



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής
Παραγωγής και Αγροτικού
Περιβάλλοντος

ΔΠΜΣ στα Σύγχρονα
Συστήματα Αγροτικής
Παραγωγής στο Μεσογειακό
Χώρο με Έμφαση στην
Αειφορική Παραγωγή και τη
Χρησιμοποίηση Νέων
Τεχνολογιών



Μεταπτυχιακή Διατριβή
Κατεύθυνση «Σύγχρονη Φυτοπροστασία»
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

Έλεγχος της δράσης *in situ* ειδικών μυκητοκτόνων εναντίον απομονώσεων του *Botrytis cinerea* επιλεγμένων

Τριμελής Επιτροπή

Επιβλέπων τέως Καθηγητής Φυτοπαθολογίας: Παππάς
Αθανάσιος

Επίκουρος Καθηγητής Φυτοπαθολογίας: Βέλλιος
Ευάγγελος

Καθηγητής Εντομολογίας: Παπαδόπουλος Νικόλαος



Παπαστεργίου Ιωάννα
Βόλος, 2014



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 13888/1
Ημερ. Εισ.: 09/06/2015
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
632.4
ΠΑΠ

Έλεγχος της δράσης *in situ* ειδικών μυκητοκτόνων εναντίον επιλεγμένων απομονώσεων του *Botrytis cinerea*

13990
9/6
632.4

Έλεγχος της δράσης *in situ* ειδικών μυκητοκτόνων εναντίον επιλεγμένων
απομονώσεων του *Botrytis cinerea*

Τριμελής Επιτροπή

Παππάς Αθανάσιος: τ. Επιβλέπων Καθηγητής Φυτοπαθολογίας

Βέλλιος Ευάγγελος: Επίκουρος Καθηγητής Φυτοπαθολογίας

Παπαδόπουλος Νικόλαος: Καθηγητής Εντομολογίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος κατά τα έτη 2011 έως 2012. Ολοκληρώνοντας τη συγγραφή της διατριβής, έχω υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της.

Αισθάνομαι λοιπόν, την ανάγκη να ευχαριστήσω με τα θερμότερα λόγια τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Αθανάσιο Παππά, Καθηγητή Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου όλα αυτά τα χρόνια, τις πολύτιμες συμβουλές και τις ερευνητικές κατευθύνσεις κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας.

Ακόμη, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον υποψήφιο διδάκτορα Χατζηδημόπουλο Μιχάλη για τη χορήγηση των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, καθώς και για την τεχνική του βοήθεια. Εν συνεχεία, ευχαριστώ ολόψυχα την Crocus Flora AE, η οποία βρίσκεται στο Κρόκιο Αλμυρού του Ν. Μαγνησίας, όπου διεξάγει μέρος της πειραματικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βέλλιο Ευάγγελο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αθανασίου Χρήστο και τον Καθηγητή κ. Παπαδόπουλο Νικόλαο για την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια όλου του κύκλου σπουδών του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος, της Κατεύθυνσης «Σύγχρονη Φυτοπροστασία», καθώς και για τις γνώσεις που μου παρείχαν μέχρι το πέρας αυτών των 2 χρόνων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλονται στην οικογένειά μου, που είναι πάντα δίπλα μου σε κάθε βήμα της ζωής μου, με ενθαρρύνουν και μου συμπαραστέκονται κάθε μέρα που περνάει όλο και περισσότερο. Τέλος, θα ήθελα να προσθέσω τις ολόθερμες ευχαριστίες μου σε ένα ξεχωριστό πρόσωπο της οικογένειάς μου, στην αδερφή μου Παπαστεργίου Φωτεινή, η οποία διέθεσε προσωπικό χρόνο και εργασία, συμβάλλοντας καθοριστικά από την αρχή μέχρι και το πέρας της πτυχιακής μου.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα όλους τους ανθρώπους που με στήριξαν και τους εύχομαι υγεία, ευτυχία και πολλές επιτυχίες.

Στους γονείς μου
Τριαντάφυλλο και Βικτώρια
και στην αδερφή μου Φωτεινή

Παρουσίαση εργασίας σε Συνέδριο:

Δράση *in situ* διαφόρων βοτρυδιοκτόνων κατά επιλεγμένων ανθεκτικών φαινοτύπων του *Botrytis cinerea* από φυτά μαρουλιού.

Παπαστεργίου Ι., Χατζηδημόπουλος Μ. και Α.Χ. Παππάς

16^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, ΕΦΕ, Θεσσαλονίκη, 2012.

(Περίληψη σελ. 161)

16^ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο



ΔΡΑΣΗ *IN SITU* ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΒΟΤΡΥΔΙΟΚΤΟΝΩΝ ΚΑΤΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ *BOTRYTIS CINEREA* ΑΠΟ ΦΥΤΑ ΜΑΡΟΥΛΙΟΥ

I. Παπαστεργίου, Μ. Χατζηδημόπουλος και Α.Χ. Παπιάς

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, 384 46 Ν. Ιωνία Μαγνησίας

Εισαγωγή

Σε καλλιέργειες μαρούλιου, η προσβολή από το παθογόνο *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., εμφανίζεται συνήθως ως σήψη του λαμού (Εικ. 1). Για την αντιμετώπιση της ασθένειας είναι διαθέσιμα αρκετά βοτρυδιοκτόνα. Η αποτελεσματικότητά τους όμως μειώνεται πολύ σύντομα μετά την εφαρμογή τους στη πράξη, λόγω ανάπτυξης ανθεκτικότητας του παθογόνου (2). Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας *in situ* επτά διαφορετικού τύπου δράσης μυκητοκτόνων (Πίν. 1) εναντίον επιλεγμένης ευαισθησίας απομονώσεων του *B. cinerea* (Πίν.2).



Εικόνα 1: Σήψη λαμού σε νεαρό φυτό μαρούλιου

Υλικά και μέθοδοι

Οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν στην πάνω επιφάνεια νεαρών φύλλων μαρούλιου (ποικ. Penelope RZ).

Διαδικασία

- ✓ Εμβάπτιση φύλλων σε υδατικό αιώρημα μυκητοκτόνων (Πίν. 1).
- ✓ Στείγωμα φύλλων και τοποθέτηση σε τρυβλία Petri με WA (water agar).
- ✓ Μόλυνση φύλλων (με ή χωρίς πληγή) δια μικροβιακού δίσκου (5 mm) ή σταγόνες αωρήματος σπορίων (5×10^4 / ml).

Η αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων αξιολογήθηκε με μέτρηση της διαμέτρου ανάπτυξης της κηλίδας προσβολής του παθογόνου μετά από 3 μέρες (μόλυνση μαρούλιου) και 6 μέρες (μόλυνση σπορίων) επίσης, αντίστοιχα, σε θερμοκρασία 18^ο C και φωτισμό 12h (3).

Πίνακας 1: Μυκητοκτόνα

Δραστική ουσία	Συγκέντρωση δ.ο. (%)
Fenhexamid (Fen) (N-βενζοξυλιδακ)	0.075%
Pyraclostrobin (Pyr) (Στραμολοστρίν, QoI's)	0.01%
Boscalid (Bos) (Καρβοξυμυδικά, SDHIs)	0.04%
Cyprodinil (Cyp) (Ανιτασπασμινικές)	0.008% και 0.038%
Fludioxonil (Flud) (Φαινόλοπρωλες)	0.012% και 0.025%
Fluazinam (Flm) (Δαντροσουλόνες)	0.02%
Chlorothalonil (Chl) (Χλωροστριλίλ)	0.15%

Αποτελέσματα

(Βλέπε Πίν. 3, Εικ. 2)

- Όταν χρησιμοποιήθηκε μικτό ως μίγμα η ανάπτυξη κηλίδας προσβολής των φαينότυπων του *B. cinerea* με ανθεκτικότητα στα fenhexamid, pyraclostrobin, boscalid, cyprodinil και fludioxonil, ήταν σε όλες τις περιπτώσεις επμβάσεων όπως στο μάρτυρα.
- Αντίθετα, τα μυκητοκτόνα fluazinam και chlorothalonil ήταν αποτελεσματικά εναντίον όλων των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν.
- Η μόλυνση με σπόρια δεν ήταν πάντοτε επιτυχής. Έπειτα από 8 μέρες επίωση εμφανίζονταν συνήθως ανοιχτόχρωμα καστανά στίγματα κάτω από τη σταγόνα μόλυνσης. Όμως, σε μερικές περιπτώσεις παρατηρήθηκε κανονική ανάπτυξη της κηλίδας προσβολής. Η παραλλακτικότητα αυτή φαίνεται να σχετίζεται με την ενεργοποίηση του μηχανισμού άμυνας (παγωγή letuciscin A) που διαθέτει το μαρούλι (1).

Πίνακας 2: Απομονώσεις (Φαινότυποι) του *B. cinerea*

Απομόνωση (Φαινότυπος)	M.I.C. (mg l ⁻¹) ανάπτυξης αποικίας <i>in vitro</i>									
	Fen*	Pyr	Bos	Cyp	Flud	Flm	Chl	Ben	Dis	
C07 (Fen ^{MR} Pyr ^{MR} Bos ^{MR} Cyp ^{MR} Flud ^{MR} Flm ^{MR} Chl ^{MR} Ben ^{MR} Dis ^{MR})	>50	>100	>100	>50	0.1	0.1	10	1	10	
A59 (Fen ^{MR} Pyr ^{MR} Bos ^{MR} Cyp ^{MR} Flud ^{MR} Ben ^{MR} Dis ^{MR})	>50	>100	25	>50	1	0.1	10	>100	10	
C14 (Fen ^{MR} Pyr ^{MR} Cyp ^{MR} Ben ^{MR} Dis ^{MR})	>50	>100	10	>50	0.1	0.1	10	>100	10	
C39 (Fen ^{MR} Pyr ^{MR} Ben ^{MR} Dis ^{MR})	>50	>100	10	0.1	0.1	0.1	10	>100	10	
A07 (Fen ^{MR} Pyr ^{MR} Dis ^{MR})	>50	>100	10	0.1	0.1	0.1	10	1	10	
C01 (Pyr ^{MR} Bos ^{MR} Cyp ^{MR} Ben ^{MR} Dis ^{MR})	1	>100	>100	>50	0.1	0.1	10	>100	10	
B18 (Pyr ^{MR} Bos ^{MR} Cyp ^{MR} Dis ^{MR})	1	>100	>100	>50	0.1	0.1	10	1	10	
A01 (Ben ^{MR})	1	1	25	0.1	0.1	0.1	10	1	3	
B18 (Flud ^{MR} Dis ^{MR})	1	1	10	0.1	1	0.1	10	1	10	
A59 (Wild type)	1	1	10	0.1	0.1	0.1	10	1	3	

*Fen: Fenhexamid, Pyr: Pyraclostrobin, Cyp: Cyprodinil, Flud: Fludioxonil, Bos: Boscalid, Ben: Carbendazim, Dis: Iprodione, HR: Υψηλή ανθεκτικότητα, MR: μέτρια ανθεκτικότητα

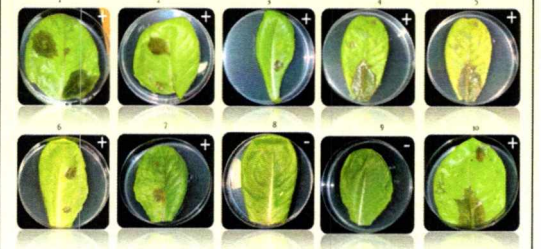
Πίνακας 3: Έλεγχος αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνων *in situ* κατά διαφορετικής ευαισθησίας απομονώσεων του *B. cinerea*

Απομ.	Μυκητοκτόνα													
	Fenhexamid (0.075%)		Pyraclostrobin (0.01%)		Boscalid (0.04%)		Cyprodinil (0.008%)		Fludioxonil (0.025%)		Fluazinam (0.02%)		Chlorothalonil (0.15%)	
	M*	Σ	M	Σ	M	Σ	M	Σ	M	Σ	M	Σ	M	Σ
C07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C01	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B18	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A01	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*M: Μόλυνση με μικτό (χωρίς πληγή), Σ: Μόλυνση με σπόρια (με πληγή)
+ : Ανάπτυξη κηλίδας προσβολής, ± : Μημεγάλυνση, - : Όχι μολύνση



Μόλυνση με μικτό



Μόλυνση με σπόρια

Εικόνα 2: Ανάπτυξη κηλίδας προσβολής του *B. cinerea* σε φύλλα μαρούλιου που μολύνθηκαν με τη πολλαπλή ανθεκτικότητα απομόνωση A59

1. Fenhexamid (0.075%)
2. Pyraclostrobin (0.01%)
3. Boscalid (0.04%)
4. Cyprodinil (0.008%)
5. Fludioxonil (0.025%)
6. Fluazinam (0.02%)
7. Chlorothalonil (0.15%)
8. Μάρτυρας

Συμπεράσματα

Από την εργασία αυτή προέκυψε ότι τα νέα βοτρυδιοκτόνα αδυνατούν να εμποδίσουν την εξέλιξη της προσβολής *in situ* όταν το στέλεχος του *B. cinerea* έχει χαρακτηριστεί ως ανθεκτικό *in vitro*.

Τα μυκητοκτόνα fluazinam και chlorothalonil βρέθηκε να είναι αποτελεσματικά εναντίον όλων των απομονώσεων του παθογόνου.

Βιβλιογραφία

1. Bennett M.H., Gallagher M.D.S., Benwick C.S., Rossiter J.T. and Mansfield J.W. (1994). The phytoalexin response of lettuce to challenge by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry and Plant Pathology* 44: 301-313.
2. Rossiter P.J. (1993). Review: Fungicide resistance: occurrence and management. *Journal of Agricultural Science* 144: 37-43.
3. Wegdel S.N. and Vabber M. (2007). Evaluation of Lysobius Cultures for Resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 91: 997-1001.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	9
Abstract.....	10
Ανασκόπηση Βιβλιογραφίας.....	11
1. Εισαγωγή	
1.1 Συνολική Έκταση Θερμοκηπίων στην Ελλάδα	12
1.2 Καταγωγή – Εξάπλωση - Ιστορικά Στοιχεία μαρουλιού	13
1.3 Κατηγορίες.....	13
1.4 Μορφολογικά Χαρακτηριστικά	17
1.5 Χρήσεις.....	17
1.6 Θρεπτική αξία μαρουλιού.....	17
2. Η ασθένεια της τεφράς σήψης.....	19
2.1 Ξενιστές – Προσβολή.....	20
2.2 Συμπτωματολογία.....	22
2.3 Παθογόνο Αίτιο - Ταξινόμηση	31
2.4 Επιβίωση	33
2.5 Επιδημιολογία.....	38
2.6 Παθογένεση.....	38
2.7 Πρόβλεψη Επιδημίας.....	42
2.8 Άμυνα του ξενιστή.....	43
2.9 Αντιμετώπιση.....	44
✓ Προληπτικά μέτρα.....	45
✓ Βιολογική Καταπολέμηση.....	46
✓ Χημική καταπολέμηση.....	47
2.10 Εμφάνιση ανθεκτικότητας.....	52
✓ Εμφάνιση ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και στα φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα.....	54
✓ Εμφάνιση ανθεκτικότητας στα δικαρβοξαμιδικά, φαινυλοπυρρόλια και στους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.....	56
✓ Εμφάνιση ανθεκτικότητας στις ανιλνοπυριμιδίνες.....	57

✓ Εμφάνιση ανθεκτικότητας στους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης.....	57
✓ Εμφάνιση ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα του συμπλόκου III της αναπνοής (QoI ^s) – Στρομπιλουρίνες.....	58
✓ Εμφάνιση ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα του συμπλόκου II της αναπνοής- Boscalid.....	61
Πειραματικό Μέρος.....	62
3. Υλικά και Μέθοδοι	
3.1 Υπόστρωμα.....	63
3.2 Απομονώσεις.....	64
3.3 Προετοιμασία νεαρών μαρουλιών.....	67
3.4 Απολύμανση μαρουλιών από τυχόν βακτήρια και διατήρησή τους	69
3.5 Υπόστρωμα διατήρησης μαρουλιών	71
3.6 Δραστικές Ουσίες.....	72
3.7 Διαδικασία τεχνητής μόλυνσης με μυκήλιο.....	73
3.8 Διαδικασία τεχνητής μόλυνσης με αιώρημα σπορίων.....	76
3.9 Στατιστική Επεξεργασία	78
4. Αποτελέσματα.....	79
4.1 Fenhexamid.....	81
4.2 Pyraclostrobin.....	83
4.3 Boscalid.....	84
4.4 Cyprodinil.....	85
4.5 Fludioxonil.....	87
4.6 Chlorothalonil.....	89
4.7 Fluazinam.....	90
5. Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	88
6. Βιβλιογραφία	
6.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία.....	91
6.2 Ελληνική Βιβλιογραφία.....	110
6.3 Πηγές εικόνων.....	111

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία, διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα *in situ* επτά μυκητοκτόνων διαφορετικού βιοχημικού τρόπου δράσεως [pyraclostrobin (στρομπιλουρίνες), boscalid (καρβοξαμιδικά), fenhexamid (υδροξυανιλίδες), cyprodinil (ανιλινοπυριμιδίνες), fludioxonil (φαινυλοπυρρόλες), fluazinam (δινιτροανιλίνες) και chlorothalonil (φθαλονιτρίλια)], κατά εννιά επιλεγμένων με πολλαπλή ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα απομονώσεων του *B. cinerea*.

Νεαρά φύλλα μαρουλιού (ποικιλίας Penelope RZ) εμβαπτίστηκαν σε υδατικό αιώρημα μυκητοκτόνων, στη συνιστώμενη για ψεκάσμο συγκέντρωση σε δραστική ουσία. Μετά το στέγνωμα, τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri με αποστειρωμένο υπόστρωμα άγαρ. Ακολούθησε μόλυνση (με ή χωρίς πληγή) στην πάνω επιφάνεια με εναπόθεση ανεστραμμένου μυκηλιακού δίσκου διαμέτρου 5 mm ή σταγόνας αιωρήματος σπορίων συγκέντρωσης 5×10^4 /ml.

Η αποτελεσματικότητα αξιολογήθηκε με μέτρηση της διαμέτρου ανάπτυξης της κηλίδας προσβολής του παθογόνου, έπειτα από 3 (μόλυσμα - μυκήλιο) ή 6 (μόλυσμα - σπόρια) μέρες επώαση, αντίστοιχα, σε θάλαμο θερμοκρασίας 18°C και 12 h φωτισμού.

Τα pyraclostrobin (0.01%) και fenhexamid (0.075%) απέτυχαν να εμποδίσουν την ανάπτυξη κηλίδας προσβολής των ανθεκτικών *in vitro* φαινοτύπων σε όλες τις περιπτώσεις δοκιμών. Παρόμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν για τα boscalid (0.04%), cyprodinil (0.018% και 0.038%) και fludioxonil (0.012% και 0.025%) όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα μυκήλιο. Όταν όμως χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα αιώρημα σπορίων, τα τελευταία μυκητοκτόνα παρεμπόδισαν την ανάπτυξη κηλίδας προσβολής, στις περισσότερες των περιπτώσεων. Απεναντίας, τα μυκητοκτόνα **fluazinam (0.02%)** και **chlorothalonil (0.15%)** ήταν αποτελεσματικά εναντίον όλων των φαινοτύπων του παθογόνου.

Από τα αποτελέσματα διαφαίνεται η αδυναμία πρόσφατα εισαχθέντων μυκητοκτόνων να εμποδίσουν την προσβολή από ανθεκτικούς *in vitro* φαινοτύπους του *B. cinerea* που απομονώθηκαν από καλλιέργειες μαρουλιού.

Abstract

Effectiveness of different fungicides *in situ* against selected resistant phenotypes of *Botrytis cinerea* originated from lettuce

The efficacy of seven fungicides with different mode of action against nine multiple resistant isolates of *B. cinerea*, was tested *in situ*. The fungicides used were: pyraclostrobin (strobilurins), boscalid (carboxamides), fenhexamid (hydroxyanilides), cyprodinil (anilinopyrimidines), fludioxonil (phenylpyrroles), fluazinam (dinitroanilines) and chlorothalonil (phthalonitriles).

Young lettuce leaves (c.v. Penelope RZ) immersed in aqueous fungicide suspensions at the recommended spraying concentrations (a.i.%). When the leaves dried they were placed in Petri dishes with sterilized water agar. Then, inoculation taken place by transferring upside down a 5 mm mycelial disc or a drop of a spore suspension (5×10^4 /ml) on the adaxial leaf surface (wounded or not).

Fungicide efficacy was evaluated by measuring the size of infection lesion after 3 (mycelium) or 6 (spores) day incubation, respectively, in a growth chamber of 18°C and 12 h lighting.

The fungicides pyraclostrobin (0.01%) and fenhexamid *in vitro* (0.075%) failed to inhibit the development of *Botrytis* lesion by the resistant isolates, in all tests. Similar results were provided by boscalid (0.04%), cyprodinil (0.018% and 0.038%) and fludioxonil (0.012% and 0.025%) when mycelial discs were used as inoculum. In most cases, the action of the latest fungicides upon lesion formation was inhibitory when spore suspension was used as inoculum. By contrast the fungicides fluazinam (0.02%) and chlorothalonil (0.15%) were always effective against all isolates used.

These results showed the inability of recently introduced fungicides to inhibit the infection by *B. cinerea* resistant *in vitro* phenotypes obtained from lettuce crops.

Ανασκόπηση Βιβλιογραφίας

1. Εισαγωγή

1.1 Συνολική Έκταση Θερμοκηπίων στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα σήμερα, υπάρχουν περίπου 52.200 στρέμματα με θερμοκηπιακές καλλιέργειες. Συγκεκριμένα, στη Θεσσαλία υπάρχουν περί τα 1.831 στρέμματα (ΕΣΥΕ, 2006). Το εντυπωσιακό είναι πως πριν από 20 χρόνια υπήρχαν 40.000 στρέμματα (Ινστιτούτο Ανάπτυξης και Διαχείρισης Φυσικών πόρων), δηλαδή τα τελευταία 20 χρόνια τα θερμοκήπια στην Ελλάδα είχαν αυξητική τάση, με ρυθμό 500 στρ. θερμοκηπίων το χρόνο, αν θεωρηθεί ότι η αύξηση γίνεται γραμμικά και ένα μέσο θερμοκήπιο έχει έκταση 1 στρέμμα.

Στη Μεσόγειο πρωτοστατεί η Ισπανία με 27% περίπου συνολικής θερμοκηπιακής καλλιεργήσιμης έκτασης, ενώ η Ελλάδα έρχεται 7^η με μόλις 3,85%.

Κατά τη συντριπτική πλειοψηφία, τα θερμοκήπια μέχρι και σήμερα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κηπευτικών και ένα μικρό μόνο ποσοστό για την παραγωγή ανθοκομικών προϊόντων (ΕΣΥΕ, 1999-2008).

1.2 Καταγωγή – Εξάπλωση - Ιστορικά Στοιχεία μαρουλιού

Το καλλιεργούμενο μαρούλι (*Lactuca sativa L.*), θεωρείται ότι προήλθε από το άγριο μαρούλι *Lactuca serriola* ή *scariola L.*, το οποίο συναντάται ως ζιζάνιο σε πολλές περιοχές της Ευρώπης. Άλλες πληροφορίες, αναφέρουν ότι μπορεί να προήλθε κατόπιν διασταυρώσεων με τα άγρια είδη *L.saligna* και *L. virosa*.

Το μαρούλι, θεωρείται ότι καλλιεργείται από τα Ρωμαϊκά χρόνια. Αναφέρεται ότι οι Πέρσες το καλλιεργούσαν τον 6^ο αι. π.Χ. Ήταν ένα γνωστό λαχανικό στην αρχαία Αίγυπτο (4.500 π.Χ.), στην Κίνα (900 μ.Χ.), αλλά και στην αρχαία Ελλάδα. Η προέλευσή του, είναι η Ασία και κάποιες χώρες της Μεσογείου. Σύμφωνα με τον Ηρόδοτο, το Θεόφραστο και τον Διοσκουρίδη, το μαρούλι καλούνταν ‘Θριδακίνη’, ή ‘Θριδάξ’, ενώ οι Κύπριοι το ονόμαζαν ‘Βρένθις’. Στην Αγγλία, αναφέρεται για πρώτη φορά το 1543. Το σημερινό όνομά του, οφείλεται στην λατινική λέξη ‘*amarula*’ (Ολυμπίου, 2001).

Η ταξινόμηση του μαρουλιού αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Ταξινόμηση

Οικογένεια	<i>Compositae</i> (Σύνθετα)
Υποδιαίρεση	<i>Liguliflorae</i>
Γένος	<i>Lactuca</i>
Είδος	<i>Sativa L.</i>

1.3 Κατηγορίες

Τα μαρούλια που καλλιεργούνται σήμερα, ανάλογα με τη μορφή που έχουν, τη διάταξη των φύλλων τους, καθώς επίσης την παρουσία ή απουσία κεφαλής, διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

I. Κως ή Ρωμάνα (*Cos* ή *Romaine*)

Lactuca sativa var. romana D.C

Φυτό σχετικά ψηλό, με λεπτή μικρή κεφαλή στο εσωτερικό του και λεπτά μακριά φύλλα στο εξωτερικό του. Το χρώμα του συνήθως, είναι σκούρο πράσινο. Προτιμάται στην Ελλάδα, τη Μέση Ανατολή και τη Β. Αφρική (Εικ. 1).



Εικόνα 1: Κως ή Ρωμάνα (*Cos* ή *Romaine*)

(Πηγές: <http://seedcount.com/lettuce-babycos-p-186.html>;

<http://www.perfection.com.au/produce/vegetables/leafy-greens/lettuce-cos.aspx>)

II. Κεφαλωτό, Λείο (*Butterhead*)

Lactuca sativa var. capitata D.C.

Φυτό με σφαιρική περίπου κεφαλή. Τα φύλλα, είναι μαλακά και το χρώμα τους ποικίλλει από ανοιχτό ως σκούρο πράσινο. Είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος μαρουλιού, στην Κεντρική και Βόρεια Ευρώπη (Εικ. 2).



Εικόνα 2: Κεφαλωτό, Λείο (*Butterhead*)

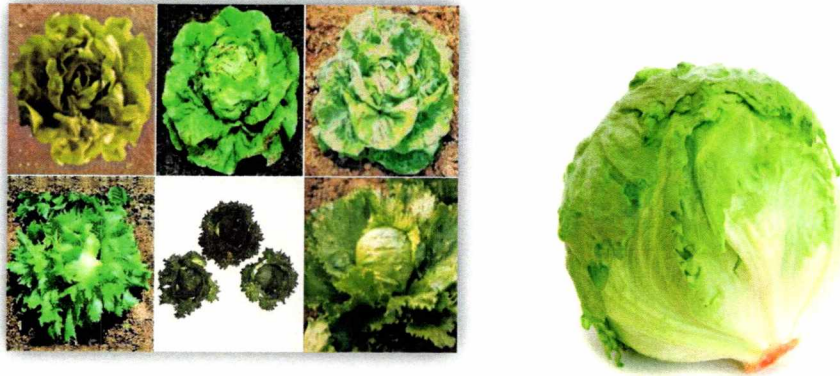
(Πηγές: <http://gothamgreens.com/our-produce/baby-butterhead-lettuce>;

http://www.rijkzwaan.nl/wps/wcm/connect/RZ+corporate/Rijk+Zwaan/Products_and_Services/Products/Crops/Lettuce)

a. Κατσαρό, κεφαλωτό (*Crisphead, Iceberg ή Curly*)

Lactuca sativa var. capitata D.C.

Το φυτό, σχηματίζει σφαιρική περίπου κεφαλή, τα φύλλα είναι κυματοειδή (σγουρά) τραγανά και εύθραυστα. Το χρώμα, ποικίλλει από ελαφρύ μέχρι βαθύτερο πράσινο. Είναι ο τύπος που καλλιεργείται κυρίως στις ΗΠΑ και τον Καναδά (Εικ. 3).



Εικόνα 3: Τύποι κατσαρού, κεφαλωτού (Crisphead, Iceberg ή Curly)
(Πηγές: <http://xoomer.virgilio.it/giuseppefiume/Introduction.html>;
<http://www.buyfruit.com.au/iceberg-lettuce>)

b. Χαλαρό ανοικτό φύλλωμα (*Looseleaf*)

Τα φυτά, αναπτύσσουν τα φύλλα τους ελεύθερα. Δε σχηματίζουν κεφάλι. Είναι κυματοειδή-κατσαρά και το χρώμα τους ποικίλλει στις διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και πολλές φορές, τα εξωτερικά κυρίως φύλλα, φέρουν απόχρωση κοκκινωπή (Εικ. 4).



Εικόνα 4: Μαρούλι με χαλαρό ανοικτό φύλλωμα (*Looseleaf*)
(Πηγή: http://www.ufseeds.com/Lettuce_084a6000320754bf0a14a1d7.html)

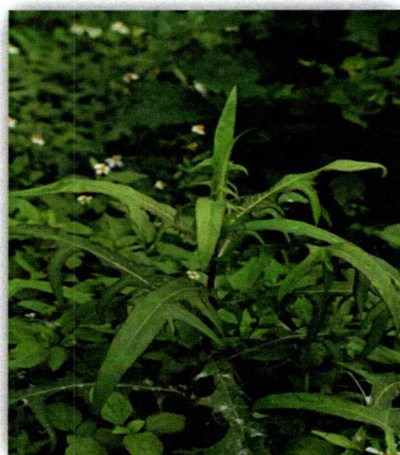
Υπάρχουν και μερικοί άλλοι τύποι μαρουλιού, όπως το κινέζικο (*Celtuce*) *Lactuca sativa* var. *angustana*, το οποίο καλλιεργείται στην Κίνα και στην *Taiwan*, τόσο για το σαρκώδες στέλεχος του (*stem-lettuce*), το οποίο χρησιμοποιείται νωπό ή μαγειρεμένο, όσο και για τα τρυφερά του φύλλα (Εικ. 5).



Εικόνα 5: Κινέζικο μαρούλι

(Πηγή: http://pinova.hr/hr_HR/baza-znanja/povrcarstvo/salata/morfoloska-svojstva-salate)

Το ινδικό μαρούλι (*Lactuca indica* L.) ενδημεί στην Κίνα, είναι πολυετές και καλλιεργείται για τα σαρκώδη φύλλα του (Εικ. 6), τα οποία χρησιμοποιούνται νωπά ή μαγειρεμένα (Ολυμπίου, 2001).



Εικόνα 6: Ινδικό μαρούλι

(Πηγή: <http://www.flickr.com/photos/30372914@N03/3896206200/in/photostream/>)

1.4 Μορφολογικά Χαρακτηριστικά

Το μαρούλι, είναι ετήσιο, ποώδες φυτό. Η ρίζα του είναι πασσαλώδης και φτάνει από 30-60cm, με επιφανειακές και πλευρικές απολήξεις. Τα φύλλα του μαρουλιού, εκπύσσονται από τον κοντό βλαστό, χρώματος ανοιχτού πράσινου ως σκούρου πράσινου. Είναι λεία και τα χαρακτηριστικά τους (μέγεθος, χρώμα, σχήμα), εξαρτώνται από τον τύπο του μαρουλιού και από την ηλικία του φυτού (Ολυμπίου, 2001).

1.5 Χρήσεις

Το μαρούλι, καταναλώνεται νωπό σε σαλάτες, αλλά και μαγειρεμένο. Ακόμη, από τον ανθοφόρο βλαστό παράγεται η ‘θριδακία’, που χρησιμοποιείται στην σαπωνοποιία, για την παραγωγή του σαπουνιού. Μια άλλη χρήση του, προέρχεται από το γαλακτώδη χυμό του, (όπως κι από τα υπόλοιπα φυτά της οικογένειας *Compositae*), ο οποίος αναφέρεται ότι έχει φαρμακευτική δράση, με ναρκωτικές και παυσίπονες ιδιότητες (Ολυμπίου, 2001).

1.6 Θρεπτική αξία μαρουλιού

Η θρεπτική αξία του μαρουλιού φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2: Η μέση σύσταση 100 g φρέσκων φύλλων μαρουλιού για τους τύπους Cos ή Romaine, Iceberg ή Crisphead, Butterhead.

Θρεπτική αξία		Τύπος Cos ή Romaine	Τύπος Iceberg ή Crisphead	Τύπος Butterhead
Βιταμίνες	Νερό	95%	96%	96 %
	Υδατάνθρακες	3.3 g (1%)	3 g (1%)	2.2 g (1%)
	Πρωτεΐνες	1.2 g (2%)	0.9 g (3%)	1.3 g (3%)
	Φυτικά έλαια	0.3 g	0.1 g	0.2 g
	Βιταμίνη A	5808 IU	502 IU	3312 IU
	Βιταμίνη C	24mg	2.8 mg	3.7 mg
	Βιταμίνη E	0.1 mg	0.2 mg	0.2 mg
Άλατα	Βιταμίνη K	103 mg	24.1 mg	102 mg
	Ασβέστιο (Ca)	33 mg	18 mg	35 mg
	Σίδηρος (Fe)	1mg	0.4 mg	1.2 mg
	Μαγνήσιο (Mg)	14 mg	7 mg	13 mg
	Φώσφορος (P)	30 mg	20 mg	33 mg
	Κάλιο (K)	247 mg	141 mg	238 mg
	Νάτριο (Na)	8 mg	10 mg	5 mg
	Ψευδάργυρος (Zn)	0.2 mg	0.2 mg	0.2 mg
	Χαλκός (Cu)	0 mg	0 mg	0 mg
	Μαγγάνιο (Mn)	0.2 mg	0.1 mg	0.2 mg

(Πηγή: Θανόπουλος, 2008)

2. Η ασθένεια της τεφράς σήψης

Ο *Botrytis cinerea*, είναι ένας φυτοπαθογόνος μύκητας, με μεγάλη οικονομική σημασία, που προκαλεί την ασθένεια γνωστή και ως **βοτρώτης**, ή **τεφρά σήψη**, ή **σταχτιά σήψη** (*Gray mold, Grey mould*). Η ασθένεια αυτή, έχει παγκόσμια εξάπλωση και προξενεί τόσο ποσοτικές, όσο και ποιοτικές ζημιές, που οδηγούν σε σοβαρές απώλειες στην παραγωγή (Elad et al., 1996; Pappas, 1997). Η ζημιά βέβαια, εξαρτάται από τον ξενιστή, τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν μετά τη μόλυνση, καθώς και την ένταση της μόλυνσης (Παππάς, 1992). Αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα σε φυτώρια παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού, σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες λαχανικών και καλλωπιστικών φυτών, σε αμπελώνες, καθώς επίσης και μετασυλλεκτικά σε καρπούς οπωροφόρων κατά την αποθήκευσή τους ή κατά τη μεταφορά τους στις αγορές (Rosslenbroich & Stuebler, 2000; Elad et al., 2007; Pappas, 2000). Στη χώρα μας όμως, ο *Botrytis cinerea* είναι ιδιαίτερα επικίνδυνος σε καλλιέργειες θερμοκηπίου, κατά τη χειμερινή περίοδο, όπου δημιουργούνται ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας, λόγω της γρήγορης εξάπλωσής του και της δυσκολίας στην αντιμετώπισή του (Pappas, 1997). Στον αγρό, η ασθένεια κάνει την εμφάνισή της, συνήθως μετά από βροχή, ή δροσιά τις πρωινές ώρες, ή ακόμη μετά από ομίχλη σε προϊόντα που προορίζονται για συγκομιδή.

Κάθε χρόνο, οι θερμοκηπιακές καλλιέργειες μαρουλιού αντιμετωπίζουν σοβαρότατα προβλήματα από το βοτρώτη, με αποτέλεσμα τη μεγάλη ποσοτική ζημιά. Σε υδροπονικές καλλιέργειες μαρουλιών, η ασθένεια εκδηλώνεται κυρίως με την μορφή καστανέρυθρης μαλακής σήψης στην περιοχή του λαιμού των φυτών (Εικ. 7). Για να αναπτυχθεί η ασθένεια, απαραίτητη είναι η ύπαρξη υψηλής σχετικής υγρασίας (>90%) από βροχοπτώσεις ή κακό αερισμό και σχετικά χαμηλής θερμοκρασίας. Η τεφρά σήψη, μπορεί να αναπτυχθεί σε εύρος θερμοκρασιών (1 έως 30°C) με άριστη θερμοκρασία τους 18 έως 23°C.



