

«ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
μεταξύ Του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος  
και Του Τμήματος Γεωπονίας Ζωικής Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος»

**Δ. Β. Παπαευαγγέλου**

**« Έλεγχος ευαισθησίας σε ειδικά βοτρυδιοκτόνα απομονώσεων  
του *Botrytis cinerea* από καλλιέργεια μαρουλιού »**

«Έλεγχος ευαισθησίας σε ειδικά βοτρυδιοκτόνα απομονώσεων του  
*Botrytis cinerea* από καλλιέργεια μαρουλιού»



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

Αριθ. Εισ.: 9459/1  
Ημερ. Εισ.: 30-03-2011  
Δωρεά: Συγγραφέας  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
635.049 3  
ΠΑΠ

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### I. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	σελ. 7
<b>2. ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ</b>	σελ. 8
<b>3. ΞΕΝΙΣΤΕΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ</b>	σελ. 11
<b>4. ΕΠΙΒΙΩΣΗ</b>	σελ. 14
α) Σκληρώτια	σελ. 14
β) Χλαμυδοσπόρια	σελ. 15
γ) Κονίδια	σελ. 15
δ) Μυκήλιο	σελ. 16
<b>5. ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΚΑΙ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗ ΣΤΙΣ ΦΥΤΙΚΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ</b>	σελ. 16
α. Διασπορά των κονιδίων με τον άνεμο και τη βροχή	σελ. 17
β. Διασπορά κονιδίων από έντομα	σελ. 18
γ. Διασπορά άλλων πολλαπλασιαστικών υλικών	σελ. 18
<b>6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΑΝΩ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ</b>	σελ. 18
α. Επίδραση της θερμοκρασίας	σελ. 18
β. Επίδραση της σχετικής υγρασίας	σελ. 19
γ. Επίδραση του φωτός	σελ. 19
δ. Άλλοι παράγοντες	σελ. 19
<b>7. ΜΟΛΥΝΣΗ</b>	σελ. 20
α. Είσοδος μέσω άθικτων ιστών του ξενιστή	σελ. 20
β. Είσοδος από φυσικά ανοίγματα	σελ. 21
γ. Είσοδος από πληγές	σελ. 22
δ. Είσοδος μέσω εξειδικευμένων οργάνων του ξενιστή	σελ. 23

<b>8. ΕΙΣΒΟΛΗ ΚΑΙ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ</b>	σελ. 23
<b>9. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗΣ</b>	σελ. 24
α. Λιπάσες	σελ. 24
β. Κουτινάσες	σελ. 25
γ. Τοξίνες	σελ. 25
δ. Οξαλικό οξύ	σελ. 25
ε. Δραστικές μορφές οξυγόνου ( AOS )	σελ. 25
στ. Πηκτινάσες	σελ. 26
i ) Πηκτινομεθυλεστεράσες	σελ. 26
ii ) Ενδοπολυγαλακτουρονάσες	σελ. 26
iii ) Εξωπολυγαλακτουρονάσες	σελ. 26
ζ. Μη πηκτινολυτικά ένζυμα αποικοδόμησης κυτταρικών τοιχωμάτων	σελ. 26
i ) Κυτταρινάσες	σελ. 27
ii ) Ξυλανάσες – Αραμπινάσες	σελ. 27
η. Άλλα ένζυμα που επιδρούν πιθανώς στην παθογένεση	σελ. 27
i ) Ασπαρτικές πρωτεάσες ( AP )	σελ. 27
ii ) Λακκάσες	σελ. 27
<b>10. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ</b>	σελ. 28
<b>11. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ</b>	σελ. 29
<b>12. ΑΜΥΝΑ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ</b>	σελ. 30
A) Μηχανική άμυνα	σελ. 30
B) Πρωτεΐνες σχετικές με την παθογένεση και άλλες πρωτεΐνες άμυνας	σελ. 32
Γ) Χημική άμυνα	σελ. 32
<b>13. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ</b>	σελ.33
A) Καλλιεργητικές μέθοδοι	σελ. 33
B) Βιολογικές μέθοδοι	σελ. 34
Γ) Χημικές μέθοδοι	σελ. 35

<b>14. ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ</b>	<b>σελ. 39</b>
<b>15. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΒΕΝΖΙΜΙΔΑΖΟΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΦΑΙΝΥΛΟΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ</b>	<b>σελ.40</b>
<b>16. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΔΙΚΑΡΒΟΞΙΜΙΔΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ</b>	<b>σελ. 42</b>
<b>17.ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΣΑΝ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ III (QoIs)</b>	<b>σελ.43</b>
<b>18. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ BOSCALID</b>	<b>σελ. 45</b>

## **II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>σελ. 48</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>σελ. 50</b>
<b>3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ</b>	<b>σελ. 54</b>
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>σελ. 55</b>
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>σελ. 66</b>

## **III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

<b>ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>σελ. 72</b>
<b>ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>σελ.86</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι</b>	<b>σελ. 87</b>

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή αποτελεί τμήμα των υποχρεώσεων του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών μεταξύ των τμημάτων Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος και Γεωπονίας, Ζωικής Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας κατά τα έτη 2009-2010.

Θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Παππά Αθανάσιο για τις πολύτιμες συμβουλές και οδηγίες του καθώς και για την κατανόηση και υπομονή του καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας διατριβής, αλλά και συνολικότερα των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Επίσης στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Βέλλιο Ευάγγελο, Λέκτορα του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συμπαράσταση και τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών και στον κ. Παπαδόπουλο Νικόλαο, αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Εντομολογίας, για την κριτική και τις υποδείξεις του στη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες :

Στους μεταπτυχιακούς συμφοιτητές μου κ. Κουτσώνη Ευάγγελο που ήταν συνοδοιπόρος και πολύτιμος συμπαραστάτης σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών και κα. Καρατσιώρη Ελένη για τη σημαντική της βοήθεια και ενθάρρυνση.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλονται στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Χατζηδημόπουλο Μιχάλη, για τη συνεργασία, βοήθεια και τεχνική υποστήριξη σε διάφορες φάσεις της παρούσας διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την σύζυγό μου Αναστασία και τα παιδιά μου Μαρία, Βησσάριο και Σοφία για την υπομονή και τη συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

**Επιβλέπων:** κ. Παππάς Αθανάσιος, Καθηγητής Φυτοπαθολογίας τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Π. Θ.

**Μέλη:** κ. Παπαδόπουλος Νικόλαος, αναπληρωτής Καθηγητής Εντομολογίας τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Π. Θ.

κ. Βέλλιος Ευάγγελος, Λέκτορας Φυτοπαθολογίας τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Π. Θ.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη έγινε έλεγχος ευαισθησίας 100 απομονώσεων *Botrytis cinerea* που συλλέχθηκαν από καλλιέργειες μαρουλιού, σε θερμοκήπιο και σε χωρίς κάλυψη αγροτεμάχια, στην περιοχή της Θεσσαλίας, κατά την άνοιξη του 2009. Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εμβολιασμού σε σημείο ( point inoculation method, ) σε τρυβλία με PDA εμπλουτισμένα με διάφορες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων. Η ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά ( iprodione ) και στα βενζιμιδαζολικά ( carbendazim ) μυκητοκτόνα ήταν εκτενώς εξαπλωμένη και υπολογίστηκε στο 15% και 20% των απομονώσεων που δοκιμάστηκαν, αντίστοιχα. Ανθεκτικές χαρακτηρίστηκαν οι απομονώσεις που ανέπτυξαν μυκήλιο στις συγκεντρώσεις των 3μg/ml iprodione και 10μg/ml carbendazim, αντίστοιχα, ενώ ευαίσθητες χαρακτηρίστηκαν οι απομονώσεις που απέτυχαν να αναπτύξουν μυκήλιο στις παραπάνω συγκεντρώσεις. Απομονώσεις ανθεκτικές στο pyraclostrobin βρέθηκαν με συχνότητα 8%, παρουσία του παρεμποδιστή της εναλλακτικής αναπνοής SHAM σε συγκέντρωση 100μg/ml. Ως ανθεκτικές χαρακτηρίστηκαν οι απομονώσεις που ανέπτυξαν μυκήλιο στη συγκέντρωση των 10μg/ml pyraclostrobin. Τέλος, ανθεκτικότητα στο boscalid βρέθηκε στο 4% των απομονώσεων που ελέγχθηκαν. Ως ανθεκτικές χαρακτηρίστηκαν οι απομονώσεις που ανέπτυξαν μυκήλιο στη συγκέντρωση των 10μg/ml boscalid. Από τις 100 απομονώσεις που ελέγχθηκαν 5 ήταν ανθεκτικές μόνο στο carbendazim, 11 παρουσίασαν διπλή ανθεκτικότητα στο iprodione και στο carbendazim, 1 παρουσίασε διπλή ανθεκτικότητα στο carbendazim και στο pyraclostrobin, 3 παρουσίασαν διπλή ανθεκτικότητα στο pyraclostrobin και στο boscalid, 3 παρουσίασαν πολλαπλή ανθεκτικότητα στο iprodione, carbendazim και pyraclostrobin, ενώ 1 παρουσίασε πολλαπλή ανθεκτικότητα στο iprodione, pyraclostrobin και boscalid. Η ανθεκτικότητα στο carbendazim ήταν πιο συχνή μεταξύ των απομονώσεων που προέρχονταν από το θερμοκήπιο σε σχέση με τις απομονώσεις που προέρχονταν από χωρίς κάλυψη αγροτεμάχια, ενώ ανθεκτικότητα στο iprodione, pyraclostrobin και boscalid παρατηρήθηκε αποκλειστικά σε απομονώσεις που προήλθαν από το θερμοκήπιο. Τέλος, ανθεκτικότητα παρατηρήθηκε ως επί τω πλείστον σε απομονώσεις που προήλθαν μετά την εφαρμογή και δεύτερου ψεκασμού με τα αντίστοιχα μυκητοκτόνα.



## **I. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ**

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο *Botrytis cinerea* και τα άλλα είδη του γένους *Botrytis* είναι σημαντικά παθογόνα κηπευτικών καλλιεργειών, καλλωπιστικών φυτών, φρούτων και νεαρών φυταρίων που καλλιεργούνται σε σπορεία, καθώς επίσης αποθηκευμένων και μεταφερόμενων αγροτικών προϊόντων. Ο Mac Farland ( 1968 ) απαρίθμησε 235 είδη ξενιστών που ανήκουν σε διάφορες οικογένειες, που προσβάλλονται από τον *B. cinerea*.

Ο Coley-Smith ( 1980 ) αναφέρεται στον *B. cinerea* σαν ένα παθογόνο των εύκρατων περιοχών ίσως εξαιτίας της τεράστιας έρευνας που έγινε σε αυτές τις περιοχές ή εξαιτίας της σημασίας του για τους αμπελώνες. Παρ' όλα αυτά, είδη του γένους *Botrytis* εμφανίζονται οπουδήποτε αναπτύσσονται οι ξενιστές τους, εκτεινόμενα από τροπικές και υποτροπικές μέχρι ψυχρές περιοχές. Για παράδειγμα, ο Anderson ( 1924 ) κατέγραψε *B. cinerea* στην Αλάσκα και οι Yunis and Elad ( 1989 ) απασχολήθηκαν με αυτό το παθογόνο σε ζεστές και ξηρές περιοχές. Ένας γρήγορος ρυθμός βλάστησης των κονιδίων, μόλυνσης, ανάπτυξης μυκηλίου και παραγωγής κονιδίων μπορεί να συμβεί κάτω από ένα μεγάλο εύρος μικροκλιματικών καταστάσεων και να δημιουργήσει σοβαρά προβλήματα αντιμετώπισης της ασθένειας παγκοσμίως.

Ο *Botrytis* spp. αναφέρεται σαν παθογόνο υψηλής υγρασίας και η βλάστηση των κονιδίων του γίνεται σε υψηλή σχετική υγρασία ( Snow, 1949 ). Σε πολλά παθοσυστήματα μόλυνση συμβαίνει παρουσία ενός φιλμ νερού πάνω στον ευπαθή φυτικό ιστό. Ο ρόλος των σταγόνων νερού και των θρεπτικών συστατικών στη βλάστηση και στη μόλυνση έχει αναγνωριστεί από καιρού. Είναι επίσης ενδιαφέρον, ότι το παθογόνο μπορεί να μολύνει φυτά όταν δεν υπάρχει φιλμ νερού πάνω στις φυτικές επιφάνειες ( Williamson *et al.*, 1995; Elad, 2000 ). Αν και ο *Botrytis* spp. μπορεί να απομονωθεί από κάποια εδάφη και είναι επίσης παρόν σε σπόρους, βολβούς και στον κορμό, περισσότερο συχνά απομονώνεται από τα υπέργεια μέρη των φυτών ( φύλλα, άνθη, καρπούς, βλαστούς ) και σε κάποιες περιπτώσεις από τη βάση του βλαστού και από τμήματα πάνω από τις ρίζες.

