις ίδιες συγκεντρώσεις μίγματος MBC+diethofencarb του οποίου η προσθήκη έγινε 24h μετά τη μόλυνση, όπου η Le2 έδωσε μεγαλύτερη παραγωγή σπορίων στη συγκέντρωση (10+10μg/ml) και η 3/94 στη συγκέντρωση (1+μg/ml).

16.5. Παραγωγή σκληρωτίων

Η παραγωγή σκληρωτίων των 16 απομονώσεων του *B. cinerea* στα πέταλα τριανταφυλλιάς φαίνεται στο διάγραμμα 3, για τις διάφορες επεμβάσεις του μίγματος carbendazim+diethofencarb. Από το διάγραμμα 3 παρατηρούμε ότι μεγαλύτερη παραγωγή σκληρωτίων είχε η απομόνωση 2/96 (W) και μετά η 4/96 (W) οι οποίες όμως αναπτύχθηκαν στο μάρτυρα. Στην επέμβαση μίγματος MBC+diethofencarb (1+1μg/ml) κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, μεγαλύτερη παραγωγή έδωσε η απομόνωση 8/96 (DicMR) και λιγότερη η 4/96 (W). Στην επέμβαση μίγματος MBC+diethofencarb (1+1μg/ml) 24 ώρες μετά τη μόλυνση, μεγαλύτερη παραγωγή έδωσε η απομόνωση 3/96 (W) και λιγότερη η 7/96 (DicMR). Στην επέμβαση μίγματος MBC+diethofencarb (10+10μg/ml) κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, μεγαλύτερη παραγωγή έδωσε η απομόνωση 8/96 η οποία ήταν και η μοναδική ενώ, στην επέμβαση μίγματος MBC+diethofencarb (10+10μg/ml) 24 ώρες μετά τη μόλυνση, μεγαλύτερη παραγωγή έδωσε η απομόνωση 8/96 (DicMR) και λιγότερη οι 4/96 (W) και 3/94 (W).

16.6. Έλεγχος εμφάνισης ανθεκτικών θυγατρικών απομονώσεων

Τα αποτελέσματα της εμφάνισης ανθεκτικών θυγατρικών απομονώσεων (Reisolations) από τα μολυσμένα πέταλα τριανταφυλλιάς στις διάφορες επεμβάσεις μίγματος MBC+diethofencarb φαίνονται στον πίνακα 7.

Μετά την πραγματοποίηση του «test» ευαισθησίας/ανθεκτικότητας των θυγατρικών απομονώσεων προέκυψαν νέοι φαινότυποι διαφορετικοί των αρχικών που χρησιμοποιήθηκαν για τις τεχνιτές μολύνσεις των διαφόρων επεμβάσεων. Στο dichlofluanid εμφανίστηκε ανθεκτικότητα με το οποίο οι απομονώσεις δεν είχαν έρθει σε επαφή. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 7 εμφανίστηκαν εντελώς νέοι φαινότυποι συγκριτικά με τους αρχικούς.

16.7. Έλεγχος ανθεκτικότητας μονόσπορων απομονώσεων *B. cinerea* από διάφορες περιοχές και καλλιέργειες.

Ο έλεγχος των φαινοτύπων 34 απομονώσεων *B. cinerea* έγινε βάση του τρόπου βλάστησης των σπορίων τους, όπως απεικονίζεται διαγραμματικά στον πίνακα 1. Απομονώσεις των οποίων τα σπόρια βλάστησαν και σχημάτισαν κανονικούς βλαστικούς σωλήνες θεωρήθηκαν ανθεκτικές. Απομονώσεις των οποίων τα σπόρια δεν βλάστησαν ή βλάστησαν με παραμορφωμένους βλαστικούς σωλήνες, θεωρήθηκαν ευαίσθητες. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο πίνακα 4. Παρατηρήθηκε ότι ορισμένες απομονώσεις απώλεσαν την ανθεκτικότητά τους σε κάποια κατηγορία φαρμάκων γεγονός που σημαίνει ότι το κονίδιο από το οποίο προήλθε η μονόσπορη απομόνωση δεν είχε το γονίδιο της ανθεκτικότητας. Αντίθετα άλλες απομονώσεις διατήρησαν τον φαινότυπο γεγονός που σημαίνει ότι έχουν σταθερά γονίδια.

16.8. Κατάταξη διαφόρων απομονώσεων *B. cinerea* βάση του επιπέδου ανθεκτικότητας στις διάφορες κατηγορίες φαρμάκων.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου βλάστησης των σπορίων των 34 απομονώσεων φαίνονται στον πίνακα 4. Με βάση την ανθεκτικότητα που δείχνουν οι απομονώσεις στις διάφορες συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων, μπορούμε να χαρακτηρίσουμε την κάθε απομόνωση όπως φαίνεται από τον πίνακα 13.

Από τις 34 απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν διακρίθηκαν οι παρακάτω 7 φαινότυποι W, DicMR, BenHR, BenHR PCRHR, DicMR BenHR, DicMR BenMR, DichMS DicMR BenMR. (φώτο 1)

16.9. Παραγωγή σπορίων και σκληρωτίων διαφόρων απομονώσεων *B. cinerea*.

Μετά την παρέλευση 15 ημερών στο θάλαμο επώασης έγινε μέτρηση των παραγόμενων σπορίων της κάθε απομόνωσης. Οι μετρήσεις παραγόμενων σπορίων/cm³ x 10⁴ αλλά και ο αριθμός σκληρωτίων παρουσιάζονται στο πίνακα 6.

Ο μέσος αριθμός παραγωγής σπορίων και σκληρωτίων των απομονώσεων φαίνεται στα διαγράμματα 4 και 5 αντίστοιχα. Από το διάγραμμα 4 οι απομονώσεις 16/93 (W), 10/94 (BenHR), Le2 (DichMS DicMR BenHR), 10/94 (BenHR), C₂ (BenHR), 1Birris 97 (W), 5/93 (BenHR) παρήγαγαν τα περισσότερα σπόρια.

Από το διάγραμμα 5 οι απομονώσεις Le2 (DichMS DicMR BenHR) και 8/96 (DicMR) έδωσαν το μεγαλύτερο αριθμό σκληρωτίων.

17. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αποτελεσματική χημική αντιμετώπιση του *Botrytis cinerea* με τα διαθέσιμα προστατευτικά μυκητοκτόνα όπως captan, folpet, zineb, thiram κ.α, απαιτεί γνώση της ευαισθησίας του μύκητα στο εφαρμοζόμενο φάρμακο. Ο Leroux και Moncomble (1994) υποστηρίζουν ότι τα παραπάνω μυκητοκτόνα δεν υφίστανται τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας εξ' αιτίας της πολύπλευρης βιοχημικής δράσης τους.

Η εμφάνιση των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων οδήγησε σε επιτυχή καταπολέμηση του βοτρύτη. Εξ' αιτίας όμως της εντατικής χρήσης εμφανίστηκαν ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά στελέχη. Η αντικατάσταση των βενζιμιδαζολικών από τα δικαρβοξιμιδικά έδωσε προσωρινή λύση στο πρόβλημα ελέγχου της ασθένειας, διότι μετά από παρατεταμένη χρήση εμφανίστηκε ανθεκτικότητα και σ' αυτή την κατηγορία μυκητοκτόνων.

Μετά την αποτυχία και των δικαρβοξιμιδικών οι προσπάθειες εξεύρεσης λύσης στο πρόβλημα της τέφρας σήψης οδήγησαν στα φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα. Οι Leroux και Gredt (1979), παρατήρησαν πρώτοι ότι στελέχη του *B. cinerea* και του *Penicillium expansum*, ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά, παρουσίαζαν μεγάλη ευαισθησία στα φαινυλοκαρβαμιδικά, εμφάνιζαν δηλαδή το φαινόμενο της αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας. Βάση αυτού του φαινομένου επιχειρήθηκε η αντιμετώπιση του βοτρύτη με μίγμα βενζιμιδαζολικών και φαινυλοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων και συγκεκριμένα με μίγμα carbendazim + diethofencarb. Η μέθοδος αυτή έδωσε αρκετά καλά αποτελέσματα εως ότου εμφανίστηκαν στελέχη με ανθεκτικότητα και στις δύο ομάδες μυκητοκτόνων μετά την χρήση του μίγματος (Leroux, 1972).