Εικόνα 7: Ποικιλία μαρουλιού Penelope RZ, η οποία έχει προσβληθεί από τον *Botrytis cinerea*. (Πηγή: Μαρούλι από το θερμοκήπιο Crocus Flora ΑΕ, 2010)

2.1 Ξενιστές - Προσβολή

Ο βοτρώτης, είναι εξαιρετικά πολυφάγος και προσβάλλει μεγάλο πλήθος φυτών, χωρίς όμως να εμφανίζει εξειδίκευση σε ορισμένο ξενιστή. Προσβάλλει τα περισσότερα από τα καλλιεργούμενα φυτά και κυρίως τα κηπευτικά (μαρούλι, τομάτα, κρεμμύδι, καρότο, φασόλι, μελιτζάνα, πιπεριά, σέλινο, τεύτλα, λάχανο κ.α.). Βέβαια, προβλήματα επιφέρει και στα καλλωπιστικά (γαρύφαλλο, τριαντάφυλλο, αζαλέα, χρυσάνθεμο κ.α.), καθώς επίσης στα αμπέλια και στα καρποφόρα δέντρα (Rigotti et al., 2006). Ακόμη, το παθογόνο αυτό, έχει την ικανότητα να προκαλεί μετασυλλεκτικές σήψεις στα συγκομιζόμενα προϊόντα κατά τη μεταφορά και αποθήκευσή τους (Παναγόπουλος, 2000).

Ο Mac Farland (1968), απαρίθμησε 235 είδη ξενιστών του *B. cinerea* που ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες (Jarvis, 1977; Παππάς, 1992). Ο βοτρώτης, αναφέρεται και ως παθογόνο εύκρατων περιοχών. Παρόλα αυτά, το παθογόνο αυτό κάνει την εμφάνισή του και στις τροπικές, υποτροπικές αλλά και ψυχρές περιοχές όταν υπάρχουν οι ξενιστές του. Αξίζει να σημειωθεί ότι έχει καταγραφεί η εμφάνιση του μύκητα και στην Αλάσκα. Αντίστοιχα οι Yunis και Elad (1989), μελέτησαν το βοτρώτη κατά την περίοδο του καλοκαιριού στο Ισραήλ.

Στα θερμοκήπια, ο *B. cinerea* εισέρχεται από τα ανοιχτά παράθυρα και γενικά από τα σπασμένα μέρη. Επίσης, μπορεί να μεταφερθεί μέσω των ανθρώπων και των

εργαλείων του. Μέσα στο θερμοκήπιο, τα προσβεβλημένα φυτά, αποτελούν πηγή μολύσματος. Τα μεγαλύτερα φυτικά μέρη γενικά, είναι πιο ευπαθή από τα μικρότερα.

Η τεφρά σήψη, προσβάλλει φυτά όλων των ηλικιών και όλα τα υπέργεια μέρη τους (στελέχη, φύλλα, άνθη), καθώς επίσης και τους καρπούς και λοβούς, στους οποίους προκαλεί τόσο προσυλλεκτικές όσο και μετασυλλεκτικές σήψεις. Προσβάλλει ακόμη τους σπόρους και τα νεαρά φυτάρια και είναι επικίνδυνος σε οποιοδήποτε στάδιο ανάπτυξης του φυτού (Agrios, 2005). Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι καλλιέργειες και τα φυτικά μέρη που προσβάλλει ο *B. cinerea*.

Πίνακας 3: Φυτά και αντίστοιχα φυτικά μέρη που προσβάλλει ο *B. cinerea*

Κηλίδωση/μάρανση Φύλλων	Νέκρωση/μάρανση βλαστού	Μάρανση ανθέων	Σήψη καρπών/βολβών	
Αντίδι	Τουλίπα	Ανεμόνα	Βιολέτα	Αμπέλι
Παντζάρι	Μπιγκόνια	Γεράνι	Γλυκομπίζελο	Βατόμουρο
Κολοκυνθοει δή	Μυρτιά	Καλέντουλα	Ζέρμπερα	Κολοκυνθοειδή
Πατάτα	Ορτανσία	Μυρτιά	Κατιφές	Κρεμμύδι
Γογγύλι	Γαριφαλιά	Πεονία	Ντάλια	Μελιτζάνα
Μελιτζάνα	Πανσές	Τουλίπα	Τριανταφυλλιά	Πιπεριά
Πιπεριά	Βιολέτα	Τριανταφυλλιά	Χρυσάνθεμο	Μήλοειδη
Ραδίκι	Γεράνι	Φούξια	Τουλίπα	Μπανάνα
Κρεμμύδι	Πεονία	Χρυσάνθεμο	Πετούνια	Τομάτα
Σταυρανθή	Κρασιά	Σκυλάκι	Γεράνι	Πυρηνόκαρπα
Λάχανο		Σπαράγγι	Γλαδίολος	Τουλίπα
Τομάτα		Τομάτα	Ηλίανθος	Τουλίπα
Μαρούλι			Κρασιά	Φασόλι
				Φράουλα

(Πηγή: Agrios, 2005)

2.2 Συμπτωματολογία

Τα συμπτώματα που προκαλεί, είναι διαφόρων τύπων και γίνονται ορατά 7-8 ημέρες μετά τη μόλυνση, η οποία ευνοείται από υψηλή σχετική υγρασία ($\Sigma.Y > 91^\circ C$ και θερμοκρασίες $9-24^\circ C$ (Agiros, 2005).

Τα **φυλλώδη λαχανικά** (μαρούλι, αγκινάρα, τεύτλα κ.α.), προσβάλλονται σε όλα τα στάδια ανάπτυξής τους. Οι πρώτες προσβολές, εμφανίζονται συνήθως στο λαιμό των νεαρών φυταρίων του σπορείου. Συγκεκριμένα, στο μαρούλι, η προσβολή εκδηλώνεται με μια καστανή σήψη του λαιμού και των φύλλων της βάσεως, που στη συνέχεια εξελίσσεται σε μαλακή σήψη ολόκληρης της κεφαλής. Οι ιστοί, νεκρώνονται και καλύπτονται από τη χαρακτηριστική πυκνή εξάνθηση του μύκητα. Τελικά, τα μολυσμένα φυτά μαραίνονται και ξηραίνονται (Εικ. 8). Αμέσως μετά τη μεταφύτευση, τα συμπτώματα που παρατηρούνται στα νεαρά φυτά, είναι παρόμοια με αυτά του σπορείου (Παναγόπουλος, 2000).



Εικόνα 8: Καστανή σήψη λαιμού και φύλλων βάσεως μαρουλιού από τον *Botrytis cinerea*
(Πηγή: <http://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=5177>)

Στους υδαρείς ιστούς και στους τρυφερούς βλαστούς (τομάτα, πιπεριά, μελιτζάνα), η περιοχή της προσβολής αποκτά αρχικά, πράσινο χρώμα και τελικά, μετατρέπεται σε καστανό. Σ' αυτή την περίπτωση, οι ιστοί που βρίσκονται κάτω από την επιδερμίδα, γίνονται υδατώδεις, αλλά η επιδερμίδα δε σχίζεται. Στην τομάτα, οι προσβολές, ξεκινούν από το σπορείο. Μετά τη μεταφύτευση, τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται στο **λαιμό** των νεαρών φυτών. Στη συνέχεια, οι ιστοί γίνονται υδαρείς και τελικά, λόγω αφυδάτωσης παρατηρείται στένωση και καστανός μεταχρωματισμός της προσβεβλημένης περιοχής. Στα **φύλλα**, η προσβολή αρχικά, έχει τη μορφή πρασινοκάστανων κηλίδων με διάχυτα όρια σαν καψίματα, οι οποίες μεγαλώνουν γρήγορα και τελικά, καλύπτουν ολόκληρο το έλασμα (Εικ. 9). Οι ιστοί των φύλλων

μαλακώνουν, σαπίζουν και κρέμονται. Συχνά η κηλίδα καλύπτεται από την εξάνθηση του μύκητα.



Εικόνα 9: Κηλίδες σε φύλλα τομάτας
(Πηγή: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2006/botrytis/>)

Από τα φύλλα, μέσω του μίσχου, η μόλυνση εξαπλώνεται και φτάνει στο **στελέχος**, όπου και δημιουργείται έλκος. Κάποιες φορές όμως, η προσβολή του στελέχους μπορεί να επιτευχθεί από πληγές κλαδέματος, ή δεσίματος, στις οποίες διεισδύουν είτε οι υφές του μύκητα, είτε τα κονίδια στα αγγεία του ξύλου, όταν η αγγειακή πίεση είναι μικρότερη της ατμοσφαιρικής (Wilson, 1966). Μάλιστα όσο μεγαλύτερο είναι το κομμάτι του μίσχου που μένει στο κλάδεμα και όσο πιο ανώμαλη είναι η τομή, τόσο ευκολότερη είναι η προσβολή του από το μύκητα. Αν το έλκος καλύψει μέρος του στελέχους, τότε εκείνη η περιοχή μαραίνεται και τελικά ξηραίνεται (Εικ. 10).

Οι βλαστοί νεαρών φυτών τομάτας, έχουν υψηλή ανθεκτικότητα στις προσβολές του μύκητα, ενώ με την αύξηση της ηλικίας γίνονται όλο και πιο ευπαθείς στην ασθένεια. Η ανθεκτικότητα αυτή, οφείλεται στον περιορισμό της ανάπτυξης του μυκηλίου, λόγω μεγάλης κατανάλωσης θρεπτικών στοιχείων από τους ιστούς, αφού η αύξηση τους είναι ταχεία. Η μετάβαση από την ανθεκτική στην ευπαθή φάση, επιταχύνεται από πολλούς παράγοντες, όπως η υψηλή εδαφική υγρασία και ο περιορισμός της ανάπτυξης των ριζών (Wilson, 1966).



Εικόνα 10: Εξάπλωση προσβολής σε βλαστό τομάτας και δημιουργία έλκους
(Πηγές: <http://www.greenhousecanada.com/content/view/2625/38/>;
<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1234129>)

Τα **άνθη** λόγω του ότι είναι ανοιχτά, προσβάλλονται πολύ εύκολα από την τεφρά σήψη. Πρώτα προσβάλλονται τα πέταλα και πολύ σύντομα ολόκληρο το άνθος, το οποίο αποκτά κάστανο χρώμα και νεκρώνεται (Εικ. 11). Τα νεκρά άνθη συχνά αποικίζονται από σαπρόφυτα του γένους *Penicillium* spp. (Παναγόπουλος, 2000). Σε θερμαινόμενα θερμοκήπια, η μόλυνση ενός άνθους σιγά-σιγά επεκτείνεται και στα υπόλοιπα μέρη της ταξιανθίας και μέσω αυτής στον κεντρικό βλαστό του φυτού (Elad & Yunis, 1993). Σε μη θερμαινόμενα θερμοκήπια, οι προσβολές από τον *Botrytis cinerea* είναι πολύ έντονες κατά την περίοδο του χειμώνα (Pappas, 1997). Η γύρη, μπορεί να δράσει ως διεγερτικό της βλάστησης των κονιδίων, ή να αυξήσει τη μολυσματικότητα του παθογόνου (Παναγόπουλος, 2000).



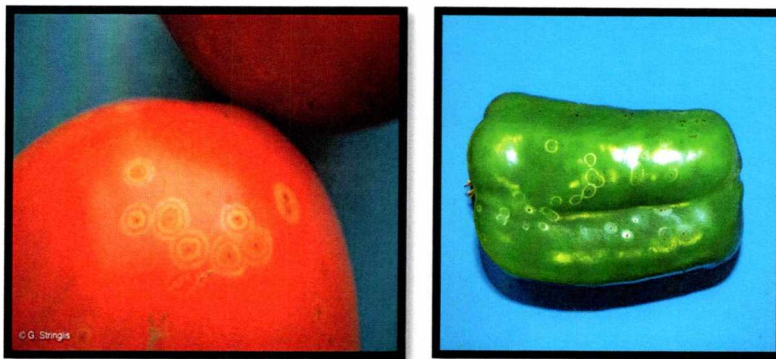
Εικόνα 11: Προσβεβλημένα φύλλα από το μύκητα *B. cinerea*
(Πηγή: <http://www.abgenternasyonel.com/ilac.php?dilkod=EN&ilacid=27&kat=bestnate-50-ec>)

Το παθογόνο, προσβάλλει τους **καρπούς** μέσω των σεπάλων, οι οποίοι γίνονται μαλακοί και υδαρείς, γεμάτοι από τις καρποφορίες του μύκητα (Εικ. 12). Πολύ συχνά βέβαια, η προσβολή μπορεί να αρχίσει από το σημείο επαφής δυο καρπών, ενώ σπανιότερα από πληγές της επιδερμίδας του καρπού. Πάνω στους καρπούς, είτε και μέσα σ' αυτούς, υπάρχει περίπτωση να σχηματιστούν και τα σκληρώτια του παθογόνου. Στην πιπεριά, η μόλυνση συνήθως, γίνεται από πληγές, οι οποίες έχουν δημιουργηθεί κατά τη συγκομιδή, ή κατά την αποκοπή φύλλων (Παναγόπουλος, 2000).



Εικόνα 12: Καρποφορίες του παθογόνου κόκκινης πιπεριάς (αριστερά), τομάτας (κέντρο) και μελιτζάνας (δεξιά)
(Πηγές: http://gardener.wikia.com/wiki/File:Sweet_pepper_Grey_mould_Botrytis_cinerea.jpg;
<http://gardener.wikia.com/wiki/Botryotinia>;
<http://www.giantsakiplants.gr/Fyta/Asth-Extr-Trof/Astheneies/AsthenMelitzanasNew.php>)

Ένα άλλο χαρακτηριστικό σύμπτωμα του βοτρυτή σε καρπούς είναι οι μικρές, στρογγυλές κηλίδες με νεκρωτικό στίγμα στο κέντρο, οι οποίες καλούνται κηλίδες «φάντασμα» ή αλλιώς ‘ghost spots’ (Παππάς, 1992). Το σύμπτωμα αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μετά τη βλάστηση του κονιδίου στην επιφάνεια του καρπού και την είσοδο του βλαστικού σωλήνα εντός, ακολουθεί θάνατος του μυκηλίου (Εικ. 13). Αυτό συμβαίνει όταν μετά από υγρές και ψυχρές συνθήκες, ακολουθήσει ζεστός και ηλιόλουστος καιρός (Macnab & Sherf, 1986). Ποτέ όμως, αυτές οι κηλίδες δεν μπορούν να προκαλέσουν σήψη ιστών, παρά μόνο υποβάθμιση της ποιότητας των καρπών (Παναγόπουλος, 2000).



Εικόνα 13: Κηλίδες «φάντασμα» σε καρπό τομάτας και πιπεριάς
(Πηγές: http://efe.aua.gr/gallery_fungal.php;
<http://www.pestnet.org/SummariesofMessages/Crops/Vegetables/Capsicumchilli/Ghostspots,Botrytis cinerea,Argentina.aspx>)

Ο βοτρυτής, έχει την ικανότητα να προσβάλλει το κρεμμύδι, το πράσο και τα υπόλοιπα **βολβώδη λαχανικά** στον αγρό, αλλά και μετά τη συγκομιδή τους κατά τη διακίνηση και αποθήκευσή τους. Το χαρακτηριστικό σύμπτωμα του *B. cinerea* στα βολβώδη λαχανικά είναι μια απλή κηλιδωση του φύλλου, χωρίς όμως το παθογόνο να εγκατασταθεί στους ιστούς. Η προσβολή όμως, μπορεί να επεκταθεί και στους βολβούς υπό μορφή μαλακής σήψης, όπου και συχνά εμφανίζονται τα σκληρώτια του μύκητα (Εικ. 14).



Εικόνα 14: Σκληρώτια σε κρεμμύδι
(Πηγή: <http://pnwhandbooks.org/plantdisease/onion-allium-cepa-botrytis-leaf-blight>)

Η τεφρά σήψη, προσβάλλει και τα **ψυχανθή**, δημιουργώντας προβλήματα κυρίως στα υπέργεια μέρη (άνθη, φύλλα, μίσχους, λοβούς, στελέχη), όταν οι θερμοκρασίες κυμαίνονται από 15 ως 25°C και η σχετική υγρασία είναι υψηλή. Σε ευνοϊκές συνθήκες, η απώλεια παραγωγής μπορεί να ξεπεράσει το 50%. Το χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι η τεφρά εξάνθηση από τις καρποφορίες του μύκητα, πάνω στους προσβεβλημένους ιστούς. Η ασθένεια, προκαλεί και μετασυλλεκτικές σήψεις στους λοβούς φασολιού (Εικ. 15). Οι παραγωγοί της Ν. Ασίας, αντιμετωπίζουν σοβαρό πρόβλημα στις καλλιέργειες ρεβιθιών, όπου προκαλείται σήψη σε φύλλα, στελέχη και λοβούς, τα οποία καλύπτονται από την τεφρή εξάνθηση του παθογόνου (Haware, 1998). Σοβαρές ζημιές έχουν καταγραφεί και σε καλλιέργειες φακής στην Ινδία, το Μαρόκο, τη Συρία και την Αυστραλία (Morrall et al., 1994; Παναγόπουλος, 2000).



Εικόνα 15: Τεφρά εξάνθηση από τις καρποφορίες του μύκητα σε λοβούς φασιολιού (Πηγές: <http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5358905>; <http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5360610>)

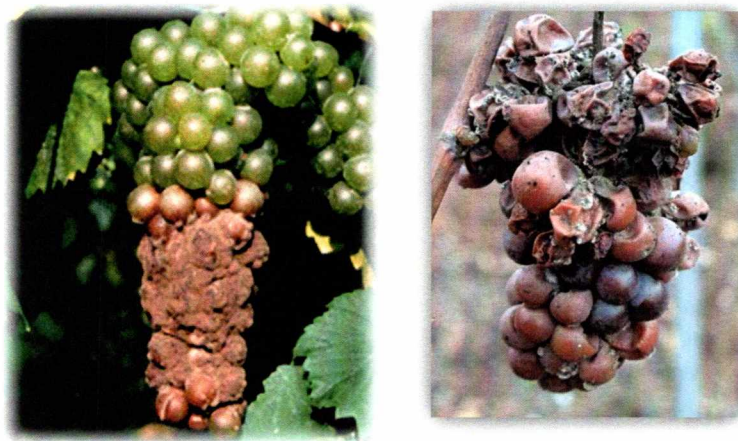
Σημαντικές ζημιές παγκοσμίως, παρατηρούνται και στις **φράουλες** με μεγάλες απώλειες στην παραγωγή (Εικ. 16). Η μόλυνση, συνήθως ξεκινάει από τα άνθη και τελικά, η ανάπτυξη του μύκητα γίνεται εντός των αναπτυσσόμενων καρπών. Η σήψη τους, μπορεί να επέλθει είτε πριν, ή μετά τη συγκομιδή (Παππάς & Jordan, 1997; Παναγόπουλος, 2000; Boff et al., 2001; Rigotti et al., 2002).

Μολύνσεις διαπιστώνονται και στα τεύτλα με προσβολές κυρίως στις ταξιανθίες κατά την περίοδο της άνθησης μέχρι την ωρίμανση.



Εικόνα 16: Εξέλιξη τεφρά σήψης σε φράουλες σε διάστημα 5 ημερών (αριστερά) και Χαρακτηριστική εμφάνιση των καρποφοριών του *Botrytis cinerea* σε φράουλες (δεξιά) (Πηγές: http://bioref.lastdragon.org/anamorphic_fungi/Botrytis_cinerea.html; <http://www.missouribotanicalgarden.org/gardens-gardening/your-garden/help-for-the-home-gardener/advice-tips-resources/pests-and-problems/diseases/fruit-spots/gray-mold-of-strawberry.aspx>)

Ο *B. cinerea*, είναι από τους πιο σημαντικούς φυτοπαθογόνους μύκητες και της **αμπέλου**, παγκοσμίως. Η βοτρυτίδα, όπως αλλιώς λέγεται, επιφέρει μεγάλες απώλειες στην παραγωγή, που κυμαίνεται από 10-50%. Στην Ελλάδα, το πρόβλημα γίνεται εντονότερο, όταν οι βροχές κατά τη φθινοπωρινή περίοδο είναι συχνές. Έτσι, τα σταφύλια που πλησιάζουν την ωρίμανση, εκείνη την περίοδο, μπορεί να υποστούν μεγάλες ζημιές. Αρχικά, παρατηρείται μια καστανή κηλίδα πάνω στις ρώγες, η οποία επεκτείνεται κι έτσι, η επιδερμίδα αποκολλάται από τη σάρκα εύκολα. Τελικά, οι περισσότερες ρώγες προσβάλλονται κι έτσι, επέρχεται μαλακή και υδαρής σήψη (Εικ. 17). Οι προσβεβλημένοι ιστοί γίνονται καστανοί και συχνά μουμιοποιούνται. Η υψηλή σχετική υγρασία, είναι υπεύθυνη για την τεφρά εξάνθηση, που αποτελείται από τα κονίδια και τους κονιδιοφόρους του μύκητα. Στις ερυθρές ποικιλίες, η υποβάθμιση είναι τόσο ποσοτική, όσο και ποιοτική, λόγω της παραγωγής οξειδάσης, που είναι υπεύθυνη για την καταστροφή των χρωστικών. Στις λευκές ποικιλίες, μπορεί να παρατηρείται ποσοτική υποβάθμιση του προϊόντος, αλλά παρατηρείται και μια θετική επίδραση στην οινοποίηση, καθώς αυξάνονται οι σακχαρικοί και αλκοολούχοι τίτλοι των σταφυλιών, λόγω αφυδάτωσης και ελάττωσης των οξέων, από το φαινόμενο της “ευγενούς σήψεως” γνωστή ως ‘*noble rot*’ (Παππάς, 1992; Rosslenbroich & Stuebler, 2000).



Εικόνα 17: Μαλακή και υδαρής σήψη σε ρώγες

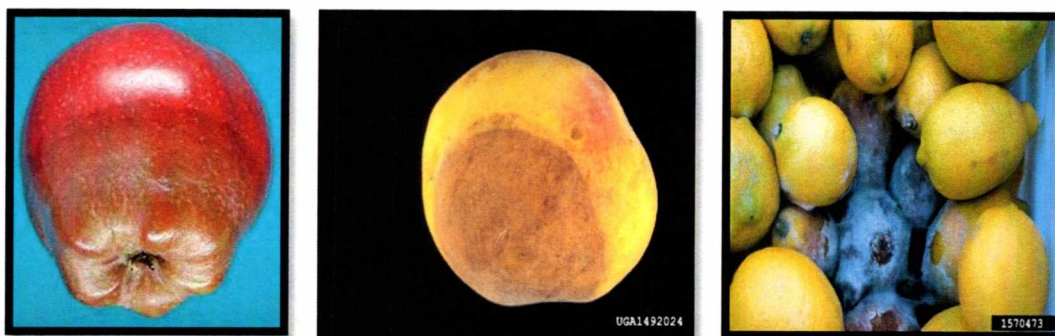
(Πηγές: http://www.endure-network.eu/about_endure/all_the_news/tackling_pesticide_use_in_grapes;
<http://www.enologyinternational.com/fungi/fungi.html>)

Σε ότι αφορά τα **ανθοκομικά φυτά**, ο βοτρυτής εμφανίζεται με τη μορφή καστανών κηλίδων στα υπέργεια μέρη των φυτών. Αυτές οι κηλίδες εξελίσσονται και τελικά, μπορεί να προκαλέσουν έλκη και ξηράνσεις των κλάδων, ιδιαίτερα όταν επικρατούν συνθήκες υψηλής υγρασίας. Στους προσβεβλημένους κλάδους, παρατηρείται η τεφρά εξάνθηση του μύκητα, ενώ συχνά στα πέταλα των ανθέων και κυρίως της τριανταφυλλιάς, εμφανίζονται στίγματα, τα οποία καλούνται “κηλίδες φάντασμα” (Εικ. 18). Αυτές οι κηλίδες όμως, δεν καλύπτονται με τη γκρίζα εξάνθηση. Οι ζημιές αυτές, στα πέταλα των ανθέων, προκαλούν ποιοτική υποβάθμιση, οπότε και μείωση της αγοραστικής τους αξίας, καθώς και της διάρκειας ζωής τους στο ανθοδοχείο, καθότι τα κονίδια που υπάρχουν στα φυτά και οι λανθάνουσες μολύνσεις προκαλούν ορατά συμπτώματα (Dik & Wubben, 2004).



Εικόνα 18: Κηλίδες φάντασμα σε άνθη τριανταφυλλιάς
(Πηγές: http://efe.aua.gr/gallery_fungal.php; <http://landaction.blogspot.gr/>)

Σε υψηλές συνθήκες υγρασίας κατά την άνθηση, προσβάλλονται και τα **καρποφόρα δέντρα** (αχλαδιά, ροδακινιά, κερασιά, δαμασκηνιά, λεμονιά, αμυγδαλιά κ.α.). Η μόλυνση, ξεκινάει από τον κάλυκα ή τον ποδίσκο, όπου και εγκαθίσταται δημιουργώντας καστανή κηλίδα. Η μόλυνση δραστηριοποιείται συνήθως στην αποθήκη και εκδηλώνεται με τη μορφή μαλακής, καστανής σήψης, όπου διαφαίνεται και η γκρίζα εξάνθηση. Κατά την αποθήκευση, η προσβολή επεκτείνεται εύκολα μέσω της επαφής των προσβεβλημένων καρπών με τους υγιείς (Εικ. 19).



Εικόνα 19: Μετασυλλεκτικές σήψεις από βοτρυτή
(Πηγές: <http://www.plantmanagementnetwork.org/elements/view.aspx?ID=4275>;
<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1492024>;
http://agrotismania.blogspot.gr/2013/06/blog-post_553.html)

2.3 Παθογόνο Αίτιο - Ταξινόμηση

Το γένος *Botrytis*, είναι από τα πρώτα γνωστά είδη των παθογόνων μυκήτων και συντάθηκε για πρώτη φορά το 1729 από τον P. A. Micheli (Παππάς, 1992; Rosslenbroich & Stuebler, 2000). Τα είδη και τα στελέχη του *Botrytis*, αναφέρεται ότι χαρακτηρίζονται από μεγάλη γενοτυπική και φαινοτυπική παραλλακτικότητα. Έχει πολλά παθογόνα είδη, μερικά από τα οποία είναι: *B. fabae* (κουκιά), *B. aclada* και *B. squamosa* (κρεμμύδι), *B. tulipae* (τουλίπα). Το πιο διαδεδομένο όμως είδος, που προκαλεί τις σοβαρότερες ασθένειες είναι το *B. cinerea*, εξαιτίας του ευρέος φάσματός του (Jarvis, 1977; Παππάς, 1992).

Ο μύκητας *Botrytis cinerea*, ανήκει στους Hyphomycetes της κλάσης των Αδηλομυκήτων. Η τέλεια μορφή του, καλείται *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. συν. *Sclerotinia fuckeliana* και ανήκει στην τάξη Leotiales και στην οικογένεια Sclerotiniaceae των Δισκομυκήτων. Το γένος *Botryotinia*, κατατάχθηκε στην οικογένεια Sclerotiniaceae, από τον Whetzel το 1945, ο οποίος και τη δημιούργησε, διαχωρίζοντας τα γένη με βάση την ανατομία τους. Η πλήρης ταξινόμηση του μύκητα φαίνεται στους Πίνακες 4 και 5 που ακολουθούν.

Πίνακας 4: Συστηματική κατάταξη της ατελούς μορφής του *B. cinerea*

Βασίλειο	Μύκητες ή Ευμύκητες (Mycota)
Φύλο	Hyphomycetes
Κλάση	Αδηλομύκητες ή Δευτερομύκητες ή Ατελείς μύκητες
Τάξη	Moniliales
Οικογένεια	Moniliaceae
Γένος	<i>Botrytis</i>
Είδος	<i>cinerea</i>

Πίνακας 5: Συστηματική κατάταξη της τέλειας μορφής του *B. cinerea*

Βασίλειο	Μύκητες ή Ευμύκητες (Mycota)
Φύλο	Ασκομύκητες (Ascomycota)
Κλάση	Μυκηλιακοί ασκομύκητες
Υπόκλαση	Δισκομύκητες (Discomycetes)
Τάξη	Leotiales
Οικογένεια	Sclerotiniaceae
Γένος	<i>Botryotinia</i> ή <i>Sclerotinia</i>
Είδος	<i>fuckeliana</i>

Σύμφωνα με το Γεωργόπουλο (1984), όταν είναι γνωστή η εγγενής αναπαραγωγή των παθογόνων, θα πρέπει οι μύκητες να αναφέρονται με την τέλεια μορφή τους και όχι με την ατελή μορφή τους. Υπάρχουν όμως ορισμένοι μύκητες, μεταξύ αυτών και ο *Botrytis cinerea*, που είναι συνηθισμένη η αγενής αναπαραγωγή τους, γιατί συναντάται πιο συχνά στα προσβεβλημένα φυτά. Σ' αυτή την περίπτωση, δύναται να χρησιμοποιείται η ατελής μορφή.

2.4 Επιβίωση

Ο *B. cinerea*, θεωρείται ως ένας νεκροτροφικός φυτοπαθογόνος μύκητας, ο οποίος μετά την προσβολή και το θάνατο του ξενιστή, μπορεί να αναπτυχθεί και να σποριοποιήσει ως σαπρόφυτο στους νεκρούς φυτικούς ιστούς, ή να δημιουργήσει μυκηλιακούς σχηματισμούς μακροχρόνιας επιβίωσης, όπως είναι οι μυκηλιακές υφές, τα χλαμυδοσπόρια και τα σκληρώτια. Αυτές είναι δυνατό να σχηματίζονται σε ζωντανά φυτά, ή σε υπολείμματα φυτικών ιστών, που βρίσκονται στο έδαφος και αποτελούν πηγή μόλυσματος. Ουσιαστικά, κάθε τμήμα του θαλλού μπορεί να λειτουργήσει ως μια μορφή επιβίωσης.

Η επιβίωση του *B. cinerea* επηρεάζεται πάρα πολύ από τη θερμοκρασία και την υγρασία και λιγότερο από τους υπόλοιπους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Στην Κεντρική Ευρώπη, που το κλίμα είναι ψυχρό και υγρό, ο μύκητας είναι ενεργός το καλοκαίρι σε αμπελώνες και το χειμώνα σε θερμαινόμενα θερμοκήπια, αφού περιοριστικός παράγοντας σε αυτές τις συνθήκες είναι οι χαμηλές θερμοκρασίες κυρίως του χειμώνα. Σε περιοχές με Μεσογειακό κλίμα, όπως η χώρα μας, όπου τα καλοκαίρια είναι ξηροθερμικά, ο μύκητας αναπτύσσεται το χειμώνα σε μη θερμαινόμενα θερμοκήπια και το φθινόπωρο σε αμπελώνες (Yunis & Elad, 1989). Σ' αυτές τις συνθήκες, το παθογόνο επιβιώνει σε **φυτικά υπολείμματα** και σε **προσβεβλημένους βλαστούς**, όπου προστατεύεται από τις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και από άλλους μικροοργανισμούς.

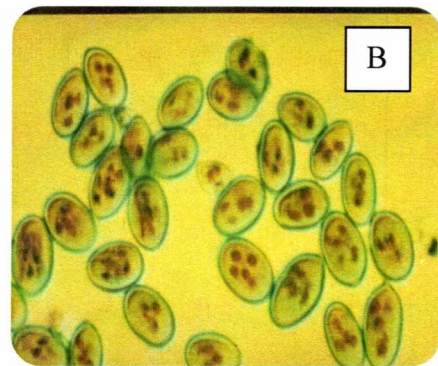
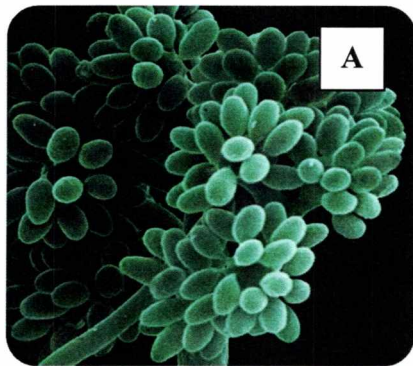
Η επιβίωση του μύκητα εκτός των προσβεβλημένων ιστών ή καρπών και ανθέων είναι αδύνατη, γιατί τα κονίδια βρίσκονται στην επιφάνεια των νεκρών φυτικών ιστών οπότε και είναι εκτεθειμένα στις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η Coley-Smith (1980), διαπίστωσε ότι ακόμη και στις λιγότερο δυσμενείς συνθήκες, τα κονίδια δεν επιζούν για περισσότερες από 53 ημέρες.

Ένας άλλος τρόπος επιβίωσης του παθογόνου κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, είναι η **αλλαγή ξενιστή**. Ο *B. cinerea*, έχει απομονωθεί από διάφορες καλλιέργειες και ζιζάνια, ενώ δεν είναι λίγες οι φορές που εμφανίζεται και σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες τριανταφυλλιάς ή άλλων καλλωπιστικών φυτών.

Βέβαια, σημαντικό ρόλο στην επιβίωση έχουν και τα διάφορα στελέχη του μύκητα, τα οποία παρουσιάζουν διαφορετική ικανότητα επιβίωσης το καλοκαίρι. Αυτό διαπιστώθηκε σε έρευνα των Raposo et al. (2000). Οι εν λόγω ερευνητές διαπίστωσαν ότι το μυκήλιο στελεχών του *B. cinerea*, που ήταν ανθεκτικό στα

δικαρβοξυμιδικά μυκητοκτόνα, επιβιώνε περισσότερο το καλοκαίρι, σε συνθήκες εκτός θερμοκηπίου για 110 ημέρες.

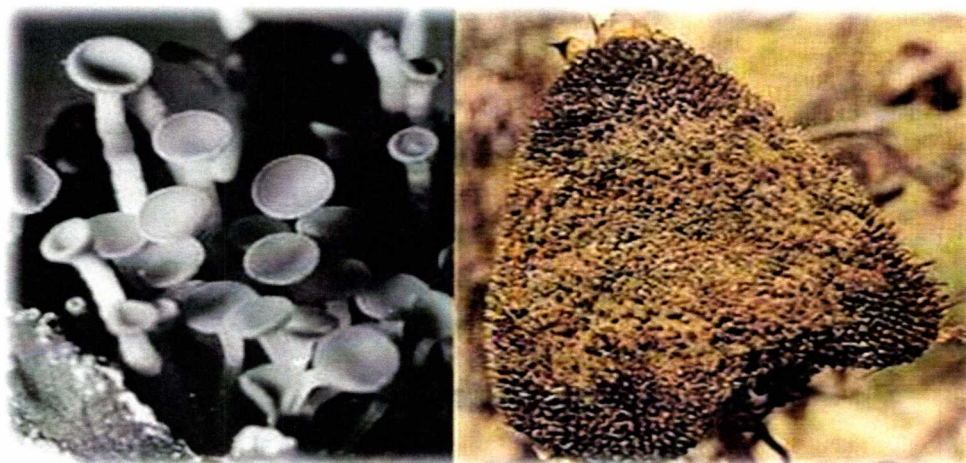
Το **μυκήλιο** του μύκητα όταν είναι νεαρό είναι υαλόχρωμο, ενώ το παλιό είναι γκρίζο και διογκωμένο κοντά στα septa. Οι **κονιδιοφόροι**, συναντώνται σε ομάδες, έχουν χρώμα τεφρό, είναι επιμήκεις και διακλαδίζονται όπως ο βότρυς (Εικ. 20Α). Στην άκρη των διακλαδώσεων σχηματίζονται τα **κονίδια** (Εικ. 22). Έτσι το γένος *Botrytis*, οφείλει το όνομα του στην ελληνική λέξη βότρυς, που υποδηλώνει ότι η καρποφορία του έχει τη διάταξη της ταξιανθίας του σταφυλιού. Τα κονίδια έχουν σχήμα ωοειδές ή σφαιρικό, χρώμα τεφρό ή υαλώδες κι είναι μονοκύτταρα, πολυπύρηννα με διαστάσεις 10x8,5 μm (Εικ. 20B). Όταν οι κονιδιοφόροι ωριμάσουν απελευθερώνουν τα κονίδια με απλό τίναγμα, τα οποία ως ξηροσπόρια που είναι, μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις με τη βοήθεια του ανέμου ή με σταγόνες νερού. Τα κονίδια, θεωρούνται ως βραχύβιες μορφές πολλαπλασιασμού στον αγρό. Η επιβίωσή τους, καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα υγρασίας, τη μικροβιακή δραστηριότητα και την έκθεση στο ηλιακό φως (Holz et al., 2004; Epton & Richmond, 1980; Jarvis, 1980).