Τα συμπτώματα που προκαλεί η μόλυνση ποικίλουν από περιορισμένες βλάβες μέχρι ξηρές και εκτεταμένες μαλακές σήψεις, με ή χωρίς την εμφάνιση καταφανών σποριοποιημένων αποικιών. Ο *Botrytis* spp. είναι υψηλά δραστήριος σε μέτριες

θερμοκρασίες, εντούτοις η ικανότητα του *B. cinerea* να είναι δραστήριος σε θερμοκρασία ακόμα και κάτω από 0°C ( Brooks and Cooley, 1917 ), τον κάνει ένα σημαντικό παθογόνο των αποθηκευμένων προϊόντων και απαιτεί την αντιμετώπιση της ασθένειας κατά την αποθήκευση και την αποστολή των εμπορευμάτων.

Η μόλυνση μπορεί να είναι αδρανής, επιθετική, περιορισμένη ή ευρύτατα αναπτυσσόμενη. Η παραγωγή υψηλού αριθμού κονιδίων και η διασπορά τους με τον άνεμο, τη βροχή και τα έντομα, συνιστά μια διαρκή απειλή για τους ευαίσθητους ξενιστές. Ο περιοριστικός παράγοντας για ξεσπάσματα επιδημίας, είναι συνήθως η εμφάνιση των απαραίτητων μικροκλιματικών συνθηκών παρά το ποσό του μολύσματος ( Shtienberg and Elad, 1997 ).

Η γενοτυπική και φαινοτυπική παραλλακτικότητα είναι πολύ σημαντική στο ευρέως φάσματος παθογόνο *B. cinerea*. Επιπλέον, αλλαγές στον πληθυσμό εξαιτίας της επιλογής από την έκθεση σε ξενοβιοτικά, ιδιαίτερα μυκητοκτόνα, είναι αρκετά κοινές στο γένος αυτό και ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα έχει καταγραφεί σε πληθυσμούς *Botrytis* σε όλη τη διάρκεια της ιστορίας των σύγχρονων μυκητοκτόνων. Λεπτομερείς μελέτες πάνω στις ακριβείς συνθήκες που προάγουν τη μόλυνση, την ανάπτυξη της ασθένειας και την επιβίωση του μολύσματος, έδωσαν τις απαραίτητες επιδημιολογικές πληροφορίες που απαιτούνται για το σχεδιασμό των στρατηγικών ελέγχου. Για παράδειγμα, έχουν αναπτυχθεί καλλιεργητικές μέθοδοι που αυξάνουν τον αερισμό και την ξηρότητα της φυτικής κόμης για να μειωθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης επιδημιών. Η αυξημένη απαίτηση για εναλλακτικές προσεγγίσεις, ώστε να μειωθεί η εξάρτηση των παραγωγών από τη χρήση μυκητοκτόνων, οδήγησε στην ανάπτυξη και βιομηχανική εκμετάλλευση πιθανών βιολογικών παραγόντων, ικανών για την ουσιαστική καταστολή της ασθένειας και την ενσωμάτωσή τους εντός ολοκληρωμένων συστημάτων διαχείρισης των καλλιεργειών.

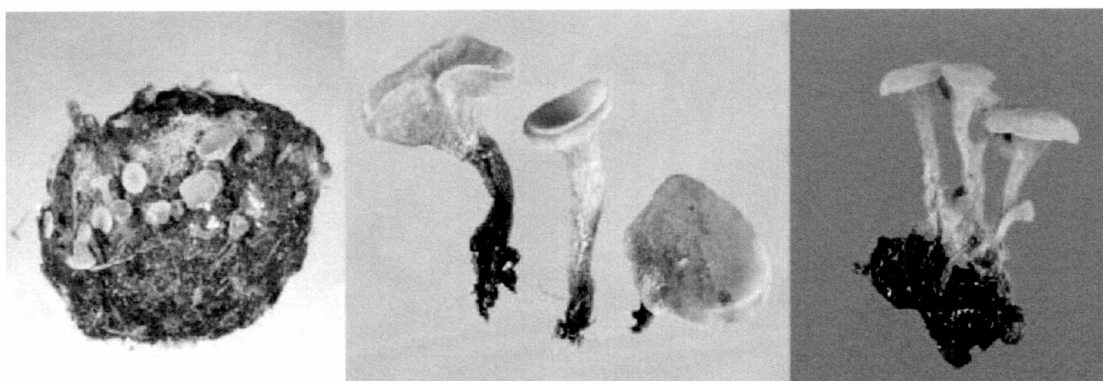
## 2. ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Το παθογόνο που προκαλεί την ασθένεια της τεφράς σήψης ή σταχτιάς μούχλας είναι ο μύκητας με ατελή μορφή στην τάξη των Moniliales, *Botrytis cinerea*, Pers. και με τέλεια μορφή το Δισκομύκητα ( Ασκομύκητα ) *Botryotinia fuceliana* de Bary. Ο μύκητας είναι εξαιρετικά πολυφάγος και προσβάλλει μεγάλο πλήθος

καλλιεργούμενων φυτών, μπορεί όμως να επιβιώσει άνετα και για μακρύ χρονικό διάστημα ως σαπρόφυτο στο έδαφος ή σε φυτικά υπολείμματα.

Το μυκήλιο του μύκητα είναι σταχτί ( τεφρό ), από το χρώμα δε αυτό προέρχεται και το όνομα της ασθένειας. Το νεαρό μυκήλιο είναι υαλώδες. Παράγει σκληρώτια διαφόρων σχημάτων, μαύρα, μεγέθους μέχρι και 6 mm. Έχει κονιδιοφόρους σε ομάδες, σαφώς διαφοροποιημένους από το μυκήλιο, σε σχήμα βοτρυοειδές, απ' όπου και το όνομα του γένους. Στις άκρες των κονιδιοφόρων σχηματίζονται τα κονίδια, υαλώδη, μονοκύτταρα, πολυύρηνα, μεγέθους 10X8.5 μm. Από τα σκληρώτια παράγονται κονιδιοφόροι και αποθήκια με σχήμα κυπελλοειδές, με μίσχο, χρώμα καστανό και πλάτος 1.5-3 mm. Οι ασκοί έχουν μέγεθος 5-6X 6-9 μ. και φέρουν ελλειψοειδή ασκοσπόρια.

Τα αποθήκια του *Botrytis cinerea* σπάνια βρίσκονται στη φύση, αν και πρέπει να αναφέρουμε ότι ο Anton de Bary περιέγραψε *Botryotinia fuckeliana* και *Botrytis cinerea* από αμπέλια στην Ελβετία, πάνω από μισό αιώνα πριν (Gregory, 1949 ). Ένα μέρος αυτής της φαινομενικής σπανιότητας μπορεί να εξηγηθεί λόγω της απουσίας έρευνας και της σύγχυσης που γίνεται με τα αποθήκια των *Sclerotinia* και *Monilinia*, παρ' όλα αυτά υποπευόμαστε ότι τα αποθήκια είναι πραγματικά ασυνήθιστα, τουλάχιστο σε σύγκριση με αυτά άλλων γενών. Τα σκληρώτια δεν βρίσκονται ή είναι σπάνια στον αγρό, σε περιοχές με ζεστά, ξηρά καλοκαίρια, όπως η Αλμερία της Ισπανίας ( Raposo *et al.*,2001 ) και το Ισραήλ ( Yunis and Elad, 1989 ) και επομένως είναι απίθανο να βρεθούν αποθήκια σε αυτές τις περιοχές. Στη χώρα μας επίσης δεν έχει απαντηθεί η τέλεια μορφή.



Εικόνα1. Αποθήκια *Botryotinia fuckeliana* πάνω σε μουμιοποιημένο ροδάκινο που συλλέχθηκε σε αγρό στην Hawke' Bay, στη Νέα Ζηλανδία ( αριστερά και στο κέντρο ), μαζί με μια ομάδα αποθηκίων που ανέρχονται από ένα σκληρώτιο, παραγόμενα στο εργαστήριο ( δεξιά ).

Το γένος *Botrytis* είναι από τα πρώτα γνωστά γένη φυτοπαθογόνων μυκήτων και δημιουργήθηκε για πρώτη φορά από τον P.A. Micheli το 1729. Η σύνδεση μεταξύ *Botrytis* spp. και της τέλειας μορφής *Botryotinia* επαληθεύτηκε κατά τη διάρκεια των δεκαετιών 1940 και 1950 ( Groves and Loveland, 1953 ). Το γένος *Botryotinia*, ο Whetzel ( 1945 ) το περιέλαβε στην οικογένεια Sclerotiniaceae, που εγκαθίδρυσε ο ίδιος.

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

Βασίλειο: Φυτικό

Φύλλο: Μύκητες ( Mycophyta, Fungi )

Κλάση: Αδηλομύκητες ή δευτερομύκητες ή ατελείς μύκητες

Τάξη: Moniliales

Οικογένεια: Botrytidaceae

Γένος: *Botrytis*

Είδος: *cinerea*

Ταξινομώντας με βάση την τέλεια μορφή, έχουμε την κάτωθι συστηματική κατάταξη:

Βασίλειο: Φυτικό

Φύλλο: Μύκητες

Κλάση: Ασκομύκητες

Υπόκλαση: Δισκομύκητες

Τάξη: *Helotiales*

Οικογένεια: *Sclerotiniaceae*

Γένος: *Botryotinia*

Είδος: *fickeliana*

Κατά τον Γεωργόπουλο ( 1984 ), οι ατελείς μύκητες, των οποίων είναι γνωστή η εγγενής αναπαραγωγή, θα πρέπει να αναφέρονται με το όνομα της τέλειας μορφής τους, σύμφωνα με το Διεθνή Κώδικα Ονοματολογίας. Επειδή όμως, πολλών μυκήτων η ατελής μορφή είναι η πιο συχνή κι εκείνη που συναντούμε πιο εύκολα πάνω στα προσβεβλημένα φυτά, επιτρέπεται και η χρήση του ονόματος της ατελούς μορφής.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, για το παθογόνο αίτιο της τεφράς σήψης, μπορούμε να χρησιμοποιούμε και τους δύο τρόπους. Στη βιβλιογραφία έχει επικρατήσει η χρήση της ατελούς μορφής.

### 3. ΞΕΝΙΣΤΕΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Ο *Botrytis cinerea* και η τεφρά σήψη που αυτός προκαλεί είναι από τις πιο διαδεδομένες και οικονομικής σημασίας ασθένειες των φυτών παγκοσμίως, ιδιαίτερα σε περιοχές που επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξή του, όπως υψηλή σχετική υγρασία. Αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για τις θερμοκηπιακές καλλιέργειες κηπευτικών, διακοσμητικών ανθέων, φράουλας, βοτάνων και φυτών που φυτεύονται σε γλάστρες. Αρχικά ο *Botrytis cinerea* εισέρχεται στα θερμοκήπια από τα ανοιχτά παράθυρα, τις χαραμάδες και τα σπασμένα μέρη, επίσης μεταφερόμενος πάνω στους ανθρώπους και τα διάφορα εργαλεία ή ακόμα και από τα νεαρά φυτάρια. Τα μολυσμένα φυτά ή μολυσμένα και αποσυντετημένα φυτικά τμήματα μέσα στο θερμοκήπιο σχηματίζουν μια πηγή μολύσματος. Τα νεαρά φυτικά τμήματα δεν είναι γενικά τόσο ευπαθή, ενώ τα μεγαλύτερα μολύνονται περισσότερο. Η εμφάνιση της μόλυνσης εκφράζεται σε διαφορετικές φάσεις στις διάφορες καλλιέργειες. Η τομάτα, το αγγουράκι, η πιπεριά, είναι από τις πλέον αναπτυσσόμενες κηπευτικές καλλιέργειες και η τεφρά σήψη μπορεί να δημιουργήσει πολύ σοβαρά προβλήματα.