Στο πειραματικό μέρος της εργασίας, έγινε έλεγχος ανθεκτικότητας συνολικά 51 απομονώσεων *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμιδικά, σουλφίδια και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των απομονώσεων. Επίσης

έγινε κατάταξη αυτών με βάση την ανθεκτικότητά τους στις διάφορες κατηγορίες μυκητοκτόνων, καθώς και στο μίγμα MBC+diethotencarb. Η εκτίμηση της ανθεκτικότητας /ευαισθησίας έγινε εξετάζοντας τον τρόπο βλάστησης των σπορίων των απομονώσεων παρουσία των μυκητοκτόνων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη:

- ◆ φαινοτύπων αγρίου τύπου (W) με ανθεκτικότητα στο diethofencarb.
- ◆ φαινοτύπων υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά (Ben HR).
- ◆ φαινοτύπων μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά (DicMR).
- ◆ φαινοτύπων μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά και υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά (DicMR BenHR).
- ◆ φαινοτύπων μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά, μέτριας ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και υψηλής ανθεκτικότητας στα φαινυλοκαρβαμιδικά (DicMR BenHR PCRHR).
- ◆ φαινοτύπων ευαίσθητων στο dihllofluanid, μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά, μέτριας ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και υψηλής ανθεκτικότητας στα φαινυλοκαρβαμιδικά (DichMS DicMR BenMR PCRHR).
- ◆ φαινοτύπων υψηλής ανθεκτικότητας και στα βενζιμιδαζολικά και στα φαινυλοκαρβαμιδικά (BenHR, PCRHR).
- ◆ φαινοτύπων μέτριας ανθεκτικότητας και στα βενζιμιδαζολικά και στα δικαρβοξιμιδικά (BenMR DicMR).
- ◆ φαινοτύπων ευαίσθητων στο dichlofluanid, μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά και μέτριας ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά (DichMS DicMR BenMR).

Από το πειραματικό μέρος παρατηρήθηκε το φαινόμενο ότι ορισμένες απομονώσεις με συγκεκριμένο φαινότυπο όταν προήλθαν από μονόσπορη καλλιέργεια άλλαξαν φαινότυπο με αποτέλεσμα να απωλέσουν την ανθεκτικότητά τους σε κάποια κατηγορία φαρμάκων. Αυτό πιθανότατα σημαίνει ότι το κονίδιο από το οποίο προήλθε η μονόσπορη απομόνωση δεν είχε το γονίδιο της ανθεκτικότητας. Το γεγονός αυτό μπορεί να αιτιολογηθεί με το φαινόμενο της ετεροκαρύωσης. Αντίθετα άλλες απομονώσεις διατήρησαν τον αρχικό τους φαινότυπο γεγονός που σημαίνει ότι είχαν σταθερά γονίδια.

Η συνεχής επομένως χρήση μιας κατηγορίας μυκητοκτόνων μπορεί να οδηγήσει σε μη ικανοποιητική καταπολέμηση του βοτρυτή

εξ' αιτίας της επιλογής ανθεκτικών στελεχών. Η γρήγορη εμφάνιση στελεχών διπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά και τριπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, φαινυλοκαρβαμιδικά και δικαρβοξιμιδικά, σχετίζεται με την χρήση του μίγματος MBC+diethofencarb. Για πρώτη φορά στην Ελλάδα έχουν αναφερθεί, από τους Λάσκαρη, Παππά και Κυριακόπουλο (1994), προσβολές από στελέχη *B. cinerea* διασταυρωτής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα σε θερμοκήπια της δυτικής Πελοποννήσου.

Για την σωστή καταπολέμηση του βοτρύτη συνίσταται περιορισμένη χρήση του μίγματος MBC+diethofencarb ή εναλλαγές αυτού με άλλα μυκητοκτόνα, όπως το dichlofluanid. Μετά από έρευνες στην Γαλλία επιβεβαιώθηκε ότι μια επέμβαση το χρόνο με δικαρβοξιμιδικά (μόνο ή σε μίγμα με thiram) άσκησε χαμηλότερη πίεση επιλογής από το μίγμα MBC+diethofencarb (Leroux, 1989).

Κατά το πείραμα εκτίμησης της παθογόνου ικανότητας απομονώσεων πάνω σε πέταλα τριανταφυλλιάς, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές της παθογόνου ικανότητας μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στα διάφορα μυκητοκτόνα, απομονώσεων. Μικρές διαφορές παρατηρήθηκαν στην αύξηση της κηλίδας προσβολής πάνω στους φυτικούς ιστούς. Μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης της προσβολής προξένησαν απομονώσεις άγριου τύπου και υψηλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά.

Η Katan κ.α.(1989), υποστήριξε ότι η παθογόνος ικανότητα των ανθεκτικών απομονώσεων στα βενζιμιδαζολικά και τα φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα ήταν παρόμοια με αυτή των αντίστοιχων άγριων απομονώσεων και οι απομονώσεις που χαρακτηρίζονται ως Ben^RNPC^S, Ben^SNPC^R, Ben^RNPC^R προκάλεσαν μόλυνση 100% (NPC: φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα).

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των διαφόρων επεμβάσεων μίγματος MBC+diethofencarb στην ανάπτυξη της κηλίδας προσβολής στα πέταλα τριανταφυλλιάς, έδειξαν ότι μεγαλύτερη παρεμπόδιση στην ανάπτυξη της κηλίδας προκάλεσε η συγκεντρωση των (10+10μg/ml) ενώ, από τις απομονώσεις η La221 με φαινότυπο DicMR BenMR PCRHR και η 3/94 με φαινότυπο W παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς την ανάπτυξή τους πάνω στους φυτικούς ιστούς. Συνεπώς δεν επηρεάστηκαν από τις διάφορες επεμβάσεις του μίγματος MBC+diethofencarb.

Τα αποτελέσματα της εμφάνισης ανθεκτικών θυγατρικών απομονώσεων (Reisolation) από τα μολυσμένα πέταλα τριανταφυλλιάς

στις διάφορες επεμβάσεις μίγματος MBC+diethofencarb έδειξαν ότι, ο βοτρύτης εμφάνισε νέους φαινότυπους διαφορετικούς από αυτούς των θυγατρικών. Πιθανότατα εμφανίστηκαν νέα ανθεκτικά στελέχη με την διαδικασία της επαναπομόνωσης. Επίσης εμφανίστηκε ανθεκτικότητα στο dichlofluanid με το οποίο οι μητρικές απομονώσεις δεν είχαν έρθει σε επαφή.

Από τους μητρικούς φαινότυπους διατηρήθηκαν οι BenHR και BenHR PCRHR. Ορισμένες απομονώσεις απώλεσαν την ανθεκτικότητά τους σε ορισμένα μυκητοκτόνα ενώ κάποιες άλλες απομονώσεις με φαινότυπο (W) έδωσαν στελέχη με ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, φαινυλοκαρβαμιδικά αλλά και στο dichlofluanid, ενώ απομονώσεις μέτριας ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά έδωσαν ανθεκτικές απομονώσεις και στις άλλες κατηγορίες φαινοτύπων. Παρατηρούμε μια τάση υπεροχής των ανθεκτικών φαινοτύπων έναντι των ευαίσθητων. Ως προς την ανθεκτικότητα/ευαισθησία στα βενζιμιδαζολικά παρατηρήθηκε διατήρηση της ανθεκτικότητας που κυμαίνεται από μέτρια έως υψηλά επίπεδα.

Ως προς την συμπεριφορά των απομονώσεων στην κατηγορία των δικαρβοξιμιδικών ορισμένες απομονώσεις διατήρησαν την ανθεκτικότητά τους ενώ άλλες την απώλεσαν όπως το ίδιο συνέβει και με τα φαινυλοκαρβαμιδικά.

Κατά την εξέταση της ικανότητας παραγωγής σπορίων των απομονώσεων στα ροδοπέταλα που δέχτηκαν διάφορες επεμβάσεις μίγματος MBC+diethofencarb βρέθηκε ότι στο μάρτυρα οι απομονώσεις 5/96 και 9/96 με φαινότυπο DicMR είχαν μεγαλύτερη παραγωγή σπορίων με τις υπόλοιπες να ακολουθούν, ενώ την μικρότερη παραγωγή είχαν οι απομονώσεις 3/94 (W) και La221 (DicMR BenMR PCRHR).

Στα τρυβλία όπου είχε γίνει επέμβαση μίγματος MBC+diethofencarb κατά την διάρκεια της μόλυνσης μεγαλύτερη παραγωγή σπορίων είχε η απομόνωση Le2 (DichMS DicMR BenMR PCRHR) στην συγκέντρωση (1+1μg/ml), ενώ η απομόνωση 3/94 (W) είχε μεγαλύτερη παραγωγή στην συγκέντρωση (10+10μg/ml). Το αντίστροφο φαινόμενο παρατηρήθηκε στις ίδιες συγκεντρώσεις μίγματος MBC+diethofencarb του οποίου η προσθήκη έγινε 24 ώρες μετά την μόλυνση, όπου η Le2 έδωσε μεγαλύτερη παραγωγή σπορίων στη συγκέντρωση (10+10μg/ml) και η 3/94 στη συγκέντρωση (1+1μg/ml).

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις προκύπτει ότι η απομόνωση αγρίου τύπου δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη (1+1μg/ml)

μίγματος MBC+diethofencarb 24 ώρες μετά την μόλυνση ενώ επηρεάστηκε από την προσθήκη της ίδιας ποσότητας του παραπάνω μίγματος τη στιγμή της μόλυνσης.