Εικόνα 20: **A.** Κονιδιοφόρος ο οποίος φέρει κονίδια του *B. cinerea* – Εικόνα από μικροσκόπιο
B. Κονίδια του μύκητα *B. cinerea*

(Πηγές: <http://www.flickr.com/photos/ajc1/1551444807/>;
http://www.fomesa.net/Calidad/Varietades/Enfermedades/Botrytis_cinerea.htm)

Ο *B. cinerea*, σχηματίζει πάνω ή μέσα στους ιστούς του ξενιστή, τα **σκληρώτια**, τα οποία είναι σκληρά, ανθεκτικά σώματα χρώματος καφέ ή μαύρου και σχήματος στρογγυλού ή ακανόνιστου. Το εσωτερικό τους είναι ανοιχτότερου χρώματος και αποτελείται από πυκνή μάζα υφών του μύκητα. Το μέγεθος τους φτάνει μέχρι τα 6mm. Γενικά, θεωρούνται οι πιο σημαντικοί μυκηλιακοί σχηματισμοί, που εμπλέκονται στην επιβίωση του μύκητα. Τα σκληρώτια, κάτω από ευνοϊκές συνθήκες, βλαστάνουν και δίνουν μυκήλιο ή κονιδιοφόρους (Εικ. 22). Πολύ σπάνια όμως κάτω από ειδικές συνθήκες μπορούν να δώσουν τα αποθήκια (Εικ. 21) που είναι εγγενής καρποφορίες του μύκητα (Beever & Weeds, 2004). Τα **αποθήκια** έχουν χρώμα καστανό και σχήμα κυπέλλου με μίσχο και πλάτος 1,5-3mm.



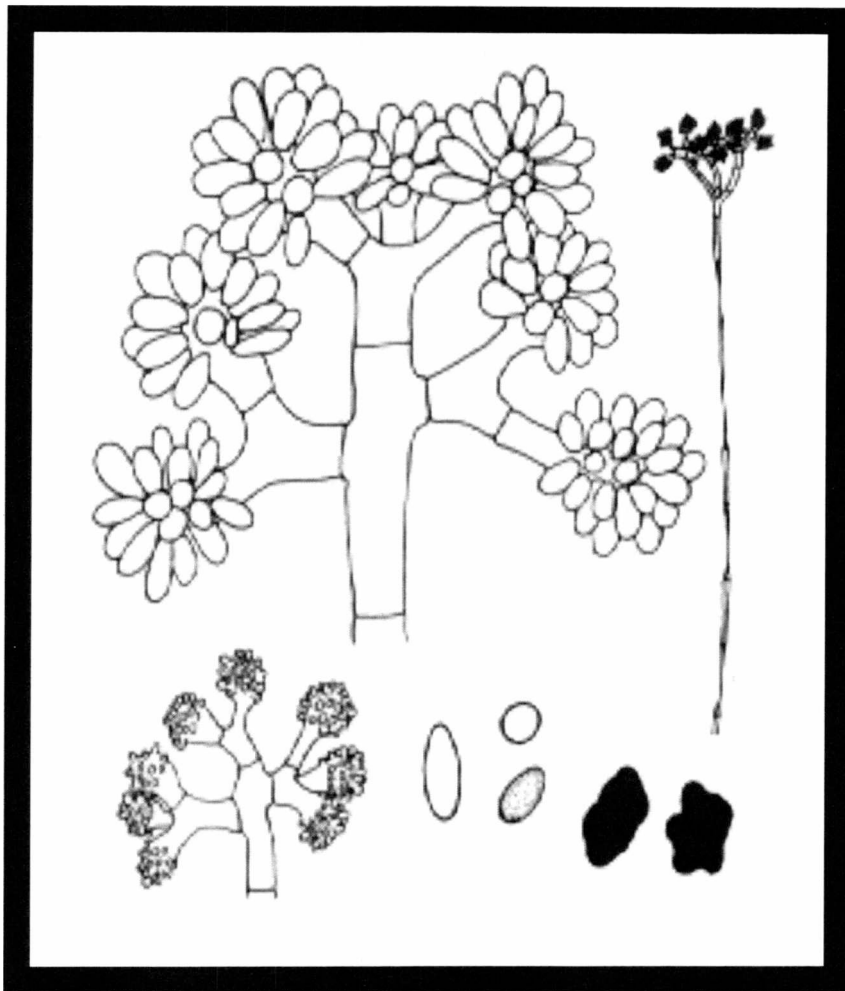
Εικόνα 21: Αποθήκια της τέλειας μορφής του *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*) (αριστερά) και συμπτώματα από προσβολή του παθογόνου σε ηλιάνθο (δεξιά)
(Πηγή: http://www.agroatlas.ru/en/content/diseases/Olee/Olee_Botrytis_cinerea/)

Πάνω στα αποθήκια σχηματίζονται οι **ασκοί**, οι οποίοι είναι κυλινδρικοί έως ωοειδείς, συχνά μαζί με παραφύσεις. Τα **ασκοσπόρια** έχουν σχήμα ωοειδές και ελευθερώνονται βίαια από τους ασκούς.

Μια άλλη κατασκευή επιβίωσης, είναι τα **γλαμυδοσπόρια**. Τα τελευταία σχηματίζονται κατά κανόνα σε γηρασμένες καλλιέργειες, ή σε ήδη μολυσμένες από άλλους μύκητες. Ανάλογα με τις συνθήκες περιβάλλοντος και θρέψης, τα γλαμυδοσπόρια βλαστάνουν και δίνουν μικρο- ή μακρο- κονίδια. Τα **μικρο-κονίδια**, δίνουν μια εναλλακτική μορφή πολλαπλασιασμού του παθογόνου, όταν αυτό βρεθεί σε δυσμενείς συνθήκες (Jarvis, 1980). Τα γλαμυδοσπόρια επομένως, μπορούν να λειτουργήσουν ως μορφές βραχυπρόθεσμης επιβίωσης, οι οποίες ίσως βοηθούν το

μύκητα να ξεπεράσει σύντομες μη- ευνοϊκές περιόδους ανάπτυξης (Holz & Weeds, 2004).

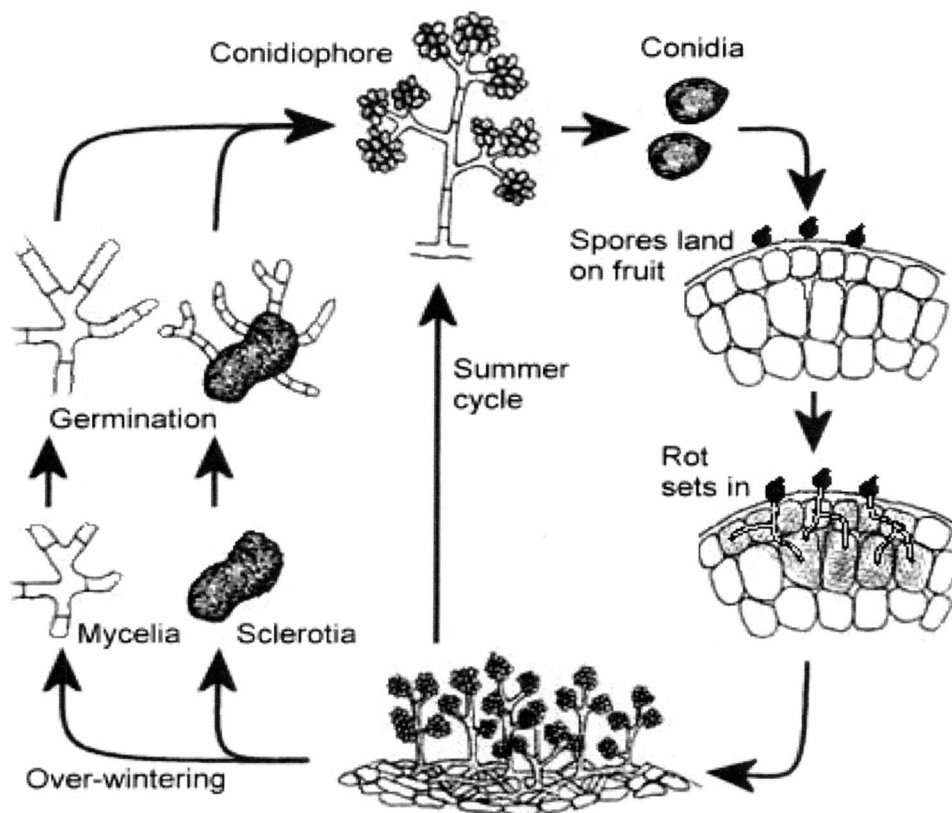
Άλλο όργανο του μύκητα είναι τα **απρεσσόρια**, τα οποία δημιουργούνται καμιά φορά από τα βλαστώνοντα κονίδια, στην επιφάνεια του φυτού ξενιστή, μετά από ερέθισμα κατά την επαφή των κονιδίων με αυτόν. Όταν η επιφάνεια του ξενιστή είναι μαλακή τότε δεν σχηματίζονται απρεσσόρια. Η μορφή τους ποικίλει από διογκωμένες έως διακλαδισμένες άκρες των βλαστικών υφών. Αυτοί οι σχηματισμοί δημιουργούνται από επαναλαμβανόμενη διχοτομική διακλάδωση των άκρων των υφών.



Εικόνα 22: Πάνω και κάτω αριστερά φαίνεται ο κονιδιοφόρος του *B. cinerea*, κάτω δεξιά τα σκληρώτια και στη μέση τα κονίδια
(Πηγή: <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Botrytis.html>)

Ο κύκλος της ασθένειας στη θερμοκρασία των 20 °C διαρκεί 95 ώρες περίπου, δηλαδή τέσσερις μέρες. Από αυτές η βλάστηση των κονιδίων είναι 5 ώρες, η διάρκεια της προσβολής 15 ώρες κι η ανάπτυξη του μυκηλίου και η παραγωγή των σπορίων του μύκητα 75 ώρες.

Τα σπόρια του μύκητα την πρώτη μέρα μετά την παραγωγή τους έχουν βλαστικότητα 100% η οποία σταδιακά μειώνεται για να φτάσει 35 μέρες μετά μόλις το 1% (Παναγόπουλος, 2000).



Εικόνα 23: Βιολογικός κύκλος του μύκητα *B. cinerea*

Conidiophore: κονιδιοφόροι, conidia: κονίδια, germination: βλάστηση, mycelia: μυκήλιο, sclerotia: σκληρώτια, over-wintering: διαχείμαση, spores: σπόρια

(Πηγή: http://szolo.blog.hu/2007/12/14/a_furt_megbetegedesei_botritisz)

2.5 Επιδημιολογία

Τα μολύσματα του *B. cinerea*, θεωρείται γενικά ότι υπάρχουν συνεχώς στο περιβάλλον του αγρού και ότι η παραγωγή, απελευθέρωση και διασπορά του είναι μια συνεχής διαδικασία (Jarvis, 1980).

Σε μελέτες που έχουν γίνει, αναφέρεται ότι τα κονίδια του *B. cinerea*, μπορούν να εξαπλωθούν και από την επιδερμίδα του εξωσκελετού ορισμένων εντόμων, ή από τις τρίχες που φέρουν, ή ακόμη και από άλλα μέρη του σώματός τους. Φορείς του παθογόνου που έχουν καταγραφεί μέχρι σήμερα από τους Fermaud & Le Menn (1989) είναι η ευδεμίδα της αμπέλου (*Lobesia botrana*), ο θρίπας (*Thrips obscuratus*) και η μύγα της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*). Ειδικότερα, η μύγα Μεσογείου, σύμφωνα με έρευνα των Holz et al. (2004), έχει την τάση να τρέφεται σε προσβεβλημένους ιστούς από τον *B. cinerea*. Ένα άλλο πείραμα, έδειξε ότι η *Drosophila melanogaster*, προσλαμβάνει τα κονίδια του μύκητα, τα οποία βλάστανουν στο πρόσθιο έντερο του εντόμου. Το μυκήλιο, διαφοροποιείται σε μικροσκληρώτια, τα οποία μεταφέρονται από τη δροσόφιλα καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής της (Louis et al., 1996).

2.6 Παθογένεση

Ο *B. cinerea*, μπορεί να προσβάλει ένα πολύ μεγάλο εύρος φυτών, χωρίς φαινομενική εξειδίκευση. Οι υγιείς ιστοί, μπορεί να προσβληθούν διαμέσου της επιδερμίδας, λόγω της έκκρισης από το μύκητα εξωκυτταρικών ενζύμων, τα οποία εμπλέκονται στην παθογένεση ή διαμέσου αλλοιωμένων ή νεκρών ιστών, στομάτων, πηλγών και τριχιδίων, που υπάρχουν στις φυτικές επιφάνειες (Manteau et al., 2003).

Οι κουτινάσες, οι λιπάσες και κάποια άλλα ένζυμα, μπορούν να διευκολύνουν τη διείσδυση του παθογόνου. Αντίθετα, οι τοξίνες, οι εστέρες οξαλικού οξέος και διάφορες μορφές οξυγόνου – AOS (OH^\cdot , O_2^\cdot , H_2O_2), μπορούν να οδηγήσουν στο θάνατο του ξενιστή. Ακόμη, διάφορα ένζυμα αποικοδόμησης κυτταρικών τοιχωμάτων, μπορούν να μετατρέψουν τους ιστούς του φυτικού κυττάρου σε βιομάζα του παθογόνου. Τέλος, υπάρχουν και διάφορα άλλα ένζυμα, όπως οι λακκάσες και οι πρωτεάσες, τα οποία φαίνεται να επιδρούν στην παθογένεση.

Η προσβολή από το μύκητα περιλαμβάνει τρεις φάσεις, όπως ακριβώς και στους άλλους μύκητες, τη βλάστηση των κονιδίων, τη διείσδυση και την εγκατάσταση του μύκητα στους ιστούς του ξενιστή (Choquer et al., 2007).

1. Βλάστηση κονιδίων

Τα κονίδια του μύκητα που εναποτίθενται στα σημεία της προσβολής του φυτού είναι δυνατόν να διατηρήσουν τη βλαστικότητα τους για περισσότερες από 12 εβδομάδες (Jarvis, 1989). Για την επιτάχυνση της βλάστησης τους χρειάζονται ένα λεπτό στρώμα νερού, ενώ οι βλαστικές υφές μπορούν να αναπτυχθούν ανεξαρτήτως της σχετικής υγρασίας περιβάλλοντος (Care & Coyier, 1984).

Τα κονίδια, προσκολλώνται στην επιφάνεια του φυτικού ιστού και προσλαμβάνουν υδατοδιαλυτές θρεπτικές ενώσεις, που βρίσκονται πάνω σε αυτήν. Οι ενώσεις αυτές συνήθως, προέρχονται από εκκρίσεις του φυτού ή από εξωτερικές πηγές όπως χημικές επεμβάσεις, γύρη, μελιτώδη απεκκρίματα εντόμων, αποσυντιθέμενοι ιστοί και νεκρό φυτικό υλικό. Από αυτές τις ενώσεις, εξαρτάται και η ένταση της προσβολής, καθώς επίσης και η παθογόνος ικανότητα του μύκητα. Οι σημαντικότερες ουσίες, είναι τα ελεύθερα άλατα, τα αμινοξέα, οι ρυθμιστές αύξησης και οι βιταμίνες που υπάρχουν στα φυτικά τμήματα.

Οι O' Neill et al. (1997), αναφέρουν ότι οι σημαντικότεροι περιβαλλοντικοί παράγοντες για την έναρξη προσβολής από το παθογόνο είναι η υψηλή σχετική υγρασία, η ελεύθερη υγρασία στις φυτικές επιφάνειες και οι ενδιάμεσες θερμοκρασίες. Οι Alderman & Lacy (1985), σημειώνουν ότι η προσβολή μειώνεται πάρα πολύ όταν η Σ.Υ. πέσει στο 30%, έστω και για πολύ σύντομο χρονικό διάστημα.

Μια έρευνα των Elad & Steward το 2004, έδειξε ότι ο *B. cinerea*, είναι ικανός να μολύνει φυτά ακόμη και σε απουσία μεμβράνης νερού. Έτσι οι Cotoras & Silva το 2005, διαπίστωσαν ότι το παθογόνο αυτό διαπερνά τους ιστούς του ξενιστή του, είτε μέσω πληγής, ή ακόμη μέσω φυσικών ανοιγμάτων.

Αναστολή της βλάστησης των κονιδίων μπορεί να συμβεί από διάφορες αιτίες. Οι αιτίες αυτές είναι κυρίως οι τοξικές ουσίες, που απελευθερώνει το φυτό.

Παρεμπόδιση της βλάστησης των κονιδίων του *B. cinerea* παρατηρείται συχνά, όπως και στα κονίδια άλλων μυκήτων, όταν είναι πολλά μαζί. Τα κονίδια του μύκητα τυπικά, δε βλαστάνουν σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή ίσες των 10⁶ κονίδια ανά ml, αλλά η ακριβής συγκέντρωση, εξαρτάται από τη θρεπτική κατάσταση και την ηλικία των κονιδίων.

Τα κονίδια του *B. cinerea*, όταν βλαστήσουν παράγουν μία ή περισσότερες βλαστικές υφές διαδοχικής και ποικίλης ανάπτυξης, που οφείλονται σε διάφορους παράγοντες. Έτσι, σε μελέτη των Cole et al. (1996), διαπιστώθηκε ότι τα ξηρά

κονίδια του μύκητα σε φύλλα μπιζελιού, παρήγαγαν κοντές υφές, οι οποίες ήταν πολύ στενά προσκολλημένες στο υπόστρωμα και είχαν την ικανότητα απευθείας διάτρησης στους ιστούς του ξενιστή.

2. Διείσδυση

Μετά τη βλάστηση των κονιδίων, ακολουθεί η διείσδυση, η οποία είναι η φάση μεταξύ της επιφανειακής ανάπτυξης του μύκητα και του ενδοκυτταρικού σχηματισμού στους ιστούς του ξενιστή. Σ' αυτήν την φάση, αναπτύσσονται οι βλαστικές υφές του μύκητα, οι οποίες μπορούν είτε να διεισδύσουν απευθείας στον φυτικό ιστό είτε να σχηματίσουν απρεσσόρια. Η παραγωγή των απρεσσορίων κι η είσοδος του παθογόνου, μέσω των στομάτων, στους μεσοκυττάριους χώρους αναφέρθηκε από τον Elad (1988).

Οι πληγές στα φυτά κι η παρουσία νεκρών κυττάρων, διευκολύνουν αρκετά την είσοδο των υφών του μύκητα στους μεσοκυττάριους χώρους. Η διαδικασία της βλάστησης των σπορίων διαρκεί 7 ώρες και της διείσδυσης 2-3 ώρες. Αυτές είναι και οι φάσεις που το παθογόνο είναι εκτεθειμένο στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Συνολικά, το παθογόνο είναι εκτεθειμένο για 9-10 ώρες.

Κατά τη διάρκεια της διείσδυσης, παρατηρούνται με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο οι ακόλουθες διαφοροποιήσεις :

- α) η επιδερμίδα αποσυντίθεται περισσότερο (Verhoeff, 1980)
- β) τα κυτταρικά τοιχώματα μαλακώνουν λόγω της αποσύνθεσης της πηκτίνης (Kars & van Kan, 2007) και
- γ) τα τοιχώματα των επιδερμικών κυττάρων αδυνατίζουν (Kars & van Kan, 2007)

Τις πρώτες ώρες της διείσδυσης μπορεί να συμβαίνει συγχρόνως η πλασμόλυση των κυττάρων και η είσοδος των υφών.

Κατά τη διείσδυση του *B. cinerea*, παράγονται διάφορα ένζυμα, όπως οι πηκτινάσες, τα οποία αποικοδομούν τους φυτικούς ιστούς. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται **ένζυμα αλλοίωσης των κυτταρικών τοιχωμάτων** (cell wall degrading enzymes, CWDE) και η παραγωγή τους αυξάνεται ιδιαίτερα στη φάση παραγωγής των κονιδίων (Have et al., 2001; Choquer et al., 2007).

Τα CWDE, έχουν τέσσερις πιθανούς τρόπους δράσης:

1. Αλλοιώνουν το κυτταρικό τοίχωμα κι ως εκ τούτου διευκολύνουν την ενδοκυτταρική ανάπτυξη του μύκητα.
2. Αλλοιώνουν το κυτταρικό τοίχωμα εφοδιάζοντας το μύκητα με θρεπτικά στοιχεία.

3. Αλλοιώνουν το κυτταρικό τοίχωμα μειώνοντας την ισχύ του για άμυνα στον κυτταρικό θάνατο.
4. Αλλοιώνουν το κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα να παράγονται τοξίνες ή άλλες ουσίες που προκαλούν τον κυτταρικό θάνατο (Have et al., 2001).

Η έκκριση της πηκτινάσης, γίνεται κατά τη διάρκεια της βλάστησης των κονιδίων και μαζί με τη χητινάση, διευκολύνονται τα πρώτα στάδια διείσδυσης των φυτικών ιστών (Kars & van Kan, 2007)

Οι πολυγαλακτορουνάσες (PGs) διαλύουν την πηκτίνη. Από αυτές, το ένζυμο PG2 βρέθηκε ότι έχει διπλό ρόλο στη διείσδυση του μύκητα. Πρώτον, βοηθά στη διάτρηση των πρώτων κυτταρικών τοιχωμάτων και δεύτερον, στο ξεκίνημα της αλυσιδωτής παραγωγής άλλων ενζύμων, τα οποία παίρνουν μέρος στον καταβολισμό της πηκτινής (Elad & Steward, 2004; Choquer et al., 2007).

Ακόμη, ο μύκητας παράγει διάφορες τοξίνες, οι οποίες θεωρούνται πολύ σημαντικές για την παθογένεση, αλλά ο ρόλος τους δεν έχει ακόμη ξεκαθαριστεί (Choquer et al., 2007). Στα πρώτα στάδια της βλάστησης των κονιδίων του *B. cinerea*, παράγεται κάποια τοξίνη, η οποία είναι υπεύθυνη για τη νέκρωση των κυττάρων του ξενιστή.

Άλλες ουσίες με πιθανή τοξική δράση είναι το οξαλικό οξύ και η θειουρία. Η θειουρία, παράγεται από το παθογόνο και προκαλεί χλώρωση και μάρανση σε φυτά τομάτας (Verhoeff, 1980).

Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι ο *B. cinerea* παράγει φυτορμόνες. Πειράματα των Sharon et al. (2007) με αρκετά στελέχη του μύκητα, έδειξαν ότι παράγονται μεγάλες ποσότητες αιθυλενίου και μικρές ποσότητες αυξινών.

3. Εγκατάσταση

Η είσοδος του μύκητα ακολουθείται από την εγκατάσταση του, δηλαδή τον χρόνο από την προσβολή έως την εμφάνιση των συμπτωμάτων, αλλά και την εξάπλωση της μόλυνσης. Στο στάδιο αυτό, το μυκήλιο αναπτύσσεται στα κύτταρα που νεκρώθηκαν, λόγω της παραγωγής τοξινών και ενζύμων.

Στην περιφέρεια αλλοίωσης μπορεί να διακριθούν οι παρακάτω ζώνες:

- α) Η **ζώνη 0**, που βρίσκεται κοντά στο νεκρωτικό κέντρο και οι άκρες των υφών του μύκητα να εκκρίνουν τοξίνες και ένζυμα.
- β) Η **ζώνη I**, που είναι η ζώνη διάχυσης των τοξικών συγκεντρώσεων τοξινών και ενζύμων.

γ) Η **ζώνη II**, στην οποία υπάρχουν υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις από τις ουσίες και των δύο τύπων.

δ) Η **ζώνη III**, στην οποία υπάρχει ο υγιής ιστός.

Στη συνέχεια, το παθογόνο αναπτύσσεται στον ιστό που απελευθερώνει θρεπτικά στοιχεία απαραίτητα για την ανάπτυξή του.

Τα ελεύθερα στοιχεία έχει αποδειχτεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του μύκητα (Jarvis, 1992). Μετά από μια περίοδο, η οποία εξαρτάται από τον ξενιστή, τις επικρατούσες καιρικές συνθήκες, το στέλεχος του μύκητα και άλλους παράγοντες, εμφανίζονται οι πρώτες κηλίδες της τεφράς σήψης. Πολύ σπουδαίος παράγοντας είναι η εναλλαγή υγρών νυχτών και ξηρών ημερών, που μπορεί να προκαλέσει τυπικές ζώνες ανάπτυξης των κηλίδων.

2.7 Πρόβλεψη Επιδημίας

Η εξέλιξη της ασθένειας συχνά αυξάνεται με ρυθμούς τελείως διαφορετικούς από τους αρχικούς, παίρνει δηλαδή τη μορφή επιδημίας. Η φάση αυτή της απότομης αύξησης της ασθένειας μπορεί να διαρκέσει από λίγες μέρες έως μερικές εβδομάδες.

Η επιδημία, είναι πάρα πολύ επικίνδυνη, καθώς μπορεί μέσα σε λίγες μέρες ή εβδομάδες να καταστρέψει την καλλιέργεια. Αναγκαία λοιπόν, είναι η πρόβλεψη της επιδημίας με βάση κάποιο πρότυπο. Μ' αυτόν τον τρόπο μπορεί να εφαρμοστεί η κατάλληλη αντιμετώπιση, έτσι ώστε να αποφευχθεί η επιδημία με το μικρότερο δυνατό οικονομικό και οικολογικό κόστος.

Μετά από αρκετές προσπάθειες όπως του Jarvis (1980), των Vincelli and Lorbreer (1988) και άλλων, το 1994 αναπτύχθηκε από τους Yunis et al. ένα μοντέλο το οποίο βασίζεται στη συσχέτιση των περιβαλλοντικών παραγόντων με την προσβολή των καρπών και των βλαστών αγγουριού από την τεφρά σήψη σε μη θερμαινόμενο θερμοκήπιο. Οι δύο σημαντικότεροι παράγοντες, που σχετίζονταν με την εμφάνιση της επιδημίας, ήταν η διάρκεια διύγρανσης των φύλλων και η χρονική διάρκεια κατά την οποία η θερμοκρασία κυμαίνεται από 9° C έως 21°C κατά τις νυχτερινές ώρες.

Το 1997 οι Shtienberg και Elad χρησιμοποίησαν σε πειραματική καλλιέργεια αγγουριού, ένα εμπειρικό πρότυπο για την πρόβλεψη της επιδημίας. Το μοντέλο αυτό, λάμβανε υπόψη του αρκετούς παράγοντες, όπως την ποσότητα των βροχοπτώσεων, τις βροχερές ημέρες, τη μέγιστη και ελάχιστη θερμοκρασία, τις

συννεφιασμένες ημέρες και τις ημέρες με ζεστό και ξηρό καιρό. Από τα αποτελέσματα της έρευνάς τους, συμπέραναν τα εξής:

1. Όταν προβλέπεται αργή, ή καθόλου ανάπτυξη της ασθένειας δε γίνεται ψεκασμός
2. Όταν προβλέπεται μέτρια ανάπτυξη χρησιμοποιούνται βιολογικά μέσα καταπολέμησης
3. Όταν αναμένεται ταχεία ανάπτυξη, γίνεται ψεκασμός με εγκεκριμένο μυκητοκτόνο.

Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί αρκετά μοντέλα πρόβλεψης επιδημίας, τα οποία όμως είναι εμπειρικά και κανένα δεν πρέπει να θεωρείται απόλυτα αξιόπιστο. Η καλή γνώση της επιδημιολογίας της ασθένειας και η αναγνώριση των περιόδων που είναι επικίνδυνες για την ανάπτυξη της μπορεί να οδηγήσουν στη μείωση του αριθμού εφαρμογής μυκητοκτόνων.

2.8 Άμυνα του ξενιστή

(A) Μηχανική άμυνα

Η εφυμενίδα των φυτικών κυττάρων αποτελείται από διάφορα ανταγωνιστικά συστατικά. Γι' αυτό και μπορεί από μόνη της, να λειτουργεί ως φράγμα στην είσοδο του *Botrytis cinerea* και άλλων μυκήτων. Όμως, οι μηχανικές πληγές ή οι πληγές από διάφορα έντομα, διευκολύνουν την είσοδο και την εγκατάσταση του παθογόνου στους υγιείς φυτικούς ιστούς (Rijkenberg et al., 1980; Hammer & Evensen, 1994).

Με τη διάρρηξη της εφυμενίδας, τα παθογόνα εισβάλλουν στα φυτικά κύτταρα πολύ πιο εύκολα. Έτσι, ακολουθεί η βλάστηση και η επιμήκυνση των βλαστικών σωλήνων τους μέσα στο φυτό. Στη συνέχεια, εκκρίνουν διάφορα ένζυμα, τα οποία αλλοιώνουν τα κυτταρικά τοιχώματα του ξενιστή και τελικά επέρχεται η νέκρωσή του.

(B) Πρωτεΐνες σχετικές με την παθογένεση και άλλες ουσίες άμυνας

Κάποιες φορές, τα φυτά έχουν διάφορες πρωτεΐνες που επιβραδύνουν την εξάπλωση της ασθένειας. Αυτές οι πρωτεΐνες (PR), σχετίζονται με την παθογένεση και επιπλέον αναφέρεται η παραγωγή ενζύμων όπως χιτινάσες και 1,3-β-γλουκανάσες, τα οποία αναφέρεται ότι προκαλούν βλάβες στα κυτταρικά τοιχώματα του μύκητα και εμποδίζουν τη μόλυνση (Punja & Zhang, 1993; Simmons, 1994).

2.9 Αντιμετώπιση

Η **χημική καταπολέμηση**, παραμένει μέχρι και σήμερα, ο κυριότερος τρόπος μείωσης της συχνότητας εμφάνισης των προσβολών του *B. cinerea* (Korolev et al., 2011). Συνήθως, οι επεμβάσεις, γίνονται με ψεκάσμο των εναέριων τμημάτων των φυτών με μυκητοκτόνα. Εκτός από τα εναέρια τμήματα, ψεκάζονται και οι σπόροι, οι βολβοί, καθώς και οι συγκομιζόμενοι καρποί. Ο αριθμός των επεμβάσεων, κατά τη διάρκεια μιας καλλιεργητικής περιόδου, κυμαίνεται από μια με δυο μέχρι και περισσότερων από είκοσι (Leroux, 2004). Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν περιορισμοί στο χημικό τρόπο αντιμετώπισης του βοτρυτή, λόγω ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε αρκετά βοτρυδιοκτόνα.

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας του *B. cinerea* οφείλεται:

1. Στην ικανότητα του παθογόνου να μεταλλάσσεται
2. Στη φύση του παθογόνου, δηλαδή την ένταση της ασθένειας, το ρυθμό αναπαραγωγής του και την εύκολη μεταφορά των σπορίων του
3. Στην εντατική χρήση των μυκητοκτόνων, η οποία εξαρτάται κυρίως από τη δόση εφαρμογής και τον αριθμό εφαρμογών ανά καλλιεργητική περίοδο.

Έτσι υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις μυκητοκτόνων, τα οποία ενώ στην αρχή ήταν πολύ αποτελεσματικά ενάντια στην τεφρά σήψη, προοδευτικά έχασαν την αποτελεσματικότητά τους λόγω επιλογής ανθεκτικών στελεχών του μύκητα.

Εκτός από τη χημική καταπολέμηση, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και τα **προληπτικά μέτρα**, όπως οι καλλιεργητικές φροντίδες και γενικότερα, όλα τα μέτρα υγιεινής, τα οποία επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα τους παράγοντες προδιάθεσης των ιστών του ξενιστή σε προσβολές του παθογόνου. Για παράδειγμα, η περίσσεια ή η έλλειψη κάποιων θρεπτικών στοιχείων (π.χ. άζωτο και ασβέστιο), επηρεάζουν έμμεσα την ευπάθεια των ιστών του ξενιστή (Elmer & Michailides, 2004). Επίσης, τα μορφολογικά, ανατομικά και χημικά χαρακτηριστικά υποκειμένου και ποικιλίας στο αμπέλι, θεωρούνται από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την εκδήλωση επιδημιών του *B. cinerea* (Ferreira & Marais, 1987; Gabler et al., 2003). Στο αμπέλι, η πυκνότητα της κόμης των πρέμων έχει σχετιστεί με αυξημένες προσβολές από το παθογόνο, ενώ στα ακτινίδια με το ποσοστό μετασυλλεκτικής σήψης κατά τη συντήρηση σε ψυκτικούς θαλάμους (Michailides & Elmer, 2000). Ως εκ τούτου, καλλιεργητικές τεχνικές, όπως κλάδεμα και αφαίρεση φύλλων κοντά στους καρπούς, αυξάνουν τον αερισμό και το φωτισμό, αποτρέποντας την ανάπτυξη

ευνοϊκών συνθηκών για το *B. cinerea*. Μια από τις εναλλακτικές μεθόδους καταπολέμησης του μύκητα στα θερμοκήπια είναι η πρόληψη σχηματισμού υγρασίας στα φυτά, με θέρμανση και αερισμό (Morgan, 1984).

Άλλες στρατηγικές αντιμετώπισης της ασθένειας, όπως είναι η **βιολογική καταπολέμηση**, φαίνονται αρκετά υποσχόμενες, καθώς έχουν το πλεονέκτημα της καλύτερης αποδοχής από το κοινό και της μειωμένης περιβαλλοντικής επιβάρυνσης. Η βιολογική καταπολέμηση, θεωρείται η λιγότερο επιβλαβής μέθοδος για το περιβάλλον. Επιπλέον, ο βιολογικός τρόπος δράσης, μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Κάποια γένη μυκήτων που χρησιμοποιούνται στη βιολογική καταπολέμηση του *B. cinerea* είναι τα εξής: *Trichoderma*, *Gliocladium* και *Ulocladium* (Kohl et al., 2000; Pappas, 2000). Επίσης, χρησιμοποιούνται και τα βακτήρια του γένους *Bacillus* και *Pseudomonas*, καθώς επίσης και οι ζύμες *Pichia* και *Candida* (Pappas, 2000; Elad & Steward, 2004).

➤ Προληπτικά μέτρα

Τα προληπτικά μέτρα, είναι πολύ βασικά για την έναρξη και εξάπλωση της τεφράς σήψης. Γι' αυτό, θα πρέπει να καταστρέφονται τα φυτικά υπολείμματα και να απομακρύνονται τα προσβεβλημένα μέρη των φυτών, ή ακόμη και ολόκληρα τα φυτά αν η μόλυνση είναι μεγάλη.

Σημαντική επίσης, είναι η ζιζανιοκτονία. Τα ζιζάνια, τόσο εντός των θερμοκηπίων, όσο και εκτός, αποτελούν εστίες μόλυνσεων.

Εξίσου σημαντικός παράγοντας, είναι η ρύθμιση των περιβαλλοντικών συνθηκών του θερμοκηπίου. Οι κατάλληλες επομένως, συνθήκες εξαερισμού και θέρμανσης, μπορεί να αποτρέψουν την εκδήλωση ασθένειας από το συγκεκριμένο παθογόνο. Ιδιαίτερη προσοχή, θα πρέπει επίσης να δίνεται στις αρδεύσεις και στους ψεκασμούς, τα οποία θα πρέπει να γίνονται πριν από το μεσημέρι, για να μειώνεται η σχετική υγρασία. Το νερό, δεν πρέπει να είναι παγωμένο, γιατί αυξάνεται πολύ η ευαισθησία των φυτών στο βοτρυτή (Παναγόπουλος, 2000).

Στα θερμοκήπια, χρησιμοποιούνται πλαστικά κάλυψης, τα οποία παρεμποδίζουν τη διέλευση της υπερϊώδους ακτινοβολίας. Έτσι, παρεμποδίζεται και η ανάπτυξη των κονιδίων του μύκητα. Τέτοιο πλαστικό, είναι το πολυαιθυλένιο, το οποίο παρεμποδίζει την UVA ακτινοβολία, όχι όμως τη UVB (Vakanoulakis, 1992).

Στην εκδήλωση της ασθένειας, φαίνεται να παίζει ρόλο και η σύσταση του εδάφους και ιδιαίτερα τα μέσης σύστασης, αμμώδη, όξινα εδάφη.