Στην τομάτα, σε μη θερμαινόμενα θερμοκήπια, ο μύκητας μπορεί να μολύνει τα άνθη, τους καρπούς και τα φύλλα και μπορεί να αναπτυχθεί δια μέσου του μίσχου στον βλαστό ( Elad and Yunis, 1993 ). Σε θερμαινόμενα θερμοκήπια η μόλυνση περιορίζεται στον βλαστό. Στο αγγούρι και στο κολοκύθι που καλλιεργούνται σε θερμαινόμενα θερμοκήπια, η μόλυνση των καρπών περιορίζεται κυρίως στους αποβαλλόμενους καρπούς. Τα παλαιότερα φύλλα μπορεί να μολυνθούν και μόλυνση του βλαστού μπορεί να εγκατασταθεί δια μέσου του μίσχου ή από άμεση μόλυνση μέσω πληγών που δημιουργούνται από το κλάδεμα. Όπως και στην τομάτα, οι βλάβες των βλαστών μπορούν τελικά να σκοτώσουν το τμήμα του φυτού πάνω από το σημείο της βλάβης.

Στην πιπεριά, η μόλυνση από τεφρά σήψη συμβαίνει κυρίως πάνω σε πληγές που δημιουργούνται κατά τη συγκομιδή ή από αποκοπή των φύλλων. Στο μαρούλι, έχουμε προσβολή σε όλα τα στάδια ανάπτυξής του και πρόκληση μαλακής σήψης της κεφαλής ή σάπισμα στο κάτω μέρος της βάσης. Σε θερμαινόμενα θερμοκήπια οι

νεαροί καρποί πιπεριάς μπορούν να μολυνθούν ( Yunis *et al.*, 1994 ; Elad and Shtienberg, 1995 ).

Ο *Botrytis cinerea* είναι επίσης σημαντικό παθογόνο για τη φράουλα. Τα άνθη μολύνονται και ο μύκητας αναπτύσσεται εντός των αναπτυσσόμενων καρπών. Σήψη του καρπού μπορεί να συμβεί πριν ή μετά τη συγκομιδή ( Boff *et al.*, 2001 ).

Σε κομμένα άνθη όπως το τριαντάφυλλο και η ζέρμπερα, η τεφρά σήψη είναι πολύ καταστρεπτική ασθένεια. Οι βλάβες συμβαίνουν στα πέταλα, μειώνοντας ως εκ τούτου την αγοραστική αξία των ανθέων, όπως και τη διάρκεια ζωής τους στο ανθοδοχείο. Σε θερμαινόμενα θερμοκήπια οι μολύνσεις ανθέων είναι πολύ σπάνιο να βρεθούν κατά την περίοδο της παραγωγής. Εντούτοις, τα κονίδια του μύκητα μπορεί να είναι παρόντα πάνω στα φυτά, όπου μπορούν να επιβιώσουν για μακρές περιόδους ( Salinas *et al.*, 1989 ) ή μπορεί να συμβαίνει λανθάνουσα μόλυνση και τα συμπτώματα να γίνουν ορατά μετά τη συγκομιδή.

Η τεφρά σήψη μπορεί επίσης να συμβεί στα περισσότερα ανθοκομικά φυτά που καλλιεργούνται σε γλάστρες, είτε κατά την περίοδο της παραγωγής τους μέσα στα θερμοκήπια, είτε μετά τη συγκομιδή. Το κύριο σύμπτωμα είναι η μόλυνση των ανθέων, αλλά ο μύκητας μπορεί επίσης να μολύνει και πληγές. Στο κυκλάμινο, φυσιολογικά γηρασμένα φύλλα μολύνονται εύκολα, οδηγώντας τελικά τα φυτά σε θάνατο ( Kohl *et al.*, 2000 ). Στο πελαργόνιο, τα άνθη δεν είναι πολύ ευαίσθητα αμέσως μετά το άνοιγμα, αλλά η ευαισθησία αυξάνει γρήγορα με την ηλικία ( Sirjusing and Sutton, 1996 ).

Από τους πιο σημαντικούς ξενιστές του *Botrytis cinerea* είναι το αμπέλι. Αυτή η καλλιέργεια είναι από τις σημαντικότερες οικονομικά καλλιέργειες, με περίπου 8 εκατομμύρια εκτάρια καλλιεργούμενες εκτάσεις και οι απώλειες από τις προσβολές του *Botrytis cinerea* υπολογίζονται σε 25 δις δολάρια Η.Π.Α., το χρόνο ( Vivier and Pretorius, 2002 ). Στην άμπελο, προσβολές παρατηρούνται σε όλες τις αμπελουργικές χώρες του κόσμου, η ένταση όμως των προσβολών είναι διαφορετική ανάλογα με τις κλιματολογικές συνθήκες, την εποχή της προσβολής και την ταχύτητα εξέλιξης της ασθένειας. Αν η προσβολή είναι έντονη, λίγο πριν την ωρίμανση των σταφυλιών και σε ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης της ασθένειας, τότε οι ζημιές μπορεί να είναι πολύ μεγάλες. Στη χώρα μας σημαντικές ζημιές, το μέγεθος των οποίων δεν έχει εκτιμηθεί μέχρι σήμερα, προκαλούνται σε όψιμες κυρίως ποικιλίες που διατηρούν τα σταφύλια πάνω στα πρέμνα αργά το φθινόπωρο. Τέτοιες προσβολές συμβαίνουν από τα μέσα Αυγούστου κι έπειτα και αν ο καιρός είναι βροχερός, με υψηλή σχετική υγρασία, τότε

σε μικρό χρονικό διάστημα μπορεί η καταστροφή της προσβολής να είναι ολοκληρωτική. Η ασθένεια προσβάλλει τα φύλλα, τις νεαρές κληματίδες, τα μοσχεύματα και κατ' εξοχήν τις ταξιανθίες και τα σταφύλια.

Στα οινοποιήσιμα ερυθρά σταφύλια ο μύκητας προκαλεί και υποβάθμιση της ποιότητας των κρασιών. Αυτό συμβαίνει διότι παράγει το ένζυμο οξειδάση που παραμένει στο κρασί και προκαλεί αλλοίωση του χρώματος και καταστροφή των χρωστικών. Αντίθετα, σε ορισμένες λευκές οινοποιήσιμες ποικιλίες, όπως π.χ. το Sauternais του Μπορντώ, τα κρασιά του Ρήνου κ.α., η παρουσία του παρασίτου βελτιώνει την ποιότητα του κρασιού. Αυτό γίνεται αφ' ενός εξαιτίας της αύξησης των σακχαρικών και αλκοολικών τίτλων, λόγω αφυδάτωσης εξαιτίας της προσβολής και αφ' ετέρου λόγω ελάττωσης, μέχρι εκμηδενισμού των οξέων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη βελτίωση της γεύσης του κρασιού λόγω της μεγάλης ελάττωσης της αναλογίας των οξέων σε σχέση με τα σάκχαρα. Από το γεγονός αυτό, οι αμπελουργοί της Γαλλίας ονόμασαν τη σήψη αυτή ως ' ευγενή σήψη '.

Σημαντικές οικονομικές απώλειες έχουμε παγκοσμίως σε καρποφόρα δέντρα, όπως η αχλαδιά, η ροδακινιά, η κερασιά, η δαμασκηλιά, το βατόμουρο, το ακτινίδιο κ.α., σαν αποτέλεσμα της μόλυνσης από *Botrytis cinerea*. Οι προσβολές παρατηρούνται όταν επικρατούν μέτριες θερμοκρασίες και υψηλά επίπεδα υγρασίας κατά την περίοδο της άνθισης. Η ασθένεια προσβάλλει κυρίως τους καρπούς και οι προσβολές παρατηρούνται στον αγρό, αλλά και μετασυλλεκτικά. Τα συμπτώματα είναι σήψεις καρπών που μοιάζουν να είναι βρεγμένοι.

Τέλος, η τεφρά σήψη αποτελεί μια σοβαρή ασθένεια για τις καλλιέργειες οσπρίων παγκοσμίως. Η σοβαρότητα των επιδημιών εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, ιδιαίτερα υψηλή υγρασία και θερμοκρασίες με εύρος 15-25°C. Ο μύκητας προσβάλλει όλα τα υπέργεια μέρη των φυτών και τα άνθη και οι αναπτυσσόμενες κορυφές είναι ιδιαίτερος ευαίσθητα. Απώλειες παραγωγής συμβαίνουν εξαιτίας μειωμένης ανάπτυξης, μαραμένων σπόρων στα άρρωστα φυτά ή θανάτου των φυτών. Όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές για ξέσπασμα της ασθένειας, οι απώλειες μπορεί να είναι σοβαρές και να ξεπερνούν το 50% της παραγωγής. Σε πολύ σοβαρές επιδημίες μπορεί να συμβεί 100% απώλεια παραγωγής. Η τεφρά σήψη αποτελεί σημαντικό πρόβλημα σε όλες τις περιοχές καλλιέργειας ρεβιθιών, ιδιαίτερα στη Ν. Ασία. Επίσης, είναι ένα σοβαρό πρόβλημα στις καλλιέργειες φακής στην Ινδία, το Μαρόκο, τη Συρία και την Αυστραλία, καθώς και στις καλλιέργειες αρακά στην Ευρώπη, τη Β. Αμερική, την Ιαπωνία και τη Νέα Ζηλανδία. Λιγότερο



σημαντικές ζημιές παρατηρούνται στις καλλιέργειες φασολιού, λούπινων και σόγιας (Ellis and Waller, 1974a; Nene and Reddy, 1987; Beniwal *et al*, 1993; Bretag *et al*, 1996; Biddle, 2001 ).

Εκτός όμως από τις απώλειες που προκαλεί προσυλλεκτικά, ο *Botrytis cinerea* θεωρείται ο πιο σημαντικός μετασυλλεκτικός παθογόνος μύκητας, που δημιουργεί σημαντικές απώλειες σε φρέσκα φρούτα, κηπευτικά και διακοσμητικά φυτά. Οι απώλειες είναι σοβαρές διότι η αξία του φρέσκου προϊόντος αυξάνει σημαντικά ενώ περνάει από τον παραγωγό στο τραπέζι του καταναλωτή. Αυτές οι απώλειες υπολογίζονται στο 50% στις αναπτυσσόμενες χώρες, εξαιτίας της απουσίας επαρκών δυνατοτήτων χειρισμού και ψύξης, ενώ οι απώλειες μπορεί να είναι μικρότερες στις αναπτυγμένες χώρες. Οι μετασυλλεκτικές σήψεις μπορεί να ακολουθούν μολύνσεις που συμβαίνουν μεταξύ άνθισης και ωρίμανσης των καρπών ή κατά τη διάρκεια της συλλογής και των ακολουθούμενων χειρισμών αποθήκευσης, προώθησης ή ακόμα και μετά την αγορά από τον πελάτη. Η ευπάθεια των κηπευτικών, των φρούτων και των διακοσμητικών φυτών στη μόλυνση από τεφρά σήψη και την ανάπτυξή της, αυξάνει μετά τη συγκομιδή καθώς οι φυτικοί ιστοί γηράσκουν. Παράγοντες που επιδρούν στην επιτάχυνση της γήρανσης, όπως το αιθυλένιο, αυξάνουν την ευπάθεια στην τεφρά σήψη. Καθυστερημένη γήρανση από μετασυλλεκτικές επεμβάσεις, όπως ελεγχόμενη ατμόσφαιρα, τροποποιημένη ατμόσφαιρα, ψυχρή αποθήκευση, παρεμποδιστές αιθυλενίου και γιβεριλλίνη, μπορούν να μειώσουν αξιοσημείωτα την ευαισθησία στη σήψη ( Sommer, 1985 ).

#### 4. ΕΠΙΒΙΩΣΗ

Ο *Botrytis cinerea* είναι ένα ευρέως φάσματος παθογόνο που μολύνει μεγάλο αριθμό ξενιστών, έχοντας ένα νεκροτροφικό τρόπο ζωής. Μετά τη μόλυνση και το θάνατο των ιστών του ξενιστή, μπορεί να επιβιώσει και να σχηματίσει σπόρια σαν σαπρόφυτο, πάνω σε νεκρωτικούς ιστούς ή να παράγει μακροχρόνιας επιβίωσης κατασκευές, όπως τα σκληρώτια. Αυτές οι κατασκευές επιβίωσης μπορεί να συνδέονται με ζωντανά φυτά ή με φυτικά υπολείμματα στην επιφάνεια του εδάφους ή θαμμένα σε αυτό.