Η Le2 δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη (1+1μg/ml) την στιγμή της μόλυνσης και (10+10μg/ml) 24 ώρες μετά την μόλυνση, ενώ επηρεάστηκε, ως προς την παραγωγή, στις συγκεντρώσεις των (10+10μg/ml) κατά την διάρκεια της μόλυνσης και (1+1μg/ml) 24 ώρες μετά τη μόλυνση.

Ως προς την παραγωγή σκληρωτίων περισσότερα έδωσαν τα άγρια στελέχη και τα μέτριάς ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά.

Όσο αφορά την παραγωγή σπορίων και σκληρωτίων των 34 μονόσπορων απομονώσεων η Le2 (DichMS DicMR BenHR) είχε παράλληλα με τη μεγαλύτερη παραγωγή σπορίων και μεγαλύτερη παραγωγή σκληρωτίων.

Από όσα έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα γίνεται φανερό ότι η συνεχής χρήση των μυκητοκτόνων στο αγρό επιλέγει ανθεκτικά στελέχη, τα οποία στη συνέχεια αναπτύσσουν υψηλή προσαρμοστικότητα και παθογόνο ικανότητα και καταστούν αναποτελεσματικά τα μυκητοκτόνα. Συγκεκριμένα η χρήση του μίγματος MBC+diethofencarb σε ανθεκτικό πληθυσμό *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα έχει σαν αποτέλεσμα εμφάνισης στελεχών τριπλής ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμιδικά και φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα (Elad, κ.α., 1992).

Από τη μέχρι σήμερα γνώση και εμπειρία θεωρείται ότι η εναλλαγή χημικών επεμβάσεων και η χρησιμοποίηση μιγμάτων μυκητοκτόνων με διαφορετική βιοχημική δράση είναι δυνατόν να καθυστερήσει την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στον αγρό. Όταν χρησιμοποιούνται μίγματα το ένα δραστικό συστατικό πρέπει να είναι προστατευτικό μη ειδικής δράσεως μυκητοκτόνο στην δοσολογία που συνίσταται όταν εφαρμόζεται και μόνο του. Το άλλο ή τα άλλα συστατικά να ανήκουν στην κατηγορία των ειδικών παρεμποδιστών και να περιέχονται στην ελάχιστη δυνατή δοσολογία για αποτελεσματική δράση στον αγρό. Το προστατευτικό μυκητοκτόνο, που κατά κανόνα έχει και μεγαλύτερη υπολειμματική δράση, περιορίζει τις απώλειες σε περίπτωση ανάπτυξης ανθεκτικότητας στον ειδικό παρεμποδιστή. Επιπλέον αυξάνει το φάσμα δράσεως εναντίων άλλων δευτερευούσης σημασίας παθογόνων.

Η χρησιμοποίηση μιγμάτων ή η εναλλαγή επεμβάσεων συμβατικών μυκητοκτόνων με μίγματα φαίνεται ότι δίνει ικανοποιητική καταπολέμηση της ασθένειας ακόμη και στην περίπτωση που επικρατούν ανθεκτικά στελέχη (Παππάς 1982b, Pappas 1985, Pappas and Elena 1992).

Διαπιστώθηκε ότι τα ανθεκτικά στελέχη του *B. cinerea* στα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα που εμφανίζονται στον αγρό είναι μέτριας ανθεκτικότητας και έχουν μειωμένη ικανότητα επιβίωσης στα υπολείμματα της καλλιέργειας κατά τη διάρκεια του θέρους (Pappas, 1986). Για το λόγο αυτό τα δικαρβοξιμιδικά αλλά και τα υπόλοιπα μυκητοκτόνα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε εναλλαγές ή μίγματα σε συνδυασμό με καλλιεργητικές και βιολογικές μεθόδους καταπολέμησης.

Βασικές πηγές βιβλιογραφίας : Elad, κ. α. (1992), Leroux (1992), Leroux and Moncomble (1994), Pappas (1982), Παππάς (1992).

ΜΕΡΟΣ Γ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Μέσοι όροι διαμέτρων σε (mm) των κηλίδων προσβολής πάνω σε ροδοπέταλα μετά από επώαση 72 ωρών σε 22⁰ C και 12 h φωτοπερίοδο.

Απομονώσεις <i>B. cinerea</i>	24h			48h			72h		
	Control	S 1	S1-24h	S 10	S10-24h	Control	S 1	S 1-24h	S 10 S 10-24h
3 94	3	3	3	3	3	12,9	7,3	5,7	6,8 7,6
1 96	3	3	3	3	3	7,6	6,5	5,6	5,5 6,1
6 94	3	3	3	3	3	6,8	6	5,7	6 6,3
11 93	3	3	3	3	3	6,4	6	7,3	5,3 6,2
4 94	3	3	3	3	3	12,3	7,7	7,5	5,5 7,1
La 221	3	3	3	3	3	11,5	7,7	9,9	9,5 10,4
Le 2	3	3	3	3	3	5,9	7,3	8,2	6,7 7
C 5	3	3	3	3	3	7,6	5,3	5,8	5,6 7,2
5 96	3	3	3	3	3	7,3	6,3	6	6,6 5,9
6 96	3	3	3	3	3	8,4	5	5,5	5 8,4
7 96	3	3	3	3	3	6,4	6,5	5,1	5 6,5
8 96	3	3	3	3	3	9,6	5,7	6	5 6,7
9 96	3	3	3	3	3	8,5	6,6	5,4	5,4 5,9
2 96	3	3	3	3	3	7,3	5,6	5	5,5 6,1
3 96	3	3	3	3	3	9,2	5,6	6	7 6,8
4 96	3	3	3	3	3	7,7	5,7	6,3	5,5 6

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Ευαισθησία / ανθεκτικότητα 17 απομονώσεων *Botrytis cinerea*,
από διάφορους ξενιστές.**

Απομονώσεις		Πηγή	Συγκέντρωση μυκητοκτόνου (µg/ml)										
			Control	Dichlofluanid	Iprodione	MBC	Diethofencarb (MBC+Diethofencarb)						
				1	3	3	10	1	100	1	100	1	100
3/94	Tomato	Greece	+	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
1/96	Tomato	Greece	+	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
6/94	Tomato	Greece	+	+/-	+/-	-	-	+	+	-	-	+/-	+/-
11/93	Tomato	Greece	+	+/-	+/-	+	+/-	-	-	+	+	+/-	+/-
4/94	Tomato	Greece	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+/-	+/-
La 221	Aubergine	Greece	+	-	-	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+/-
La 238	Aubergine	Greece	+	-	-	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+
Le 2	Grapes	France	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+/-
C 5	Cucumber	Israel	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+
5/96	Tomato	Greece	+	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
6/96	Tomato	Greece	+	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
7/96	Cucumber	Israel	+	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
8/96	Tomato	Greece	+	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
9/96	Tomato	Greece	+	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
2/96	Tomato	Greece	+	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
3/96	Tomato	Greece	+	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
4/96	Tomato	Greece	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-

+, κανονική βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη βλαστικών σωλήνων.

+/-, κοντοί ή παραμορφωμένοι βλαστικοί σωλήνες.

-, σπόρια μη βλαστάνοντα μετά από επώαση 20h στους 25⁰C στο σκοτάδι.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Ευαισθησία / ανθεκτικότητα 34 απομονώσεων *Botrytis cinerea*,
από διάφορους ξενιστές.**

Απομονώσεις	Πηγή	Συγκέντρωση μυκητοκτόνου (μg/ml)									
		Control	Dichlofluanid	Iprodione		MBC		Diethofencarb		(MBC+Diethofencarb)	
		1	3	3	10	1	100	1	100	1	100
1 Birris 97	Tomato Greece	+	+	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-
16/93	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-
1/96	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-
7/96	Tomato Greece	+	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-
9/96	Tomato Greece	+	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-
7/96	Tomato Greece	+	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-
11S1-24h	Tomato Greece	+	+	-	+	+/-	+	+/-	+	+	+/-
3 Birris 97	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-
6/94	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-
10/94	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-
C5(Cu89)	Cucumber Israel	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-
12S1-24h	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
12S1-24h	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
5/93	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-
4/94	Tomato Greece	+	+	-	+	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-
5/93	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-
Le 2/93	Grapes France	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+/-
C2 A/96	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-
C2 A/96	Tomato Greece	+	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-
La 221/94	Aubergine Greece	+	+	-	+	+/-	+	+/-	+	+	+/-
La 221/94	Aubergine Greece	+	+	-	+	+/-	+	+/-	+	+	+/-
11Reis.Cont.	Tomato Greece	+	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-
1S10	Tomato Greece	+	+	+	+	-	+	+/-	+	+	+/-
8/96	Tomato Greece	+	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-
16/93	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-
9/96	Tomato Greece	+	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-
8/96	Tomato Greece	+	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-
10/94	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-
7/96	Tomato Greece	+	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-
5/93	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-
3 Birris 97	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-
C5(Cu89)	Cucumber Israel	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-
1 Birris 97	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-
5/93	Tomato Greece	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-

+, κανονική βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη βλαστικών σωλήνων.

+/-, κοντοί ή παραμορφωμένοι βλαστικοί σωλήνες.