Άλλο ένα μέτρο είναι η χρησιμοποίηση υγιούς και απολυμασμένου σπόρου. Η μεταφύτευση των φυτών, θα πρέπει να γίνεται αραιά, ώστε να αερίζονται επαρκώς και να μη σκιάζονται μεταξύ τους.

Τέλος, η επιλογή των κατάλληλων ποικιλιών, μπορεί να μειώσει κατά πολύ την εξάπλωση της ασθένειας (Παναγόπουλος, 2000).

➤ Βιολογική Καταπολέμηση

Οι στρατηγικές βιολογικής καταπολέμησης του *Botrytis*, εξαρτώνται από τη συμπεριφορά του παθογόνου πριν την ανάπτυξή του στις υγιείς φυτικές επιφάνειες, καθώς και από την ύπαρξη νεκρωτικών ιστών μέσα στην καλλιέργεια, ως πηγές μολύσματος.

Από το 1951 άρχισαν να γίνονται οι πρώτες έρευνες για τη βιολογική αντιμετώπιση της τεφράς σήψης. Έτσι, ο Newhook (1951) σε έρευνά του, ψέκασε γηρασμένα φύλλα μαρουλιού με τους σαπροφυτικούς ανταγωνιστικούς μύκητες *Cephalosporium* sp., *Fusarium flocciferum* και *Phoma eupyrena* και διαπίστωσε ότι παρεμποδίστηκε αισθητά η εγκατάσταση του *Botrytis cinerea*.

Από τη δεκαετία του 1970, είδη του γένους *Trichoderma* βρέθηκε ότι ήταν αποτελεσματικά εναντίον του *B. cinerea* που προσβάλλει άνθη φασολιού, σταφυλιών, φραουλών και διάφορων άλλων θερμοκηπιακών καλλιεργειών.

➤ Χημική καταπολέμηση

Η καταπολέμηση της τεφράς σήψης και γενικά όλων των μυκητολογικών ασθενειών γίνεται αποτελεσματικά μόνο με την προληπτική χρήση χημικών ουσιών. Τα καλλιεργητικά μέτρα, η χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών και οι βιολογικές μέθοδοι, τις περισσότερες φορές, δεν επαρκούν για να αντιμετωπίσουν καταστάσεις αυξημένου κινδύνου στον αγρό, όπως είναι οι επιδημίες. Έτσι, η αντιμετώπιση ασθενειών στηρίζεται και συνεχίζει να στηρίζεται κυρίως στη χημική μέθοδο, με αποτέλεσμα κάποιες φορές την αλόγιστη χρήση της (Pappas, 2000; Chatzidimopoulos et al. 2013). Γι' αυτό το λόγο, αφενός δημιουργήθηκαν περιβαλλοντικά προβλήματα μείζονος σημασίας και αφετέρου απωλέσθηκε η αποτελεσματικότητα των περισσότερων μυκητοκτόνων, λόγω της εμφάνισης και επικράτησης των ανθεκτικών στελεχών (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992). Ο *Botrytis cinerea* είναι ένα παθογόνο το οποίο χρήζει ιδιαίτερης σημασίας, λόγω των μοναδικών επιδημιολογικών χαρακτηριστικών του (Rosslenbroich & Stuebler, 2000).

Μέχρι και σήμερα, η καταπολέμηση του *Botrytis cinerea* βασίζεται σε διάφορα μυκητοκτόνα, τα οποία ταξινομούνται ανάλογα με το βιοχημικό τρόπο δράσης τους, σε **πέντε κατηγορίες** (Leroux et al., 2002; Korolev et al., 2011):

1. Μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στη μίτωση και στην κυτταροδιαίρεση
2. Μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στην ωσμωρύθμιση
3. Μυκητοκτόνα αναστολής βιοσύνθεσης αμινοξέων (μεθειονίνης)
4. Μυκητοκτόνα αναστολής βιοσύνθεσης στερολών
5. Μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στην αλυσίδα αναπνοής

Τη δεκαετία του 1960, αναπτύχθηκαν τα πρώτα διασυστηματικά μυκητοκτόνα, όπως είναι τα **βενζιμιδαζολικά** (benomyl, carbendazim) και οι εστέρες του θειοφανικού οξέος (thiophonate-methyl). Τα μυκητοκτόνα αυτά είναι προστατευτικά και θεραπευτικά, ευρέως φάσματος και εμφάνιζαν εξαιρετική βοτρυδιοκτόνο δράση (Leroux, 2004). Ανήκουν στην κατηγορία των μυκητοκτόνων που **αναστέλλουν τη μιτωτική διαίρεση**, καθώς παρεμποδίζουν τον πολυμερισμό της β-τουμπουλίνης, οπότε και το σχηματισμό της πυρηνικής ατράκτου. Σ' αυτή την ομάδα ανήκει και το **φαινυλοκαρβαμιδικό** μυκητοκτόνο **diethofencarb**, το οποίο επίσης χρησιμοποιείται εναντίον του βοτρυτή (Davidse & Flach, 1978; Russell, 1995).

Μια άλλη κατηγορία μυκητοκτόνων, που χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα, είναι αυτά που **παρεμβαίνουν στην ωσμωρύθμιση**. Σ' αυτή την κατηγορία ανήκουν τα **δικαρβοξιμίδια** (chlorzoxonil, iprodione, procymidone, vinclozolin), τα **φαινυλοπυρρόλια** (fludioxonil, fenpiclonil) και τα μυκητοκτόνα (dicloran, quintozene) της ομάδας των **αρωματικών υδρογονανθράκων** (Leroux, 2004).

Κατά τα τέλη του 1970, τα **δικαρβοξιμίδια** αντικατέστησαν τα βενζιμιδαζολικά και χρησιμοποιήθηκαν για περισσότερες από δυο δεκαετίες για την αντιμετώπιση της ασθένειας (Pappas, 1982; Sun et al., 2010). Αυτά, παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπορίων, αλλά κυρίως την ανάπτυξη μυκηλίου. Συνήθως, τα δικαρβοξιμίδια προκαλούν μορφολογικές ανωμαλίες στου βλαστικούς σωλήνες, όπως διάφορα εξογκώματα και εμφανείς διακλαδώσεις. Τα **φαινυλοπυρρόλια** είναι συνθετικά ανάλογα του αντιβιοτικού pyrolnitrin, το οποίο προήλθε από είδη βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* (Rosslenbroich & Stuebler, 2000) και χρησιμοποιούνται ως μυκητοκτόνα φυλλώματος, κατά του βοτρυτή και άλλων συγγενών μυκήτων από το 1998. Μια αντιπροσωπευτική δραστική ουσία της ομάδας αυτής είναι το fludioxonil. Ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Φαίνεται ότι επηρεάζουν την ωσμωρύθμιση, με αποτέλεσμα την ακανόνιστη συσσώρευση γλυκερόλης. Τα φαινυλοπυρρόλια, παρεμποδίζουν την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα και την ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών (Myresiotis et al., 2007). Είναι μη-διασυστηματικά μυκητοκτόνα, τα οποία διατίθενται και ως μίγματα με το cyprodinil (Rosslenbroich & Stuebler, 2000). Τέλος, από τους **αρωματικούς υδρογονάνθρακες**, η πιο γνωστή δραστική ουσία είναι το dicloran. Είναι μη διασυστηματικό μυκητοκτόνο και κυκλοφόρησε στο εμπόριο από το 1959.

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των μυκητοκτόνων αυτών δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Υποστηρίζεται ότι παρεμβαίνουν στις αντιδράσεις μεταφοράς σημάτων ωσμωρύθμισης, που περιλαμβάνουν κινάση, ιστιδίνη και άλλες διαδοχικές κινάσες MAP (Yamaguchi & Fujimura, 2005).

Και τα τρία μέλη της κατηγορίας αυτής, αναστέλλουν τη βλάστηση των σπορίων του μύκητα και παρεμποδίζουν την μυκηλιακή του ανάπτυξη.

Στα μέσα της δεκαετίας του 1990, εισήχθησε μια νέα ομάδα μυκητοκτόνων, οι **ανιλινοπυριμιδίνες**. Οι αντιπροσωπευτικές δραστικές ουσίες της ομάδας αυτής είναι το cyprodinil, το meranipyrim και το pyrimethanil. Τα μυκητοκτόνα αυτά, έχουν ικανοποιητική δράση κατά του *Botrytis cinerea* και είναι αποτελεσματικά κατά των ανθεκτικών πληθυσμών στα βενζιμιδαζολικά και στα δικαρβοξιμιδικά

μυκητοκτόνα (Leroux et al., 1999). Οι ανιλινοπυριμιδίνες, **αναστέλλουν τη βιοσύνθεση διαφόρων αμινοξέων** και ιδιαίτερα της μεθειονίνης, παρεμποδίζοντας την κυσταθειονίνη-β-λιάση. Επίσης, αναστέλλουν την έκκριση εξωκυτταρικών πρωτεϊνών και των υδρολυτικών ενζύμων, που σχετίζονται με την παθογένεση των μυκήτων (Heye et al., 1994; Milling & Richardson, 1995; Petsikos-Panayotaru et al., 2003). Είναι διασυστηματικά μυκητοκτόνα με προστατευτική δράση και μερικώς θεραπευτική (Rosslenbroich & Stuebler, 2000). Οι ανιλινοπυριμιδίνες, χρησιμοποιήθηκαν στην Ελλάδα εναντίον του βοτρυτή σε καλλιέργειες κηπευτικών από το 1998 (Myresiotis et al., 2007). Παρεμποδίζουν την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα και την ανάπτυξη μυκηλίου. Όλα τα μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής, έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης και συνεπώς, παρατηρείται διασταυρωτή ανθεκτικότητα (Hilber & Schuepp, 1996).

Μια άλλη ομάδα είναι αυτή που **παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση των στερολών**. Στην κατηγορία αυτή, ανήκουν οι αναστολείς της απομεθυλίωσης του άνθρακα 14 της λανοστερόλης και η νεότερη ομάδα των **υδροξυανιλιδίων**, που παρεμβαίνουν στην απομεθυλίωση του άνθρακα 4 στη διαδικασία βιοσύνθεσης της εργοστερόλης, αναστέλλοντας τη δράση της 3-κετο-ρεδουκτάσης (Debieu et al., 2001; Leroux, 2004; Chatzidimopoulos et al., 2013). Η ομάδα των υδροξυανιλιδίων, έχει ως αντιπροσωπευτικό μέλος το **fenhexamid**, το οποίο έχει προστατευτική δράση εναντίον πολλών παθογόνων σε διάφορες καλλιέργειες, όπως *Monilinia spp.* και *Sclerotinia sclerotiorum* (Ziogas et al., 2003; Myresiotis et al., 2007). Τα μυκητοκτόνα αυτής της κατηγορίας, δεν παρεμποδίζουν τη βλάστηση των κονιδίων του μύκητα, όμως σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν και αναστέλλουν την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα και της μυκηλιακής ανάπτυξης (Leroux et al., 1999). Στην Ελλάδα, το μυκητοκτόνο αυτό είναι διαθέσιμο από το 1999, για την αντιμετώπιση του *B. cinerea* σε αμπέλια και σε κηπευτικές καλλιέργειες (Myresiotis et al., 2007).

Στην τελευταία ομάδα μυκητοκτόνων με βοτρυδιοκτόνο δράση, περιλαμβάνονται δραστικές ουσίες, οι οποίες έχουν ως στόχο την **αλυσίδα αναπνοής**. Τα μυκητοκτόνα αυτά, διακόπτουν τη σύνθεση ATP. Τέτοιες ενώσεις είναι ισχυροί αναστολείς της βλάστησης των σπορίων. Στην ομάδα αυτή ανήκουν:

1. Τα πολυθεσικά μυκητοκτόνα
2. Οι παρεμποδιστές οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

3. Οι παρεμποδιστές του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων (αναστολείς αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος, SDHI' s – succinate dehydrogenase inhibitors)

4. Οι παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων

Από την κατηγορία των *πολυθεσικών μυκητοκτόνων*, χρησιμοποιήθηκαν για πολλά χρόνια τα **διθειοκαρβαμιδικά** (thiram, mancozeb, maneb), τα **φθαλιμίδια** και τα **αρυλοσουλφαμίδια** (captan, folpet, dichlofluanid, tolyfluanid) και το **chlorothalonil**. Όλα τα μέλη αυτής της κατηγορίας είναι προστατευτικά και χρειάζονται συχνές εφαρμογές σε μεγάλες δόσεις (Leroux, 2004). Ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε τέτοια μυκητοκτόνα είναι μικρός, όμως υπάρχουν διάφορες αναφορές αποτυχίας αντιμετώπισης του παθογόνου.

Το **fluazinam**, είναι μια **αρυλαμινοπυριδιναμίνη**, η οποία παρεμποδίζει τη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορύλιωση, άρα και τη σύνθεση ATP. Γι' αυτό το λόγο, θεωρείται ότι δεν επιτρέπει τα σπόρια να βλαστήσουν, καθώς και το μυκήλιο να αναπτυχθεί (Leroux et al., 2002; Chatzidimopoulos et al., 2013).

Οι *παρεμποδιστές του συμπλόκου II της αναπνοής*, είναι μια παλιά ομάδα μυκητοκτόνων, που περιλαμβάνει τα **καρβοξαμίδια** και τα συγγενικά **ανιλίδια**. Τα μυκητοκτόνα αυτά, εισήχθησαν στη γεωργική πράξη, κατά τα τέλη του 1960 ως διαφυλλικά και επενδυτικά σπόρων, λόγω της διασυστηματικής τους δράσης κυρίως έναντι βασιδιομυκήτων (Leroux, 2004). Στη νεότερη γενιά των ανιλιδίων, ανήκει και το **boscalid**, το οποίο παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα δράσης και είναι αποτελεσματικό εναντίον του *B. cinerea* (Chatzidimopoulos et al., 2013).

Σε ότι αφορά τους *παρεμποδιστές του συμπλόκου III*, περιλαμβάνονται οι *στρομπιλουρίνες* (QoI' s, Quinone Outside Inhibitors), οι οποίες αποτελούν μια σημαντική ομάδα μυκητοκτόνων, με νέο τρόπο δράσης (Chatzidimopoulos et al., 2013). Η ανακάλυψη αυτής της ομάδας, προέκυψε από τη μελέτη μιας ομάδας φυσικών β-μεθοξυ ακρυλικών ενώσεων, οι απλούστερες εκ των οποίων είναι η στρομπιλουρίνη A, η oudemansin A και η myxothiazol A (Barlett et al., 2002). Οι φυσικές αυτές ουσίες, απομονώθηκαν από βασιδιομύκητες, συμπεριλαμβανομένου και του *Strobilurus tenacellus* (Εικ.24).



Εικόνα 24: Καρποφορίες του βασιδιομύκητα *Strobilurus tenacellus*, από τον οποίο απομονώθηκαν οι β-μεθόξυ ακρυλικές ενώσεις (στρομπιλουρίνη A, oudemansin A, myxothiazol A) (Πηγή: <http://www.pilz-baden.ch/galerie/tenacellus.html>)

Οι πρώτες στρομπιλουρίνες, που κυκλοφόρησαν στο εμπόριο το 1996, ήταν το azoxystrobin και το kresoxim-methyl, από τις εταιρίες ICI και BASF αντίστοιχα, για την καταπολέμηση ασθενειών στα σιτηρά (Barlett et al., 2002). Σήμερα, κυκλοφορούν περισσότερες από 13 διαφορετικές ενώσεις (Fernandez-Ortuno et al., 2008).

Γενικά, οι στρομπιλουρίνες είναι αποτελεσματικά μυκητοκτόνα σε ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, διαφόρων καλλιεργειών (σιτηρά, βιομηχανικά φυτά, λαχανικά, χλοοτάπητες, καλλωπιστικά). Για παράδειγμα, το azoxystrobin είναι αποτελεσματικό εναντίον των τεσσάρων κυριότερων ομάδων φυτοπαθογόνων μυκήτων ήτοι των Ασκομυκήτων, Βασιδιομυκήτων, Δευτερομυκήτων και Ωομυκήτων (Clough & Godfrey, 1998). Παρόμοιο εύρος δράσης έχει και το pyraclostrobin. Παρόλα αυτά, δεν προσφέρουν όλες οι στρομπιλουρίνες υψηλά επίπεδα αποτελεσματικότητας και στις τέσσερις κλάσεις φυτοπαθογόνων μυκήτων. Για παράδειγμα, το kresoxim-methyl και το trifloxystrobin, παρουσιάζουν μέτρια δράση κατά των Ωομυκήτων (*Plasmopara viticola* – Περονόσπορος αμπέλου), ενώ σε ασθένειες που προκαλούνται από Βασιδιομύκητες (Σκωριάσεις σιτηρών), παρουσιάζουν υψηλά

επίπεδα αποτελεσματικότητας. Επίσης, στρομπιλουρίνες όπως το metominostrobin και το picoxystrobin, έχουν αναπτυχθεί για χρήση αποκλειστική στο ρύζι και στα σιτηρά, αντίστοιχα (Barlett et al., 2002).

2.10 Εμφάνιση ανθεκτικότητας

Η ευαισθησία των παθογόνων στις τοξικές ουσίες, μπορεί να μεταβληθεί με μια και μόνο μετάλλαξη, ή με επιλογή του φυσικού πληθυσμού του παθογόνου. Αν υπάρξει λοιπόν, μείωση της ευαισθησίας του παθογόνου σε ένα συγκεκριμένο μυκητοκτόνο, από μια ή περισσότερες μεταλλάξεις, τότε θα προκύψει **ανθεκτικό στέλεχος**, το οποίο με τη συχνή πίεση επιλογής θα επικρατήσει κι έτσι η καταπολέμηση θα είναι ανεπιτυχής (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992). Γενικότερα, η ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα ορίζεται ως μια σταθερή, κληρονομήσιμη προσαρμογή ενός μύκητα σε ένα μυκητοκτόνο, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ευαισθησία του μύκητα σε αυτό (Ma & Michailides, 2005).

Πριν από το 1970, σχεδόν όλα τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνταν κατά των φυτοπαθογόνων μυκήτων ήταν πολυθεσικοί αναστολείς με προστατευτική δράση. Σ' αυτές τις δραστικές ουσίες και παρά την ευρεία χρήση τους, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας ήταν ένα σπάνιο φαινόμενο. Στα τέλη της δεκαετίας του 1960, έγινε η εισαγωγή των μυκητοκτόνων εξειδικευμένου τρόπου δράσης (Brent, 1995; Morton & Staub, 2008; Chatzidimopoulos et al., 2013). Τα πλεονεκτήματα των διασυστηματικών μυκητοκτόνων σε σχέση με τους πολυθεσικούς αναστολείς είναι πολλά. Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι ότι καταπολεμούν παθογόνα που βρίσκονται στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων δρώντας θεραπευτικά και παρεμποδίζοντας την εξάπλωση του παθογόνου ακόμα και μετά τη μόλυνση. Επίσης, τα διασυστηματικά μυκητοκτόνα εισέρχονται και κυκλοφορούν μέσα στο φυτό, για αυτό και δεν είναι απαραίτητη η πλήρης κάλυψη της φυτικής επιφάνειας. Τέλος, χρησιμοποιούνται ως επενδυτικά σπόρων και έτσι προστατεύουν τα νεαρά φυτά από τα διάφορα παθογόνα (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992). Παρά τα πλεονεκτήματα των διασυστηματικών μυκητοκτόνων με εξειδικευμένο τρόπο δράσης, η ανθεκτικότητα έχει γίνει ένα σοβαρό πρόβλημα στη φυτοπροστασία.

Όταν η ευαισθησία ενός παθογόνου μειώνεται λόγω μετάλλαξης, τότε γίνεται αναφορά σε μεταλλαγή χρωματοσωματικού ή εξωχρωματοσωμικού γόνου. Οι εξωχρωματοσωμικοί, είναι οι γόνιμοι του μιτοχονδριακού DNA (mt DNA). Η

ανθεκτικότητα των παθογόνων στα διάφορα μυκητοκτόνα, περιγράφεται ως **μείζονων γόνων ή ολιγονική** και ως **πολυγονική** (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992).

Στην ολιγονική ανθεκτικότητα, είναι αρκετή μια και μόνο μετάλλαξη για να επιτευχθεί μεγάλο επίπεδο ανθεκτικότητας. Βέβαια, αυτό εξαρτάται και από το γόνο που θα υποστεί τη μεταλλαγή αυτή. Στους διπλοειδείς πυρήνες, το ανθεκτικό αλληλόμορφο γονίδιο, μπορεί να συμπεριφερθεί ως κυρίαρχο, ημικυρίαρχο ή υπολειπόμενο. Μυκητοκτόνα όπως είναι τα βενζιμιδαζολικά και οι στρομπιλουρίνες που έχουν εξειδικευμένο τρόπο δράσης, είναι επιρρεπή για την ανάπτυξη ολιγονικής ανθεκτικότητας.

Στην πολυγονική ανθεκτικότητα, η επίδραση του κάθε γονιδίου στο φαινότυπο είναι πολύ μικρή και δύσκολα αναγνωρίζεται σε συνθήκες αγρού. Όταν στο απλοειδές κύτταρο του παθογόνου, γίνει μετάλλαξη σε περισσότερα από ένα γονίδια, τότε το επίπεδο ανοχής μπορεί να αυξηθεί ραγδαία. Η πολυγονική ανθεκτικότητα συνήθως εμφανίζεται βαθμιαία και μπορεί να προκύψει τόσο από τη μείωση της δράσης κατά του παθογόνου, όσο και από τη μείωση της ευαισθησίας του στο μυκητοκτόνο. Βέβαια, με μείωση της πίεσης επιλογής από τη διακοπή της χρήσης του μυκητοκτόνου, είναι δυνατό το παθογόνο να επανέρθει στην αρχική ευαίσθητη κατάστασή του (Brent, 1995). Πολυγονική ανθεκτικότητα εμφανίζουν οι παρεμποδιστές απομεθυλίωσης των στερολών (DMI's).

Η ανθεκτικότητα, χαρακτηρίζεται ως ολιγονική ή πολυγονική, ανάλογα με το μυκητοκτόνο και όχι το μύκητα που εκτίθεται σε αυτό.

Έχουν προσδιοριστεί διάφοροι **μηχανισμοί ανθεκτικότητας**. Ο πιο κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας στους φυτοπαθογόνους μύκητες είναι η **αλλαγή στην ευαίσθητη θέση**, δηλαδή στο κυτταρικό συστατικό που αντιδρά με το φάρμακο. Η θέση – στόχος, παραμένει λειτουργική, αλλά είναι λιγότερο ευαίσθητη στα μυκητοκτόνα. Αλλαγές στο σημείο-στόχο, προκύπτουν από σημειακές μεταλλάξεις στο αντίστοιχο γονίδιο. Κάποιοι άλλοι μηχανισμοί που έχουν αναφερθεί είναι:

1. Η υπερέκφραση του στόχου
2. Η ενεργοποίηση μιας εναλλακτικής οδού αντιδράσεων
3. Η αποτοξικοποίηση (detoxification) του τοξικού παράγοντα
4. Η μείωση της εισροής του μυκητοκτόνου, ή η αύξηση της εκροής του, με αποτέλεσμα τη χαμηλότερη συγκέντρωσή του εντός του κυττάρου (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992; Brent & Hollomon, 1998; Leroux et al., 2010).

Ανθεκτικά στελέχη τυπικά υπάρχουν στη φύση σε πολύ χαμηλές συχνότητες. Λόγω της μεγάλης πίεσης επιλογής, από την επαναλαμβανόμενη χρήση ενός μυκητοκτόνου, επικρατούν τα ανθεκτικά στελέχη του παθογόνου. Το αποτέλεσμα της επιλογής ανθεκτικών στελεχών, μπορεί να είναι ο περιορισμός ή και η πλήρης απώλεια της αποτελεσματικότητας του μυκητοκτόνου, οπότε και η αποτυχημένη καταπολέμηση (Ma & Michailides, 2005).

Είναι ευρέως γνωστό ότι ο *B. cinerea* είναι ένα παθογόνο **υψηλού κινδύνου**, σε ότι αφορά την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα, εξαιτίας της υψηλής γενετικής παραλλακτικότητάς του, της άφθονης σποριοποίησης, του σύντομου βιολογικού του κύκλου και του μεγάλου εύρους ξενιστών του (Brent & Hollomon, 1998; Myresiotis et al., 2008). Επομένως, η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου στα χρησιμοποιούμενα βοτρυδιοκτόνα ήταν αναμενόμενη.

➤ **Εμφάνιση ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και στα φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα**

Τα βενζιμιδαζολικά είναι διασυστηματικά μυκητοκτόνα, ευρέως φάσματος, παράγωγα της βενζιμιδαζόλης (benzimidazole). Το πιο γνωστό μυκητοκτόνο της ομάδας αυτής είναι το benomyl, το οποίο ανακαλύφτηκε το 1963 από τους Delp και Kloring. Αμέσως μετά την ανακάλυψή του, σχηματίστηκε η εντύπωση ότι είχε αρχίσει μια νέα εποχή στην καταπολέμηση των κυριότερων μυκητολογικών ασθενειών, με εξαίρεση τους ωομύκητες (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992).

Ο μηχανισμός δράσης των βενζιμιδαζολικών βασίζεται στην παρεμπόδιση της μιτωτικής πυρηνοτομίας των μυκήτων. Τα μυκητοκτόνα αυτής της ομάδας αλληλεπιδρούν με την τουμπουλίνη παρεμποδίζοντας το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων της πυρηνικής ατράκτου. Έτσι, δεν μπορούν να αποχωριστούν τα θυγατρικά χρωμοσώματα.

Τη δεκαετία του 1960, καταγράφηκαν και οι πρώτες αναφορές ανθεκτικότητας, λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο της β-τουμπουλίνης (Faretta & Pollastro, 1991). Η πρώτη αναφορά ανθεκτικότητας του *B. cinerea* στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, έγινε σε θερμοκήπια κυκλαμίνων στην Ολλανδία, δυο χρόνια μετά τη χρήση τους. Λίγο αργότερα, παρουσιάστηκε ανθεκτικότητα και σε αμπελώνες στην Ευρώπη. Γι' αυτό το λόγο και ανακλήθηκε η κυκλοφορία τους στη Ν. Ευρώπη (Bollen & Scholten, 1971; Leroux & Clerjeau, 1985).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις αμινοξέων στις θέσεις 198 και 200 του γονιδίου της β-τουμπουλίνης (Yarden & Katan, 1993; Morton & Staub, 2008). Ωστόσο, τα περισσότερα στελέχη του *B. cinerea* με την E198A μεταλλαγή, τα οποία ήταν ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά, ήταν ταυτοχρόνως πολύ ευαίσθητα στα N – Φαινυλοκαρβαμιδικά, όπως το **diethofencarb** (φαινότυπος Ben R1) και αντιστρόφως (Pappas, 1997; Leroux et al., 1999; Banno et al., 2008). Στα τέλη της δεκαετίας του 1980, λόγω του φαινομένου της **αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας** (Zhang et al., 2009), κυκλοφόρησε ένα μίγμα μυκητοκτόνου με δραστικές ουσίες τις carbendazim και diethofencarb. Σύντομα όμως, στελέχη με μετάλλαξη την F200Y ή την E198K, τα οποία εμφανίζουν διπλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και στο diethofencarb, επιλέχθηκαν στους πληθυσμούς του παθογόνου (Yarden & Katan, 1993; Pappas, 2000; Leroux et al., 2002). Συγκεκριμένα, στο Ισραήλ βρέθηκαν ανθεκτικοί πληθυσμοί του παθογόνου στο μίγμα αυτό, σε θερμοκήπια αγγουριάς, σχεδόν αμέσως μετά την κυκλοφορία του (Katan et al., 1989). Στελέχη ανθεκτικά και στα δυο μυκητοκτόνα (φαινότυπος Ben R2), ανιχνεύθηκαν και στην Καμπανία, δυο χρόνια μετά τη χρήση του μίγματος (Leroux et al., 1999). Ο φαινότυπος αυτός, βρέθηκε στην Ελλάδα και σε άλλες χώρες, σε διάφορες καλλιέργειες με μέτρια ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά (Yarden & Katan, 1993; Pappas, 1997).

Η ανθεκτικότητα και στους δυο φαινοτύπους, φαίνεται να αποδίδεται στο ίδιο αλληλόμορφο γονίδιο (Mbc1 ή BenA), το οποίο είναι κωδικοποιημένο για τη β-τουμπουλίνη (Farettra & Pollastro, 1991). Για το φαινότυπο Ben R1, η ανθεκτικότητα αποδίδεται στην αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από αλανίνη στη θέση 198, ενώ για το φαινότυπο Ben R2 στην αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από τυροσίνη στη θέση 200.

Στη θέση 198, διαπιστώθηκαν δυο επιπλέον μεταλλάξεις από στελέχη ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά, που απομονώθηκαν από κηπευτικά. Η πρώτη μετάλλαξη αφορούσε την αντικατάσταση γλουταμινικού οξέος από λυσίνη, η οποία προσέδιδε υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και στα φαινυλοκαρβαμιδικά (Yarden & Katan, 1993). Η δεύτερη μετάλλαξη, αφορούσε την αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από βαλίνη, η οποία προσέδιδε μια μικρή ανθεκτικότητα στο φαινυλοκαρβαμιδικό diethofencarb.

➤ **Εμφάνιση ανθεκτικότητας στα δικαρβοξαμιδικά, φαινυλοπυρρόλια και στους αρωματικούς υδρογονάνθρακες**

Τα μυκητοκτόνα, που επηρεάζουν την ωσμωρύθμιση (δικαρβοξαμιδικά, φαινυλοπυρρόλια και αρωματικοί υδρογονάνθρακες), συνιστούν μια χημικά ετερογενή ομάδα. Αυτό όμως, δεν εμπόδισε την ανάπτυξη διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των ουσιών αυτών. Έρευνες πληθυσμών του *B. cinerea* σε διάφορες καλλιέργειες έδειξαν την παρουσία μετρίως ανθεκτικών στελεχών στα **δικαρβοξαμιδικά** μυκητοκτόνα, με διασταυρωτή ανθεκτικότητα στους **αρωματικούς υδρογονάνθρακες**, αλλά καμία ανθεκτικότητα στα **φαινυλοπυρρόλια** (Leroux, 2004; Chatzidimopoulos et al., 2013). Σε κάποια στελέχη αγρού, η ανθεκτικότητα περιορίζεται στα δικαρβοξαμιδικά (Leroux et al., 1999) ή στα φαινυλοπυρρόλια (Vignutelli et al., 2002; Chatzidimopoulos et al., 2013).

Οι Faretra και Pollastro (1991), διαπίστωσαν ότι η ανθεκτικότητα στα δικαρβοξαμιδικά, καθορίζεται από ένα πολυμορφικό γονίδιο, που ονομάζεται BcOS1 ή Bos1 και κωδικοποιεί μια ιστιδίνη-κινάση.

Στα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη του βοτρύτη στα δικαρβοξαμιδικά, η ανθεκτικότητα οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις στις θέσεις 365 και 369, του γονιδίου BcOS1 ή Bos1 (Sierotzki et al., 2000). Στη θέση 365, η ανθεκτικότητα οφείλεται στην αντικατάσταση ισολευκίνης στα άγρια στελέχη από μια σερίνη. Σε αμπελώνες της Γαλλίας, αντί για σερίνη βρέθηκε αργινίνη ή ασπαραγίνη (Leroux et al., 2002; Oshima et al., 2002).

Μέχρι το 2007, δεν υπήρχε καμία αναφορά ανάπτυξης ανθεκτικότητας του *Botrytis cinerea* στο fludioxonil, στον αγρό (Myresiotis et al., 2007). Σε πειράματα *in vitro* όμως, το fludioxonil εμφάνισε ανθεκτικότητα σε στελέχη του *B. cinerea* από τον αγρό. Αυτή είναι και η πρώτη αναφορά ανθεκτικότητας του *Botrytis cinerea* στο fludioxonil στην Ελλάδα (Chatzidimopoulos et al., 2013). Παρόμοια επίπεδα ανθεκτικότητας στο fludioxonil είχαν διαπιστωθεί και στο Ισραήλ (Korolev et al., 2011).

➤ Εμφάνιση ανθεκτικότητας στις Ανιλινοπυριμιδίνες

Ανθεκτικότητα στις **ανιλινοπυριμιδίνες**, έχει επίσης καταγραφεί σε στελέχη του βοτρώτη, σε αρκετές καλλιέργειες, διαφόρων χωρών (Latorre et al., 2002; Moyano et al., 2004; Myresiotis et al., 2007; Kretchmer & Hahn, 2008). Έχουν προσδιοριστεί διάφοροι φαινότυποι ανθεκτικότητας (Leroux et al., 1999; Myresiotis et al., 2007). Σε μια έρευνα των Bardas et al. το 2008, απεδείχθει ότι η ανθεκτικότητα αυτή, είναι σταθερή και δεν επηρεάζεται η προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών απομονώσεων.

➤ Εμφάνιση ανθεκτικότητας στους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης

Τα μυκητοκτόνα που ανήκουν στους **παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών (SBI's, Sterol Biosynthesis Inhibitors)**, θεωρούνται αρκετά αποτελεσματικά, καθώς παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μυκηλίου του *Botrytis cinerea*. Ο τρόπος δράσης τους είναι η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης παρεμποδίζοντας την απομεθυλίωση του C-14 στο μόριο της λανοστερόλης (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992). Συγκεκριμένα, αναστέλλουν τη δράση του κυτοχρώματος P-450, το οποίο είναι προσθετική ομάδα της 14α απομεθυλάσης, που καταλύει την απομεθυλίωση της λανοστερόλης. Η λανοστερόλη είναι πρόδρομη ουσία της εργοστερόλης και γι' αυτό τα μυκητοκτόνα αυτά αποκαλούνται και παρεμποδιστές βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (EBI'S). Η παρεμπόδιση της απομεθυλίωσης αυτής έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση πρόδρομων στερολών οι οποίες όμως, δεν είναι κατάλληλες να αντικαταστήσουν την εργοστερόλη στη δόμηση των μεμβρανών των μυκηλιακών κυττάρων (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992).

Κάποια μυκητοκτόνα που ανήκουν σ' αυτή την ομάδα, έχει διαπιστωθεί ότι είναι αποτελεσματικά σε *in vitro* συνθήκες, αλλά δεν έχουν καλή δράση σε συνθήκες αγρού (Elad, 1992; Stehmann & de Waard, 1996). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε δυο λόγους: (1) στις σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις εφαρμογής σε επίπεδο αγρού, που συστήνονται για τα DMI's και (2) στη μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα ευαισθησίας των πληθυσμών στα DMI's (Stehmann & de Waard, 1996). Η εφαρμογή όμως, υψηλότερων δόσεων δεν ενδείκνυται, γιατί προκαλεί φυτοτοξικότητα. Αυτό βέβαια, μπορεί να ξεπεραστεί εφαρμόζοντας μίγματα πολυθεσικών μυκητοκτόνων. Το πιο αποτελεσματικό μυκητοκτόνο, εναντίον του *B. cinerea*, που ανήκει στην

ομάδα των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης στερολών είναι το υδροξυανιλίδιο, **fenhexamid**. Ωστόσο, πριν ακόμη κυκλοφορήσει στο εμπόριο αυτή η δραστική ουσία, ανιχνεύτηκαν ανθεκτικά στελέχη σε πληθυσμούς αγρού (Leroux, 2004).