##### α. Σκληρώτια

Όλα τα είδη *Botrytis* σχηματίζουν σκληρώτια, τα οποία μπορεί να διαφέρουν σε μέγεθος και σχήμα, ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας. Τα σκληρώτια, είναι

γενικά αποδεκτό, αποτελούν τις πιο σημαντικές κατασκευές που εμπλέκονται στην επιβίωση των ειδών *Botrytis*. Τα σκληρώτια μπορούν να επιβιώσουν σε μη ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες, μπορούν να παράγουν αποθήκια μετά από μια σεξουαλική διαδικασία και έχουν μια αξιοσημείωτη ικανότητα παραγωγής επιτυχημένων καλλιεργειών κονιδίων σε πολλά είδη *Botrytis* (Coley-Smith, 1980).

Τα τοιχώματα του φλοιού των σκληρωτίων περιέχουν μελανές χρωστικές, οι υφές περιβάλλονται από ένα συνεχόμενο περίβλημα β-γλυκανών και τα ενδοκυτταρικά θρεπτικά αποθέματα είναι πρωτεΐνες, γλυκογόνο, πολυφωσφατάση και λιπίδια (Backhouse and Willets, 1984).

### **β. Χλαμυδοσπόρια**

Τα χλαμυδοσπόρια του *Botrytis cinerea* είναι υαλώδη κύτταρα εξαιρετικά ποικίλου σχήματος και μεγέθους (Urbasch, 1983). Γενικά βρίσκονται σε γερασμένες καλλιέργειες και συνήθως σε στρωματικούς τομείς καλλιεργειών μυκήτων, οι οποίοι μολύνονται από άλλους οργανισμούς και είναι σε σύνδεση με τα σκληρώτια. Τα χλαμυδοσπόρια σχηματίζονται σαν τελικά ή εμβόλιμα κύτταρα, από μετατροπή αναπτυσσόμενων τμημάτων του μυκηλίου και απελευθερώνονται από αποσύνθεση υφών. Παρατηρήθηκαν μέσα και πάνω σε φυσικά ή τεχνητά μολυσμένα φύλλα τομάτας και ο αριθμός τους αυξήθηκε σε μεγαλύτερης ηλικίας βλάβες (Urbasch, 1983). Κάτω από υγρές συνθήκες και χωρίς προσθήκη θρεπτικών συστατικών, τα χλαμυδοσπόρια βλάστισαν πάνω σε φύλλα, από μικροκονίδια τα οποία ήταν σε λήθαργο. Όταν φρέσκα θρεπτικά συστατικά τροφοδοτήθηκαν στα χλαμυδοσπόρια, βλάστισαν με υφές και διαπέρασαν τον ξενιστή ή παρήγαγαν μια νέα καλλιέργεια μακροκονιδίων. Πάνω σε καρπούς νεκταρινιάς, δαμασκηνιάς και αχλαδιάς, μολύσματα παραγόμενα από ξηρά, αερομεταφερόμενα κονίδια *Botrytis cinerea* σχημάτισαν χλαμυδοσπόρια με κοντούς βλαστικούς σωλήνες όταν οι καρποί υποβλήθηκαν σε διακοπόμενες ξηρές περιόδους ή όταν κρατήθηκαν για 48h στους 5°C (Holz, 1999). Τα χλαμυδοσπόρια επομένως, μπορούν να θεωρηθούν ως μικρού χρόνου κατασκευές επιβίωσης, οι οποίες μπορούν να βοηθήσουν το μύκητα να ξεπεράσει μικρής διάρκειας δυσμενείς περιόδους, που επικρατούν απρόσμενα πάνω στις φυτικές επιφάνειες.

### **γ. Κονίδια**

Τα κονίδια θεωρούνται σαν βραχύβιο πολλαπλασιαστικό υλικό, σε συνθήκες αγρού και η επιβίωσή τους είναι σε μεγάλο βαθμό καθορισμένη από ακραίες θερμοκρασίες, διαθεσιμότητα υγρασίας, μικροβιακή δραστηριότητα και ηλιακή

έκθεση. Τα κονίδια του *Botrytis cinerea* είναι ικανά να επιβιώσουν στην επιφάνεια καρπών ακτινιδιάς, παραμένοντας ζωτικά καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου ( Walter *et al.*, 1999b ). Οι Salinas *et al.* ( 1989 ), ανέφεραν ότι αποθηκευμένα ξηρά κονίδια ήταν ικανά να επιβιώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για πάνω από 14 μήνες. Εντούτοις, στην επιφάνεια αχλαδιών ποικιλίας Αηίου, η ζωτικότητα των κονιδίων *Botrytis cinerea* μετά από 7 εβδομάδες είχε μειωθεί, με ένα ποσοστό βλάστησης 10% ( Spotts, 1985 ).

Τα μικροκονίδια, που υπάρχουν σε όλα τα είδη *Botrytis*, παρέχουν ένα μικροσκοπικό, πολλαπλασιαστικό υλικό γι' αυτούς τους μύκητες, όταν υπόκεινται σε εχθρικές συνθήκες. Γενικά, αυτά βρίσκονται σε μεγαλύτερης ηλικίας καλλιέργειες του μύκητα ή σε εκείνες που μολύνθηκαν από άλλους οργανισμούς και είναι σε συνδυασμό με τα σκληρώτια. Μικροκονίδια αναπτύσσονται από βλαστικούς σωλήνες που παράγονται από μακροκονίδια, πιο ώριμες υφές, εσωτερικά κενά κύτταρα υφών και από απρεσσόρια και σκληρώτια ( Jarvis, 1980a; Lorenz and Eichhorn, 1983 ).

#### **δ. Μυκήλιο**

Υπάρχουν αποδείξεις ότι το μυκήλιο κάποιων ειδών *Botrytis*, ιδιαίτερα εκείνων που είναι εξειδικευμένα στον παρασιτισμό, μπορεί να επιβιώσει για μεγάλες περιόδους στους βολβούς, σπόρους και άλλα βλαστικά φυτικά τμήματα ( Coley-Smith, 1980 ). Ο *Botrytis cinerea* θεωρείται ότι είναι ένα χαρακτηριστικό παθογόνο των υπέργειων επιφανειών κάποιων ειδών φυτών, ενώ είναι απών ή σπάνια απομονωμένος από άλλα. Η συχνότητα απομόνωσης του μύκητα τείνει να αυξηθεί καθώς προοδεύει η περίοδος, δείχνοντας μια αυξητική ικανότητα να εισέλθει σε φυτικούς ιστούς σαν ένα αδύναμο παράσιτο ή σαν ένα σαπρόφυτο κατά τη διάρκεια των γηρατειών ( Blackman, 1980 ). Ο Kobayashi ( 1984 ), παρατήρησε ότι μάζες κονιδίων *Botrytis cinerea* αναπτύχθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της χρονιάς, από μυκήλιο σε πεσμένα πέταλα 28 φυτικών ειδών που ανήκουν σε 19 γένη και 14 οικογένειες.

### **5. ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΚΑΙ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗ ΣΤΙΣ ΦΥΤΙΚΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ**

Για να επιτευχθεί η μόλυνση πρέπει το παθογόνο να μετακινηθεί από την πρωτεύουσα πηγή και να αποτεθεί στον ευπαθή φυτικό ιστό. Κάθε μέρος του θαλλού

του μύκητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μονάδα διασποράς. Αυτά τα πολλαπλασιαστικά υλικά διασπείρονται με τον άνεμο, τη βροχή και τα έντομα.

#### α. Διασπορά των κονιδίων με τον άνεμο και τη βροχή

Τα κονίδια θεωρούνται το πιο σημαντικό διασπειρόμενο πολλαπλασιαστικό υλικό των ειδών *Botrytis*. Η διασπορά των κονιδίων με τον άνεμο έχει τρεις ευδιάκριτες φάσεις: απελευθέρωση, μεταφορά και απόθεση ( Aylor, 1990 ). Η ελευθέρωση των κονιδίων δημιουργείται από μια απότομη συστροφή των κονιδιοφόρων εξαιτίας αλλαγών στη σχετική υγρασία ( Fitt *et al.*, 1985 ) και την εκτόξευσή τους από μια μηχανική διαταραχή. Αυτή η μηχανική διαταραχή θεωρείται ότι δημιουργείται από δύο δυνάμεις, τον άνεμο και την εκτόξευση νερού. Αν και οι μέσες ταχύτητες του ανέμου στα χαμηλότερα τμήματα της κλειστής φυτοκόμης είναι τυπικά ένα κλάσμα της ταχύτητα υπεράνω της φυτοκόμης, ριπές ανέμου με ταχύτητες μερικές φορές γρηγορότερες από την τοπική μέση ταχύτητα συμβαίνουν στο εσωτερικό της φυτοκόμης. Αυτό φαίνεται να είναι σημαντικό στη μετακίνηση των κονιδίων. Μετά την απελευθέρωση των κονιδίων κάποια μεταφέρονται εντός της φυτοκόμης και κάποια μετακινούνται ελεύθερα σε στρώματα αέρα υπεράνω αυτής. Η τελική φάση της διασποράς των αερομεταφερόμενων κονιδίων, η απόθεση, συνίσταται από δύο διαδικασίες: την ιζηματοποίηση και το σφήνωμα ( Aylor, 1978 ), που επηρεάζονται από την ισχύ του ανέμου. Η ιζηματοποίηση συμβαίνει με ήπιο άνεμο και είναι η διαδικασία κατά την οποία τα κονίδια εισβάλλουν κάτω από την επίδραση της βαρύτητας, με μια σταθερή τελική ταχύτητα. Το σφήνωμα είναι η διαδικασία με την οποία ένα κονίδιο, επειδή είναι βαρύτερο από τα μόρια του αέρα που το περιβάλλουν, δεν ακολουθεί ακριβώς τις διακυμάνσεις του αέρα και εισχωρεί σε ένα αντικείμενο ακόμα κι όταν ο αέρας ρέει γύρω του. Ο βαθμός απόθεσης επηρεάζεται από το εάν τα κονίδια διασπείρονται μόνα τους ή σε ομάδες. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των κονιδίων που σχηματίζουν συμπαγή μάζα, τόσο γρηγορότερη είναι η ταχύτητα καθόδου.

Οι σταγόνες βροχής χτυπούν τα φύλλα και εκτοπίζουν τα κονίδια από τα μολυσμένα φύλλα. Εργαστηριακά πειράματα έδειξαν ότι οι σταγόνες βροχής μπορούν να μεταφέρουν τα κονίδια εσωτερικά ή στο εξωτερικό των σταγόνων ( Jarvis, 1962b ). Πολύ λίγα κονίδια *Botrytis cinerea* που διασπείρονται από σταγόνες βροχής γίνονται αρκετά υγρά για να εισέλθουν στις σταγόνες και η πλειονότητα μεταφέρεται πάνω στην επιφάνεια της σταγόνας. Τα κονίδια του *Botrytis cinerea* προσδένονται πάνω στις υδροφοβικές επιφάνειες σε δύο ευκρινή στάδια ( Doss *et al.*, 1993, 1995 ).

Το πρώτο στάδιο, άμεση προσκόλληση, συμβαίνει μετά από εφύγρανση των φρεσκοαποθετημένων κονιδίων. Κονίδια *Botrytis cinerea* προσκολλούνται στην επιδερμίδα καρπών τομάτας και σταφυλιών, φύλλα και πέταλα άλλων ξενιστών, αμέσως μετά από εφύγρανση. Ξηρά κονίδια εφαρμοζόμενα σε υγρές επιφάνειες καρπών προσκολλούνται στον ίδιο βαθμό, όπως κονίδια από υγρό αιώρημα, στην επιφάνεια δαμάσκηνων και σταφυλιών. Τα κονίδια προσκολλούνται πιο ισχυρά όταν εφαρμόζονται σε αιώρημα νερού ή σε υγρή επιφάνεια στις ράγες σταφυλιών, απ' ότι όταν ξηρά κονίδια εφαρμόζονται σε μια ξηρή επιφάνεια ( Spotts and Holz, 1996 ).