-, σπόρια μη βλαστάνοντα μετά από επώαση 20h στους 25⁰C στο σκοτάδι.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Αριθμός σπορίων και σκληρωτίων 34
απομονώσεων *Botrytis cinerea*.**

Απομονώσεις	Σπόρια/cm ³ x10 ⁴	Σκληρώτια
1 Birris 97	57	13
16/93	83	0
1/96	70	0
7/96	47	6
9/96	56	9
7/96	65	6
11S1-24h	2	16
3 Birris 97	106	2
6/94	75	0
10/94	209	0
C5(Cu89)	75	0
12S1-24h	20	0
12S1-24h	90	0
5/93	69	7
4/94	96	0
5/93	50	0
Le 2/93	198	31
C2 A/96	190	0
C2 A/96	132	4
La 221/94	56	0
La 221/94	59	0
11Reis.Cont.	112	6
1S10	42	7
8/96	106	13
16/93	222	0
9/96	80	18
8/96	58	30
10/94	218	5
7/96	102	9
5/93	81	8
3 Birris 97	139	9
C5(Cu89)	128	3
1 Birris 97	195	12
5/93	187	0

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Φαινότυποι των θυγατρικών απομονώσεων (Reisolations) *B. cinerea* σε σχέση με τους αρχικούς φαινότυπους των μητρικών.

		R e i s o l a t i o n s																								
		W					DicMR					BenMR					BenHR					DichMS BenMR				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Φαινότυποι	*																									
μ	3/94																									
	1/96	+										+										+				
η	2/96		+									+														
	3/96																									
	4/96																									
τ	11/93	+																								
	5/96																									
ρ	6/96						+																			
	7/96																									
	8/96																									
ι	9/96																									
	4/94																									
κ																										
	La 221																									
ε																										
	Le2																									
ς	C5																									

* Απομονώσεις *Botrytis cinerea*

- 1: C
2: S1
3: S10
4: S1-24h
5: S10-24h
- Μάρτυρας
Επέμβαση μίγματος MBC+diethofencarb(1+1μg/ml) κατά τη διάρκεια της μόλυνσης
Επέμβαση μίγματος MBC+diethofencarb(10+10μg/ml) κατά τη διάρκεια της μόλυνσης
Επέμβαση μίγματος MBC+diethofencarb(1+1μg/ml) 24h μετά τη μόλυνση
Επέμβαση μίγματος MBC+diethofencarb(10+10μg/ml) 24h μετά τη μόλυνση

ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων επεμβάσεων μίγματος MBC+diethofencarb στα ροδοπέταλα βάση του κριτηρίου Duncan κατά τη διάρκεια των 48h.

Επεμβάσεις	Control	S1	S1-24h	S10	S10-24h
Control		*	*	*	*
S1	*				*
S1-24h	*				*
S10	*				*
S10-24h	*	*	*	*	

Στατιστικά μεγέθη (ANOVA)			
	Sum of	Mean	
	Squares	Square	F
Effect	184,408	46,102	14,062
Error	557,333	3,27843	

Με (*) παριστάνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκρινόμενων μεγεθών

ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των 17 απομονώσεων *B. cinerea* βάση του κριτηρίου Duncan κατά τη διάρκεια των 48h.

Απομονώσεις	3 94	1 96	6 94	11 93	4 94	La 221	La 238	Le 2	C 5	5 96	6 96	7 96	8 96	9 96	2 96	3 96	4 96
3 94						*	*										
1 96						*	*										
6 94						*	*										
11 93						*	*										
4 94						*	*										
La 221	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
La 238	*	*	*	*	*			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Le 2						*	*										
C 5						*	*										
5 96						*	*										
6 96						*	*										
7 96						*	*										
8 96						*	*										
9 96						*	*										
2 96						*	*										
3 96						*	*										
4 96						*	*										

Στατιστικά μεγέθη (ANOVA)			
	Sum of	Mean	
	Squares	Square	F
Effect	985,702	61,606	18,7
Error	557,333	3,2784	

Με (*) παριστάνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκρινόμενων μεγεθών

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων επεμβάσεων μίγματος MBC+diethofencarb στα ροδοπέταλα βάση του κριτηρίου Duncan κατά τη διάρκεια των 72h.

Επεμβάσεις	Control	S1	S1-24h	S10	S10-24h
Control		*	*	*	*
S1	*				
S1-24h	*			*	
S10	*		*		
S10-24h	*			*	

Στατιστικά μεγέθη (ANOVA)			
	Sum of	Mean	
	Squares	Square	F
Effect	976,49	244,123	48,379
Error	857,83	5,0461	

Με (*) παριστάνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκρινόμενων μεγεθών

ΠΙΝΑΚΑΣ 11. Στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των 17 απομονώσεων *B. cinerea* βάσει του κριτηρίου Duncan κατά τη διάρκεια των 72h.

Απομονώσεις	3 94	1 96	6 94	11 93	4 94	La 221	La 238	Le 2	C 5	5 96	6 96	7 96	8 96	9 96	2 96	3 96	4 96
3 94		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1 96	*					*	*										
6 94	*					*	*				*						
11 93	*					*	*										
4 94	*					*	*										
La 221	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
La 238	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Le 2	*					*	*				*						
C 5	*					*	*										
5 96	*					*	*										
6 96	*		*			*	*	*									
7 96	*					*	*										
8 96	*					*	*										
9 96	*					*	*										
2 96	*					*	*										
3 96	*					*	*										
4 96	*					*	*										

Στατιστικά μέγεθη (ANOVA)		
	Sum of Squares	Mean Square
Effect	2089,6	130,6
Error	857,83	5,046

Με (*) παριστάνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκρινόμενων μεγεθών