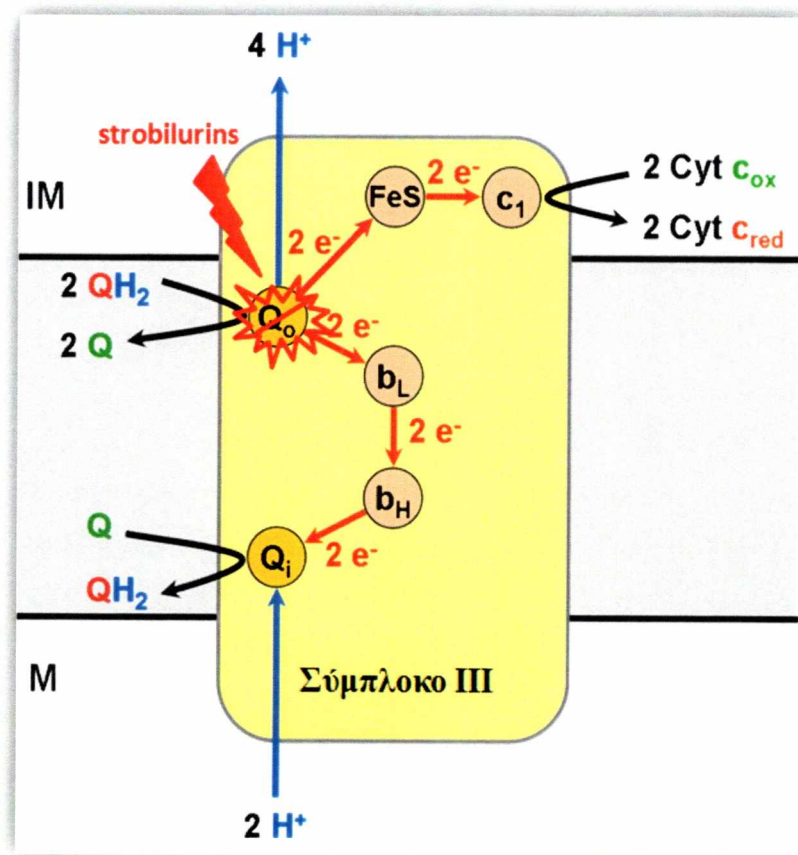
➤ **Εμφάνιση ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα του συμπλόκου III της αναπνοής (QoI' s) – Στρομπιλουρίνες**

Οι στρομπιλουρίνες είναι η πρώτη ομάδα μυκητοκτόνων με εξειδικευμένη δράση στο σύμπλοκο III της αναπνευστικής αλυσίδας, που εμφανίστηκε στη γεωργική πράξη το 1996.

Το κυτόχρωμα b, είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία σχηματίζει τον πυρήνα του ενζυμικού συμπλέγματος των κυτοχρωμάτων bc (σύμπλοκο III) της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Εικ. 25). Η πρωτεϊνική υπομονάδα του συμπλόκου III, στο κυτόχρωμα b, κωδικοποιείται από το γονίδιο του κυτοχρώματος b (cytb), το οποίο βρίσκεται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Brandt & Trumpower, 1994; Grasso et al., 2006b).

Τα μυκητοκτόνα της ομάδας των στρομπιλουρινών, έχουν την ιδιαιτερότητα ενός νέου τρόπου δράσης. Οι ουσίες αυτές, δεσμεύονται στη θέση Qo (θέση προς την εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, όπου η ουμπικινόλη οξειδώνεται προς ουμπικινόνη) του κυτοχρώματος b, εμποδίζοντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ κυτοχρώματος b και κυτοχρώματος c1. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την παρεμπόδιση της μιτοχονδριακής αναπνοής και της παραγωγής τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) με συνέπεια τη διαταραχή του ενεργειακού κύκλου του μύκητα (Bartlett et al., 2002). Η μιτοχονδριακή αναπνοή, παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για τη βλάστηση των σπορίων και συνεπώς, αρχικά επηρεάζεται η βλάστηση και άλλες διαδικασίες με ενεργειακές απαιτήσεις (Lesemann et al., 2006).

Τα μυκητοκτόνα που ανήκουν στη κατηγορία των Qo παρεμποδιστών είναι επιτυχημένα προστατευτικά προϊόντα. Η επιτυχία αυτή, οφείλεται στις ιδιότητές τους και συγκεκριμένα στο ότι έχουν ευρύ φάσμα δράσης, είναι παρεμποδιστές εξειδικευμένου σημείου (site-specific inhibitors) και ενίοτε έχουν διασυστηματική και θεραπευτική δράση. Η εξειδίκευση αυτή σε υποκυτταρικό επίπεδο αποτελεί πιθανότητα εμφάνισης ανθεκτικότητας από μια και μόνο σημειακή μεταλλαγή.



Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση της δομής του κυτοχρώματος b. Στην εικόνα, μεταξύ άλλων, φαίνεται η θέση Qo και η ροή ηλεκτρονίων από την ουμπικινόλη (QH₂) προς το κυτόχρωμα c (cyt c), μέσω του κυτοχρώματος b (Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Coenzyme_Q_%E2%80%93_cytochrome_c_reductase)

Το κυτόχρωμα b, που αποτελεί την πρωτεΐνη-στόχο των QoI's (Quinone outside inhibitors), κωδικοποιείται από το μιτοχονδριακό DNA (mt DNA), το οποίο θεωρείται ότι μεταλλάσσεται σε υψηλότερες συχνότητες, απ' ό,τι το γενωμικό DNA. Το mt DNA, παρουσιάζει ρυθμούς μετάλλαξης περίπου 10% περισσότερο απ' ό,τι το γενωμικό. Αυτό πιστεύεται ότι οφείλεται στην παραγωγή υψηλότερων συγκεντρώσεων ενδιάμεσων ριζών οξυγόνου (reactive oxygen intermediates, ROI's), την απουσία ιστονών από τα μιτοχόνδρια και την έλλειψη ορισμένων αντιδράσεων επιδιόρθωσης, που λειτουργούν στους πυρήνες και μειώνουν τους ρυθμούς μετάλλαξης (Taylor et al., 2002; Avila-Adame et al., 2003). Επίσης, ο ρυθμός μετάλλαξης στα μιτοχόνδρια είναι υψηλότερος σε φυτοπαθογόνους μύκητες, οι οποίοι έχουν αερομεταφερόμενα κονίδια καθότου εκτίθενται περισσότερο στην υπεριώδη ακτινοβολία (Lesemann et al., 2006).

Το 1998, δυο μόλις χρόνια μετά την εισαγωγή των πρώτων στρομπιλουρινών στη γεωργική πράξη, έγινε η πρώτη αναφορά ανθεκτικότητας στο μύκητα *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* στη Γερμανία (Bartlett et al., 2002). Μέχρι σήμερα, έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα στις στρομπιλουρίνες σε 46 φυτοπαθογόνους μύκητες (FRAC, 2010). Στα περισσότερα παθογόνα, όπου έχει αναφερθεί ανάπτυξη ανθεκτικότητας, ο κυριότερος μηχανισμός ανθεκτικότητας αποδόθηκε σε μια μετάλλαξη στο γονίδιο του κυτοχρώματος b, προκαλώντας την αντικατάσταση της γλυκίνης με αλανίνη στο κωδικόνιο 143 (G143A). Αυτή η μετάλλαξη έχει προσδιοριστεί σε ανθεκτικές απομονώσεις σημαντικών φυτοπαθογόνων όπως: *Blumeria graminis*, *Alternaria alternata*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Plasmopara viticola*, *Venturia inaequalis*, *Botrytis cinerea* κτλ. (Sierotzki et al., 2000; Gisi et al., 2002; Jiang et al., 2009). Σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, η ανθεκτικότητα του *B.cinerea* στους QoI' s, οφείλεται στη σημειακή μετάλλαξη της γουανίνης (G) σε κιτοσύνη (C), στη θέση 143 (Banno et al., 2009; Ishii et al., 2009; Jiang et al., 2009; Leroux et al., 2010; Bardas et al., 2010).

Σε μερικά από αυτά τα παθογόνα, συμπεριλαμβανομένου και του *B. cinerea*, εμπεριέχεται ένα **ιντρόνιο** (intron) μεταξύ των θέσεων 143 και 144 (**bi-143/144**). Ανθεκτικότητα στους QoI' s, διαπιστώθηκε στον αγρό μόνο στις απομονώσεις με τη συγκεκριμένη σημειακή μετάλλαξη, που όμως **δεν** εμπεριείχαν το συγκεκριμένο ιντρόνιο (Grasso et al., 2006a; Sierotzki et al., 2007; Banno et al., 2009).

Βιοχημικές και μοριακές μελέτες, έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα στους QoI' s, μπορεί να εμφανιστεί και με έναν άλλο μηχανισμό, πέραν της μετάλλαξης στη θέση στόχο (Zhang et al., 2000). Ο μηχανισμός αυτός, αφορά την αύξηση της μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω της μεταβολικής διεργασίας της εναλλακτικής οξειδάσης (AOX). Παρόλα αυτά, οι Zhang et al. (2000), επεσήμαναν ότι η εναλλακτική αναπνοή δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των πληθυσμών του παθογόνου. Αυτό, μάλλον οφείλεται στην απελευθέρωση κάποιων φλαβονών κατά τη μόλυνση.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι σε μελέτες ανθεκτικότητας με στρομπιλουρίνες, διαπιστώθηκε ότι η χρήση σαλικιλ-υδροξαμικού οξέος (SHAM) αναστέλλει τη δραστηριότητα της εναλλακτικής οξειδάσης (Avila-Adame et al., 2003). Όταν υπάρξει η αναστολή αυτή η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στις στρομπιλουρίνες εξαρτάται μόνο από τυχόν μεταλλαγή στις πρωτεΐνες του κυτοχρώματος b.

➤ Εμφάνιση ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα του συμπλόκου II της αναπνοής- Boscalid

Το boscalid, είναι μέλος της τάξης των ανιλιδών μυκητοκτόνων και ανήκει στην ομάδα των καρβοξαμιδίων. Ο τρόπος δράσης του οφείλεται στην κυτταρική αναπνοή (σύμπλεγμα II) και βασίζεται στη παρεμπόδιση αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος ή αλλιώς τη σαζινική αφυδρογονάση (SDHI's). Συγκεκριμένα, δεσμεύεται στα μιτοχόνδρια των μυκήτων το ένζυμο SDHI. Το μυκητοκτόνο αυτό, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σε αμπελώνες της Γαλλίας, το 2004, όπου δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Λίγα χρόνια αργότερα όμως, εμφανίστηκε στη Κίνα μέτρια ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Myresiotis et al., 2008). Σε επόμενες έρευνες, διαπιστώθηκε ότι βρέθηκαν απομόνωσεις του *Botrytis cinerea* με υψηλή ανθεκτικότητα τόσο στις στρομπιλουρίνες όσο και στο boscalid σε καλλιέργειες φράουλας, ακτινιδίων και μαρουλιού στην Ελλάδα (Bardas et al., 2010; Veloukas et al., 2011; Chatzidimopoulos et al., 2013), αλλά και σε διάφορα μικρά φρούτα στη Β. Γερμανία (Weber, 2011).

Η πρωτεΐνη – στόχος αυτής της ομάδας είναι η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος, η οποία αποτελείται από 4 υπομονάδες (SdhA, SdhB, SdhC, SdhD) και συμμετέχει σε δυο σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες, στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος και στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (Chatzidimopoulos et al., 2013). Με τον τρόπο αυτό, οι SDHI' s, εμποδίζουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το ηλεκτρικό οξύ στην ουμπικινόνη.

Το boscalid, παρεμποδίζει τη βλάστηση σπορίων, την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα και τη μυκηλιακή αύξηση (Avenot & Michailides, 2007; Chatzidimopoulos et al., 2013).

Πειραματικό Μέρος

3. Υλικά και Μέθοδοι

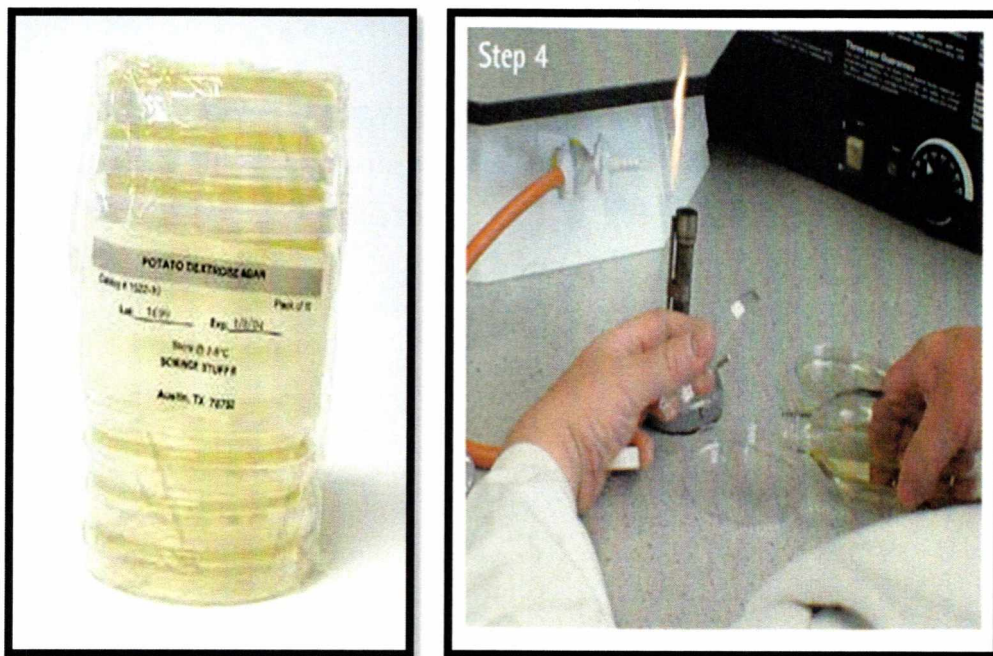
3.1 Υπόστρωμα

Όλες οι απομονώσεις διατηρήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA). Η παρασκευή του θρεπτικού αυτού υλικού έγινε ως εξής:

1. Τοποθέτηση 1000ml απιονισμένου νερού σε μια κωνική φιάλη.
2. Πολύ καλή θέρμανση του απιονισμένου νερού, χωρίς όμως να φτάσει σε σημείο βρασμού.
3. Προσθήκη 39gr σκόνης PDA (Oxoid-CM 0139).
4. Συνεχόμενη κυκλική ανάδευση μέχρι να γίνει το μίγμα ομοιογενές.
5. Έγχυση του μίγματος σε γυάλινες θερμοανθεκτικές φιάλες και σε δοκιμαστικούς σωλήνες πριν προλάβει να σταθεροποιηθεί.
6. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121° C για 15 min με πίεση 1,2 atm (Εικ.26).
7. Πριν τη στερεοποίηση του PDA, είναι εφικτό να επιστρωθούν και τρυβλία Petri (Εικ.27).
8. Με την στερεοποίηση του PDA, έπειτα από την αποστείρωση, πραγματοποιούνται οι καλλιέργειες των μυκήτων.



Εικόνα 26: Αυτόκαυστο το οποίο χρησιμοποιείται για αποστείρωση
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)



Εικόνα 27: Επιστρωμένα τρυβλία Petri με PDA
(Πηγές: <http://www.sciencestuff.com/prod/L-p-Agar/1522-10>;
<http://www.nuffieldfoundation.org/practical-biology/pouring-agar-plate>)

3.2 Απομονώσεις

Οι απομονώσεις του *Botrytis cinerea* που επιλέχθηκαν, ήταν από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, της σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος. Οι απομονώσεις αυτές, έγιναν από προσβεβλημένα φυτά υδροπονικής καλλιέργειας μαρουλιών, του θερμοκηπίου *Crocus Flora AE*, το οποίο βρίσκεται στο Κρόκιο Αλμυρού, κατά το έτος 2010. Η ευαισθησία των απομονώσεων σε διάφορα μυκητοκτόνα ελέγχθηκε *in vitro* (Chatzidimopoulos et al., 2013). Οι φαινότυποι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6: Απομονώσεις (Φαινότυποι) του *Botrytis cinerea*

Απομόνωση	Φαινότυπος
A56	Wild-type
A7	Pyr ^R Bos ^R Dic ^{MR}
A59	Fen ^R Pyr ^R Cyp ^R Flud ^{MR} Ben ^{HR} Dic ^{MR}
A91	Bos ^{MR}
B18	Pyr ^R Bos ^R Cyp ^R Dic ^{MR}
B58	Flud ^{MR} Dic ^{MR}
C1	Pyr ^R Bos ^R Cyp ^R Ben ^{HR} Dic ^{MR}
C7	Fen ^{HR} Pyr ^{HR} Bos ^{HR} Cyp ^{HR} Dic ^{MR}
C14	Fen ^R Pyr ^R Cyp ^R Ben ^{HR} Dic ^{MR}
C39	Fen ^{HR} Pyr ^{HR} Ben ^{HR} Dic ^{MR}

όπου: Fen: Fenhexamid, Pyr: Pyraclostrobin, Cyp: Cyprodinil, Flud: Fludioxonil, Bos: Boscalid, Ben: Carbendazim, Dic: Iprodione, HR: Υψηλή ανθεκτικότητα, MR: μέτρια ανθεκτικότητα

Από τις απομονώσεις αυτές, πραγματοποιήθηκαν μεταφορές σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες ή σε τρυβλία Petri, με PDA. Η μεταφορά, επιτεύχθηκε με απλή επαφή μιας αποστειρωμένης βελόνας πάνω στις καρποφορίες της κάθε απομόνωσης χωριστά, σε αποστειρωμένο ειδικό χώρο (laminar). Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25° C στο σκοτάδι (Εικ. 28).

Έλεγχος της δράσης *in situ* ειδικών μυκητοκτόνων εναντίον επιλεγμένων απομονώσεων του *Botrytis cinerea*



Εικόνα 28: α. Διαδικασία μεταφοράς μυκήτων, β. αποστειρωμένος θάλαμος-laminar και γ. θάλαμος επώασης μυκήτων

(Πηγές: <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Cultivation.html>;

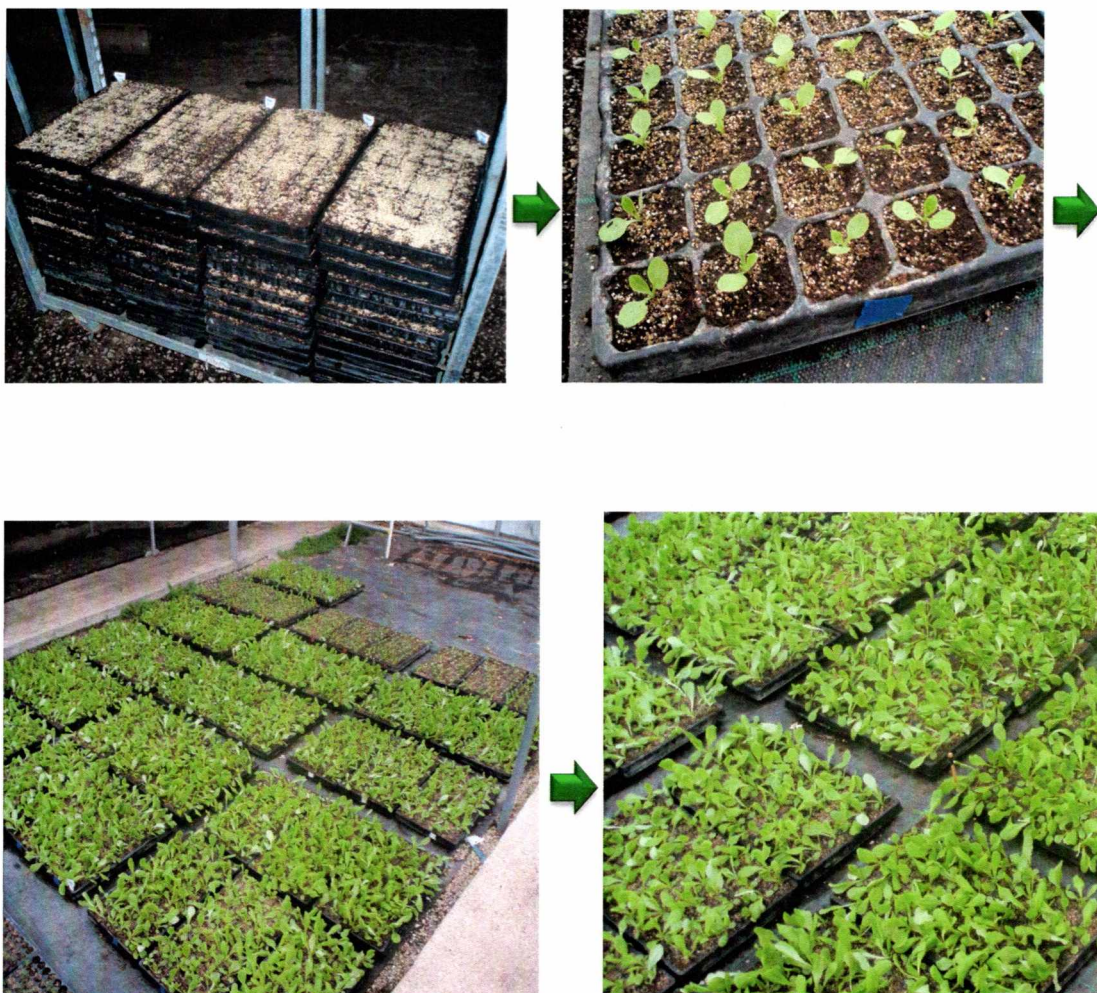
<http://www.projectsday.hci.edu.sg>;

<http://www.domusweb.it/en/interviews/2011/11/22/design-and-biology-a-unified-laboratory.html>)

3.3 Προετοιμασία νεαρών μαρουλιών

Στις 19/10/2011, στο θερμοκήπιο Crocus Flora ΑΕ, πραγματοποιήθηκε σπορά μαρουλιών σε παλέτες. Η ποικιλία μαρουλιών που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Penelope RZ, κατηγορίας Butterhead. Σύμφωνα με κάποιες προκαταρκτικές δοκιμές που έγιναν στο εν λόγω θερμοκήπιο, διαπιστώθηκε ότι η ποικιλία Penelope RZ, ήταν η πιο εύρωστη σε σχέση με τις υπόλοιπες και εμφάνιζε τα χαμηλότερα ποσοστά προσβολής από τον *Botrytis cinerea*. Αυτός ήταν και ο κυριότερος λόγος που επιλέχτηκε για τη συγκεκριμένη μελέτη.

Αμέσως μετά τη σπορά και αφού τοποθετήθηκε τύρφη, οι παλέτες μεταφέρθηκαν στο προβλαστήριο. Μετά τη βλάστηση των μαρουλιών, έγινε η μεταφορά τους στο σπορείο (Εικ.29).



Εικόνα 29: Διαδικασία σποράς μέχρι μεταφύτευσης των νεαρών μαρουλιών
(Πηγή: Θερμοκήπιο Crocus Flora ΑΕ, 2011)

Μετά από 40 ημέρες περίπου, στις 28/11/2011, οι παλέτες μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, έτσι ώστε να γίνει η μεταφύτευση των νεαρών φυταρίων σε πλαστικά δοχεία. Στην κάτω επιφάνεια των δοχείων, δημιουργήθηκαν μικρές τρύπες για την κατάλληλη απορρόφηση ποσότητας νερού που χρειαζόνταν τα μαρούλια για την ανάπτυξή τους. Η μεταφορά των φυτών, έγινε στο στάδιο του 7^{ου} – 8^{ου} πραγματικού φύλλου. Με το πέρας της μεταφύτευσης, τα μαρούλια μεταφέρθηκαν σε συνθήκες θερμοκηπίου, σε ειδικό θάλαμο επώασης/ανάπτυξης (growth cabinet), με φωτοπερίοδο 10:14 και θερμοκρασία 18° C (Εικ. 30).



Εικόνα 30: Μεταφυτευμένα νεαρά μαρούλια σε θάλαμο ανάπτυξης (growth cabinet)
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

Καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξής τους, τα νεαρά μαρούλια ποτίζονταν κανονικά. Όταν έφτασαν στο στάδιο του 12^{ου} πραγματικού φύλλου, στις 5/12/2011, πραγματοποιήθηκε λίπανση για την καλύτερη ανάπτυξή τους. Το λίπασμα, που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Nitrophoska blau-spezial (12-12-17 (+2+6)). Δηλαδή περιείχε 12% άζωτο (6,5% -NH₄ και 5,5% -NO₃), 12% P₂O₅, 17% K₂O, 2% MgO, 6% S, 0,02% B και 0,01% Zn (Εικ.31).



Εικόνα 31: Λίπασμα Nitrophoska blau-spezial (12-12-17 (+2+6))
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

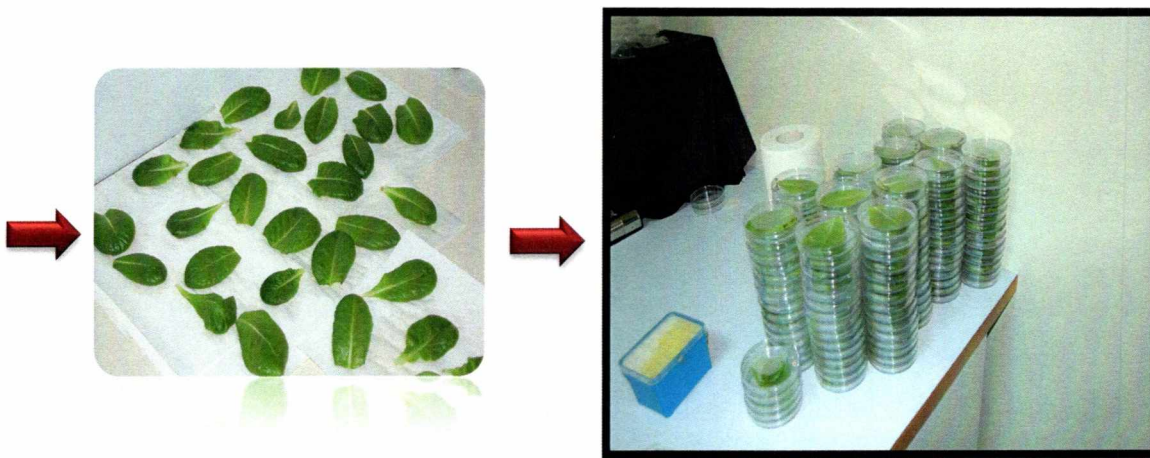
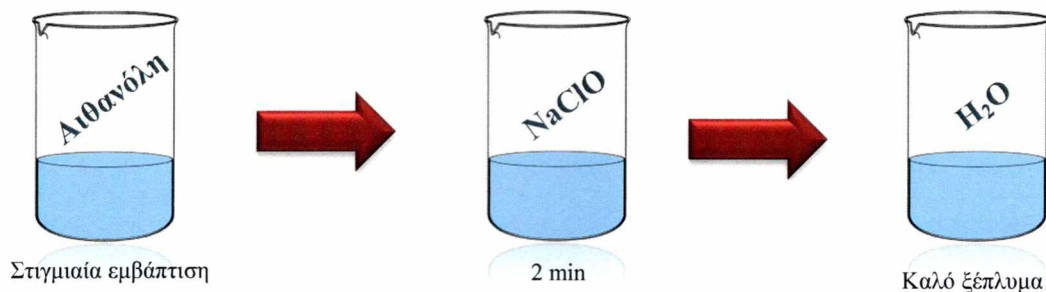
3.4 Απολύμανση μαρουλιών από τυχόν βακτήρια και διατήρησή τους

Στο στάδιο του 14^{ου} πραγματικού φύλλου, από κάθε μεταφυτευμένο φυτάριο, χρησιμοποιήθηκαν τα πιο εύρωστα, νεαρά φύλλα μαρουλιού, τα οποία ακολούθησαν μια διαδικασία απολύμανσης από τυχόν μικροοργανισμούς που βρίσκονταν στην επιφάνειά τους. Στη συνέχεια, διατηρήθηκαν μέσα σε τρυβλία Petri για 3 ημέρες στον ειδικό θάλαμο ανάπτυξης (growth chamber). Η διαδικασία, είχε ως εξής (Wegulo & Vilchez, 2007):

1. Σε ένα γυάλινο ποτήρι ζέσεως προστέθηκε αιθανόλη (αιθυλική αλκοόλη – EtOH).
2. Σε ένα άλλο ποτήρι ζέσεως προστέθηκε 0,5% sodium hypochlorite (υποχλωριώδες νάτριο).
3. Τέλος, σε ένα τρίτο ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό.
4. Με μια ειδική λαβίδα (τσιμπίδα), πάρθηκαν τα νεαρά φύλλα μαρουλιού και καθένα χωριστά, εμβαπτίστηκαν στιγμιαία στην αιθανόλη, στη συνέχεια για 2

min στο υποχλωριώδες νάτριο και τελικά, τοποθετήθηκαν στο αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό μέχρι να ξεπλυθούν καλά.

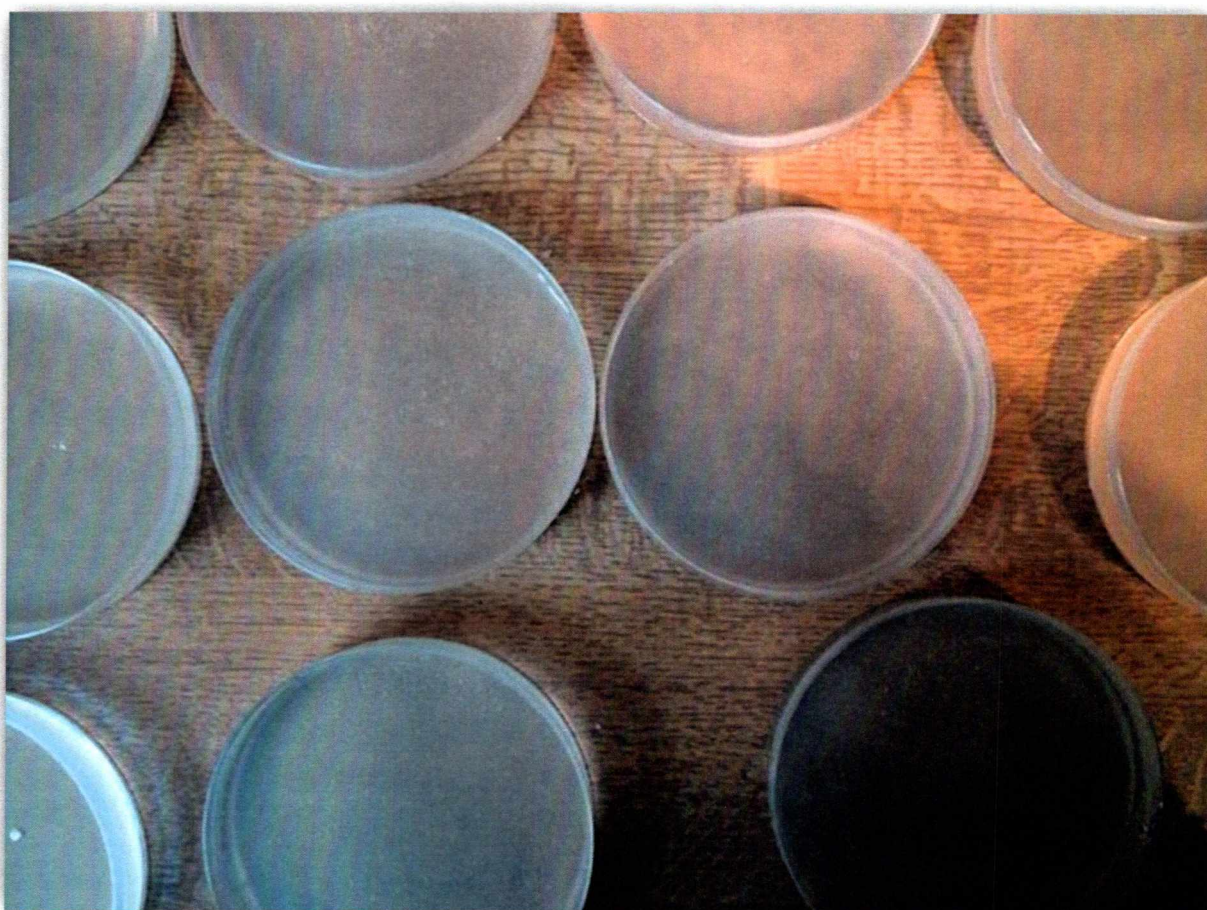
5. Σε τρυβλία Petri, στα οποία είχε τοποθετηθεί ειδικό αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί, αφέθηκαν τα φύλλα μαρουλιού για να στραγγίσουν καλά.
6. Στη συνέχεια, τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε άλλα τρυβλία Petri, τα οποία είχαν επιστρωθεί με water agar (WA).
7. Τέλος, για να διατηρηθούν και να επιβεβαιωθεί η απολύμανσή τους, μεταφέρθηκαν στο θάλαμο επώασης (chamber growth) για 3 ημέρες (Εικ.32).



Εικόνα 32: Διαδικασία αποστείρωσης των τρυφερών φύλλων μαρουλιού
(Πηγές: http://gr.clipartlogo.com/image/becherglas_116644.html;
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

3.5 Υπόστρωμα διατήρησης μαρουλιών

Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν σε τρυβλία επιστρωμένα με θρεπτικό υλικό water agar (Εικ.33).



Εικόνα 33: Επιστρωμένα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα water agar (WA)
(Πηγή: <http://www.jamiedobson.com/pointlessendeavour/archives/date/2012/04/10>)

3.6 Δραστικές Ουσίες

Οι δραστικές ουσίες και οι συγκεντρώσεις τους, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. Επίσης, παρατηρούνται και κάποια από τα εμπορικά σκευάσματα των δραστικών ουσιών, που κυκλοφορούν στο εμπόριο και είναι εγκεκριμένα για την αντιμετώπιση του *B. cinerea* σε κηπευτικές καλλιέργειες.

Πίνακας 7: Εμπορικά σκευάσματα και συγκεντρώσεις δραστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ευαισθησίας των απομονώσεων του *B. cinerea*

Εμπορικά Ονόματα Σκευασμάτων	Δραστική ουσία	Συγκέντρωση δ.ο. (%)
Teldor 50 WG Bayer CropScience	Fenhexamid (Fen) (Υδροξυανιλίδες)	0.075%
F-500 25 EC BASF	Pyraclostrobin (Pyr) (Στρομπιλουρίνες, QoI's)	0.01%
510F 50 WG BASF	Boscalid (Bos) (Καρβοξαμιδικά, SDHI's)	0.04%
Chorus 50 WG Syngenta	Cyprodinil (Cyp) (Ανιλινοπυριμιδίνες)	0.018% και 0.038%
Geoxe 50 WG Syngenta	Fludioxonil (Flud) (Φαινυλοπυρρόλες)	0.012% και 0.025%
Daconil 50 SC Syngenta	Chlorothalonil (Chl) (Χλωρονιτρίλια)	0.15%
Ohayo 50 SC ISK Biosciences	Fluazinam (Flm) (Δινιτροανιλίνες)	0.02%

Οι δόσεις των δραστικών ουσιών είναι αντίστοιχες με αυτές που συστήνονται από τους παρασκευαστές των εμπορικών σκευσμάτων. Εξαιρέση αποτέλεσαν το cyprodinil και το fludioxonil, τα οποία εφαρμόστηκαν και στη μισή από τη συνιστώμενη συγκέντρωση δραστικής ουσίας. Αυτό έγινε διότι σε προηγούμενη μελέτη, τα εν λόγω μυκητοκτόνα, εφαρμόστηκαν σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια μαρουλιών στις κανονικές δόσεις και διαπιστώθηκε ότι προκλήθηκε φυτοτοξικότητα στα φυτάρια.

3.7 Διαδικασία Τεχνητής Μόλυνσης με Μυκήλιο

1^ο Βήμα

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν οι μεταφορές των δέκα επιλεγμένων απομονώσεων, σε τρυβλία Petri επιστρωμένα με PDA. Οι μεταφορές αυτές, αφέθηκαν στο θάλαμο επώασης για 3 ημέρες, έτσι ώστε να δημιουργηθεί μυκήλιο.

Στη συνέχεια, με φελλοτρυπητή (cork borer) διαμέτρου 5mm, αφαιρέθηκαν κυκλικά τμήματα μυκηλίων από την περιφέρεια των αναπτυσσόμενων αποικιών και μεταφέρθηκαν στο κέντρο νέων επιστρωμένων με PDA τρυβλίων Petri. Τα εμβόλια, τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα στο κέντρο των τρυβλίων Petri, κατά τρόπο δηλαδή τέτοιο, ώστε το μυκήλιο να εφάπτεται στο υπόστρωμα.