#### β. Διασπορά κονιδίων από έντομα

Τα κονίδια των ειδών *Botrytis* διασπείρονται επίσης από έντομα. Τα κονίδια του *Botrytis cinerea* παγιδεύονται πάνω στο δερμάτιο, τις σωματικές τρίχες και ανάγλυφες περιοχές της δροσόφιλας ( *Drosophila melanogaster* ), της ευδεμίδας ( *Lobesia botrana* ), του *Thrips obscuratus* και της μύγας της Μεσογείου ( *Ceratytis capitata* ). Τα κονίδια παραμένουν ζωτικά στα αποχωρήματα αυτών των εντόμων.

#### γ. Διασπορά άλλων πολλαπλασιαστικών υλικών

Στις ασθένειες που δημιουργούνται από τον *Botrytis cinerea*, τα κονίδια φαίνεται να είναι λιγότερο σημαντικά απ' ότι το σαπροφυτικό μυκήλιο, για την εγκατάσταση της ασθένειας. Τα χλαμυδοσπόρια επίσης, λόγω της ικανότητάς τους να βλαστάνουν, αντιπροσωπεύουν μονάδες διασποράς οι οποίες μπορεί να λειτουργούν σαν κατασκευές μόλυνσης.

Ο *Botrytis cinerea* μπορεί να μολύνει τους κόκκους της γύρης και τα πέταλα της φράουλας ( Bristow *et al.*, 1986 ) και αυτά τα ανθικά όργανα μπορούν να διασπαρούν με τον άνεμο και να προσκολληθούν σε άλλους ιστούς για εξάπλωση του μυκηλίου και μόλυνση.

## **6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΑΝΩ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ**

Τα κονίδια βλαστάνουν, αν και όχι απαραίτητα, σε σταγόνα νερού αλλά ταχύτατα σε ένα θρεπτικό διάλυμα όπως είναι ο χυμός του σταφυλιού. Στο νερό χρειάζονται αρκετές ώρες για να βλαστήσουν, ενώ σε θρεπτικό διάλυμα βλαστάνουν σε 2 ώρες σε θερμοκρασία 29°C. Οι υφές αυξάνονται ταχύτατα σε θρεπτικό υλικό, ενώ στο νερό η ανάπτυξη σταματάει.

#### α. Επίδραση της θερμοκρασίας

Η βλάστηση των σπορίων μπορεί να γίνει σε θερμοκρασιακό εύρος από -1°C μέχρι 40°C, ενώ κατ' άλλους τα κονίδια νεκρώνονται στους 35°C μέσα σε 48 ώρες. Στους 8°C η βλάστηση είναι βραδύτατη, ενώ στους 14°C χρειάζονται περισσότερο από 40 ώρες για να έχουμε 100% βλάστηση. Η άριστη θερμοκρασία είναι 18-20°C, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες ο ρυθμός βλάστησης μειώνεται.

Για το μυκήλιο ο καλύτερος ρυθμός ανάπτυξης σημειώνεται στους 20-22°C και μειώνεται πάνω από τους 25°C. Το εναέριο μυκήλιο αναπτύσσεται ταχύτερα στους 21°, 94% σχετική υγρασία και 0 m/sec ταχύτητα ανέμου, ενώ με 69% σχετική υγρασία και άνεμο δεν αναπτύσσεται καθόλου.

#### β. Επίδραση της σχετικής υγρασίας

Η υγρασία είναι επίσης αναγκαία για τη βλάστηση. Σε ξηρές συνθήκες τα κονίδια του παθογόνου χάνουν ταχύτητα τη βλαστική τους ικανότητα. Ο Snow ( 1949 ) συμπέρανε ότι τα κονίδια του *Botrytis cinerea* απαιτούν επίπεδα σχετικής υγρασίας 93-100% για να βλαστήσουν.

#### γ. Επίδραση του φωτός

Το φως δεν ευνοεί τόσο την ανάπτυξη του μύκητα, ενώ η ανάπτυξη του είναι ιδιαίτερα έντονη σε σκιαζόμενα από το φύλλωμα μέρη. Ο Islam *et al.* (1998), έδειξαν ότι κοντά στο υπεριώδες και το μπλε φως (300-520nm) προκαλούνταν αρνητικός φωτοτροπισμός σε *Botrytis cinerea* εμβολιασμένο σε *Vicia faba* και ότι το κόκκινο φως (600-700nm) προκάλεσε θετικό φωτοτροπισμό και μείωσε τον αριθμό των επιτυχών μολύνσεων.

#### δ. Άλλοι παράγοντες

Μελέτες μόλυνσης με αιώρημα κονιδίων πάνω σε διάφορους ξενιστές, έδειξαν γενικά ότι όσο περισσότερα είναι τα κονίδια στη σταγόνα μόλυνσης, τόσο πιο επιτυχής είναι η μόλυνση. Για να πετύχουμε έκφραση συμπτωμάτων κατά τη διάρκεια τεχνητών μολύνσεων με αιώρημα κονιδίων, αυτό πρέπει να περιέχει ένα μεγάλο αριθμό κονιδίων  $1 \times 10^3$  έως  $1 \times 10^5$  ανά ml φορέα, ο οποίος στις περισσότερες περιπτώσεις είναι απεσταγμένο, απιονισμένο νερό.

Το  $\text{Ca}^+$  μειώνει τη διαρροή των εκκριμάτων στην επιφάνεια του ξενιστή και επομένως τη διαθεσιμότητά τους στο παθογόνο ( Volpin and Elad, 1991 ). Επιάζοντας κονίδια *Botrytis cinerea* σε αυξημένη συγκέντρωση  $\text{CaCl}_2$  μειώθηκε η βλάστηση κονιδίων και το μέγεθος των βλαστικών σωλήνων ( Chardonnet *et al.*, 2000 ).

Ο μύκητας μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει το CO<sub>2</sub> σαν θρεπτικό υλικό. Εντούτοις, όταν η περιεκτικότητα υπερβεί το 23%, η ανάπτυξη του μύκητα σταματάει. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη χρησιμοποίηση του CO<sub>2</sub> για τη διατήρηση των επιτραπέζιων σταφυλιών με τη μεταφορά τους σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> πάνω από 25%.

Σε υγρές καλλιέργειες ο μύκητας εκκρίνει D-glucan, ένα μεγάλο μέρος του οποίου προσαρτάται στην υφή, μέσα σε μια εξωκυτταρική κάψουλα. Εκτός από την προσκόλληση στην επιφάνεια του ξενιστή και σαν αποθήκη νερού, αυτή η κάψουλα προσφέρεται σαν εξωκυτταρικό απόθεμα πολυσακχαρίτη.

## 7. ΜΟΛΥΝΣΗ

Η μόλυνση είναι η διαδικασία που περιλαμβάνει την είσοδο του παθογόνου στους ιστούς του ξενιστή καθώς και την έναρξη της διατροφής του σε βάρος του ξενιστή. Οι θέσεις εισόδου μπορεί να μολύνονται από κονίδια, μυκήλιο και ασκοσπόρια (Jarvis, 1977). Η είσοδος στον ξενιστή μπορεί να γίνει από την έκταση του βλαστικού σωλήνα μέσω φυσικών ανοιγμάτων ή από πληγές, είτε από άμεση διαπέραση των πετάλων, σεπάλων, στιγμάτων, φύλλων και νεαρών καρπών. Ακολούθως της βλάστησης των κονιδίων, η άμεση διαπέραση της άθικτης εφυμενίδας και των κυτταρικών τοιχωμάτων φαίνεται να είναι ο κανόνας (Blackman and Welsford, 1916; Elad, 1989). Οι κορυφές των βλαστικών σωλήνων, τα απρεσσόρια και τα μαξιλαράκια μόλυνσης, τα οποία αποτελούνται από ένα σύμπλεγμα άκρων υφών, με ή χωρίς διογκώσεις και τα οποία προέρχονται από μια υψηλά διακλαδισμένη υφή, αποτελούν τις τρεις κύριες κατασκευές διείσδυσης που σχηματίζονται από τον *Botrytis* (Elad, 1989).

### α. Είσοδος μέσω άθικτων ιστών του ξενιστή

Η εφυμενίδα αποτελεί το πρωταρχικό φράγμα του ξενιστή και είναι αδιαπέραστη καθώς η υφή δεν φτάνει στα υποκείμενα στρώματα πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος. Η διείσδυση των βλαστικών υφών σε μια άθικτη εφυμενίδα ξενιστή, θεωρήθηκε αρχικά ότι είναι μια πράξη καθαρά μηχανικής πίεσης. Το κονίδιο εγκαθίσταται πάνω στην εφυμενίδα μέσα σε σταγόνα νερού και σύντομα προσκολλάται με τη βοήθεια μιας κολλώδους ουσίας που περιβάλλει τη βλαστική υφή. Συχνά η διείσδυση γίνεται από την άκρη της βλαστικής υφής, αλλά κάποιες φορές σχηματίζεται ένα απρεσσόριο ή πλάκα συγκράτησης. Τα απρεσσόρια είναι όργανα συγκράτησης του μύκητα τα οποία μεσολαβούν για τη διαπέραση της

επιφάνειας του ξενιστή. Στην επιφάνεια επαφής μεταξύ της άκρης της βλαστικής υφής ή του απρεσσορίου και της εφυμενίδας του ξενιστή, σχηματίζεται μια μικρή ακίδα, το ράμφος μόλυνσης, το οποίο διεισδύει στην εφυμενίδα ασκώντας μηχανική πίεση.

Η άποψη της διάτρησης της άθικτης εφυμενίδας μέσω μηχανικής πίεσης υποστηρίχθηκε και από το γεγονός ότι ο *Botrytis cinerea* μπορεί να διαπεράσει τεχνητές επιφάνειες, όπως είναι τα στρώματα χρυσού ( Verhoeff, 1980 ). Αυτός ο μηχανισμός όμως φαίνεται να έχει παραμεληθεί πρόσφατα έναντι της ενζυματικής δράσης. Σύμφωνα με ανάλυση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, αυτό το παθογόνο παράγει μια μικρή οπή με αιχμηρά και καθαρά άκρα στην εφυμενίδα φύλλων φασολιού, η οποία ερμηνεύεται σαν ενζυματική δράση, επειδή έχει αποδειχθεί η δράση της εστεράσης στις άκρες των βλαστικών σωλήνων ( McKeen, 1974 ). Αν η διάτρηση της εφυμενίδας είναι μια ενζυματική διαδικασία, μετά πρέπει να βρεθούν ένζυμα που αλλοιώνουν την κουτίνη. Η διάτρηση της εφυμενίδας από εκκριθείσες κουτινάσες επαληθεύτηκε από το 80% των κατασταλτικών επιδράσεων, που μονόκλωνες αντικουτινάσες εφαρμοζόμενες πάνω στον ξενιστή, άσκησαν πάνω στον σχηματισμό βλάβης ( Salinas, 1992 ).

Πρόσφατα, ένας μικρός πόρος έγινε ορατός στην εφυμενίδα κάτωθεν του απρεσσορίου. Υπεροξειδίο του υδρογόνου μυκητιακής προέλευσης εγκαταστάθηκε άνω, μέσα και κάτω από αυτό τον πόρο και διαχύθηκε στο επιδερμικό τοίχωμα, όπου μια άλως επεκτάθηκε με έναν ομοκεντρικό τρόπο. Αυτό το νεοανακαληφθέν γεγονός μπορεί να θεωρηθεί σαν η αρχική διαδικασία που οδηγεί στη διάτρηση της εφυμενίδας, διότι παρατηρήθηκε νωρίς και πριν οποιαδήποτε κυτταρική κατασκευή τρυπήσει την επιφάνεια ( Tenberg *et al.*, 2002 ). Με εξειδικευμένους παρεμποδιστές, επιβεβαιώθηκε ότι η υπεροξειδική δυσμουτάση ( SOD ), που προέρχεται από τον μύκητα, περιλαμβάνεται σε αυτή τη διαδικασία (Tenberg *et al.*, 2002; Rolke *et al.*, 2004 ). Επιπρόσθετα, οι μελανίνες που είναι παρούσες στο τοίχωμα των απρεσσορίων, πιθανώς συμβάλουν σε αυτή τη διαδικασία, επειδή αποτελούν μια δεξαμενή σταθερών ελεύθερων ριζών και μπορεί να έχουν την πιθανότητα να δημιουργήσουν υπεροξειδία και  $H_2O_2$ , παρουσία του υπεροξειδίου της δυσμουτάσης.