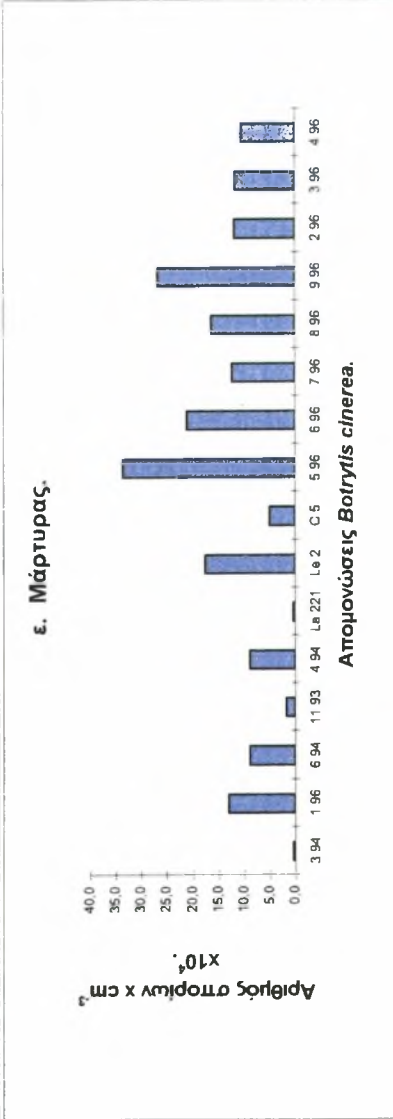
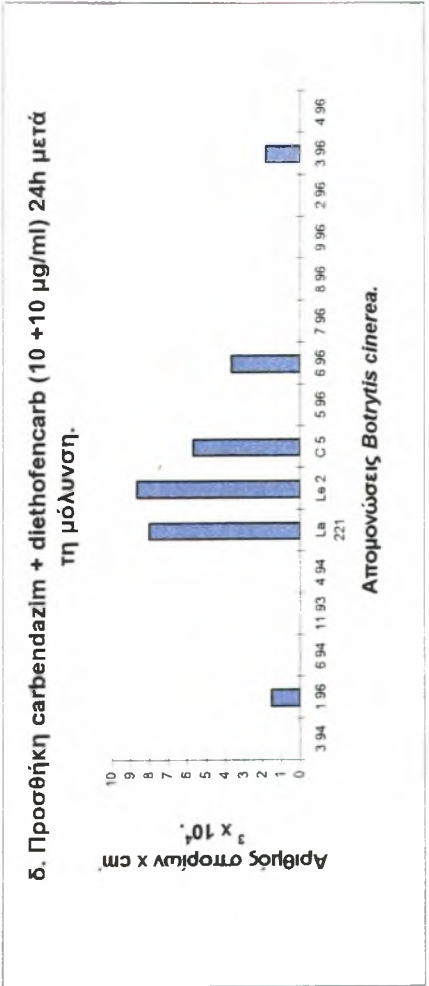
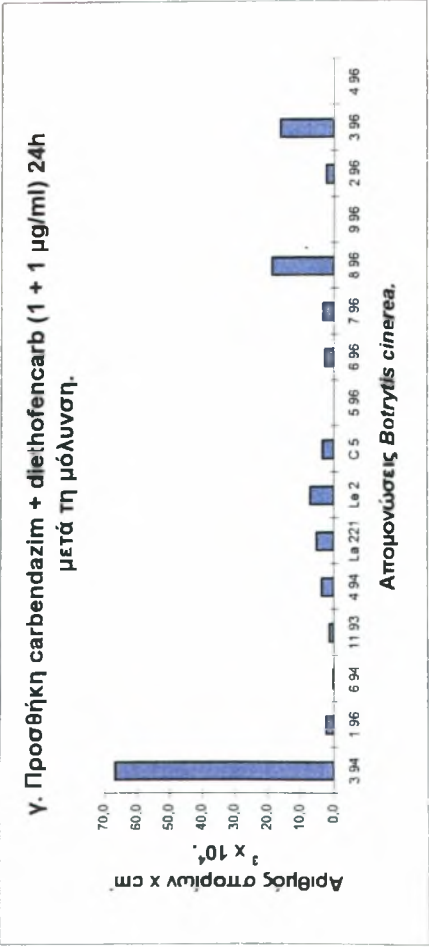
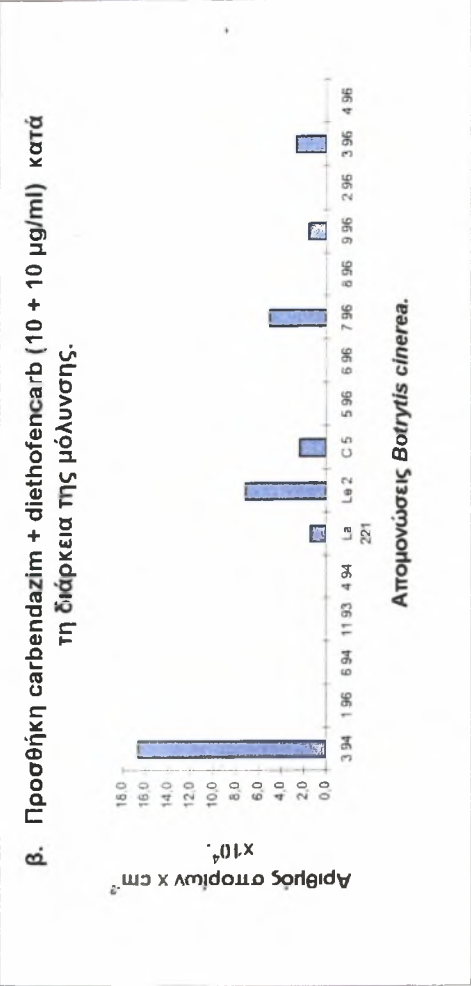
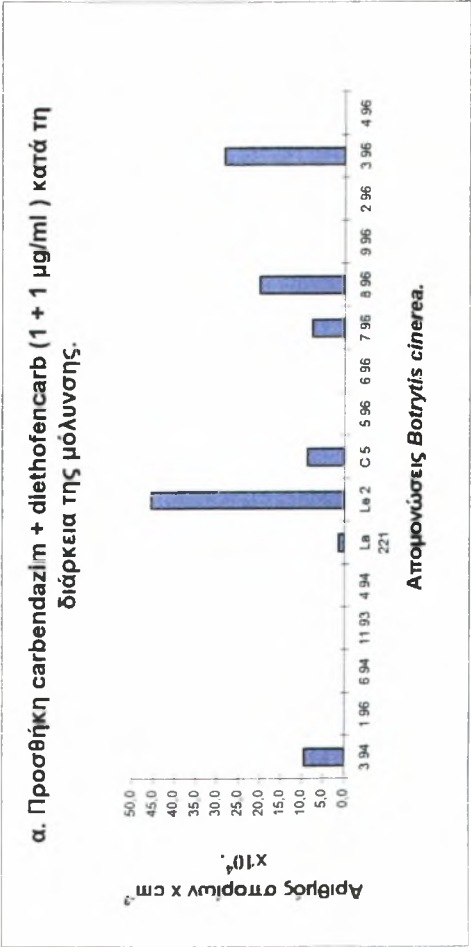
ΠΙΝΑΚΑΣ 12. Φαινότυποι 17 απομονώσεων *Botrytis cinerea*.

Απομονώσεις	Φαινότυποι
3/94	W
1/96	W
6/94	BenHR
11/93	DicMR
4/94	DicMR BenHR
La 221	DicMR BenMR PCRHR
La 238	DicMR BenMR PCRHR
Le 2	DichMS DicMR BenMR PCRHR
C 5	BenHR PCRHR
5/96	DicMR
6/96	DicMR
7/96	DicMR
8/96	DicMR
9/96	DicMR
2/96	W
3/96	W
4/96	W

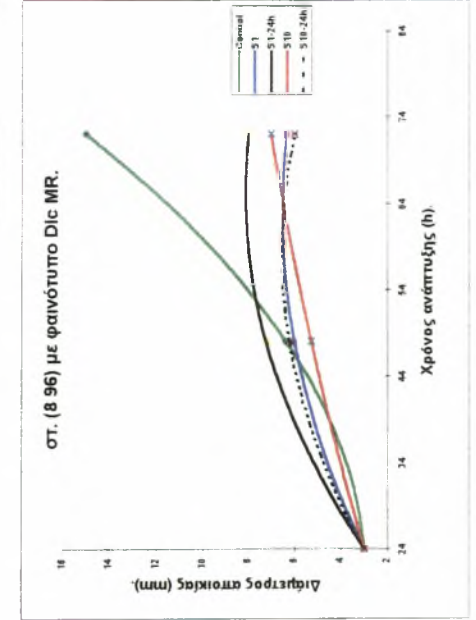
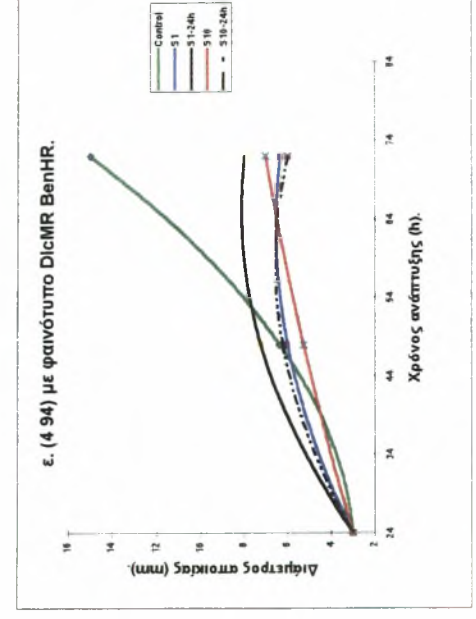
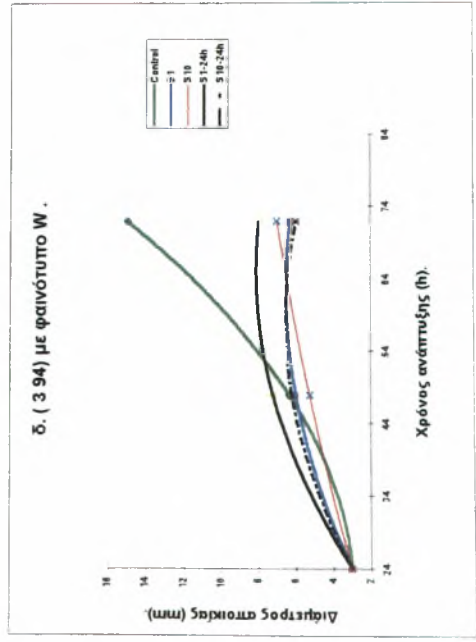
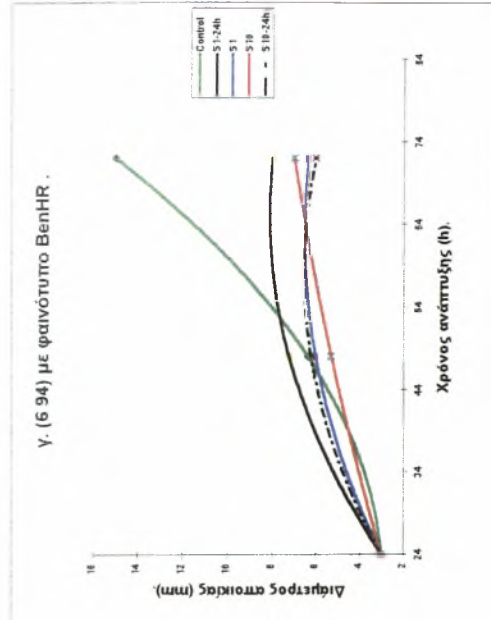
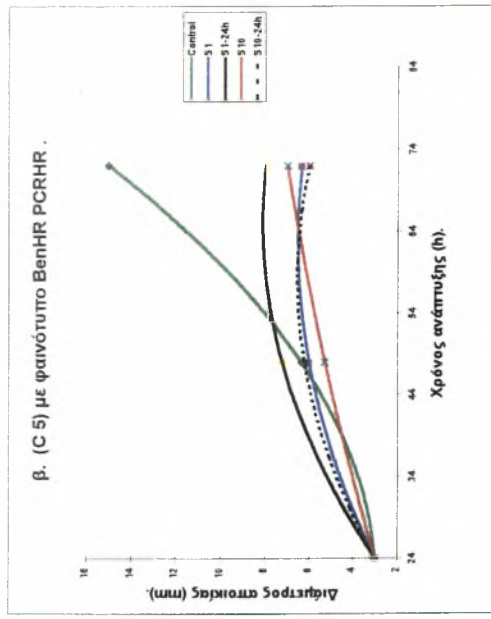
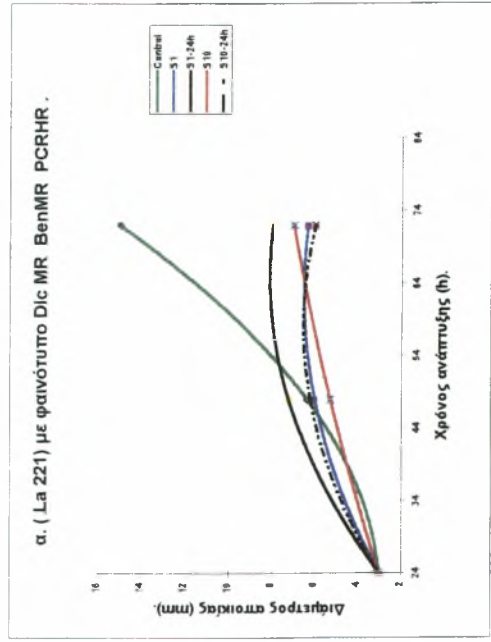
ΠΙΝΑΚΑΣ 13. Φαινότυποι 34 απομονώσεων *Botrytis cinerea*.