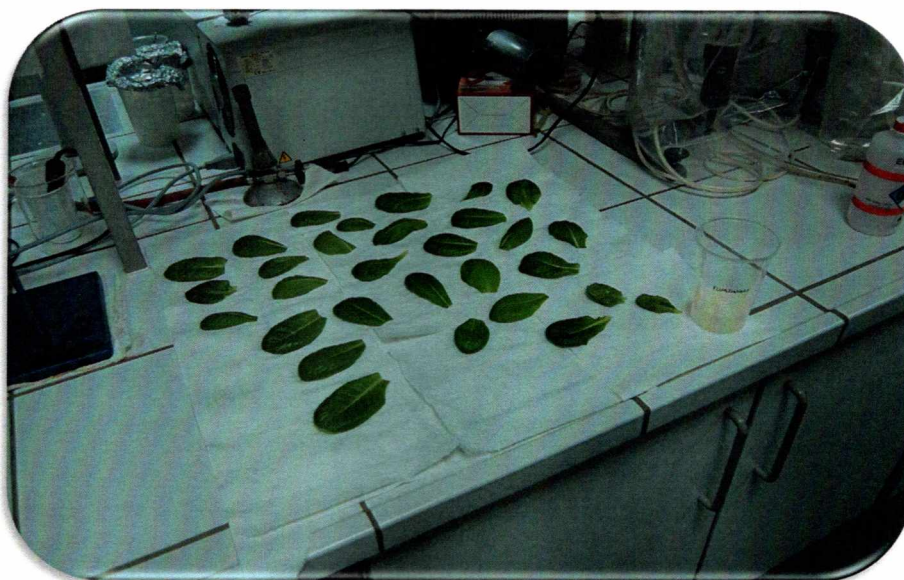
Μετά από 3 ημέρες επώασης, παρατηρήθηκε κυκλική ομοιομορφία των μυκηλίων των απομονώσεων του *Botrytis cinerea* (Εικ.35).



Εικόνα 35: Φελλοτρυπητής - cork borer (αριστερά) και κυκλική ανάπτυξη μυκηλίου, στην περιφέρεια του οποίου εμφανίζονται οι αποσπώμενοι δίσκοι μυκηλίου (5mm/δίσκος μυκηλίου) (δεξιά)
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

2^ο Βήμα

Αρχικά, επιστρώθηκαν τρυβλία Petri με αποστειρωμένο υπόστρωμα Water Agar. Εν συνεχεία, αφαιρέθηκαν τα πιο τρυφερά φύλλα των μαρουλιών της ποικιλίας Penelope RZ, τα οποία απολυμάνθηκαν με τη μέθοδο που έχει ήδη προαναφερθεί (Εικ. 32). Με το πέρας της απολύμανσης, τα φύλλα εμβαπτίστηκαν σε υδατικό αιώρημα μυκητοκτόνων, στις συνιστώμενες για ψεκάσμο συγκεντρώσεις σε δραστική ουσία κι έπειτα από καλό στέγνωμα (Εικ. 36), τοποθετήθηκαν στα τρυβλία.

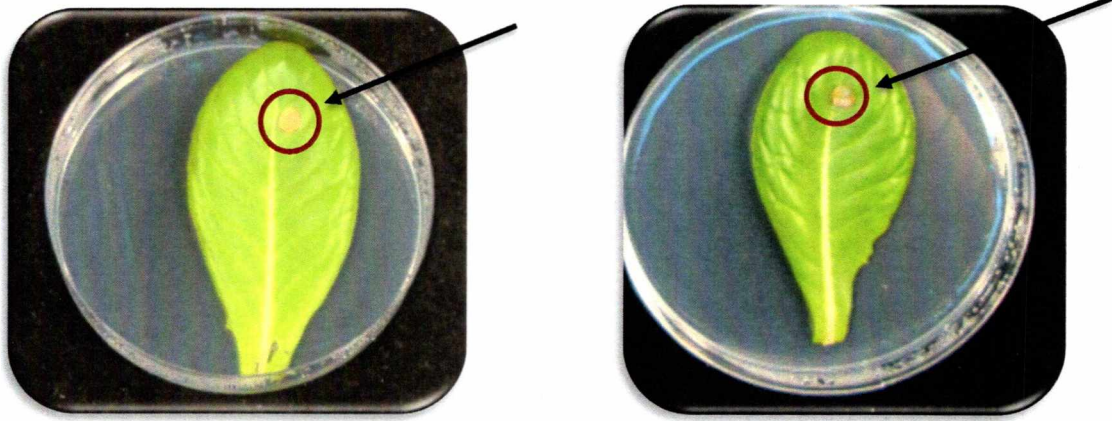


Εικόνα 36: Στέγνωμα αποστειρωμένων φύλλων μαρουλιού κατόπιν εμβάπτισης σε υδατικό αιώρημα μυκητοκτόνου
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

3^ο Βήμα

Σε κάθε απομόνωση του *Botrytis cinerea*, δημιουργήθηκαν περιμετρικά δίσκοι μυκηλίου διαμέτρου 5mm (Εικ.35). Οι δίσκοι μυκηλίου, τοποθετήθηκαν ανεστραμμένοι στην πάνω επιφάνεια των φύλλων, κατά τρόπο δηλαδή τέτοιο, ώστε το μυκήλιο να εφάπτεται στα φύλλα. (Εικ.37).

Για καθεμιά απομόνωση, έγινε επανάληψη τρεις φορές. Συνολικά, οι απομονώσεις ήταν 10 και οι δραστικές ουσίες 10 (Πιν.8). Οπότε χρειάστηκαν 300 τρυβλία Petri επιστρωμένα με WA και 300 τρυφερά φύλλα μαρουλιού.



Εικόνα 37: Δίσκοι μυκηλίου στην πάνω επιφάνεια φύλλων μαρουλιού εμβαπτισμένων σε μυκητοκτόνα
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

4^ο Βήμα

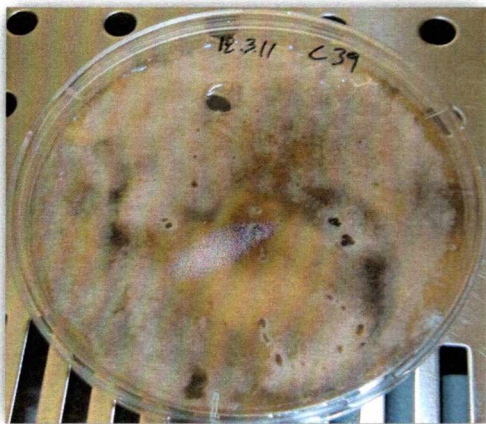
Τα τρυβλία Petri, τοποθετήθηκαν για τρεις ημέρες σε θάλαμο θερμοκρασίας 18°C και 12 h φωτισμού, έτσι ώστε να παρατηρηθεί η αποτελεσματικότητα των μυκητοκτόνων. Με την ολοκλήρωση λοιπόν, της επώασης μετρούνταν η διάμετρος (mm) των αποικιών κάθε απομόνωσης για κάθε μυκητοκτόνο, σε σχέση με το μάρτυρα. Σημειώνεται ότι ο μάρτυρας για την κάθε απομόνωση, ακολουθούσε την ίδια διαδικασία, χωρίς όμως να εμβαπτιστεί σε υδατικό αιώρημα μυκητοκτόνου.

Τα αποτελέσματα, αναφέρονται αναλυτικά στα παρακάτω κεφάλαια.

3.8 Διαδικασία Τεχνητής Μόλυνσης με Αιώρημα Σπορίων

1^ο Βήμα

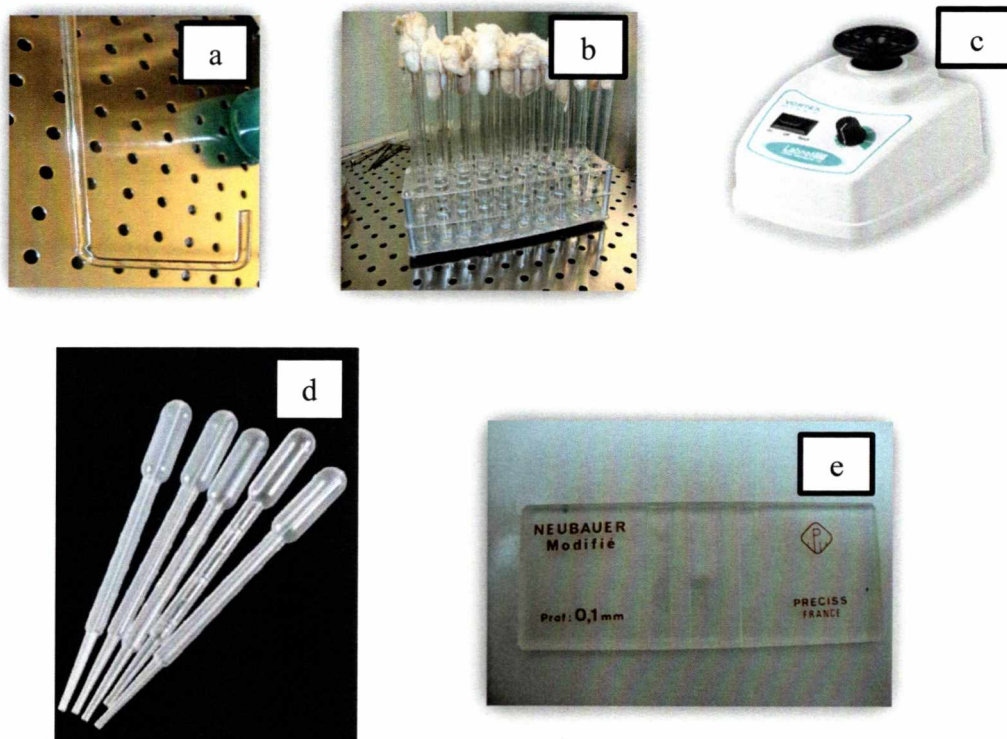
Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν οι μεταφορές των δέκα επιλεγμένων απομονώσεων, σε τρυβλία Petri επιστρωμένα με PDA. Οι μεταφορές αυτές, αφέθηκαν στο θάλαμο επώασης για 6 ημέρες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν για μια ημέρα σε black light, έτσι ώστε να επιτευχθεί η σποριοποίησή τους (Εικ.38).



Εικόνα 38: Απομόνωση η οποία έχει σποριοποιήσει
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

2^ο Βήμα

Σε κάθε τρυβλίο με τις σποριοποιημένες απομονώσεις, προσθέτονταν από 10 ml απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό (Εικ.39b). Στη συνέχεια, με ειδική γυάλινη ράβδο (Εικ.39a) και κυκλικές κινήσεις διασπείρονταν τα σπόρια μέσα στο νερό. Το αιώρημα αυτό, μεταφερόταν σε δοκιμαστικό σωλήνα, με διήθηση των σπορίων μέσω φαρμακευτικής γάζας (τουλπάνι), η οποία είχε κατάλληλη διάμετρο πόρων. Ακολουθούσε πολύ καλή ανάδευση (περίπου 1 min) με Vortex (Εικ. 39c), ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφος καταμερισμός των σπορίων. Η μέτρηση της περιεκτικότητας του αιωρήματος σε σπόρια έγινε με αιματοκυττόμετρο τύπου Neubauer (Poly-Optic, Bad Blankenburg, Germany) (Εικ.39e). Από το αιώρημα σπορίων λοιπόν, που προέκυπτε με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur (Εικ. 39d), τοποθετούνταν στο αιματοκυττόμετρο δυο σταγόνες (30μl/σταγόνα).



Εικόνα 39: **a.** Γυάλινη ράβδος **b.** Δοκιμαστικοί σωλήνες με 10 ml απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό **c.** Vortex **d.** Πιπέτες Pasteur **e.** Αιματοκυττόμετρο
(Πηγές: a, b, e: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, c: <http://www.totallab.co.nz/productfull/?prodid=1446>
d: <http://www.atomizer.gr/static/871.html>)

Στη συνέχεια, το αιματοκυττόμετρο τοποθετούνταν στο μικροσκόπιο. Κάθε πεδίο του αιματοκυττόμετρου, έπρεπε να έχει 5×10^4 /ml σπόρια. Σε περίπτωση, που το αιώρημα είχε περισσότερα, τότε γινόταν αραιώση.

3^ο Βήμα

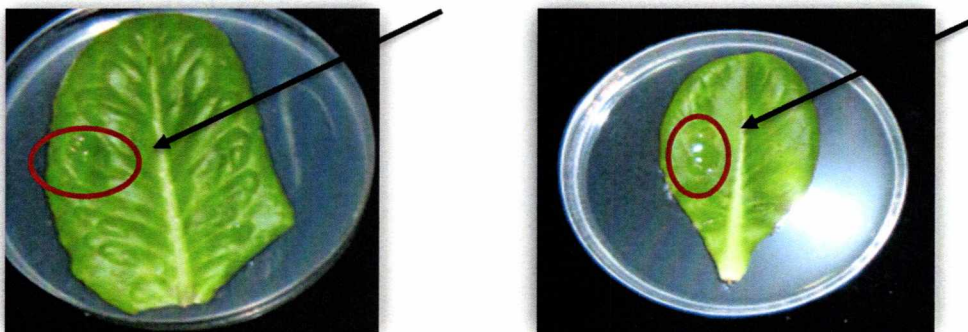
Μόλις επιτυγχάνονταν η ιδανική συγκέντρωση σπορίων του *B. cinerea*, τοποθετούνταν πάνω στα τρυφερά φύλλα μαρουλιού από δυο σταγόνες του αιωρήματος (Εικ.40). Στη συνέχεια, τα τρυβλία μεταφέρονταν σε θάλαμο θερμοκρασίας 18°C και 12 h φωτισμού, για 6 ημέρες, έτσι ώστε να παρατηρηθεί η μόλυνση ή μη των φύλλων.

Η αποτελεσματικότητα των βοτρυδιοκτόνων, διαπιστώθηκε σε σχέση με την ανάπτυξη κηλίδας προσβολής σε σχέση με το μάρτυρα. Σημειώνεται ότι ο μάρτυρας

για την κάθε απομόνωση, ακολουθούσε την ίδια διαδικασία, χωρίς όμως να εμβαπτιστεί σε υδατικό αιώρημα μυκητοκτόνου.

Για καθεμιά απομόνωση, έγινε επανάληψη τρεις φορές. Συνολικά, οι απομονώσεις ήταν 10 και οι δραστικές ουσίες 10. Οπότε συνολικά, χρειάστηκαν 300 τρυβλία Petri επιστρωμένα με WA και 300 τρυφερά φύλλα μαρουλιού απολυμασμένα και εμβαπτισμένα στα εν λόγω μυκητοκτόνα.

Τα αποτελέσματα αναφέρονται στα παρακάτω κεφάλαια.



Εικόνα 40: Σταγόνες αιωρήματος σπορίων στην πάνω επιφάνεια φύλλων μαρουλιού εμβαπτισμένων σε μυκητοκτόνα
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

3.9 Στατιστική Επεξεργασία

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, μετρήθηκε η διάμετρος κηλίδας προσβολής στα νεαρά φύλλα μαρουλιού και συγκρίθηκε με αυτή του μάρτυρα της κάθε απομόνωσης, για το κάθε μυκητοκτόνο χωριστά.

Τα αριθμητικά δεδομένα, μεταφέρθηκαν στο στατιστικό πακέτο S.P.S.S. 20 κι αναλύθηκαν με το One-Way ANOVA test (Duncan post-hoc test). Από τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν οι σημαντικές διαφορές σε σχέση με το μάρτυρα (Σημαντικότητα: P-values $\leq 0,05$).

4. Αποτελέσματα

Η αποτελεσματικότητα των βοτρυδιοκτόνων, αξιολογήθηκε με μέτρηση της διαμέτρου ανάπτυξης της κηλίδας προσβολής του παθογόνου, έπειτα από 3 ημέρες επώασης σε θάλαμο θερμοκρασίας 18°C και 12 h φωτισμού, όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα ανεστραμμένος δίσκος μυκηλίου, διαμέτρου 5mm. Όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα αιώρημα σπορίων (5×10^4 /ml), η αξιολόγηση της προσβολής έγινε έπειτα από 6 ημέρες επώασης.

Συγκεκριμένα, οι μολύνσεις με ανεστραμμένο δίσκο μυκηλίου πραγματοποιήθηκαν στις 21-12-2011 και η μέτρηση των αποτελεσμάτων έγινε στις 24-12-2011. Ομοίως, οι μολύνσεις με αιώρημα σπορίων πραγματοποιήθηκαν στις 05-01-2012, 08-05-2012 και 07-06-2012 και οι μετρήσεις έγιναν στις 08-01-2012, 11-05-2012 και 10-06-2012, αντίστοιχα.

Πίνακας 8: Έλεγχος αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνων *in situ* κατά διαφορετικής ευαισθησίας απομονώσεων του *B. cinerea* όταν χρησιμοποιήθηκε μόλυσμα μυκηλίου

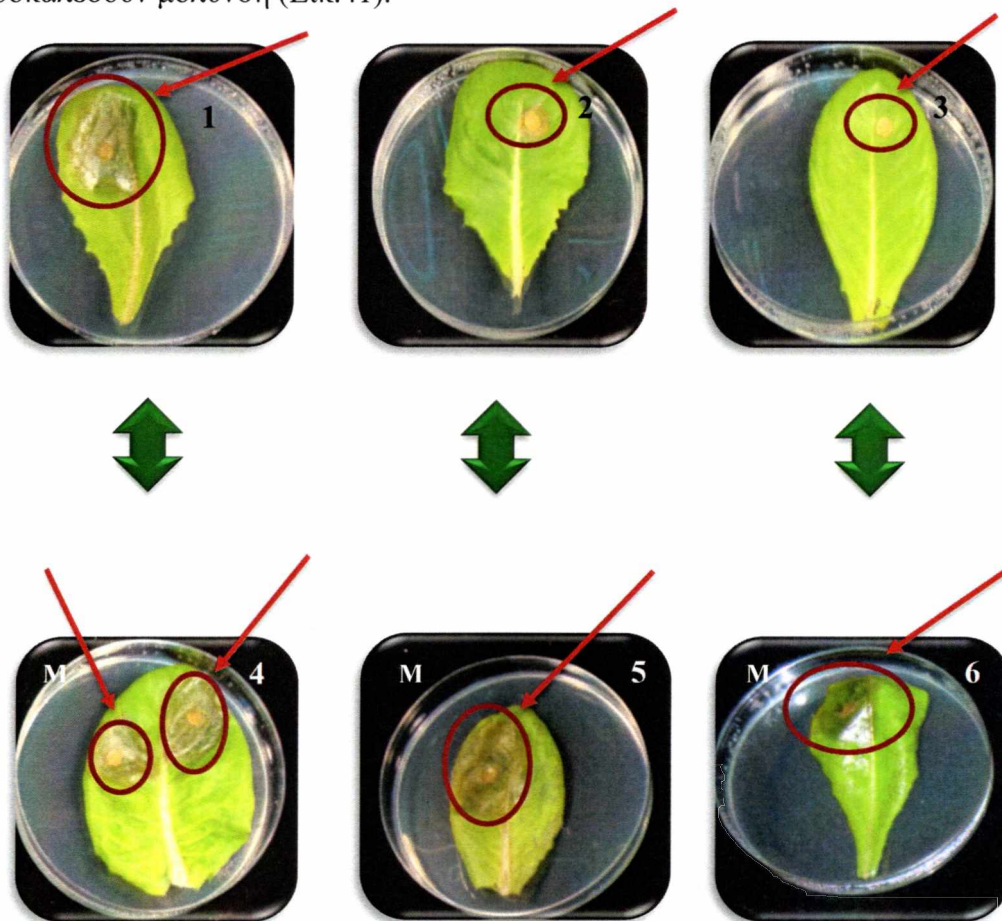
Διαφορετικοί Φαινότυποι για τον έλεγχο ευαισθησίας στα διάφορα μυκητοκτόνα																	
Μετ/σεις	A56	A7	A59	A91	B18	B58	C1	C7	C14	C39							
Fen (0.075%)	0.3ab (±0.36)	0ab (±0)	0.76b (±0.05)	R	1.2d (±0.26)	0.43b (±0.15)	0.1ab (±0.17)	0a (±0)	0.93de (±0.3)	HR	1b (±0.1)	R	1.16e (±0.28)	HR			
Pyr (0.01%)	0.63b (±0.11)	0.13b (±0.23)	R	0.76b (±0.2)	R	0.73abcd (±0.2)	1.06c (±0.11)	R	0.1ab (±0.17)	0.8b (±0.1)	R	0.76cd (±0.05)	HR	1b (±0.17)	R	0.93cd (±0.15)	HR
Bos (0.04%)	0a (±0)	0.6a (±0.11)	R	0.66b (±0.15)		0.73abcd (±0.05)	MR	1.3cd (±0.26)	R	0a (±0)	1.5c (±0.2)	R	0.63bcd (±0.23)	HR	0.86b (±0.05)	0a (±0)	
Cyp (0.018%)	0.66b (±0.28)	0.23ab (±0.25)		0.73b (±0.11)	R	0.63abc (±0.05)		1.13cd (±0.11)	R	0.23abc (±0.4)	0.16a (±0.28)	R	0.46bc (±0.05)	HR	0.96b (±0.15)	R	1.13de (±0.23)
(0.038%)	0.7b (±0.17)	0.26ab (±0.25)		0.66b (±0.05)	R	1.03cd (±0.2)		0.4b (±0.17)	R	0.6c (±0)	0.83b (±0.15)	R	0.73bcd (±0.15)	HR	1b (±0.1)	R	0.46b (±0.05)
Flud (0.012%)	0.36ab (±0.05)	0.3a (±0.05)		0.76b (±0.2)	MR	0.53ab (±0.4)		0.36b (±0.25)		0a (±0)	MR	0.2a (±0.1)	0a (±0)		1.03b (±0.2)		0.86cd (±0.15)
(0.025%)	0.46ab (±0.4)	0.3a (±0.05)		0.76b (±0.11)	MR	0.76abcd (±0.25)		0a (±0)		0.13ab (±0.23)	MR	0a (±0)	0a (±0)		0.23a (±0.2)		0.36b (±0.32)
Chl (0.15%)	0.43ab (±0.4)	0.6a (±0.11)		0.73b (±0.11)		0.9abcd (±0.3)		0.56b (±0.11)		0.43bc (±0.11)		0.26a (±0.23)	0.66bcd (±0.2)		0.9b (±0.17)		0.63bc (±0.2)
Flm (0.02%)	0.56ab (±0.55)	0.33ab (±0.2)		0.13a (±0.23)		0.43a (±0.4)		0.6a (±0.11)		0.43bc (±0.35)		0.2a (±0.26)	0.4b (±0.2)		0.4a (±0.34)		1d (±0.1)
Μάρτυρας	0.66b (±0.57)	0.53b (±0.25)		0.93b (±0.11)		0.97bcd (±0.05)		1.4d (±0)		0.43bc (±0.11)		1b (±0.2)	1.16e (±0.25)		1.13b (±0.05)		1.4e (±0.17)

Οι αριθμοί που υπάρχουν στις στήλες είναι οι μέσες διάμετροι (± τυπική απόκλιση) κηλίδων προσβολής των νεαρών φύλλων μαρουλιού. Αυτοί που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν σημαντικά, σύμφωνα με το Duncan post hoc test; Σημαντικότητα: p-values ≤ 0.05.

Fen: Fenhexamid, Pyr: Pyraclostrobin, Bos: Boscalid, Flm: Fluazinam, Chl: Chlorothalonil, Cyp: Cyprodinil, Flud: Fludioxonil, Ben: Carbendazim, Dic: Iprodione, A56: Wild-type, A7: PyrRBosRDicMR, A59: FenRPyrRCypRFludMRBenHRDicMR, A91: BosMR, B18: PyrRBosRCypRDicMR, B58: FludMRDicMR, C1: PyrRBosRCypRBenHRDicMR, C7: FenHRPyrHR BosHRCypHRDicMR, C14: FenRPyrRCypRBenHRDicMR, C39: FenHRPyrHRBenHRDicMR
R: Ανθεκτικότητα, MR: Μέτρια ανθεκτικότητα, HR: Υψηλή ανθεκτικότητα

4.1 Fenhexamid

Οι απομονώσεις, που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα *in vitro* στο fenhexamid ήταν οι A59, C7, C14 και C39, οι οποίες ανέπτυξαν κηλίδα προσβολής παρόμοια με αυτή του μάρτυρα και της απομόνωσης A56 (άγριου τύπου) στα νεαρά φύλλα μαρουλιού, όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα μυκήλιο. Από τις υπόλοιπες απομονώσεις, η A7 και η B58, προκάλεσαν μερική προσβολή, ενώ οι υπόλοιπες τρεις (A91, B18, C1), που παρουσίασαν ευαισθησία *in vitro* στο συγκεκριμένο μυκητοκτόνο, απέτυχαν να προκαλέσουν μόλυνση (Εικ.41).

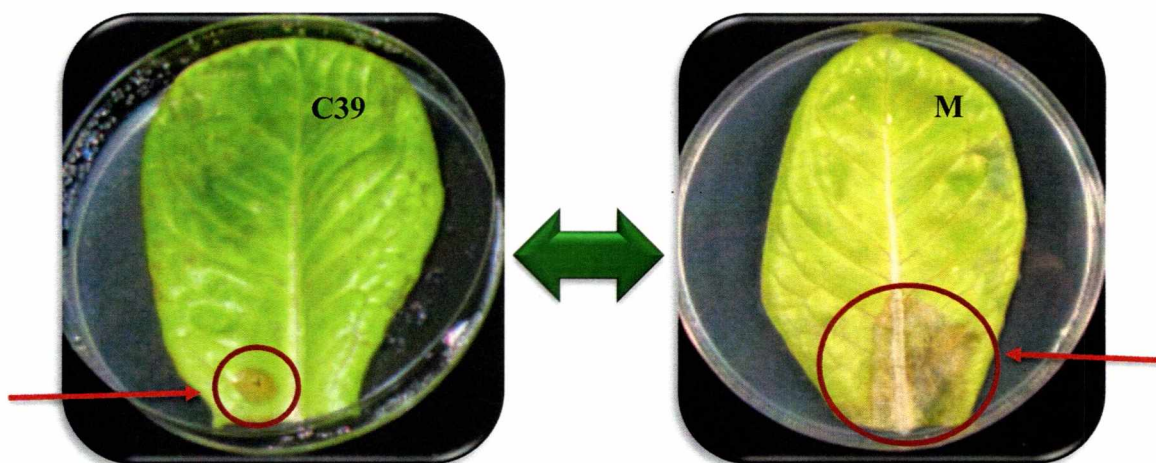


Εικόνα 41: Μολύνσεις με ανεστραμμένο μυκηλιακό δίσκο του *Botrytis cinerea* σε εμβαπτισμένα φύλλα μαρουλιού στο μυκητοκτόνο fenhexamid (επάνω) και μολύνσεις στους μάρτυρες (κάτω).

1. C7: Απομόνωση με πολλαπλή ανθεκτικότητα ($Fen^{HR}Pyr^{HR}Bos^{HR}Cyp^{HR}Dic^{MR}$)
2. B58: Απομόνωση με μερική μυκηλιακή ανάπτυξη ($Flud^{MR}Dic^{MR}$)
3. B18: Ευαίσθητη απομόνωση ($Pyr^RBos^RCyp^RDic^{MR}$)
4. Μάρτυρας της απομόνωσης C7 ($Fen^{HR}Pyr^{HR}Bos^{HR}Cyp^{HR}Dic^{MR}$)
5. Μάρτυρας της απομόνωσης B58 ($Flud^{MR}Dic^{MR}$)
6. Μάρτυρας της απομόνωσης B18 ($Pyr^RBos^RCyp^RDic^{MR}$)

(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

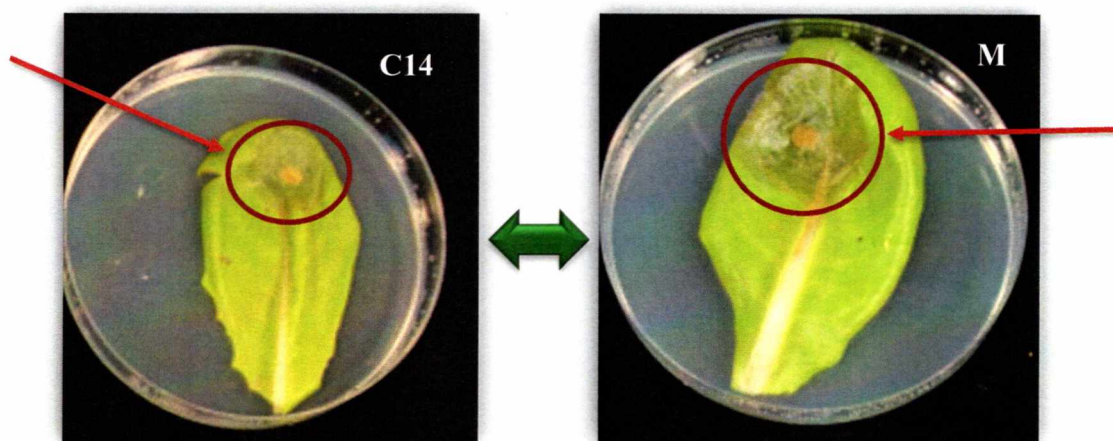
Το fenhexamid, στις ανθεκτικές απομονώσεις A59 και C14, των φαινοτύπων $Fen^R Pyr^R Cyp^R Flud^{MR} Ben^{HR} Dic^{MR}$ και $Fen^R Pyr^R Cyp^R Ben^{HR} Dic^{MR}$ αντίστοιχα, δεν παρεμπόδισε την προσβολή, όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα αιώρημα σπορίων. Ομοίως και στην υψηλής ανθεκτικότητας απομόνωση C39 του φαινοτύπου $Fen^{HR} Pyr^{HR} Ben^{HR} Dic^{MR}$. Αντιθέτως, στην απομόνωση C7 του φαινοτύπου $Fen^{HR} Pyr^{HR} Bos^{HR} Cyp^{HR} Dic^{MR}$, η οποία εμφάνιζε υψηλή ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο μυκητοκτόνο παρατηρήθηκε μεν μόλυνση από το αιώρημα σπορίων, όμως η κηλίδα προσβολής ήταν περιορισμένη, σε σχέση με αυτή του μάρτυρα (Εικ.42). Οι υπόλοιπες απομονώσεις διέφεραν σημαντικά σε σχέση με το μάρτυρα, λόγω της ευαισθησίας τους στο fenhexamid. Εξαιρέση από τις ευαίσθητες απομονώσεις αποτέλεσε η A7, η οποία στη συνιστώμενη συγκέντρωση δραστικής ουσίας, αναπτύχθηκε χωρίς καμία παρεμπόδιση.



Εικόνα 42: Μόλυνση με αιώρημα σπορίων της ανθεκτικής στο fenhexamid απομόνωσης C7 σε εμβαπτισμένα φύλλα μαρουλιού (αριστερά) και ο μάρτυρας της απομόνωσης (δεξιά)
C7: $Fen^{HR} Pyr^{HR} Bos^{HR} Cyp^{HR} Dic^{MR}$
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

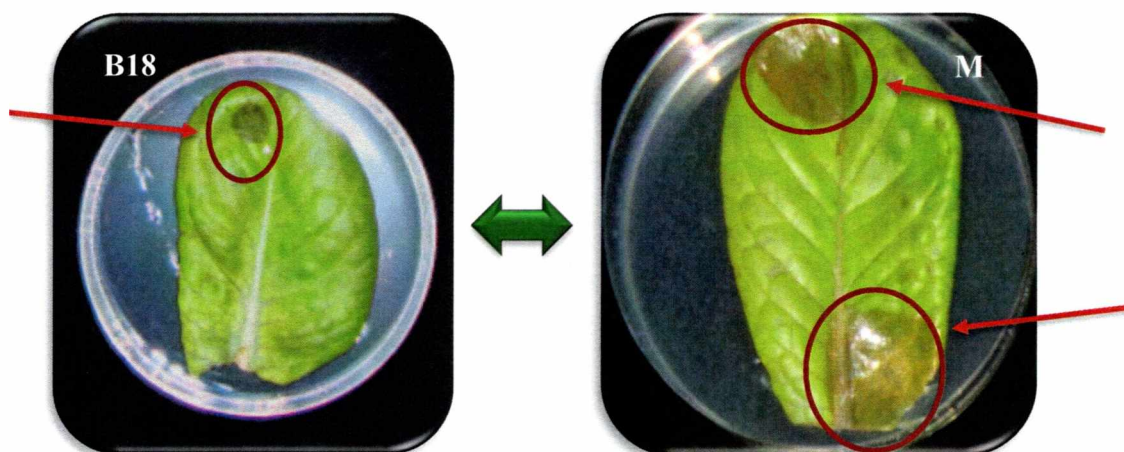
4.2 Pyraclostrobin

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος για το pyraclostrobin, έδειξε ότι σχεδόν όλες οι ανθεκτικές απομονώσεις στο pyraclostrobin, ανέπτυξαν κηλίδα προσβολής που δε διέφερε από αυτό του μάρτυρα (Εικ.43), ενώ οι δύο υψηλής ανθεκτικότητας απομονώσεις C7 ($Fen^{HR}Pyr^{HR}Bos^{HR}Cyp^{HR}Dic^{MR}$) και C39 ($Fen^{HR}Pyr^{HR}Ben^{HR}Dic^{MR}$), είχαν την ίδια διάμετρο κηλίδας προσβολής σε σχέση με το μάρτυρα. Κηλίδα προσβολής όμως, ανέπτυξε και η απομόνωση A91 (Bos^{MR}).



Εικόνα 43: Κηλίδα προσβολής της απομόνωσης C14 ($Fen^R Pyr^R Cyp^R Ben^{HR} Dic^{MR}$) σε εμβαπτισμένο φύλλο μαρουλιού στο pyraclostrobin (αριστερά) και ο μάρτυρας της απομόνωσης C14 ($Fen^R Pyr^R Cyp^R Ben^{HR} Dic^{MR}$) (δεξιά)
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

Κατά τον έλεγχο της ευαισθησίας των απομονώσεων στο pyraclostrobin, με μόλυσμα αιώρημα σποριών, παρατηρήθηκε μόλυνση στις ανθεκτικές στο pyraclostrobin απομονώσεις A7 και A59, των φαινοτύπων $Pyr^R Bos^R Dic^{MR}$ και $Fen^R Pyr^R Cyp^R Flud^{MR} Ben^{HR} Dic^{MR}$, αντίστοιχα. Στις υπόλοιπες δυο ανθεκτικές απομονώσεις B18 ($Pyr^R Bos^R Cyp^R Dic^{MR}$) και C1 ($Pyr^R Bos^R Cyp^R Ben^{HR} Dic^{MR}$), παρατηρήθηκε κηλίδα προσβολής με περιορισμένη όμως ανάπτυξη, σε σχέση με το μάρτυρα. Η C7 ($Fen^{HR} Pyr^{HR} Bos^{HR} Cyp^{HR} Dic^{MR}$) και η C39 ($Fen^{HR} Pyr^{HR} Ben^{HR} Dic^{MR}$) που ήταν χαρακτηρισμένες ως υψηλής ανθεκτικότητας απομονώσεις *in vitro*, εμφάνισαν παρόμοια αποτελέσματα με τη B18 (Εικ.44) και C1. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε πλήρης παρεμπόδιση ανάπτυξης κηλίδας προσβολής των ευαίσθητων απομονώσεων A91, B58 των φαινοτύπων Bos^{MR} και $Flud^{MR} Dic^{MR}$, αντίστοιχα και του άγριου τύπου A56.