#### β. Είσοδος από φυσικά ανοίγματα

Εκτός από την εφυμενίδα, οι βλαστικές υφές του *Botrytis cinerea* μπορούν να διεισδύσουν και από φυσικά ανοίγματα. Οι Pucheu-Plante and Mercier ( 1983 ), βρήκαν ότι οι αρχικές θέσεις διείσδυσης ήταν τα στομάτια και μικροσχιμές στην



επιδερμίδα ραγών σταφυλιών. Ιστολογικές έρευνες με *Botrytis cinerea* πάνω σε καρπούς δαμασκηλιάς, νεκταρινιάς, αχλαδιάς και ράγες σταφυλιών, αποκάλυψαν ότι αιώρημα κονιδίων σε σταγόνες προδιέθετε για εγκατάσταση στο κέντρο της σταγόνας δημιουργώντας μια συσσώρευση κονιδίων. Αυτή η δράση ανάγκασε τα κονίδια να αποικήσουν γύρω από τα στομάτια και να εισέλθουν σε αυτές τις θέσεις. Αυτά βλάστησαν και υφές σχηματίστηκαν πάνω στην επιφάνεια του ξενιστή στις περισσότερες σταγόνες. Σημειώθηκε επίσης ότι μικροσχισμές, οι οποίες έδρασαν σαν λεωφόροι για διείσδυση από τις υφές, αναπτύχθηκαν με τον καιρό στην εφυμενίδα κάτω από τη σταγόνα. Προσομοίωση φυσικής μόλυνσης στις επιφάνειες αυτών των ξενιστών με ξηρά κονίδια σε θάλαμο αποικισμού, έδειξε ότι τα κονίδια σπάνια προσπίπτουν πάνω στα στομάτια και τους πόρους. Σε ένα τέτοιο γεγονός, οι βλαστικοί σωλήνες που σχηματίστηκαν από κονίδια πάνω σε υγρές επιφάνειες ήταν πολύ μικροί για να εισέλθουν σε αυτές τις κατασκευές. Σε βρεγμένες επιφάνειες, βλαστικοί σωλήνες ή υφές συνήθως αναπτύχθηκαν γύρω από τα στομάτια και τους πόρους. Επιπλέον, οι επιχειρηθείσες διεισδύσεις ήταν πάντα άμεσες και ανεξάρτητες από το μέγεθος του βλαστικού σωλήνα, τον αριθμό ή τη διακλάδωση (Holz, 1999; Coertze *et al.*, 2002 ).

#### γ. Είσοδος από πληγές

Η μόλυνση από πληγές συμβαίνει όταν κονίδια εισέρχονται σε μια πληγή στον ιστό του ξενιστή. Σε όλα τα πρόσφατα πειράματα με *Botrytis cinerea*, μολύνσεις φρέσκων πληγών με ποικίλους αριθμούς κονιδίων σε αιωρήματα νερού, είχαν σαν αποτέλεσμα την εγκατάσταση της μόλυνσης. Κονίδια και μολύσματα *Botrytis cinerea* που είναι προσκολλημένα στην εφυμενίδα δεν είναι εύκολο να αποσπαστούν από τις επιφάνειες των καρπών. Επομένως, για να μολύνουν μια πληγή στους ιστούς του ξενιστή, πρόσφατα αφιχθέντα κονίδια πρέπει να προσγειωθούν μέσα ή κοντά στην πληγή και να αναπτυχθούν μέσα στην πληγή κάτω από τις επικρατούσες συνθήκες. Επιπλέον, τα φρεσοαποθετημένα κονίδια χρειάζονται ελεύθερο νερό και όχι υψηλή υγρασία ή εκκρίσεις των πληγών για να μολύνουν τις φρέσκες πληγές.

Τα έντομα μπορούν να παίξουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο δρώντας σαν εφοδιαστές μολύσματος στις πληγές. Μόλυσμα συνιστώμενο από ομάδες κονιδίων ή μυκήλιο, το οποίο επίσης μπορεί να αποτεθεί στις πληγές, είναι περισσότερο επιθετικό από ότι μοναχικά κονίδια τα οποία προσγειώνονται κοντά στην πληγή και τα οποία πρέπει να αναπτυχθούν μέσα στην πληγή κάτω από τις επικρατούσες συνθήκες. Η Engelbrecht (2002 ), εξερεύνησε τη μεταφορά *Botrytis cinerea* από τη

μύγα της Μεσογείου πάνω σε σταφύλια και βρήκε μια ασυνήθιστη αλληλεπίδραση μεταξύ παθογόνου, μύγας και έκφρασης συμπτωμάτων στη ζώνη προσκόλλησης του μίσχου του άνθους των ραγών. Η συστηματική παρακολούθηση της συμπεριφοράς της *Drosophila melanogaster* σε καρπούς και ράγες σταφυλιών, σε διάφορα στάδια ωρίμανσης, έκανε αυτή τη μύγα έναν παράγοντα υπεύθυνο για τη διασπορά του *Botrytis cinerea* σε αμπελώνες και οπωρώνες ( Louis *et al.*, 1996 ).

#### δ. Είσοδος μέσω εξειδικευμένων οργάνων του ξενιστή

Διαφορετικές οδοί έχουν περιγραφεί για τη διείσδυση και την εγκατάσταση των αδρανών ή λανθανουσών μολύνσεων από *Botrytis cinerea*, σε άνθη και αναπτυσσόμενους καρπούς. Στη μαύρη σταφίδα, το παθογόνο μπορεί να αναπτυχθεί δια μέσου του στύλου στον ύπερο ( McNicol and Williamson, 1989 ). Στα αχλάδια ( DeKock and Holz, 1992), όπως και στις φράουλες ( Bristow *et al.*, 1986 ), οι στύλοι μπορεί να μην είναι μια σημαντική πηγή για λανθάνουσα μόλυνση. Από την άλλη, οι στήμονες είναι σημαντικές θέσεις διείσδυσης στα αχλάδια. Μόλυνση ανώριμων ραγών σταφυλιού με *Botrytis cinerea*, έδειξε ότι το παθογόνο μπορεί να εισέλθει στους στύλους και μετά να παραμείνει σε λανθάνουσα κατάσταση σε νεκρωτικούς ιστούς του στύλου ( McClellan and Hewitt, 1973 ), αλλά μελέτες με φυσικό μόλυσμα *Botrytis cinerea* σε διάφορες θέσεις σε τσαμπιά σταφυλιών, έδειξαν ότι οι στύλοι δεν είναι μια σημαντική πηγή για λανθάνουσα μόλυνση στα σταφύλια.

### **8. ΕΙΣΒΟΛΗ ΚΑΙ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ**

Από τη στιγμή που εισέρχεται της εφυμενίδας ο *Botrytis cinerea* νεκρώνει τα υποκείμενα επιδερμικά κύτταρα, πριν αυτά δεχθούν την εισβολή από τις υφές ( Clark and Lorbeer, 1976 ). Η εισβολή των φυτικών ιστών από *Botrytis cinerea* προκαλεί δράση διαδικασιών δηλωτικών του προγραμματισμένου θανάτου των κυττάρων σε μια απόσταση από τις υφές ( Govrin and Levine, 2000 ), υποδηλώνοντας ότι διαχύσιμοι παράγοντες έχουν μια άμεση ή έμμεση φυτοτοξική δράση.

Όταν η εφυμενίδα παραβιάζεται, σχηματίζεται μια ενδιάμεση διόγκωση στα στρώματα των κυτταρικών τοιχωμάτων κάτω από την εφυμενίδα. Σαν επακόλουθο της διείσδυσης των εξωτερικών κυτταρικών τοιχωμάτων, ο μύκητας εισβάλλει σε υποδερμικούς ιστούς μέσο- και ενδοκυτταρικά για να εγκαταστήσει τη μόλυνση. Από τη στιγμή που το φράγμα της κουτίνης διαρρηγνύεται, εκκρινόμενα ένζυμα ( CWDE ) που αλλοιώνουν τα κυτταρικά τοιχώματα και άλλα περιεχόμενα όπως τοξίνες και οξαλικό οξύ, μπορεί να διαχυθούν στον ξενιστή. Η μεταβολή και αποσύνθεση των

κυτταρικών τοιχωμάτων είναι προφανής, δείχνοντας ότι τα CWDE είναι δραστήρια. Ιδιαίτερα οι πολυγαλακτουρονάσες και πηκτινομεθυλεστεράση φαίνεται να είναι παράγοντες μολυσματικότητας ( Ten Have *et al.*, 2002; Valette-Collete *et al.*, 2003 ). Η ενζυματική αποσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών απελευθερώνει υδρογονάνθρακες οι οποίοι σχηματίζουν μια κύρια πηγή άνθρακα για κατανάλωση. Εντούτοις, εξαρτώμενος από τις συνθήκες, ο *Botrytis* επιβιώνει και σε μια αδρανή φάση και περιορισμός της μεταδιεισδυτικής ανάπτυξης αναφέρεται συχνά π.χ. στα φύλλα των τριαντάφυλλων, στις ράγες των σταφυλιών ή στα φύλλα των φασολιών ( Volpin and Elad, 1991 ). Αυτό δείχνει ότι υπάρχουν κρίσιμα γεγονότα που καθορίζουν τις μεταδιεισδυτικές φάσεις. Οι κυκλοφυλίνες περιλαμβάνονται στη μεταδιεισδυτική ανάπτυξη του *Botrytis cinerea* σε τομάτα και φασόλι επειδή άκυρες μεταλλάξεις έδειξαν φυσιολογική διείσδυση αλλά μειωμένη μολυσματικότητα ( Viaud *et al.*, 2003 )

## 9. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η μόλυνση φυτών ξενιστών από *Botrytis* spp. γίνεται με τη μεσολάβηση ενός μεγάλου αριθμού εξωκυτταρικών ενζύμων και/ή μεταβολιτών. Καθένας από αυτούς τους παράγοντες μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο σε διαφορετικά στάδια της διαδικασίας μόλυνσης. Οι κουτινάσες, λιπάσες και κάποια άλλα ένζυμα αποικοδόμησης κυττάρων μπορούν να διευκολύνουν τη διείσδυση της επιφάνειας του ξενιστή, ενώ τοξίνες, εστέρες του οξαλικού οξέος και δραστικές μορφές οξυγόνου ( AOS ), όπως  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^\cdot$  και  $\text{H}_2\text{O}_2$ , μπορούν να συνεισφέρουν στο θάνατο των κυττάρων του ξενιστή. Διάφορα ένζυμα αποικοδόμησης κυτταρικών τοιχωμάτων συνεισφέρουν στη μετατροπή των ιστών του ξενιστή σε βιομάζα του μύκητα, αλλά επίσης και άλλα ένζυμα όπως οι λακκάσες και οι πρωτεάσες, είναι πιθανό να επιδρούν στην παθογένεση.

### α. Λιπάσες

Το ένζυμο είναι ικανό να υδρολύσει ακόρεστους, μακράς αλυσίδας εστέρες λιπαρών οξέων, που είναι γνωστό ότι είναι συστατικά της κουτίνης και του κηρώδους στρώματος ( Commenil *et al.*, 1995 ). Η λιπάση κατέχει κουτινολυτική δραστηριότητα. Το ένζυμο παίζει ένα ρόλο στη μετατροπή του κηρώδους στρώματος και της εφουμενίδας καθώς και στην προσκόλληση των κονιδίων στην επιφάνεια του ξενιστή. Όταν αντισώματα εφαρμόστηκαν πάνω σε άθικτα φύλλα τομάτας, πριν από τον εμβολιασμό με κονίδια *Botrytis cinerea*, οι βλαστικοί σωλήνες του μύκητα ήταν

ανίκανοι να διεισδύσουν στην εφυμενίδα ( Commenil *et al.*, 1998 ). Τα αντισώματα δεν επηρέασαν τη βλάστηση των κονιδίων, ούτε παρεμπόδισαν τη μόλυνση πληγωμένων ιστών, προτείνοντας ένα ρόλο για τη λιπάση, ειδικά κατά τη διάρκεια της διείσδυσης της επιφάνειας του ξενιστή.