Απομονώσεις	Φαινότυποι
1 Birris 97	W
16/93	W
1/96	W
7/96	DicMR
9/96	DicMR
7/96	DicMR
11S1-24h	DicMR BenMR
3 Birris 97	BenHR
6/94	BenHR
10/94	BenHR
C5(Cu89)	BenHR
12S1-24h	BenHR PCRHR
12S1-24h	BenHR PCRHR
5/93	BenHR
4/94	DicMR BenHR
5/93	BenHR
Le 2/93	DichMS DicMR BenMR
C2 A/96	BenHR
C2 A/96	DicMR
La 221/94	DicMR BenMR
La 221/94	DicMR BenMR
11Reis.Cont.	DicMR
1S10	DichMS DicMR BenMR
8/96	DicMR
16/93	W
9/96	DicMR
8/96	DicMR
10/94	BenHR
7/96	DicMR
5/93	BenHR
3 Birris 97	BenHR
C5(Cu89)	BenHR
1 Birris 97	W
5/93	BenHR

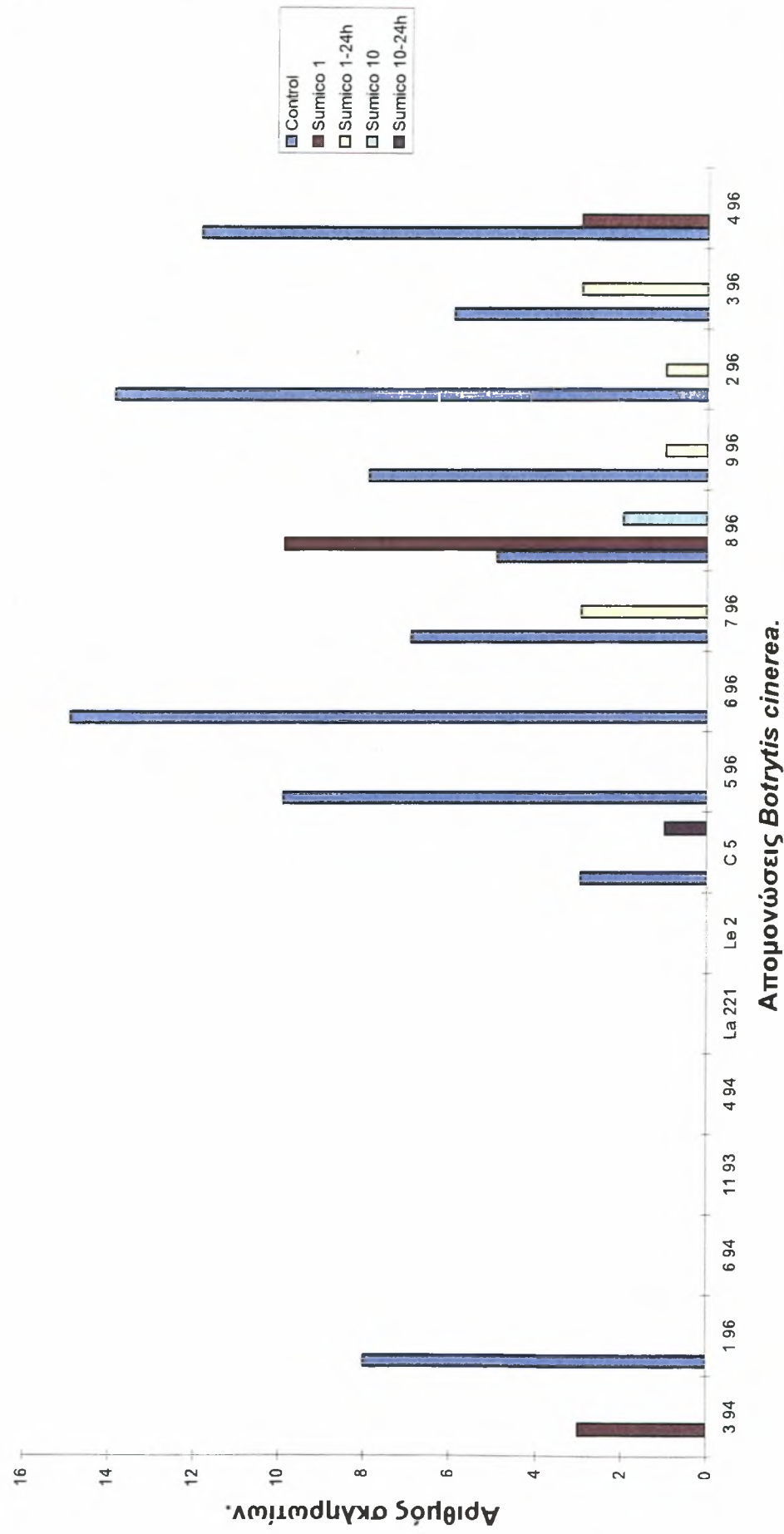
Διάγραμμα 1. Μέσος αριθμός παραγωγής σπορίων διαφόρων απομονώσεων του *B. cinerea* σε ροδοπέταλα που εδέχθηκαν διάφορες επεμβάσεις μίγματος carbendazim + diethofencarb.



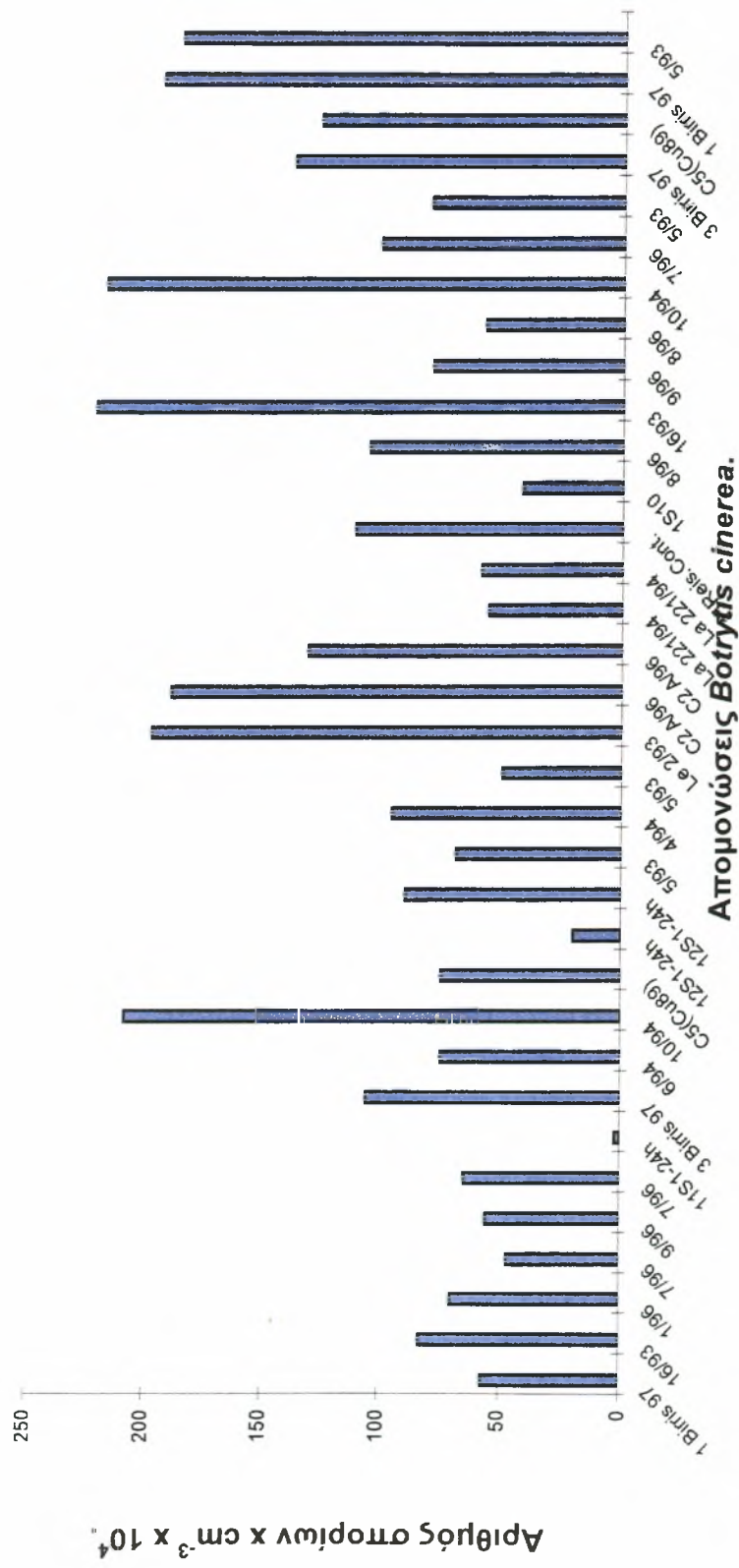
Διάγραμμα 2. Επίδραση διαφόρων επεμβάσεων μίγματος carbandazim + dlethofencarb στην ανάπτυξη της κηλίδας προσβολής σε ροδοπέταλα απομονώσεων B. cinerea.