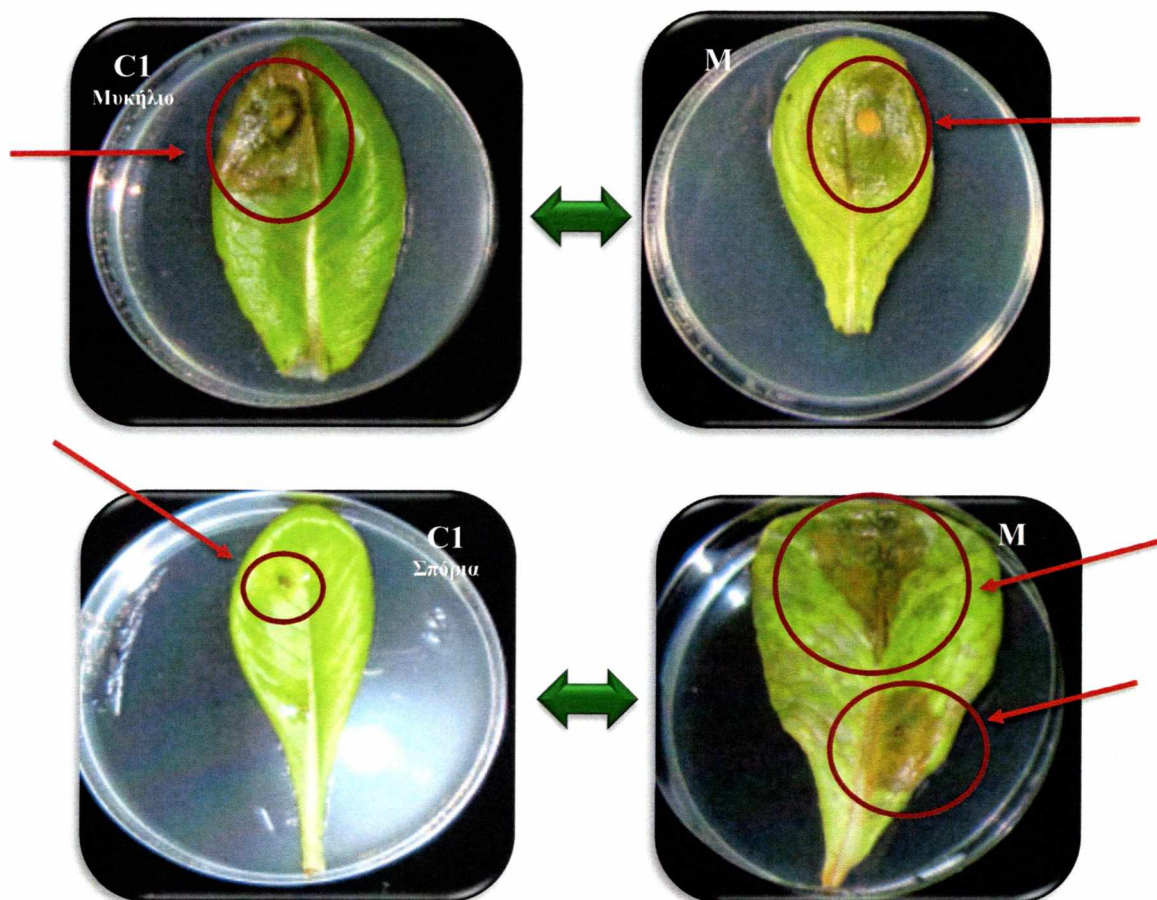


Εικόνα 44: Μόλυνση με αιώρημα σπορίων της ανθεκτικής στο ryaclostrobin απομόνωσης B18 ($\text{Pyg}^{\text{R}}\text{Bos}^{\text{R}}\text{Cyp}^{\text{R}}\text{Dic}^{\text{MR}}$) σε εμβαπτισμένα φύλλα μαρουλιού (αριστερά) και ο μάρτυρας της απομόνωσης (δεξιά).

(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

4.3 Boscalid

Από τις 10 απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα, μόνο οι τρεις εμφάνιζαν ευαισθησία *in vitro* στο boscalid. Οι ανθεκτικές απομονώσεις A7 ($\text{Pyg}^{\text{R}}\text{Bos}^{\text{R}}\text{Dic}^{\text{MR}}$) και C1 ($\text{Pyg}^{\text{R}}\text{Bos}^{\text{R}}\text{Cyp}^{\text{R}}\text{Ben}^{\text{HR}}\text{Dic}^{\text{MR}}$) παρουσίασαν ανάπτυξη κηλίδας προσβολής, όμως με σχετικά μικρή διάμετρο. Ανάπτυξη κηλίδας προσβολής παρατηρήθηκε στη μετρίως ανθεκτική απομόνωση A91 (Bos^{MR}) και στην υψηλής ανθεκτικότητας απομόνωση C7 ($\text{Fen}^{\text{HR}}\text{Pyg}^{\text{HR}}\text{Bos}^{\text{HR}}\text{Cyp}^{\text{HR}}\text{Dic}^{\text{MR}}$). Κατά τον έλεγχο με αιώρημα σπορίων στις ίδιες απομονώσεις, διαπιστώθηκαν σημειακές μολύνσεις (Εικ.45). Σε όλες τις υπόλοιπες απομονώσεις (A59, A91, B18, B58, C14, C39), το boscalid παρεμπόδισε την ανάπτυξη κηλίδας προσβολής.

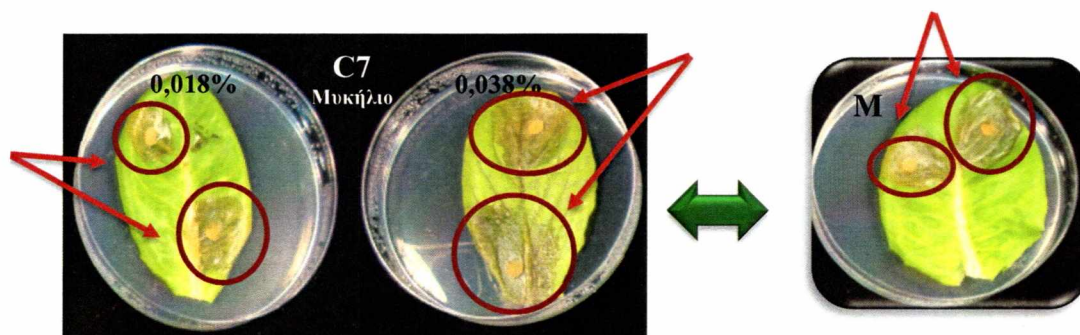


Εικόνα 45: Ανάπτυξη κηλίδας προσβολής σε φύλλα μαρουλιού εμβαπτισμένα στο boscalid, που μολύνθηκαν με την πολλαπλής ανθεκτικότητας απομόνωση C1 του φαινοτύπου $\text{Pyr}^{\text{R}}\text{Bos}^{\text{R}}\text{Cyp}^{\text{R}}\text{Ben}^{\text{HR}}\text{Dic}^{\text{MR}}$, τόσο όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα μυκήλιο (επάνω), όσο και αιώρημα σπορίων (κάτω), ενώ στη δεξιά πλευρά παρατηρούνται οι μάρτυρες της απομόνωσης C1 ($\text{Pyr}^{\text{R}}\text{Bos}^{\text{R}}\text{Cyp}^{\text{R}}\text{Ben}^{\text{HR}}\text{Dic}^{\text{MR}}$) (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

4.4 Cyprodinil

Τα αποτελέσματα των δοκιμών όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα ανεστραμμένος δίσκος μυκηλίου, έδειξαν ότι τόσο στη μισή (0,018%), όσο και στην κανονική (0,038%) δόση η υψηλής ανθεκτικότητας στο cyprodinil απομόνωση C7 ($\text{Fen}^{\text{HR}}\text{Pyr}^{\text{HR}}\text{Bos}^{\text{HR}}\text{Cyp}^{\text{HR}}\text{Dic}^{\text{MR}}$), καθώς και οι τρεις από τις τέσσερις ανθεκτικές απομονώσεις (A59, C1, C14) ανέπτυξαν κηλίδα προσβολής που δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά από αυτό του μάρτυρα. Η τέταρτη ανθεκτική απομόνωση B18 του φαινοτύπου $\text{Pyr}^{\text{R}}\text{Bos}^{\text{R}}\text{Cyp}^{\text{R}}\text{Dic}^{\text{MR}}$, παρουσίασε κηλίδα προσβολής σε συγκέντρωση 0,018% δραστικής ουσίας, ενώ σε συγκέντρωση 0,038% η διάμετρος ανάπτυξης περιορίστηκε αισθητά. Παρόμοια ανάπτυξη προσβολής στη μισή δόση παρατηρήθηκαν και στις απομονώσεις A7, B58 και C39.

Σχετικά με την αντίδραση των 10 απομονώσεων στο cyprodinil, όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα αιώρημα σπορίων του *Botrytis cinerea*, διαπιστώθηκε ότι στις έξι απομονώσεις A56 (άγριου τύπου), C1 (Pyr^RBos^RCyp^RBen^{HR}Dic^{MR}), C14 (Fen^RPyr^RCyp^RBen^{HR}Dic^{MR}), C39 (Fen^{HR}Pyr^{HR}Ben^{HR}Dic^{MR}), B18 (Pyr^RBos^RCyp^RDic^{MR}) και B58 (Flud^{MR}Dic^{MR}) υπήρξε πλήρης παρεμπόδιση μόλυνσης και στις δυο συγκεντρώσεις δραστικής ουσίας. Από τις έξι αυτές, οι τρεις ήταν χαρακτηρισμένες ως ανθεκτικές στο μυκητοκτόνο (C1, C14, B18), ενώ οι υπόλοιπες τρεις (A56, C39, B58) ήταν ευαίσθητες *in vitro*. Ανάπτυξη προσβολής όμως, παρατηρήθηκε στην ανθεκτική στο cyprodinil απομόνωση A59 του φαινοτύπου Fen^RPyr^RCyp^RFlud^{MR}Ben^{HR}Dic^{MR}, τόσο στη συγκέντρωση 0,018%, όσο και στη συγκέντρωση 0,038%. Η A7 απομόνωση του φαινοτύπου Pyr^RBos^RDic^{MR}, προκάλεσε μόλυνση μόνο στην περίπτωση που τα φύλλα εμβαπτίστηκαν στη μισή από τη συνιστώμενη δόση μυκητοκτόνου (0,018%). Η απομόνωση A91 (Bos^{MR}) δε διέφερε σημαντικά σε σχέση με το μάρτυρα, καθώς ανέπτυξε κηλίδα προσβολής και στις δυο συγκεντρώσεις δραστικής ουσίας. Τέλος, στην υψηλής ανθεκτικότητας στο cyprodinil απομόνωση C7 του φαινοτύπου Fen^{HR}Pyr^{HR}Bos^{HR}Cyp^{HR}Dic^{MR}, παρατηρήθηκε σημειακή μόλυνση.



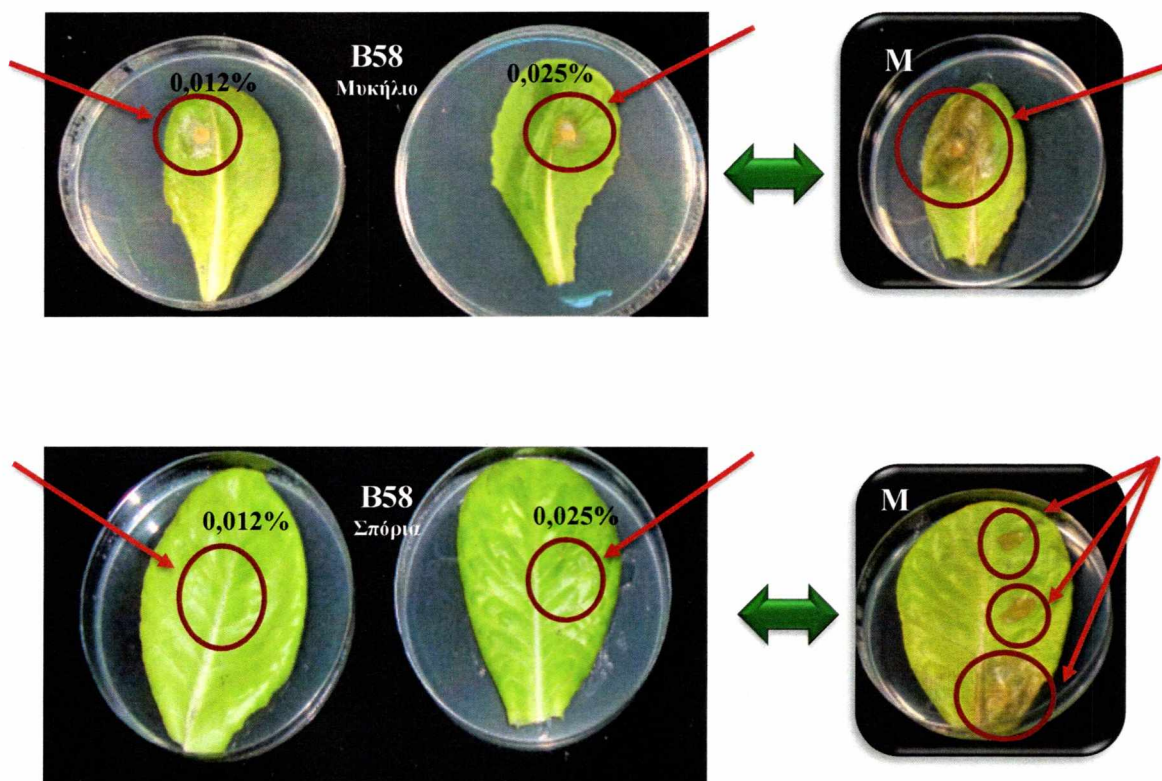
Εικόνα 46: Ανάπτυξη κηλίδας προσβολής της υψηλής ανθεκτικότητας στο cyprodinil απομόνωσης C7 του φαινοτύπου Fen^{HR}Pyr^{HR}Bos^{HR}Cyp^{HR}Dic^{MR}, σε εμβαπτισμένα φύλλα μαρουλιού τόσο στη μισή (0,018%), όσο και στην κανονική (0,038%) συγκέντρωση δραστικής ουσίας. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

4.5 Fludioxonil

Τα αποτελέσματα της μελέτης, έδειξαν ότι η ανθεκτική απομόνωση A59 εμφάνισε ανάπτυξη προσβολής τόσο στη μισή (0,012%), όσο και στη συνιστώμενη δόση (0,025%) του μυκητοκτόνου. Αντίθετα, το fludioxonil παρεμπόδισε την κηλίδα προσβολής στη μετρίως ανθεκτική απομόνωση B58 (Flud^{MR}Dic^{MR}) και στις δυο δόσεις (Εικ.47). Επίσης, το μυκητοκτόνο φάνηκε να είναι αποτελεσματικό στη συγκέντρωση 0,025% των απομονώσεων A7, B18 και C14, των φαινοτύπων Pyg^RBos^RDic^{MR}, Pyg^RBos^RCyp^RDic^{MR} και Fen^RPyg^RCyp^RBen^{HR}Dic^{MR}, αντίστοιχα, ενώ στη μικρότερη συγκέντρωση (0,012%) δεν παρεμπόδισε τη μυκηλιακή ανάπτυξη. Αντίθετα, οι υπόλοιπες τέσσερις απομονώσεις A91, C1, C7, C39, των φαινοτύπων Bos^{MR}, Pyg^RBos^RCyp^RBen^{HR}Dic^{MR}, Fen^{HR}Pyg^{HR}Bos^{HR}Cyp^{HR}Dic^{MR}, Fen^{HR}Pyg^{HR}Ben^{HR}Dic^{MR} αντίστοιχα, απέτυχαν να προσβάλλουν τα φύλλα που εμβαπτίστηκαν στο συγκεκριμένο μυκητοκτόνο.

Το fludioxonil, δεν προκάλεσε παρεμπόδιση μόλυνσης, όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα αιώρημα σπορίων στην ανθεκτική απομόνωση A59 του φαινοτύπου Fen^RPyg^RCyp^RFlud^{MR}Ben^{HR}Dic^{MR}, τόσο στη μισή όσο και στην κανονική συγκέντρωση του μυκητοκτόνου. Σε όλες τις υπόλοιπες απομονώσεις, το fludioxonil, παρεμπόδισε πλήρως την προσβολή, ακόμη και στη μετρίως ανθεκτική απομόνωση B58, χωρίς να εμφανιστεί ακόμη και σημειακή μόλυνση.

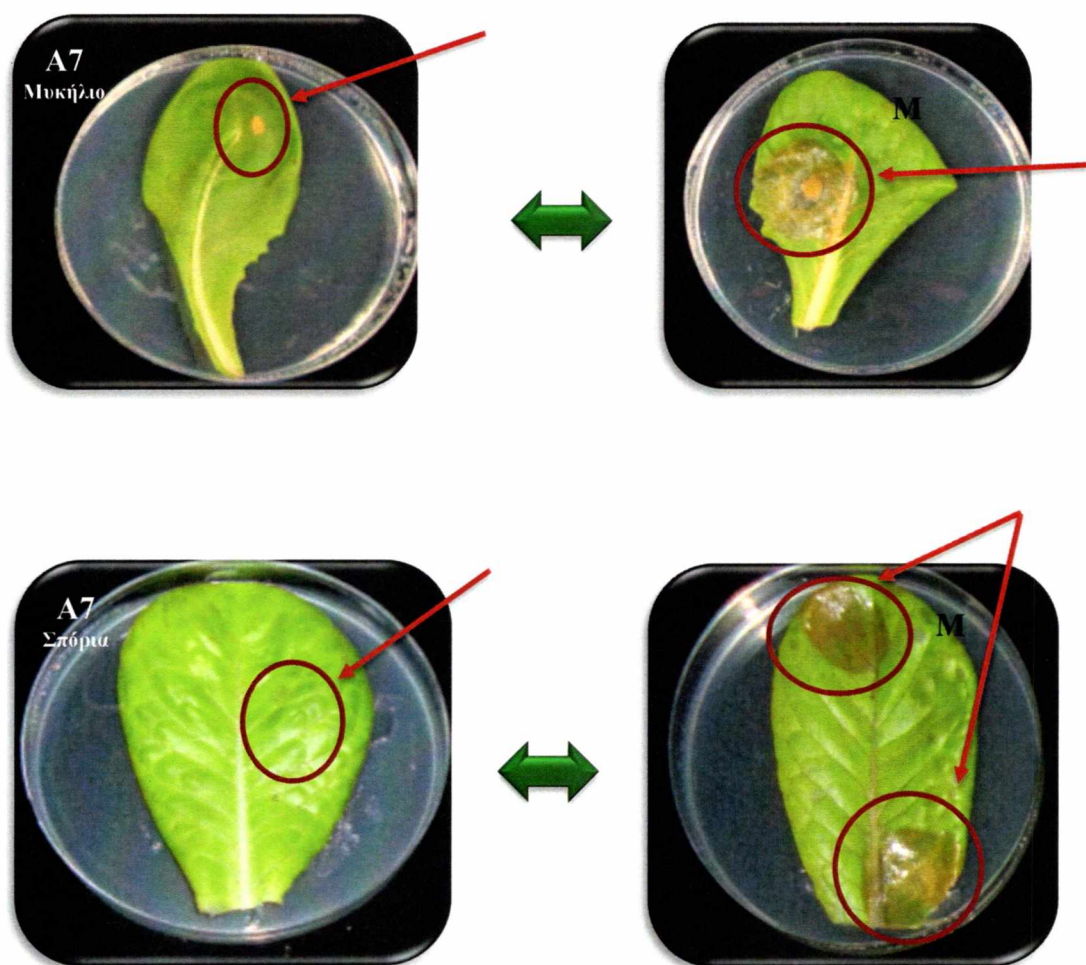
Έλεγχος της δράσης *in situ* ειδικών μυκητοκτόνων εναντίον επιλεγμένων απομονώσεων του *Botrytis cinerea*



Εικόνα 47: Ανάπτυξη κηλίδας προσβολής της μετρίως ανθεκτικής απομόνωσης στο fludioxonil B58 του φαινοτύπου Flud^{MR}Dic^{MR}, σε εμβαπτισμένα φύλλα μαρουλιού τόσο στη μισή (0,012%) όσο και στην κανονική (0,025%) συγκέντρωση δραστικής ουσίας.
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

4.6 Chlorothalonil

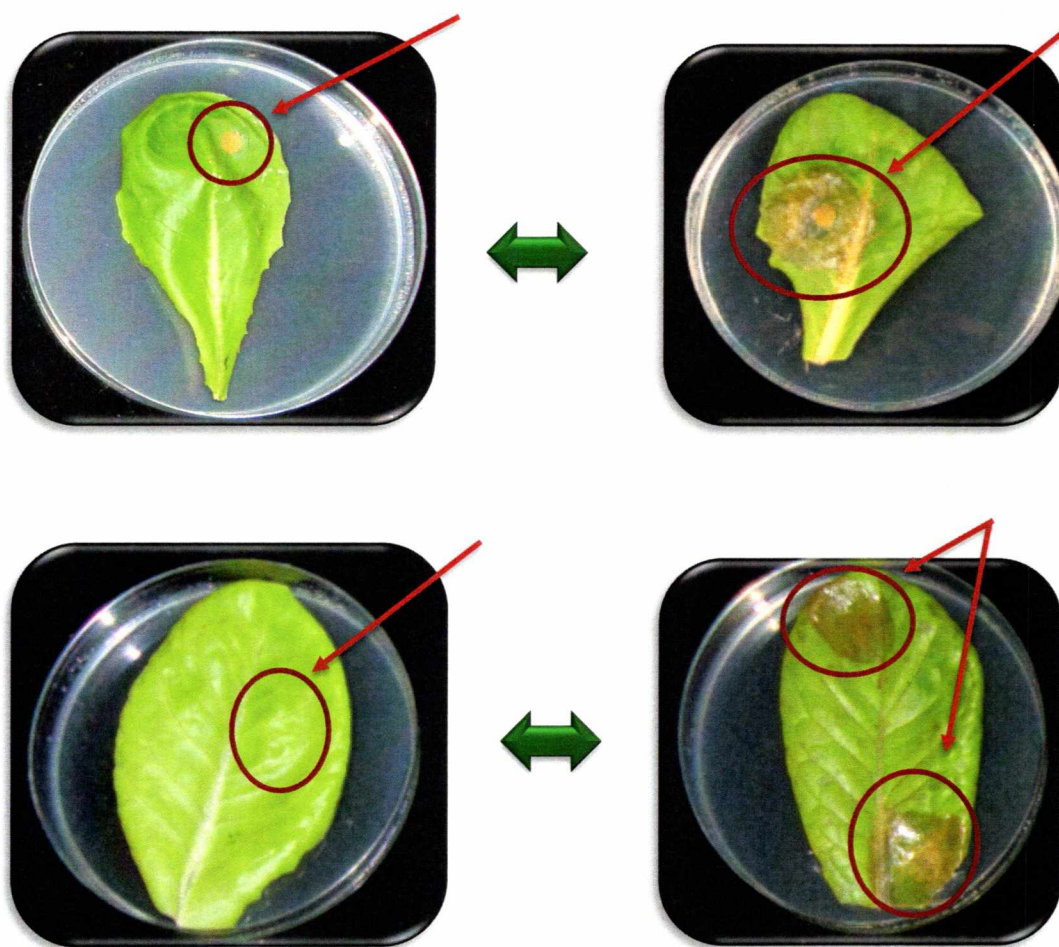
Το chlorothalonil, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος αποδείχθηκε ότι ήταν αποτελεσματικό εναντίον όλων των απομονώσεων. Στις δοκιμές με μόλυσμα μυκηλίου, παρεμπόδισε την κηλίδα προσβολής σε όλες τις απομονώσεις (Εικ.48). Το ίδιο διαπιστώθηκε όταν ως μόλυσμα χρησιμοποιήθηκε αιώρημα σπορίων του *Botrytis cinerea*. Σε όλες τις περιπτώσεις υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και των διαφόρων απομονώσεων που δέχθηκαν επέμβαση με το chlorothalonil (Εικ.48).



Εικόνα 48: Αποτελέσματα δοκιμών όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα μυκήλιο (πάνω) και αιώρημα σπορίων (κάτω) της απομόνωσης A7 του φαινοτύπου $\text{Pyr}^{\text{R}}\text{Bos}^{\text{R}}\text{Dic}^{\text{MR}}$, σε εμβαπτισμένα στο chlorothalonil φύλλα μαρουλιού.
(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

4.7 Fluazinam

Όπως το chlorothalonil, έτσι και με το fluazinam αποδείχθηκε αποτελεσματικό εναντίον όλων των απομονώσεων του *B. cinerea*. Τα αποτελέσματα των δοκιμών, τόσο όταν χρησιμοποιήθηκε ανεστραμμένος δίσκος μυκηλίου, όσο και αιώρημα σπορίων, έδειξαν ότι δεν εμφανίστηκε κηλίδα προσβολής. Το fluazinam λοιπόν, παρεμπόδισε πλήρως τόσο την ανάπτυξη μυκηλίου όσο και τη μόλυνση από αιώρημα σπορίων (Εικ.49).



Εικόνα 49: Αποτελέσματα δοκιμών όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα μυκήλιο (πάνω) και αιώρημα σπορίων (κάτω) της απομόνωσης A7 του φαινοτύπου Pyg^RBos^RDic^{MR}, σε εμβαπτισμένα στο fluazinam φύλλα μαρουλιού.

(Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας)

5. Συζήτηση – Συμπεράσματα

Ο μύκητας *B. cinerea* αποτελεί μια χαρακτηριστική περίπτωση παθογόνου “υψηλού κινδύνου” ως προς την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα, εξαιτίας της υψηλής γενετικής παραλλακτικότητας, της άφθονης σποριοποίησης, της πολυκυκλικής φύσης της ασθένειας, της ικανότητας ανάπτυξης σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, του μεγάλου αριθμού ξενιστών και του μεγάλου αριθμού επεμβάσεων που απαιτούνται για την επιτυχή καταπολέμησή του (Brent & Hollomon, 1998; Myresiotis et al., 2007; Bardas et al., 2008).

Πράγματι, κατά το παρελθόν, μερικά από τα πιο σοβαρά προβλήματα ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα, εμφανίστηκαν σε αυτό το παθογόνο (Panagiotakou & Malathrakis, 1983; Wang et al., 1986). Επιπλέον, σχεδόν όλες οι νέες ομάδες βοτρυδιοκτόνων, όπως τα ανιλινοπυριμιδινικά, φαινυλοπυρρολικά και υδροξυανιλιδικά, αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας όπως έχει ήδη αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες με στελέχη στα οποία είχε αναπτυχθεί ανθεκτικότητα *in vitro* (Faretra & Pollastro, 1993; Chapeland et al., 1999; Ziogas et al., 2003). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε, η αποτελεσματικότητα επτά μυκητοκτόνων διαφορετικού βιοχημικού τρόπου δράσεως, κατά εννιά επιλεγμένων με πολλαπλή ανθεκτικότητα απομονώσεων του *B. cinerea* (Chatzidimopoulos et al., 2013).

Το **fenhexamid**, είναι από τα πιο νέα βοτρυδιοκτόνα. Χρησιμοποιείται από το 1999 και έχει ως στόχο την 3-κετορεδουκτάση που κωδικοποιεί το γονίδιο *erg27* και εμπλέκεται στην απομεθυλίωση του C-4, κατά τη διάρκεια βιοσύνθεσης της εργοστερόλης. Φαίνεται ότι τα σπόρια και ο βλαστικός σωλήνας του *B. cinerea*, νεκρώνονται πριν πραγματοποιηθεί η διείσδυσή τους στο εσωτερικό των φυτών (Billard et al., 2011). Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, διαπιστώνεται ότι όταν έγιναν μολύνσεις είτε με δίσκους μυκηλίου, είτε με αιώρημα σπορίων στα εμβαπτισμένα στο fenhexamid φύλλα μαρουλιού, δεν αναπτύχθηκε κηλίδα προσβολής. Τα ίδιο όμως δεν παρατηρήθηκε όταν το μόλυσμα προερχόταν από ανθεκτικές στο fenhexamid *in vitro* απομονώσεις, από θερμοκήπιο. Το μυκητοκτόνο αυτό έχει προστατευτική δράση. Αυτό όμως δε σημαίνει ότι η καταπολέμηση στον αγρό είναι πλήρως αποτυχημένη. Η εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι είτε λόγω της μειωμένης προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών στελεχών, είτε λόγω του μικρού βαθμού ανθεκτικότητας (Myresiotis et al., 2007; Billard et al., 2011;

Chatzidimopoulos et al., 2013). Αυτή η μειωμένη προσαρμοστικότητα οφείλεται σε μεταλλάξεις του *erg27* γονιδίου (F412), οι οποίες επιφέρουν μεταβολές ειδικά σε χαμηλές θερμοκρασίες ή γενικά σε δυσμενείς συνθήκες. Αυτές οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την επιβίωση του παθογόνου και πιο αναλυτικά φαίνεται να έχουν μειωμένη προσαρμοστικότητα ως αναφορά τη διασπορά του μύκητα (Billard et al., 2011). Στην Ελλάδα, βρέθηκε για πρώτη φορά ανθεκτικότητα στο fenhexamid στον αγρό, το 2013 από τους Chatzidimopoulos και συν.

Το **pyraclostrobin** είναι ένα νέο σχετικά μυκητοκτόνο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1996 και θεωρείται ότι αντιμετωπίζει αποτελεσματικά τον *B. cinerea*, καθώς έχει διαφορετικό τρόπο δράσης σε σχέση με τα υπόλοιπα μυκητοκτόνα που είχαν τεθεί παλαιότερα σε εφαρμογή στην πράξη (Myresiotis et al., 2008). Η αποτελεσματικότητά του σχετίζεται κυρίως με την παρεμπόδιση της βλάστησης των σπορίων του παθογόνου. Με βάση τα στοιχεία της παρούσας μελέτης, διαπιστώθηκε ότι οι φαινότυποι του *B. cinerea* με ανθεκτικότητα στο pyraclostrobin, ανέπτυξαν κηλίδα προσβολής που δε διέφερε μακροσκοπικά από αυτή του μάρτυρα, τόσο όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα μυκήλιο, όσο και όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα αιώρημα σπορίων. Αντιθέτως, οι φαινότυποι χωρίς ανθεκτικότητα *in vitro* στο pyraclostrobin δεν ανέπτυξαν κηλίδα προσβολής σε καμία από τις δυο περιπτώσεις. Σ' αυτές τις απομονώσεις το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο, ήταν αποτελεσματικό.

Το **boscalid** χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη Γαλλία το 2004. Έχει διαπιστωθεί ότι παρεμποδίζει κυρίως τη βλάστηση σπορίων των Ασκομυκήτων, αλλά συμμετέχει ενεργά και σε πολλά άλλα στάδια της ανάπτυξης του παθογόνου. Από τα αποτελέσματα της μελέτης, φάνηκε ότι στους φαινότυπους που δεν είναι ανθεκτικοί στο boscalid, παρατηρήθηκε μια σχετική ευαισθησία. Όμως, στις περισσότερες των ανθεκτικών *in vitro* απομονώσεων, το boscalid παρεμπόδισε την ανάπτυξη κηλίδας προσβολής, μόνο όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα αιώρημα σπορίων. Αυτό εν μέρει μπορεί να επιβεβαιώσει προηγούμενη έρευνα των Zhang et al., (2007), οι οποίοι αναφέρθηκαν στην ευαισθησία βλάστησης των σπορίων του *Botrytis cinerea*.

Σε προηγούμενη μελέτη που έγινε σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια λαχανικών στην Κρήτη, διαπιστώθηκε ότι οι φαινότυποι του *Botrytis cinerea* που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στις ανιλνοπυριμιδίνες και στα βενζιμιδαζολικά, παρουσίαζαν ευαισθησία στο pyraclostrobin και στο boscalid (Myresiotis et al., 2008). Αυτό δεν επιβεβαιώνεται στην παρούσα μελέτη, καθώς οι ανθεκτικοί φαινότυποι στο

cyprodinil και στο carbendazim, ανέπτυξαν κηλίδα προσβολής όταν χρησιμοποιήθηκε το cyprodinil.

Ο εξειδικευμένος τρόπος δράσης αυτών των δυο μυκητοκτόνων, μπορεί να οδηγήσει σε υψηλή ανθεκτικότητα στον αγρό. Μέχρι σήμερα, έχει αναπτυχθεί ανθεκτικότητα στις στρομπιλουρίνες στον αγρό (Ma et al., 2003), αλλά και στο boscalid, στην *Alternaria alternata* (Avenot & Michailides, 2007).

Οι ανιλινοπυριμιδίνες (**cyprodinil**), έχουν εισαχθεί στην Ελλάδα και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες από το 1998. Όλα τα μυκητοκτόνα αυτής της ομάδας έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης, γι' αυτό κι έχει αναπτυχθεί διασταυρωτή ανθεκτικότητα (Hilber & Schuerpp, 1996; Petsikos-Panayotarou et al., 2003). Το cyprodinil, παρεμποδίζει την ανάπτυξη μυκηλίου, αλλά δεν επηρεάζει τη βλάστηση των σπορίων, παρά μόνο την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα. Είναι προστατευτικό μυκητοκτόνο και λιγότερο θεραπευτικό. Το 1999 ο Leroux και οι συνεργάτες του, ανέφεραν ότι οι ανιλινοπυριμιδίνες είναι αποτελεσματικές εναντίον ανθεκτικών στελεχών του *Botrytis cinerea* στα βενζιμιδαζολικά και στα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα. Στα αποτελέσματα αυτής της εργασίας, παρατηρήθηκε ότι τα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη του παθογόνου στο iprodione και στο carbendazim, ανέπτυξαν κηλίδα προσβολής που δε διέφερε μακροσκοπικά από αυτή του μάρτυρα, όταν χρησιμοποιήθηκε το cyprodinil. Λίγες ήταν οι περιπτώσεις που πραγματοποιήθηκε μόλυνση με δίσκο μυκηλίου και η προσβολή ήταν σημειακή. Μόλυνση προκλήθηκε και στις περιπτώσεις που οι φαινότυποι του βοτρώτη ήταν ανθεκτικοί στο cyprodinil, τόσο όταν χρησιμοποιήθηκε η συνιστώμενη δόση του μυκητοκτόνου, όσο όταν εφαρμόστηκε και η μισή. Βέβαια, όταν χρησιμοποιήθηκε ως μόλυσμα μυκήλιο, στις ευαίσθητες απομονώσεις στο cyprodinil, το μυκητοκτόνο είχε σχετικά καλά αποτελέσματα, καθώς στις περισσότερες παρεμποδίστηκε η προσβολή, ενώ σε λίγες μόνο η μόλυνση ήταν σημειακή και στη μισή δόση. Τα συμπεράσματα του πειράματος αυτού, έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενη μελέτη των Petsikos-Panayotarou et al. (2003), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι τόσο σε φυτά αγγουριάς, όσο και σε ώριμους καρπούς που μολύνθηκαν με ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη του *Botrytis cinerea* σε διάφορα βοτρυδιοκτόνα, η εφαρμογή του cyprodinil ήταν αποτελεσματική για την καταπολέμηση της ασθένειας. Μέχρι σήμερα, έχουν γίνει αρκετές μελέτες στις οποίες αναφέρεται η εμφάνιση ανθεκτικότητας του βοτρώτη στις ανιλινοπυριμιδίνες, σε διάφορες καλλιέργειες, στον αγρό (Chapeland et al., 1999; Leroux et al., 1999; Latorre et al., 2002; Moyano et al., 2004; Zhao et al., 2010). Το

μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικότητας του *B. cinerea* στις ανιλνοπυριμιδίνες στον αγρό, σε λαχανοκομικές καλλιέργειες, ανέρχεται στο 49% (Myresiotis et al., 2007). Σε πρόσφατη έρευνα των Bardas et al. (2008), αναφέρεται ότι η ανθεκτικότητα του *B. cinerea* στις ανιλνοπυριμιδίνες είναι μόνιμη και δεν επηρεάζει την προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών απομονώσεων.

Τα φαινυλοπυρρολικά μυκητοκτόνα (**fludioxonil**), χρησιμοποιούνται κι αυτά από το 1998, όπως οι ανιλνοπυριμιδίνες και είναι θεραπευτικά. Παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μυκηλίου και την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, διαπιστώνεται ότι στις ανθεκτικές *in vitro* απομονώσεις του *Botrytis cinerea* στο fludioxonil, παρατηρείται ανάπτυξη κηλίδας προσβολής. Σε προηγούμενη μελέτη, έχει αναφερθεί ότι υπάρχει διαφορά μεταξύ ανθεκτικών απομονώσεων του *Botrytis cinerea* στο fludioxonil στον αγρό, σε σχέση με τα ανθεκτικά στελέχη που προέκυψαν *in vitro* σε γενετικό επίπεδο. Το λιγότερο δυο είναι οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την ανθεκτικότητα του παθογόνου στο fludioxonil (Vignutelli et al., 2002). Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι στελέχη του *B. cinerea* που ήταν ανθεκτικά στα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα στον αγρό, δεν έχασαν την ευαισθησία τους στα φαινυλοπυρρολικά (Chapeland et al., 1999; Leroux et al., 1999). Διαφορετική διαπίστωση στο παραπάνω, έδωσαν άλλες έρευνες, στις οποίες αναφέρεται ότι μειωμένη ευαισθησία απομονώσεων στον αγρό στα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα, δεν οδηγεί και σε μειωμένη ευαισθησία στα φαινυλοπυρρόλια (Farettra & Pollastro, 1993). Στο δεδομένο πείραμα, οι απομονώσεις του βοτρυτή, που ήταν χαρακτηρισμένες ως ανθεκτικές στα δικαρβοξιμιδικά, στις περισσότερες περιπτώσεις εμφάνισαν σημειακή προσβολή στα νεαρά μαρούλια, όταν αυτά μολύνθηκαν με δίσκους μυκηλίου και εμβαπτίστηκαν στη μισή συγκέντρωση του εν λόγω μυκητοκτόνου. Αντίθετα, στη συνιστώμενη δόση του fludioxonil δεν παρατηρήθηκε μόλυνση από τις ανθεκτικές απομονώσεις στα δικαρβοξιμιδικά, με εξαίρεση μια απομόνωση, η οποία ήταν ανθεκτική και στο fludioxonil. Μέχρι το 2007, δεν υπάρχει καμία αναφορά για ανάπτυξη ανθεκτικότητας του παθογόνου στον αγρό. Αυτό μάλλον οφείλεται στον πολυγονικό έλεγχο ανθεκτικότητας (Vignutelli et al., 2002), ο οποίος εμφανίζεται βαθμιαία στον αγρό και μπορεί να προκύψει τόσο από τη μείωση ελέγχου του παθογόνου, όσο και από τη μείωση ευαισθησίας του στο μυκητοκτόνο (Brent, 1995). Ο πολυγονικός έλεγχος, φαίνεται ότι είναι υπεύθυνος για τη μειωμένη προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών απομονώσεων του *Botrytis cinerea*, ή τη μειωμένη ικανότητα ανταγωνισμού με τις απομονώσεις άγριου τύπου

(Myresiotis et al., 2007). Στην ίδια έρευνα, καθώς και σ' αυτή των Brent & Hollomon (1998), αναφέρεται ότι η ενδεχόμενη ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο fludioxonil στον αγρό, μπορεί να έχει αρνητικές επιδράσεις σε διάφορα χαρακτηριστικά της προσαρμοστικότητας, όπως την επιβίωση του παθογόνου. Σε μια έρευνα όμως που πραγματοποιήθηκε το 2013 από τους Chatzidimopoulos και συν. αναφέρεται για πρώτη φορά ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο fludioxonil στον αγρό, στην Ελλάδα.