#### β. Κουτινάσες

Κάτω από το κηρώδες στρώμα βρίσκεται η κουτίνη, ένα σύνθετο, τρισδιάστατο δίκτυο, χημικώς ετερογενών, εστεροποιημένων, μερικώς ακόρεστων, λιπαρών οξέων. Ο ρόλος των κουτινάσων στη διάτρηση της κουτίνης και επομένως στη διαπέραση της εφυμενίδας, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως έχει μελετηθεί τις τελευταίες δεκαετίες και θεωρείται από πολλούς ερευνητές εξαιρετικά σημαντικός. Ο Salinas ( 1992 ), απομόνωσε μια κουτίνη από *Botrytis cinerea* και διέγειρε μονόκλωνα αντισώματα εναντίον αυτής της πρωτεΐνης. Η εφαρμογή του αντισώματος σε άνθη ζέρμπερας, πριν από τη μόλυνση, μείωσε τον αριθμό των βλαβών που σχηματίστηκαν.

#### γ. Τοξίνες

Οι τοξίνες που παράγονται από τον *Botrytis cinerea* έχουν γενική φυτοτοξική δράση και η φυτοτοξικότητά τους είναι σχετικά χαμηλή. Δεν υπάρχουν αποδείξεις για την παραγωγή από *Botrytis cinerea* τοξινών εξειδικευμένων για τον ξενιστή. Αυτό είναι αναμενόμενο, εξαιτίας του μεγάλου εύρους ξενιστών του παθογόνου.

#### δ. Οξαλικό οξύ

Ο *Botrytis cinerea* παράγει οξαλικό οξύ *in vitro* και *in planta* ( Verhoeff *et al.*, 1988 ). Το οξαλικό οξύ σχηματίζει οξαλικούς κρυστάλλους Ca εντός των ιστών του ξενιστή ( Prins *et al.*, 2000b ). Το μέγεθος των βλαβών που προκαλούνται από διάφορα στελέχη *Botrytis cinerea* πάνω σε φύλλα φασολιών και σταφυλιών, συνδέεται με το ποσό του οξαλικού οξέως που αυτά τα στελέχη εκκρίνουν *in vitro* ( Germeier *et al.*, 1994 ). Παραμένει αδιευκρίνιστο αν τα επίπεδα του οξαλικού οξέος που παράγονται *in planta*, είναι επαρκεί για να δημιουργήσουν κατάπτωση των κυττάρων του ξενιστή.

#### ε. Δραστικές μορφές οξυγόνου ( AOS )

Μια οξειδωτική έκρηξη και μεγάλες διαταραχές στην οξειδοαναγωγή παρατηρήθηκαν κατά την αλληλεπίδραση μύκητα – ξενιστή καθώς επίσης και σε φυτικούς ιστούς σε κάποια απόσταση από το μέτωπο της μόλυνσης. Ένα μεγάλο μέρος της παραγωγής H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> φαίνεται να συμβαίνει στις πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων του ξενιστή που γειτονεύουν με υφές του μύκητα ( Govrin and Levine,

2000; Schouten *et al.*, 2002a ). Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ενζύμων του μύκητα που πιθανόν συμβάλουν στην παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το υπεροξειδίο της δυσμουτάσης (SOD ) και εξωκυτταρικές οξειδάσες σακχάρων του μύκητα είναι πιθανόν υπεύθυνες για την παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### στ. Πηκτινάσες

Η πηκτίνη είναι ένα κύριο συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών. Ένζυμα που είναι ικανά να αποικοδομούν πηκτινικά συστατικά καλούνται πηκτινάσες. Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από *Botrytis* παράγονται διάφοροι τύποι πηκτινασών, έχοντας ο καθένας ευκρινή ρόλο στην αποικοδόμηση των πηκτινών.

##### i. Πηκτινομεθυλεστεράσες

Τα περισσότερα πηκτινολυτικά ένζυμα δεν μπορούν να αποικοδομήσουν υψηλά μεθυλιομένη πηκτίνη. Επομένως, απαιτείται η δράση της πηκτινομεθυλεστεράσης, η οποία απομεθυλιώνει την πηκτίνη. Δραστηριότητα της πηκτινομεθυλεστεράσης ανιχνεύτηκε σε φύλλα φασολιών μολυσμένα με *Botrytis cinerea* και τα επίπεδά της συσχετίστηκαν με τη σοβαρότητα της ασθένειας ( Zimand *et al.*, 1996 ).

##### ii. Ενδοπολυγαλακτουρονάσες

Οι ενδοπολυγαλακτουρονάσες είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση της ομογαλακτουρονάνης. Πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να διαλευκάνουν τον σύνθετο μηχανισμό δράσης της ενδοπολυγαλακτουρονάσης του *Botrytis*. Παρόλα αυτά, οι μελέτες δεν αποκάλυψαν την ακριβή λειτουργία των ανεξάρτητων ισοενζύμων της ενδοπολυγαλακτουρονάσης στην παθογένεση.

##### iii. Εξωπολυγαλακτουρονάσες

Οι εξωπολυγαλακτουρονάσες διαχωρίζουν μονομερές και διμερές γλυκοζιτικές ομάδες από τους πηκτικούς πολυσακχαρίτες, εφοδιάζοντας το μύκητα με πιθανά θρεπτικά συστατικά. Ο *Botrytis cinerea* παράγαγε εξωπολυγαλακτουρονάσες σε νεκρωτικά τεμάχια φύλλων κρεμμυδιών ( Hancock *et al.*, 1964a,b ). Η δράση των εξωπολυγαλακτουρονασών ανιχνεύτηκε επίσης σε μίσχους και καρπούς τομάτας μολυσμένους με *B. cinerea* ( Verhoeff and Warren, 1972 ).

#### ζ. Μη πηκτινολυτικά ένζυμα αποικοδόμησης κυτταρικών τοιχωμάτων

Αν και ο *B. cinerea* είναι ένας πηκτινολυτικός μύκητας, η αποικοδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων μπορεί επίσης να απαιτεί μη πηκτινολυτικά ένζυμα, όπως κυτταρινάσες, ξυλανάσες και αραμπινάσες ( Hancock *et al.*, 1964a,b; Verhoeff and Warren, 1972; Cole *et al.*,1998; Ten Have *et al.*,2002 )

i. Κυτταρινάσες

Το κυτταρινολυτικό σύμπλεγμα αποτελείται, μεταξύ άλλων, από ενδογλυκανάση, κυτταρινοβιοϋδρολάση και β-γλυκοσιδάση και αποικοδομεί την κυτταρίνη σε σελοβιόζη και γλυκόζη. Ο *B. cinerea* βρέθηκε ότι παράγει 3 ενδοκυτταρικές β-γλυκοσιδάσες και μια εξωκυτταρική β-γλυκοσιδάση ( Sasaki and Nagayama, 1994; Gueguen *et al.*, 1995 ). Μόνο όμως η εξωκυτταρική β-γλυκοσιδάση προτείνεται ότι επιδρά στην αποικοδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων.

ii. Ξυλανάσες – Αραμπινάσες

Οι Urbanek and Zalewska-Sobczak ( 1984 ), ανέφεραν ότι ο *Botrytis cinerea* εκκρίνει 1 ξυλανάση και 3 αραμπινάσες κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης των κυτταρικών τοιχωμάτων, καρπών μήλων.

η. Άλλα ένζυμα που επιδρούν πιθανώς στην παθογένεση

i. Ασπαρτικές πρωτεάσες ( AP )

Οι Movahedi and Heale ( 1990a ), απέδειξαν ότι ο *Botrytis cinerea* παράγει ασπαρτική πρωτεάση σε υγρές καλλιέργειες και κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της διαδικασίας μόλυνσης. Η δραστηριότητα της ασπαρτικής πρωτεάσης ανιχνεύτηκε πριν την εμφάνιση των πηκτινινασών. Όταν το μόλυσμα συμπληρώθηκε με έναν εξειδικευμένο παρεμποδιστή της ασπαρτικής πρωτεάσης, την πεπστατίνη, η δράση της παρεμποδίστηκε και η μόλυνση μειώθηκε ισχυρά. Αυτό οδήγησε στο να προτείνουν ότι η εκκρινόμενη από τον μύκητα ασπαρτική πρωτεάση είναι σημαντική για την παθογένεση.

ii. Λακκάσες

Η παραγωγή λακκασών από *Botrytis cinerea*, καταστάλθηκε από δευτερογενείς μεταβολίτες των Cucurbitaceae, τις λεγόμενες κουκουρμπιτασίνες, ενώ η δραστηριότητα άλλων ενζύμων του μύκητα δεν επηρεάστηκε ( Viterbo *et al.*, 1993a ). Οι κουκουρμπιτασίνες προστάτευσαν καρπούς αγγουριάς και φύλλα λάχανων από μόλυνση από *Botrytis cinerea*, οδηγώντας στην υπόθεση ότι οι λακκάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση ( Bar-Nun and Mayer, 1990 ).

## 10. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Το παθογόνο αναπτύσσεται επί υγιών, εξασθενημένων ή νεκρών φυτικών ιστών. Προσβάλλει φυτά όλων των ηλικιών και σχεδόν όλα τα μέρη τους ( φύλλα, άνθη, καρπούς , στελέχη , ρίζες ) και προκαλεί συμπτώματα διαφόρων τύπων. Στους υδαρείς καρπούς και στους τρυφερούς βλαστούς ( τομάτα, μελιτζάνα, πιπεριά ), η προσβεβλημένη περιοχή αρχικά έχει ανοιχτό πράσινο χρώμα και αργότερα ανοιχτό καστανό. Η επιδερμίδα δεν σχίζεται αλλά οι ιστοί που βρίσκονται κάτω από αυτή γίνονται μαλακοί και υδαρείς. Στο μαρούλι η προσβολή εκδηλώνεται σαν μαλακή σήψη των κεφαλών με καστανέρυθρο χρωματισμό, προσβάλλεται δηλαδή η βάση του στελέχους και η βάση των φύλλων κοντά στην επιφάνεια του εδάφους. Μολύνσεις με τη μορφή υγρής σήψης εμφανίζονται στις ρίζες διαφόρων κονδυλόρριζων φυτών, όπως το καρότο. Στα όσπρια προσβάλλονται όλα τα υπέργεια μέρη και προκαλούνται νεκρώσεις και σήψεις που καλύπτονται από τη χαρακτηριστική τεφρή εξάνθιση του παθογόνου ( Παναγόπουλος, 1995 )

Οι πρώτες προσβολές εμφανίζονται στα ψυχρά σπορεία, όπου η θερμοκρασία είναι υψηλή, αλλά επίσης και στον αγρό , όταν ο σπόρος είναι αναμεμειγμένος με σκληρότσια ή μυκήλιο του μύκητα ή σκληρότσια βρίσκονται στο έδαφος. Προσβάλλεται ο λαιμός των φυταρίων. Οι προσβεβλημένοι ιστοί γίνονται μαλακοί, νεκρώνονται και καλύπτονται από την πυκνή, χαρακτηριστική τεφρή εξάνθιση του παθογόνου που αποτελείται από τους κονιδιοφόρους και τα κονίδια του μύκητα. Τα μολυσμένα φυτά μαραίνονται, πέφτουν στο έδαφος και ξηραίνονται.

Μετά τη μεταφύτευση, τα πρώτα συμπτώματα της προσβολής εμφανίζονται στο λαιμό των νεαρών φυτών. Οι προσβεβλημένοι ιστοί γίνονται μαλακοί, ενώ στη συνέχεια λόγω της αφυδάτωσης, παρατηρείται στένωση και καστανό χρώμα της προσβεβλημένης περιοχής.

Στο έλασμα των φύλλων έχουμε το σχηματισμό πρασινοκάστανων μέχρι ανοιχτών καστανών κηλίδων, οι ιστοί των οποίων είναι μαλακοί. Με ευνοϊκές συνθήκες οι κηλίδες μεγαλώνουν γρήγορα, καλύπτουν ολόκληρο το φυλλίδιο και μέσω του μίσχου η προσβολή προχωράει στα άλλα φυλλίδια του σύνθετου φύλλου. Τελικά ολόκληρο το φύλλο ξηραίνεται, ενώ η προσβολή μέσω του μίσχου φτάνει στο στέλεχος

Στο στέλεχος αρχικά σχηματίζεται μικρό, ανοιχτού καστανού ή καστανού χρώματος, έλκος. Το έλκος με ευνοϊκές συνθήκες μεγαλώνει και εάν περιβάλλει το στέλεχος, το μέρος του φυτού πάνω από την προσβολή γίνεται χλωρωτικό, μαραίνεται και τελικά ξηραίνεται. Τα έλκη συχνά καλύπτονται από την πυκνή, χαρακτηριστική τεφρή εξάνθιση του παθογόνου.