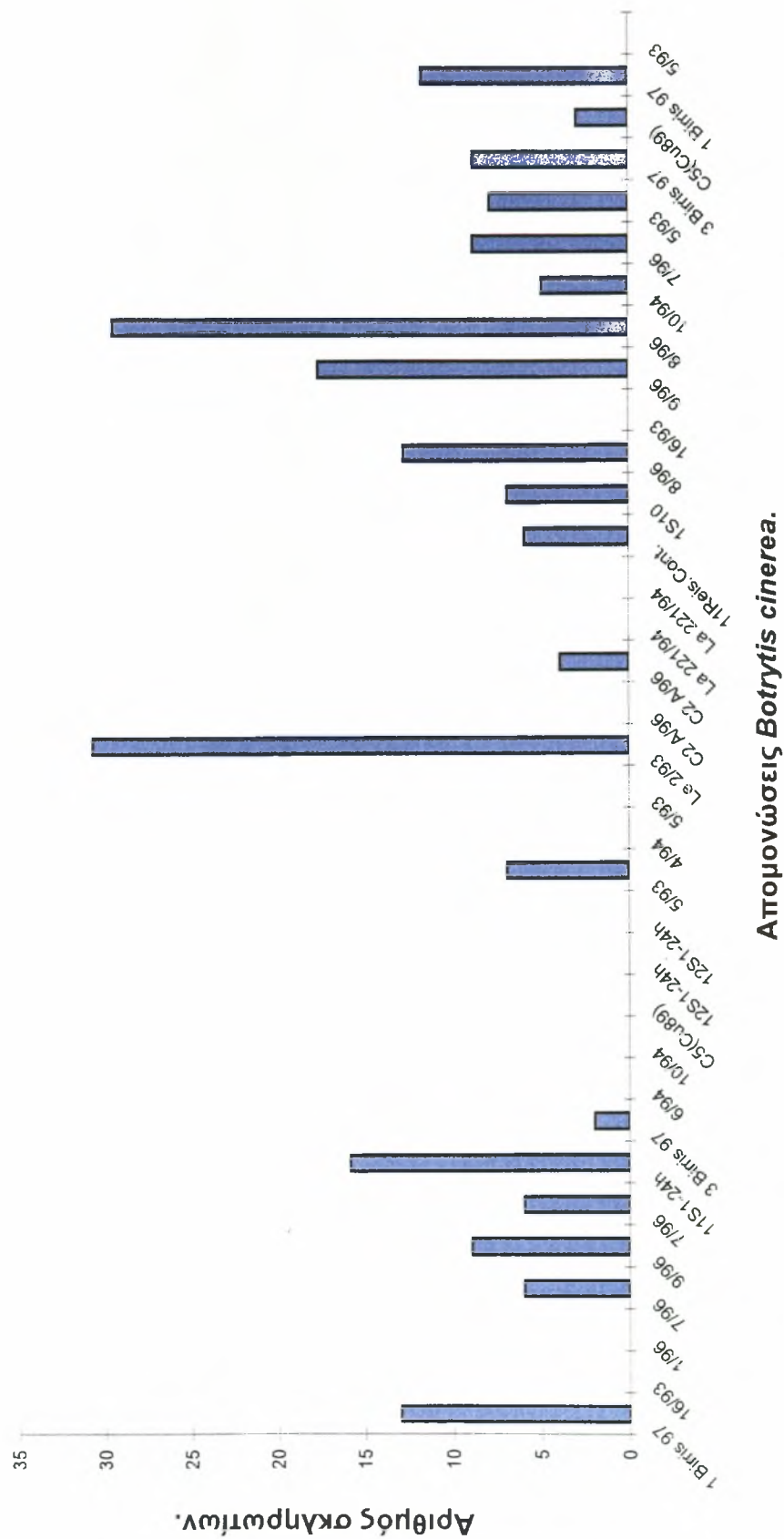
Διάγραμμα 3. Παραγωγή σκληρωτίων 16 απομονώσεων *Botrytis cinerea* σε ροδοπέταλα που δέχτηκαν διάφορες επεμβάσεις μύγματος carbendazim + diethofencarb.

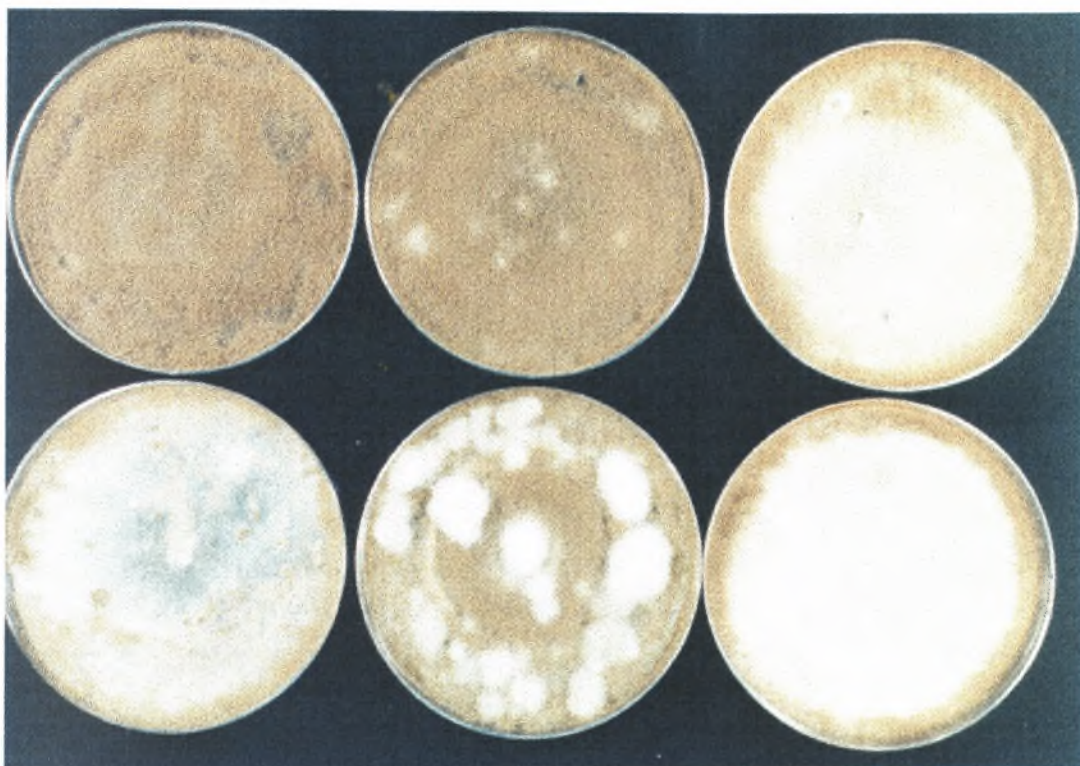


Διάγραμμα 4. Μέσος αριθμός παραγωγής σπορίων 34 απομονώσεων *Botrytis cinerea*.



Διάγραμμα 5. Παραγωγή σκληρωτίων 34 απομονώσεων *Botrytis cinerea*.





Φωτο 1 Σύγκριση φαινοτύπων ως προς την παραγωγή σπορίων, 6 αντιπροσωπευτικών απομονώσεων *Botrytis cinerea*, σε καλλιέργειες 15 ημερών, σε υλικό PDA.