Το **chlorothalonil** είναι ένα πολυθεσικό, προστατευτικό μυκητοκτόνο, το οποίο χρησιμοποιείται από παλιά για την καταπολέμηση του *B. cinerea*. Και στην περίπτωση του chlorothalonil, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι απομονώσεις με πολλαπλή ανθεκτικότητα στα διάφορα μυκητοκτόνα, εμφάνισαν ευαισθησία στο συγκεκριμένο βοτρυδιοκτόνο, τόσο όταν η μόλυνση έγινε με δίσκους μυκηλίου, όσο και με αιώρημα σπορίων. Αντίθετα, μειωμένη ευαισθησία στο chlorothalonil, παρατήρησαν σε απομονώσεις από θερμοκηπιακές καλλιέργειες ο Zhang και οι συνεργάτες του (2009). Επίσης, ανέφεραν ότι ο βαθμός ανθεκτικότητας αυτού του μυκητοκτόνου είναι μικρός γεγονός που επιφέρει μικρή μείωση στην καταπολέμηση του βοτρώτη και της αποτελεσματικότητάς του, τον αγρό.

Το **fluazinam**, είναι ένα νέο προστατευτικό μυκητοκτόνο, που ανήκει στην κατηγορία των αρυλαμινοπυριδιναμινών. Έχει την ιδιότητα να παρεμποδίζει ισχυρά τη βλάστηση σπορίων και την ανάπτυξη μυκηλίου. Αυτό επιβεβαιώνεται από την παρούσα μελέτη, η οποία έδειξε ότι το fluazinam ήταν αποτελεσματικό εναντίον του *B. cinerea*. Τόσο όταν προκλήθηκε μόλυνση με ανεστραμμένους δίσκους μυκηλίου, όσο και με αιώρημα σπορίων, δεν παρατηρήθηκε κηλίδα προσβολής στα νεαρά φύλλα μαρουλιού. Σε προηγούμενη έρευνα έχει διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου, όταν χρησιμοποιήθηκε σε ανθεκτικά στελέχη του παθογόνου στα βενζιμιδαζολικά, σε ευαίσθητα στελέχη στα βενζιμιδαζολικά, ή ακόμη και σε στελέχη με πολλαπλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμίδια και στο μίγμα carbendazim+diethofencarb (Kalamarakis et al., 2000). Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα αυτής της αναφοράς.

Η μόλυνση με αιώρημα σπορίων δεν ήταν πάντοτε επιτυχής. Έπειτα από 8 μέρες επώαση εμφανίζονταν συνήθως ανοιχτόχρωμα καστανά στίγματα κάτω από τη σταγόνα μόλυνσης. Όμως, σε μερικές περιπτώσεις παρατηρήθηκε κανονική ανάπτυξη της κηλίδας προσβολής. Παρόμοιες διατυπώσεις έγιναν και στην έρευνα των Bennett et al. (1994), οι οποίοι παρατήρησαν ότι παρεμποδιζόταν πλήρως η βλάστηση σπορίων του μύκητα, αλλά με την προσθήκη γλυκόζης, εμφανίζονταν μια

μικρή διαφοροποίηση στο βλαστικό σωλήνα. Τα συμπτώματα πάνω στα φύλλα, ήταν όμοια με αυτά της παρούσης μελέτης. Η παραλλακτικότητα αυτή φαίνεται να σχετίζεται με την ενεργοποίηση του μηχανισμού άμυνας (παραγωγή lettuценin A) που διαθέτει το μαρούλι. Η lettuценin A, είναι από τις σημαντικότερες φυτοαλεξίνες στο μαρούλι και αναφέρεται ότι στα αρχικά στάδια μόλυνσης έχει αυξητικές τάσεις, ενώ όταν επεκτείνεται η προσβολή η φυτοαλεξίνη μειώνεται σταδιακά (Bennett et al., 1994).

Συμπερασματικά, η συνεχής χρήση χημικών μέσων καταπολέμησης, δηλαδή η αυξημένη πίεση επιλογής, οδηγεί στην εμφάνιση όλο και περισσότερων ανθεκτικών στελεχών, με αποτέλεσμα την αποτυχημένη αντιμετώπιση του *Botrytis cinerea*. Η απειλή για την αποτυχία στην αντιμετώπιση της ασθένειας ξεκίνησε από τη διπλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και τα δικαρβοξιμίδια. Γι' αυτό το λόγο, τα τελευταία χρόνια η προσοχή στράφηκε στην εύρεση νέων δραστικών ουσιών με διαφορετικό τρόπο δράσης. Από την εργασία αυτή προέκυψε ότι τα νέα βοτρυδιοκτόνα αδυνατούν να εμποδίσουν την εξέλιξη της προσβολής *in situ* όταν το στέλεχος του *B. cinerea* έχει χαρακτηριστεί ως ανθεκτικό *in vitro*. Υπάρχει λοιπόν ανάγκη για νέες στρατηγικές καταπολέμησης, μεταξύ των οποίων απαραίτητη είναι η εναλλαγή μυκητοκτόνων και η χρησιμοποίηση σκευασμάτων με μίγματα δραστικών ουσιών, κυρίως στα θερμοκήπια που οι επεμβάσεις είναι αυξημένες. Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι το μίγμα cyprodinil + fludioxonil, μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας, αφού μέχρι σήμερα δεν έχει εμφανιστεί πρόβλημα ανθεκτικότητας στο fludioxonil, στον αγρό. Για τον ίδιο λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το μίγμα boscalid + pyraclostrobin. Επίσης, το fenhexamid, θεωρείται από τα πιο αποτελεσματικά μυκητοκτόνα για την αντιμετώπιση της ασθένειας από μόνο του, καθώς δεν έχει εμφανίσει διασταυρωτή ανθεκτικότητα με τα υπόλοιπα βοτρυδιοκτόνα, λόγω του νέου μηχανισμού δράσης του.

Συνοψίζοντας λοιπόν, στην παρούσα εργασία, βρέθηκε ότι όταν χρησιμοποιήθηκε μυκήλιο ως μόλυσμα, η ανάπτυξη κηλίδας προσβολής των φαινοτύπων του *B. cinerea* με ανθεκτικότητα στα fenhexamid, pyraclostrobin, boscalid, cyprodinil και fludioxonil, ήταν σε όλες τις περιπτώσεις επεμβάσεων όπως στο μάρτυρα. Αντίθετα, τα μυκητοκτόνα fluazinam και chlorothalonil ήταν αποτελεσματικά εναντίον όλων των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν. Όμως, η μόλυνση με σπόρια δεν ήταν πάντοτε επιτυχής, ακόμη και στην περίπτωση των ανθεκτικών απομονώσεων. Έπειτα από 8 μέρες επώαση εμφανίζονταν συνήθως

ανοιχτόχρωμα καστανά στίγματα κάτω από τη σταγόνα μόλυνσης. Όμως, σε μερικές περιπτώσεις παρατηρήθηκε κανονική ανάπτυξη της κηλίδας προσβολής. Η παραλλακτικότητα αυτή φαίνεται να σχετίζεται με την ενεργοποίηση του μηχανισμού άμυνας (παραγωγή lettuценin A) που διαθέτει το μαρούλι.

6. Βιβλιογραφία

6.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

1. Agrios, G.N., 2005. Plant Pathology. 5th edition. *Academic Press Inc.*, San Diego, California, pp. 510-514.
2. Alderman, S.C. and Lacy, M.L., 1985. Influence of interruptions of dew periods on number of lesions produced on onion by *Botrytis squamosa*. *Phytopathology* **75**: 808-810.
3. Avenot, H.F. and Michailides, T.J., 2007. Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. *Plant Disease* **91**: 1345-1350.
4. Avila-Adame, C., Olaya, G. and Koller, W., 2003. Characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to strobilurin-related QoI fungicides. *Plant Disease* **87**: 1426-1432.
5. Banno, S., Fukumori, F., Ichiishi, A., Okada, K., Uekusa, H., Kimura, M. and Fujimara, M., 2008. Genotyping of benzimidazole-resistant and dicarboximide-resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. *Phytopathology* **98**: 397-404.
6. Banno, S., Yamashita, K., Fukumori, F., Okada, K., Uekusa, H., Tagakaki, M., Kimura, M., and Fujimara, M., 2009. Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome b gene. *Plant Pathology* **58**: 120-129.
7. Bardas, G.A., Myresiotis, C.K. and Karaoglanidis, G. S., 2008. Stability and fitness of anilinopyrimidine-resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **98**: 443-450.
8. Bardas, G.A., Veloukas, T., Koutita, O. and Karaoglanidis, G.S., 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. *Pest Management Science* **66**: 967-973.
9. Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M. and Parr-Dobranski, B., 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* **58**: 649-662.
10. Beaver, R.E. and Weeds, L., 2004. Taxonomy and Genetic Variation of *Botrytis* and *Botyotinia*. In 'Botrytis: Biology, Pathology and Control'. Elad, Y.,

Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. eds. *Springer*, The Netherlands, pp. 29-52.

11. Bennett, M.H., Gallagher, M.D.S., Bestwick, C.S., Rossiter, J.T. and Mansfield, J. W., 1994. The phytoalexin response of lettuce to challenge by *Botrytis cinerea*, *Bremia lactucae* and *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **44**, 321-333.

12. Billard, A., Fillinger, S., Leroux, P., Lachaise, H., Beffa, R. and Debieu, D., 2011. Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. *Pest Management Science* **68**: 684-691.

13. Boff, P., Kastelein, P., de Kraker, J., Gerlagh, M. and Kohl, J., 2001. Epidemiology of grey mould in annual waiting-bed production of strawberry. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 615-624.

14. Bollen, G.J. and Scholten, G., 1971. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **77**: 83-90.

15. Brandt, U. and Trumpower, B.L., 1994. The proton-motive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology* **29**: 165-197.

16. Brent, K.J., 1995. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be damaged? In 'FRAC Monograph No1', *GIFAP*, Brussels, pp. 48.

17. Brent, K.J. and Hollomon, D.W., 1998. Fungicide resistance: The assessment of risk. In 'FRAC Monograph No2', *Global Crop Protection*, Brussels, Belgium, pp. 1-48.

18. Care, D.D. and Coyier, D.L., 1984. Influence of atmospheric humidity and free water on germ tube growth of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **74**: 1136.

19. Chapeland, F., Fritz, R., Lanen, C., Gredt, M. and Leroux, P., 1999. Inheritance and mechanisms of resistance to anilinopyrimidine fungicides in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **64**: 85-100.

20. Chatzidimopoulos, M., Papaevaggelou, D. and Pappas, A.C., 2013. Detection and characterization of fungicide resistant phenotypes of *Botrytis cinerea* in lettuce crops in Greece. *European Journal of Plant Pathology* **137**: 363-376.

21. Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.M., Simon, A. and Viaud, M., 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters* **277**: 1-10.
22. Clough, J.M. and Godfrey, C.R.A., 1998. The strobilurin fungicides. In 'Fungicidal Activity. Chemical and Biological Approaches to Plant Protection'. Hutsun, D. and Miyamoto, J., eds. *John Wiley & Sons Ltd.*, West Sussex, England, pp. 254.
23. Cole, L., Dewey, F.M. and Hawes, C.R., 1996. Infection mechanism of *Botrytis* species: pre-penetration and pre-infection process of dry and wet conidia. *Mycological Research* **100** (3): 277-286.
24. Coley-Smith, J.R., 1980. Sclerotia and other structures in survival. In 'The Biology of *Botrytis*'. Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R., eds. *Academic Press*, London, pp.85-114.
25. Cotoras, M. and Silva, E., 2005. Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape. *Mycologia* **97**: 485-492.
26. Davidse, L.C. and Flach, W., 1978. Interaction of thiabendazole with fungal tubulin. *Biochemistry Biophysical Acta* **543**: 82-90.
27. Debieu, D., Bach, J., Hungon, M., Malosse, C. and Leroux, P., 2001. The hydroxyanilide fenhexamid, a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botrytinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Management Science* **57**: 1060-1067.
28. Dik, A.J. and Wubben, J.P., 2004. Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. In '*Botrytis*: Biology, Pathology and Control'. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. eds. *Springer*, The Netherlands, pp. 319-333.
29. Elad, Y., 1988. Latent infection of *Botrytis cinerea* in rose flowers and combined chemical physiological control of the disease. *Crop Protection* **7**: 361-366.
30. Elad, Y., 1992. Reduced sensitivity of *Botrytis cinerea* to two sterol biosynthesis - inhibiting fungicides: fenetrazole and fenethanil. *Plant Pathology* **41**: 47-54.
31. Elad, Y. and Yunis, H., 1993. Effect of microclimate and nutrients on development of cucumber gray mold (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica* **21**: 257-268.
32. Elad, Y., Malathrakis, N.E. and Dick, A.J., 1996. Biological control of *Botrytis* - incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. *Crop Protection* **15**: 229-240.

33. Elad, Y. and Stewart, A., 2004. Microbial Control of *Botrytis* spp. In ‘*Botrytis: Biology, Pathology and Control*’. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen N., eds. Springer, The Netherlands, pp. 223-241.
34. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., 2007. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction. In ‘*Botrytis: Biology, Pathology and Control*’. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. eds. Springer, The Netherlands, pp. 1-8.
35. Elmer, P.A.G. and Michailides, T.J., 2004. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in Orchard and Vine Crops. In ‘*Botrytis: Biology, Pathology and Control*’. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. eds. Springer, The Netherlands, pp. 243-272.
36. Epton, H.A.S. and Richmond, D.V., 1980. Formation, structure and germination of conidia. In ‘*The Biology of Botrytis*’. Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R., eds. Academic Press, London, pp.41-84.
37. Faretra, F. and Pollastro, S., 1991. Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research* **95**: 943-951.
38. Faretra, F. and Pollastro, S., 1993. Isolation, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* resistant to the phenylpyrrole fungicide CGA 173506. *Mycological Research* **97**: 620-624.
39. Fermaud, M. and Le Menn, R., 1989. Association of *Botrytis cinerea* with grape berry moth larvae. *Phytopathology* **79**: 651-656.
40. Fernandez-Ortuno, D., Tores, J.A., de Vicente, A. and Perez-Garcia, A., 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology* **11**: 1-9.
41. Ferreira, J.H.S. and Marais, P.G., 1987. Effect of rootstock cultivar, pruning method and crop load on *Botrytis cinerea* rot of *Vitis vinifera* cv. Chenin Blanc grapes. *South African Journal for Enology and Viticulture* **8**: 41-44.
42. FRAC, 2010. List of pathogens with field resistance towards QoI fungicides. Online, www.frac.info.
43. Gabler, F.M., Smilanick, J.L., Mansour, M., Ramming, D.W. and Mackey, B.E., 2003. Correlations of morphological, anatomical, and chemical features of grape berries with resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **93**: 1263-1273.

44. Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., and Mc Caffery, A., 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science* **58**: 859-867.
45. Grasso, V., Sierotzki, H., Garibaldi, A. and Gisi, U., 2006a. Characterization of the cytochrome b gene fragment of *Puccinia* species responsible for the binding site of QoI fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **84**: 72-82.
46. Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A. and Gisi, U., 2006b. Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science* **62**: 465-472.
47. Hammer, P.E. and Evensen, K.B., 1994. Differences between rose cultivars in susceptibility to infection by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **84**: 1305-1312.
48. Have, A. ten, Breuil, W.O., Wubben, J.P., Visser, J. and Kan, J.A.L. van, 2001. *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genetics and Biology* **33**: 97-105.
49. Haware, M.P., 1998. Diseases of chickpea. In 'The Pathology of Food and Pasture Legumes'. Allen, D.J. and Lenne, J.M. eds. *CAB International*, Wallingford, UK, pp. 473-516.
50. Heye, U.J., Speich, J., Siegle, H., Steinmann, A., Forster, B., Knauf-Beiter, G., Hergoz, J. and Hubele, A., 1994. CGA 219417: A novel broad-spectrum fungicide. *Crop Protection* **13**: 541-549.
51. Hilber, U.W. and Schuepp, H., 1996. A reliable method for testing the sensitivity of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidines *in vitro*. *Pesticide Science* **47**: 241-247.
52. Holz, G., Coertze, S. and Williamson, B., 2004. The Ecology of *Botrytis* on Plant surfaces. In '*Botrytis*: Biology, Pathology and Control'. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., eds. *Springer*, The Netherlands, pp. 9-27.
53. Ishii, H., Fountaine, J., Chung, W-H., Kansako, M., Nishimura, K., Takashashi, K. and Oshima, M., 2009. Characterization of QoI-resistant and field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest Management Science* **65**: 916-922.
54. Jarvis, W.R., 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology, and pathogenicity. Monograph No15, *Research Branch Canada Department of Agriculture*, Harrow, Ontario, pp. 195.

55. Jarvis, W.R., 1980. Taxonomy. In 'The Biology of *Botrytis*'. Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R., eds. *Academic Press*, London, pp.1-17.
56. Jarvis, W.R., 1989. Managing diseases in greenhouse crops. *Plant Disease* **73**: 190-194.
57. Jarvis, W.R., 1992. Managing diseases in greenhouse crops. *The American Phytopathological Society Press*, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 288.
58. Jiang, J., Ding, L., Michailides, T.J., Li, H. and Ma, Z., 2009. Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **93**: 72-76.
59. Kalamarakis, A.E., Petsikos-Panagiotarou, N., Mavroidis, B. and Ziogas, B.N., 2000. Activity of Fluazinam against Strains of *Botrytis cinerea* Resistant to Benzimidazoles and/or Dicarboximides and to a Benzimidazole-phenylcarbamate Mixture. *Journal of Phytopathology* **148**: 449-455.
60. Kars, I. and van Kan, A.L., 2007. Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of *Botrytis*. In '*Botrytis*: Biology, Pathology and Control'. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. eds. *Springer*, The Netherlands, pp. 99-118.
61. 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.
62. Kohl, J., Gerlagh, M. and Grit, G., 2000. Biocontrol of *Botrytis cinerea* by *Ulocladium atrum* in different production systems of Cyclamen. *Plant Disease* **84**: 569-573.
63. Korolev, N., Mamiev, M., Zahavi, T. and Elad, Y., 2011. Screening of *Botrytis cinerea* isolates from vineyards in Israel for resistance to fungicides. *European Journal of Plant Pathology* **129**: 591-608.
64. Kretchmer, M. and Hahn, M., 2008. Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* **115**: 214-219.
65. Latorre, B.A., Spadaro, I. and Rioja, M.E., 2002. Occurrence of resistance strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection* **21**: 957-961.
66. Leroux, P. and Clerjeau, M., 1985. Resistance of *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola* to fungicides in French vineyards. *Crop Protection* **4**: 137-160.

67. Leroux, P., Chapeleand, F., Desbrosses, D. and Gredt, M., 1999. Patterns of cross resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* **18**: 687-697.
68. Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M. and Chapeland, F., 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* **58**: 876-888.
69. Leroux, P., 2004. Chemical control of *Botrytis* and its Resistance to chemical Fungicides. In '*Botrytis: Biology, Pathology and Control*'. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., eds. *Springer*, The Netherlands, pp. 195-222.
70. Leroux, P., Gredt, M., Leroch, M. and Walker, A-S., 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 6615-6630.
71. Lesemann, S.S., Schimpke, S., Dunemann, F. and Deising, H.B., 2006. Mitochondrial heteroplasmy for the cytochrome b gene controls the level of strobilurin resistance in the apple powdery mildew fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell. &Ev.) ES Salmon. *Journal of Plant Diseases and Protection* **113**: 259-266.
72. Ma, Z., Felts, D. and Michailides, T.J., 2003. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **77**: 66-74.
73. Louis, C., Girard, M., Kuhl, G. and Lopez-Ferber, M., 1996. Persistence of *Botrytis cinerea* in Its Vector *Drosophila melanogaster*. *Phytopathology* **86**: 934-939.
74. Ma, Z., and Michailides, T.J., 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* **24**: 853-863.
75. Macnab, A. and Sherf, A. 1986. Vegetable diseases and their control. 2nd Edition. *Wiley & sons*, New York, pp. 645-646.
76. Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B. and Legendre, L., 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology* **43**: 359-366.
77. Michailides, T.J. and Elmer, P.A.G., 2000. *Botrytis* Gray Mold of kiwifruit caused by *Botrytis cinerea* in the United States and New Zealand. *Plant Diseases* **84**: 208-223.

78. Milling, R.J. and Richardson, C.J., 1995. Mode of action of the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. 2. Effects on enzyme secretion in *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science* **45**: 43-48.
79. Morgan, W.M., 1984. The effect of night temperature and glasshouse ventilation on the incidence of *Botrytis cinerea* in a late planted tomato crop. *Crop Protection* **3**: 243-251.
80. Morrall, R.A.A., Paisley, J. and French, M., 1994. Seed-borne diseases of lentil in Saskatchewan in 1993. *Canadian Plant Disease Survey* **74**: 101.
81. Morton, V. and Staub, T., 2008. A Short History of Fungicides. Online, APSnet Features. doi: 10.1094/APSnetFeature-2008-0308.
82. Moyano, C., Gomez, V. and Melgarejo, P., 2004. Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. *Journal of Phytopathology* **152**: 484-490.
83. Myresiotis, C.K., Karaoglanidis, G.S., and Tzavella-Klonari, K., 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole and dicarboximide fungicide. *Plant Disease* **91**: 407-413.
84. Myresiotis, C.K., Bardas, G.A. and Karaoglanidis, G.S., 2008. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine-and benzimidazole resistant strains by these fungicides. *Plant Disease* **92**: 1427-1431.
85. Newhook, F.J., 1951. Microbiological control of *Botrytis cinerea* Pers. II antagonism by fungi and actinomycetes. *Annals of applied Biology* **35**: 185-202.
86. O' Neill, 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.
87. Oshima, M., Fujimura, M., Bannos, S., Hashimoto, C., Motoyama, T., Ichiishi, A. and Yagamushi, I., 2002. A point mutation in the two component histidine kinase BcoS-1 gene confers dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **92**: 75-80.
88. Panagiotakou, M. and Malathrakis, N.F., 1983. Resistance of *Botrytis cinerea* to dicarboximide fungicide in protected crops. *Annals of Applied Biology* **102**: 293-299.

89. Pappas, A.C., 1982. Inadequate control of grey mould on cyclamen by diacarboximide fungicides in Greece. *Journal of Plant Diseases and Protection* **89**: 52-58.
90. Pappas, A.C., 1997. Evolution of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in protected crops in Greece. *Crop Protection* **16**: 257-263.
91. Pappas, A.C., 2000. Epidemiology and control of *Botrytis cinerea* in tomato crops grown under cover in Greece. *OEPP/EPPO Bulletin* **30**: 269-274.
92. Petsikos-Panayotarou, N., Markellou, E. and Kalamarakis, A.E., 2003. *In vitro* and *in vivo* activity of cyprodinil and pyrimethanil on *Botrytis cinerea* isolates resistant to other botryticides and selection for resistance to pyrimethanil in a greenhouse population in Greece. *European Journal of Plant Pathology* **109**:173-182.
93. Punja, Z.K. and Zhang, Y.Y., 1993. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *Journal of Nematology* **25**: 526-540.
94. Raposo, R., Gomez, V., Urrutia, T. and Melgarejo, P., 2000. Fitness of *Botrytis cinerea* associated with dicarboximide resistance. *Phytopathology* **90**: 1246-1249.
95. Rigotti, S., Gindro, K., Richter, H. and Viret O., 2002. Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) using PCR. *FEMS Microbiology Letters* **209**: 169-174.
96. Rigotti, S., Viret, O. and Gindro, K., 2006. Two new primers highly specific for detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. *Phytopathologia Mediterranea* **45**: 253-260.
97. Rijkenberg, F.H.J., de Leeuw, G.T.N. and Verhoeff, K., 1980. Light and electron microscopy studies on the infection of tomato fruits by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Botany* **58**: 1394-1404.
98. Rosslénbroich, H.J. and Stuebler, D., 2000. *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* **19**: 557-561.
99. Russell, P.E., 1995. Review-Fungicide resistance: occurrence and management. *Journal of Agricultural Science* **124**, 317-323.
100. Sanglard, D., Ischer, F., Koymans, L. and Bille, J., 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1)

from Azole resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **42** (2): 241-53.

101. Sharon, A., Elad, Y., Barakat, R. and Tudzynski, P., 2007. Phytohormones in *Botrytis*-Plant Interactions. In '*Botrytis: Biology, Pathology and Control*'. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. eds. *Springer*, The Netherlands, pp. 163-179.

102. Shtienberg, D. and Elad, Y., 1997. Incorporation of weather forecasting to integrated chemical-biological management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **87**: 332-340.

103. Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfeld, U., Tenzer, I., Poiery, S. and Gisi, U., 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Management Science* **56**: 833-841.

104. Sierotzki, H., Frey, R., Wullschlegel, J., Palermo, S., Karlin, S., Goodwin, J. and Gisi, U., 2007. Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. *Pest Management Science* **63**: 225-33.

105. Simmons, C.R., 1994. The physiology and molecular biology of plant 1,3-beta-D-glucanases and 1,3:1,4-beta-D-glucanases. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**: 325-387.

106. Stehmann, C. and de Waard, M.A., 1996. Factors influencing activity of triazole fungicides towards *Botrytis cinerea*. *Crop Protection* **15**: 39-47.

107. Stromeng, G.M., Hjeljord, L.G. and Stensvand, A., 2009. Relative contribution of various sources of *Botrytis cinerea* inoculum in strawberry fields in Norway. *Plant Disease* **93**: 1305-1310.

108. Sun, H.Y., Wang, H.C., Chen, Y., Li, H.X., Chen, C.J. and Zhou, M.G., 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from vegetable crops to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in China. *Plant Disease* **94**: 551-556.

109. Taylor, D.R., Zeyl, C. and Cooke, E., 2002. Conflicting levels of selection in the accumulation of mitochondrial defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**: 3690-3694.

110. Vakalounakis, D.J., 1992. Control of fungal diseases of greenhouse tomato under long wave infrared-absorbing plastic film. *Plant Disease* **76**:43-46.

111. Veloukas, T., Leroch, M., Hahn, M. and Karaoglanidis, G. S., 2011. Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Disease* **95**: 1302–1307.
112. Verhoeff, K., 1980. The infection process and host-pathogen interactions. In 'The Biology of *Botrytis*'. Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R., eds. *Academic Press*, London, pp. 153-180.
113. Vincelli, P.C. and Lorbeer, J.W., 1988. Forecasting spore episodes of *Botrytis squamosa* in commercial onion fields in New York. *Phytopathology* **78**: 966-970.
114. Vignutelli, A., Hilber-Bodmer, M. and Hilber, U.W., 2002. Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana*. *Mycological Research* **106**: 329-335.
115. Wang, Z.-N., Coley-Smith, J.R. and Wareing, P.W., 1986. Dicarboximide resistance in *Botrytis cinerea* in protected lettuce. *Plant Pathology* **35**: 427-433.
116. Weber, R.W.S., 2011. Resistance of *Botrytis cinerea* to multiple fungicides in northern German small-fruit production. *Plant Disease* **95**: 1263–1269.
117. Wegulo, S.N. and Vilchez, M., 2007. Evaluation of Lisianthus Cultivars for Resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* **91**: 997-1001.
118. Wilson, A.R., 1966. Infection of tomato stems by *Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr. *Acta Hort. ISHS* **4**: 135-135.
119. Yamaguchi, I. and Fujimura, M., 2005. Recent Topics on Action Mechanisms of Fungicides. *Journal of Pesticide Science* **30**: 67-74.
120. Yarden, O. and Katan, T., 1993. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **83**: 1478-1483.
121. Yunis, H. and Elad, Y., 1989. Survival of *Botrytis cinerea* in plant debris during summer in Israel. *Phytoparasitica* **17**: 13-21.
122. Yunis, H., Shtienberg, D., Elad, Y. and Mahrer, Y., 1994. Qualitative approach for modeling outbreaks of grey mould epidemics in non-heated cucumber greenhouses. *Crop Protection* **13(2)**: 99-104.
123. Zhang, D., Olaya, G., Koller, W., 2000. Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. *Current Genetics* **38**: 148-155.

- 124.** Zhang, C.Q., Yuan, S.K., Sun, H.Y., Qi, Z.Q., Zhou, M.G. and Zhu, G.N., 2007. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid. *Plant Pathology* **56**: 646-653.
- 125.** Zhang, C.Q., Hu, J.L., Wei, F.L. and Zhu, G.N., 2009. Evolution of resistance to different classes of fungicides in *Botrytis cinerea* from greenhouse vegetables in eastern China. *Phytoparasitica* **37**: 351-359.
- 126.** Zhao, H., Kim, Y.K., Huang, L. and Xiao, C.L., 2010. Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. *Postharvest Biology and Technology* **56**: 12-18.
- 127.** Ziogas, B.N., Markoglou, A.N. and Malandrakis, A.A., 2003. Studies on the inherent resistance risk to fenhexamid in *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 311-317.

6.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

1. Γεωργόπουλος, Σ. Γ., Ζιώγας Β. Ν., 1992. *Αρχές και μέθοδοι καταπολέμησης των ασθενειών των φυτών*. Αθήνα: Επιμέλεια Εκδόσεων Β. Ν. Ζιώγας.
2. ΕΣΥΕ – Εθνική Στατιστική Υπηρεσία Ελλάδας, 1999-2008. *Πίνακες απογραφής θερμοκηπίων*. Αθήνα.
Ηλεκτρονική διεύθυνση: www.statistics.gr
3. ΕΣΥΕ – Εθνική Στατιστική Υπηρεσία Ελλάδας, 2011. *Στατιστικές Πρωτογενούς Τομέα για το έτος 2006*. Πειραιάς.
Ηλεκτρονική διεύθυνση: www.statistics.gr
4. Θανόπουλος, Χ., 2008. *Τεχνικές βιολογικής καλλιέργειας φυλλωδών λαχανικών*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Χρηματοδοτούμενο πρόγραμμα από την Ε.Ε., eContentplus Project, Organic. Edunet.
5. Ολυμπίου, Χ.Μ., 2001. *Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλης.
6. Παναγόπουλος, Χ.Γ., 2000. *Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλης. 2^η Έκδοση.
7. Παππάς, Α.Χ., 1992. *Ο «Βοτρώτης» στα κηπευτικά και σε άλλες καλλιέργειες*. Εργαστήριο Μυκητολογίας Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου. Αθήνα: Έκδοση ΕΦΕ. Φυτοπαθολογικό Φύλλο 4.
8. Παππάς, Α.Χ. και Jordan, V.W.L., 1997. Φαινολογία σταδίων άνθησης-αύξησης καρπού και ευπάθεια στην προσβολή του βοτρώτη (*Botrytis cinerea*) σε φράουλα, σμέουρο και ριβήσιο. *Χρον. Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Ν.Σ.)* **18**: 1-13.

6.3 Πηγές Εικόνων

1. <http://seedcount.com/lettuce-babycos-p-186.html>
2. <http://www.perfection.com.au/produce/vegetables/leafy-greens/lettuce-cos.aspx>
3. <http://gothamgreens.com/our-produce/baby-butterhead-lettuce>
4. http://www.rijkzwaan.nl/wps/wcm/connect/RZ+corporate/Rijk+Zwaan/Products_and_Services/Products/Crops/Lettuce
5. <http://xoomer.virgilio.it/giuseppefiume/Introduction.html>
6. <http://www.buyfruit.com.au/iceberg-lettuce>
7. http://www.ufseeds.com/Lettuce_084a6000320754bf0a14a1d7.html
8. http://pinova.hr/hr_HR/baza-znanja/povrcarstvo/salata/morfoloska-svojtva-salate
9. <http://www.flickr.com/photos/30372914@N03/3896206200/in/photostream/>
10. <http://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=5177>
11. <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2006/botrytis/>
12. <http://www.greenhousecanada.com/content/view/2625/38/>
13. <http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1234129>
14. <http://www.abgenternasyonel.com/ilac.php?dilkod=EN&ilacid=27&kat=bestnate-50-ec>
15. http://gardener.wikia.com/wiki/File:Sweet_pepper_Grey_mould_Botrytis_cinerea.jpg
16. <http://gardener.wikia.com/wiki/Botryotinia>
17. <http://www.giantsakiplants.gr/Fyta/Asth-ExtrTrof/Astheneies/AsthenMelitzanasNew.php>
18. http://efe.aua.gr/gallery_fungal.php
19. <http://www.pestnet.org/SummariesofMessages/Crops/Vegetables/Capsicumchilli/Ghostspots,Botrytiscinerea,Argentina.aspx>
20. <http://pnwhandbooks.org/plantdisease/onion-allium-cepa-botrytis-leaf-blight>
21. <http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5358905>
22. <http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5360610>
23. http://bioref.lastdragon.org/anamorphic_fungi/Botrytis_cinerea.html

24. <http://www.missouribotanicalgarden.org/gardens-gardening/your-garden/help-for-the-home-gardener/advice-tips-resources/pests-and-problems/diseases/fruit-spots/gray-mold-of-strawberry.aspx>
25. http://www.endure-network.eu/about_endure/all_the_news/tackling_pesticide_use_in_grapes
26. <http://www.enologyinternational.com/fungi/fungi.html>
27. http://efe.aua.gr/gallery_fungal.php
28. <http://landaction.blogspot.gr/>
29. <http://www.plantmanagementnetwork.org/elements/view.aspx?ID=4275>
30. <http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1492024>
31. http://agrotismania.blogspot.gr/2013/06/blog-post_553.html
32. <http://www.flickr.com/photos/ajc1/1551444807/>
33. http://www.fomesa.net/Calidad/Variedades/Enfermedades/Botrytis_cinerea.htm
34. http://www.agroatlas.ru/en/content/diseases/Olee/Olee_Botrytis_cinerea/
35. <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Botrytis.html>
36. http://szolo.blog.hu/2007/12/14/a_furt_megbetegedesei_botritisz
37. <http://www.pilz-baden.ch/galerie/tenacellus.html>
38. http://en.wikipedia.org/wiki/Coenzyme_Q_%E2%80%93_cytochrome_c_reductase
39. <http://www.sciencestuff.com/prod/L-p-Agar/1522-10>
40. <http://www.nuffieldfoundation.org/practical-biology/pouring-agar-plate>
41. <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Cultivation.html>
42. <http://www.projectsday.hci.edu.sg>
43. <http://www.domusweb.it/en/interviews/2011/11/22/design-and-biology-a-unified-laboratory.html>
44. http://gr.clipartlogo.com/image/becherglas_116644.html
45. <http://www.jamiedobson.com/pointlessendeavour/archives/date/2012/04/10>
46. <http://www.totallab.co.nz/productfull/?prodid=1446>
47. <http://www.atomizer.gr/static/871.html>



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000123172