Επάνω: W, Ben HR, Dic MR

Κάτω: Dic MR Ben HR, Dic MR Ben MR, Ben HR PCR H R

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agrios, G. N., 1978. *Plant Pathology*, 2nd. Academic, Press Inc. New York w.p.p 703.
- 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.
- Benlioglu, S. and Yilmaz, D., 1992. Influence of plant growth regulators on mycelial growth, germination of conidia and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. In *Recent Advances in Botrytis Research* (Verhoeff, K., Malathrakakis, N. E. and Williamson, B., Eds), pp119-122.
- Γεωργόπουλος, Σ. Γ. 1984. *.Βασικές γνώσεις Φυτοπαθολογίας*. Αθήνα.
- Γεωργόπουλος, Σ. Γ. και Ζιώγας Β. Ν. 1992. *Αρχές και μέθοδοι καταπολέμησης των ασθενειών των φυτών*. Αθήνα.
- Davidse, L. C., 1987. *.Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and resistance*. The Netherlands.
- Dubos, B., 1992. Biological control of *Botrytis*: state-of-the-art. In *Recent Advances in Botrytis Research* (Verhoeff, K., Malathrakakis, N. E. and Williamson, B., Eds), pp169-178.
- Elad, Y., Shtienberg, D., Yunis, H. and Mahrer, Y., 1992. Epidemiology of grey mould, caused by *Botrytis cinerea* in vegetable greenhouses. In *Recent Advances in Botrytis Research* (Verhoeff, K., Malathrakakis, N. E. and Williamson, B., Eds), pp 147-158.
- Elad, Y., Yunis, H. and Katan, T., 1992. Multiple fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofenarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathology* **41**, 41-46.
- Faretra, f., and Grindle, M., 1992. Genetic studies of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). In *Recent Advances in Botrytis research* (Verhoeff, K., Malathrakakis, N. E. and Williamson, B., Eds), pp 7-17.
- Faretra, F. and Pollastro, S., 1993. Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides

- in isolates of *Botriotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) from nine countries. *Plant Pathology* **42**, 48-57.
- Gisi, U. and Staehle-Csech, U., 1994. Resistance risk evaluation of new candidates for disease control. In *fungicide Resistance in North America* (Delp, J. C. Ed) pp 101-106.
- Gould, A. B., Kobayashi, D. Y. and Bergen, M. S., 1996. Identification of bacteria for biological control of *Botrytis cinerea* on petunia using a petal disk assay. *Plant disease* **80** : 1029-1033.
- Gouot, J. .M., 1994. Characteristics and population dynamics of *Botrytis cinerea* and other pathogens resistant to dicarboximides. In *fungicide Resistance in North America* (Delp, J. C., Ed) pp 53-57.
- Hsiang, T. and Chastagner, G. A., 1992. Production and viability of sclerotinia from fungicide-resistant and fungicide-sensitive isolates of *Botrytis cinerea*, *B. elliptica*, *B. tulipae*. *Plant Pathology* **41**, 600-605.
- Jarvis, W. R., 1977. *Botryotinia and Botrytis species*. Canada Department of Agriculture, Ottawa.
- Ziogas, B. N. and Girgis, S. M., 1993. Cross-Resistance Relationships between Benzimidazole Fungicides and Diethofencarb in *Botrytis cinerea* and their Genetical Basis in *Ustilago maydis*. *Pestic. Sci.* **39**, 199-205.
- Ζιώγας, Β. Ν., 1981. *Τεφρά σήψη της αμπέλου*. Θεσσαλονίκη.
- Katan, T., Elad, Y. and Yunis, H., 1989. Resistance to diethofencarb (NPC) in benomyl-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* **38**, 86-92.
- Kerssies, A., 1992. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in gerbera and rose grown in glasshouses. In *Recent Advances in Botrytis Research* (Verhoeff, K., Malathrakakis, N. E. and Williamson, B., Eds), pp 159-166.
- 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.
- Leone, G., 1992. Significance of polygalacturonase production by *Botrytis cinerea* in pathogenesis. In *Recent Advances in Botrytis Research* (Verhoeff, K., Malathrakakis, N. E. and Williamson, B., Eds), pp 63-68.

- Leroux, P., 1992. Negative cross-resistance in fungicides: from the laboratory to the field p. 179-190. *Developments in Combating Pesticide Resistance*.
- Leroux, P. and Moncomble, D., 1994. Resistans of *Botrytis cinerea* to Dicorboximides, Benzimidazoles, and Phenylcarbamates in the champagne vineyards. *BCPC Monograph no 60: fungicide Resistance*.
- Lorenz, G., 1994. Dicarboximide fungicides : History of resistance development and monitoring methods. *In fungicide Resistance in North America* (Delp, J. C., Ed), pp 45-51.
- Μπαλαγιάνης, Π. Γ., 1985. *Μαθήματα Γεωργικής Φαρμακολογίας*. Αθήνα.
- Μπούρμπος, Β. Α. και Σκουντριδάκης, Μ., 1987. *Εχθροί και ασθένειες της τομάτας θερμοκηπίου*. Εκδοτική αγροτεχνική.
- Μπούρμπος, Β. Α. και Σκουντριδάκης, Μ., 1993. *Ασθένειες και εχθροί των κολοκυνθοειδών*. Χανιά.
- Niklis, N. D., Thanassouloupoulos, C. C. and Sfakiotakis, E. M., 1992. Ethylene production and growth of *Botrytis cinerea* in Kiwifruit as influenced by temperature and low oxygen storage. *In Recent Advances in Botrytis research* (Verhoeff, K., Malathrakis, N. E. Williamson, B., Eds), pp 113-118.
- O' Neil, T. M., Shtienberg, D., and Elad, Y., 1997. Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. *Plant disease* **81**, 36-40.
- Παναγόπουλος, Χ. Γ., 1992. *Ασθένειες λαχανικών, βιομηχανικών και καλλωπιστικών φυτών*. Αθήνα.
- Παναγόπουλος, Χ. Γ., 1993. *Ασθένειες καρποφόρων δέντρων και αμπέλου*. Αθήνα.
- Παναγόπουλος, Χ. Γ., 1995. *Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών*. Αθήνα-Πειραιάς.
- Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, Ε., 1991. *Γεωργικά φάρμακα*. (Διδακτικές σημειώσεις Μέρος II). Θεσσαλονίκη.
- Παππάς, Α. Χ., 1992. Ο βοτρυτής στα κηπευτικά και σε άλλες καλλιέργειες. *Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρία*. Φύλο **4**.
- Pappas, A. C., 1982. Inadequate control of grey mould on cyclamen by dicarboximide fungicides in Greece. *Journal of Plant Diseases and Protection* **89**, 52-58.
- Pappas, A. C., 1997. Evolution of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in protected crops in Greece. *Crop Protection* **16**: 257-263.
- Παππάς, Α. Χ. Η αντιμετώπιση του φαινομένου της ανθεκτικότητας.

των φυτοπαθογόνων μυκήτων στα μυκητοκτόνα. Περίληψη ανακοινώσεων. 6^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο. Πάτρα 1992 : 64-65.

- Pappas, A. C. and Elena, K., 1988. Sensitivity to diethofencarb and control of *Botrytis cinerea* pers. in greenhouse grown plants. 5th International Congress of Plant Pathology. Kyoto Japan.
- Pappas, A. C. and Elena, K., 1992. Effect on grey mould of presence of *Botrytis cinerea* strains showing reduced sensitivity to diclofluanid. In *Recent Advances in Botrytis Research* (Verhoeff, K., Malathrakakis, N. E. and Williamson, B., Eds), pp 252-256.
- Παππάς, Α. Χ., και Ψαλλίδας, Π. 1998. Χημική Αντιμετώπιση των Ασθενειών των Φυτών : Ανασκόπηση-Προοπτικές. 2^η Πανελλήνια Συνάντηση Φυτοπροστασίας. Λάρισα.
- Raposo, R., Delcan, J., Melgarejo, P. And Gomez V., 1994. Multiple fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from commercial greenhouses in southeastern Spain. *Pests and Diseases* **4C-15**.
- Ρούμπος, Ι. Χ., 1994. Ασθένειες και εχθροί της αμπέλου (3^η έκδοση). Αθήνα
- Scheinflug, H., 1994. History of DMI fungicides and monitoring for resistance. In *fungicide resistance in North America* (Delp, J. C., Ed) pp 77-78.
- Susuki, K., Kato, T., Takahashi, J. and Kamoshita, K., 1984. Mode of Action of Methyl N-(3,5-Dichlorophenyl)-carbamate in the Benzimidazole-resistant Isolate of *Botrytis cinerea*. *J. Pesticide Sci.* **9**, 497-501.
- Van Kan, J. A. L., Bergmans, C. J. B. and Van't Klooster, J. W., 1992. Molecular genetic analysis of pathogenesis of *Botrytis cinerea*. In *Recent Advances in Botrytis Research* (Verhoeff, K., Malathrakakis, N. E. and Williamson, B., Eds), pp 18-21.
- Verhoeff, K., 1992. Introduction. In *Recent Advances in Botrytis Research* (Verhoeff, K., Malathrakakis, N. E. and Williamson, B., Eds), pp 2-3.