Σε πολύ ευνοϊκές συνθήκες προσβάλλονται και τα άνθη. Τα προσβεβλημένα μέρη του άνθους ( σέπαλα, πέταλα, ποδίσκος, κ.λ.π. ) αποκτούν καστανό χρώμα, νεκρώνονται και πέφτουν.

Στους καρπούς η προσβολή αρχίζει από τα σέπαλα και μέσω αυτών προχωράει στον καρπό, του οποίου οι ιστοί γίνονται μαλακοί, υδαρείς και καλύπτονται από άφθονη εξάνθιση των καρποφοριών του παθογόνου. Τα γηρασμένα πέταλα είναι πολύ ευπαθή στις μολύνσεις και το παθογόνο μπορεί να εξαπλωθεί μέσα από αυτά στα σέπαλα και μέσω αυτών στον καρπό. Σε μερικές περιπτώσεις η προσβολή ξεκινάει από την κορυφή του καρπού. Έτσι οι προσβολές εμφανίζονται στη βάση του καρπού, γύρω από το σημείο προσφύσεώς του στον ποδίσκο ή στην κορυφή του καρπού. Επάνω ή μέσα στους προσβεβλημένους ιστούς είναι δυνατό να σχηματιστούν τα σκληρώτια του μύκητα.

Στους καρπούς της τομάτας και στα άνθη της τριανταφυλλιάς, η προσβολή μπορεί να εκδηλωθεί και με τη μορφή της κηλίδας 'φάντασμα' ( ghost spot ), δηλαδή με την εμφάνιση στην επιφάνεια των καρπών ή των πετάλων μικρών δακτυλιοειδών κηλίδων, διαμέτρου 3-8 mm, υπόλευκου χρώματος, με νεκρωτικό στίγμα στο κέντρο που θυμίζει νύγμα εντόμου. Αυτή η φάση της ασθένειας προκαλείτε μετά από βλάστηση σποριών του παθογόνου πάνω στην επιφάνεια των καρπών, την είσοδο του βλαστικού σωλήνα και τον εν συνεχεία θάνατο του μυκηλίου ( Ferrer and Owen, 1959 ).

## 11. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Το παθογόνο διαχειμάζει πάνω σε φυτικά υπολείμματα της καλλιέργειας της προηγούμενης χρονιάς. Αργά το φθινόπωρο, όταν οι συνθήκες υγρασίας γίνονται ευνοϊκές, κονίδια του μύκητα παράγονται πάνω σε ετοιμοθάνατους ιστούς, από παραμένον μυκήλιο ή πάνω στα σκληρώτια του μύκητα και προσφέρονται σαν κύρια πηγή μολυσμάτων. Τα ασκοσπόρια του μύκητα παράγονται πολύ σπάνια και δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση της ασθένειας, ενώ δεν έχουν βρεθεί ποτέ



κάτω από φυσικές συνθήκες στην Ελλάδα. Στα θερμοκήπια τα πρώτα συμπτώματα της τεφράς σήψης συνήθως εμφανίζονται αργά το φθινόπωρο ( τέλη Νοέμβρη ) ή αρχές του χειμώνα. Η πρόοδος της ασθένειας εξαρτάται από τις επικρατούσες καιρικές συνθήκες και πλησιάζει στο μέγιστο κατά τον Φεβρουάριο με Μάρτιο. Σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες ( μέση νυχτερινή θερμοκρασία κάτω από 12°C ) και παρατεταμένες περιόδους υψηλής υγρασίας και υγρασίας των φυτικών επιφανειών ( πάνω από 14h ημερησίως ) μέσα στο περιβάλλον μη θερμαινόμενων θερμοκηπίων κατά τη διάρκεια του χειμώνα, ευνοούν την έντονη παραγωγή μολύσματος και ξεσπάσματα επιδημιών της ασθένειας, σχεδόν κάθε χρονιά.

Αφθονη παραγωγή σπορίων συμβαίνει σε όλα τα μολυσμένα όργανα της φυτικής κόμης, πάνω σε σαπισμένους καρπούς, πεσμένους στο έδαφος και πάνω σε φυτικά υπολείμματα που συχνά αποθέτονται στην περιφέρεια των θερμοκηπίων. Αυτές οι πηγές παρέχουν ένα συνεχόμενο εφοδιασμό μολύσματος *Botrytis cinerea* καθ' όλη την περίοδο του χειμώνα μέχρι τις αρχές της άνοιξης. Τα κονίδια είναι το κύριο μόλυσμα για την εισαγωγή της ασθένειας και την ανάπτυξή της. Διασπείρονται σε μεγάλους αριθμούς από τα ρεύματα του αέρα και τη βροχή. Μηχανικές δονήσεις, κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης με γύρη, των ανθέων ή αναταράξεις των φυτών από τους αγρότες κατά τη διάρκεια διαφόρων χειρισμών, συνεισφέρουν στην τοπική διασπορά των κονιδίων.

Όλο το γερασμένο φύλλωμα των ώριμων φυτών με πυκνή κόμη, τα ανθικά μέρη των καρπών ( πέταλα, στύλος, στήμονες, σέπαλα ) και οι πληγωμένοι βλαστοί, έχουν την προδιάθεση για μόλυνση από κονίδια. Η σάρκα των νεαρών πράσινων καρπών είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε μολύνσεις μέσω του κάλυκα των ανθέων. Τέτοιες μολύνσεις δημιουργούν σοβαρές πτώσεις ανώριμων καρπών και μείωση της παραγωγής. Μολύνσεις νεαρών φύλλων, καρπών και άλλων φυτικών οργάνων που ξεκινούν από το σημείο επαφής με σάπιους ιστούς, είναι επίσης αξιοσημείωτες. Μετά τον Απρίλιο η πρόοδος της ασθένειας σταματά κάπως αιφνίδια εξαιτίας της απότομης αύξησης της θερμοκρασίας και της συνεπακόλουθης μείωσης της ατμοσφαιρικής υγρασίας ( Elad *et al*, 1992; Pappas, 2000 ).

## 12. ΑΜΥΝΑ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ

### A) Μηχανική άμυνα

Η εφυμενίδα παρέχει ένα σημαντικό φράγμα στη διείσδυση από *Botrytis cinerea*. Πληγώματα και μεταχειρίσεις που διασπούν ή διαλύουν την εφυμενίδα έχουν σαν αποτέλεσμα την πιο γρήγορη μόλυνση από *B. cinerea* και άλλους φυτοπαθογόνους μύκητες. Η εφυμενίδα μπορεί να δρα σαν ένα χημικό ή φυσικό φράγμα από τη στιγμή που περιέχει ουσίες ανταγωνιστικές του μύκητα. Το πάχος της εφυμενίδας έχει συσχετιστεί με ανθεκτικότητα στη σταχτιά σήψη σε καρπούς τομάτας και τριαντάφυλλα ( Rijkenberg *et al.*, 1980; Hammer *et al.*, 1994 ). Η παχύτερη εφυμενίδα μπορεί να επιφέρει ανθεκτικότητα με διάφορους τρόπους: παρέχοντας μηχανική ανθεκτικότητα στη διείσδυση, προσφέροντας μια μεγαλύτερη ποσότητα υποστρώματος για να αποικοδομηθεί από τις κουτινάσες και άλλα ένζυμα και μειώνοντας τη διαπερατότητα, οπότε έχει σαν αποτέλεσμα λιγότερη διάχυση θρεπτικών συστατικών στην επίπεδη επιφάνεια του φύλλου. Τα θρεπτικά συστατικά επηρεάζουν τη βλάστηση, την ανάπτυξη πάνω στην επιφάνεια και τη διαδικασία της μόλυνσης, στον *Botrytis cinerea*. Εφυμενίδες που είναι παχύτερες είναι πιο ανθεκτικές στη διάρρηξη, έχουν λιγότερους πόρους ή άλλες περιοχές εύκολα προσπελάσιμες από το παθογόνο και επομένως βελτιώνουν την ανθεκτικότητα.

Η συχνότητα των λανθανουσών μολύνσεων σε νεαρούς καρπούς υποδηλώνει ότι άμυνες πέρα από την εφυμενίδα είναι πολύ σημαντικές. Στις λανθάνουσες μολύνσεις, ο μύκητας διαπερνά την εφυμενίδα αλλά αποτυγχάνει να παράγει ασθένεια ( εκτεταμένη νέκρωση ). Αν και το περιβάλλον είναι σημαντικό στο να καθορίσει αν οι λανθάνουσες μολύνσεις θα αναπτυχθούν περαιτέρω, μηχανισμοί ανθεκτικότητας πρέπει επίσης να παρουσιάζονται για να εξηγήσουν την ανάπτυξη της ασθένειας σε κάποιες περιπτώσεις αλλά όχι σε άλλες. Κάποιοι από αυτούς τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας μπορεί να αντιμετωπίζονται όταν ο *B. cinerea* εισβάλει στα κυτταρικά τοιχώματα του ξενιστή. Όταν η εφυμενίδα του φυτού διαρρηγνύεται ή αμέσως μετά τη βλάστηση και την επέκταση του βλαστικού σωλήνα σε πληγωμένους ή γερασμένους ιστούς, ο μύκητας εκκρίνει ένζυμα τα οποία αλλοιώνουν τα κυτταρικά τοιχώματα του ξενιστή. Επειδή η ανάπτυξη της σταχτιάς σήψης μπορεί να καθυστερήσει στην περίπτωση της αδρανούς μόλυνσης, τα κυτταρικά τοιχώματα του φυτού μπορούν να θεωρηθούν σαν το δεύτερο φράγμα στη μόλυνση των άθικτων ιστών. Σε κάποια είδη ξενιστές ή μη ξενιστές, μπορεί να σχηματιστούν παχύνσεις των

κυτταρικών τοιχωμάτων στη θέση διείσδυσης, περιορίζοντας την ανάπτυξη και την περαιτέρω διείσδυση των υφών του *Botrytis cinerea*. Η πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να ακολουθείται από άλλες χημικές αλλαγές σε ιστούς γύρω από τη θέση μόλυνσης, αυξάνοντας την ανθεκτικότητα των ιστών στην εξασθένιση και στη διάρρηξη. Τέτοιες αντιδράσεις άμυνας μπορούν να συμβούν στο καρότο, περιλαμβάνοντας σχηματισμό φελλού, μετατροπή σε ξύλο και συσσώρευση φυτοαλεξινών.

#### B) Πρωτεΐνες σχετικές με την παθογένεση και άλλες πρωτεΐνες άμυνας

Τα φυτά μπορεί να αντιδράσουν στην εισβολή του παθογόνου αναπτύσσοντας διάφορες άμυνες οι οποίες επιβραδύνουν την εξάπλωση της ασθένειας. Κάποιες από αυτές τις άμυνες μπορεί να περιλαμβάνουν την παραγωγή μιας ομάδας πρωτεϊνών, που ονομάζονται πρωτεΐνες σχετικές με την παθογένεση ( PR ), οι οποίες προκαλούνται στα φυτά εξαιτίας της προσβολής από το παθογόνο και οι οποίες συνδέονται με νεκρωτικές αντιδράσεις. Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες έχουν αναγνωριστεί και χαρακτηριστεί, περιλαμβάνοντας χιτινάσες και 1,3-β-γλουκανάσες, οι οποίες πιστεύεται ότι λειτουργούν επιτιθέμενες στα κυτταρικά τοιχώματα του μύκητα ( Punja and Zhang, 1993; Simmons, 1994 ).

Υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που μπορεί να είναι σημαντικές στην ανθεκτικότητα των ξενιστών έναντι του *Botrytis cinerea*. Παρεμποδιστές πρωτεάσης είναι ευρέως κατανεμημένοι στα φυτά και πιθανώς έχουν μια λειτουργία στην προστασία των φυτών εναντίον μυκήτων, παρεμποδίζοντας την βλάστηση και την ανάπτυξη αυτών. Γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε υδροξυπρολίνη ( HGRP ), αυξάνονται στα φυτά σαν αντίδραση κατά τη διάρκεια μολύνσεων από μύκητες. Συσσώρευση τέτοιων γλυκοπρωτεϊνών έχει συνδεθεί με ανθεκτικότητα του ξενιστή σε διάφορες μυκητολογικές ασθένειες. Αυτές μπορεί να λειτουργούν βοηθώντας στο σχηματισμό προστατευτικών φραγμάτων ή ακινητοποιώντας το παθογόνο ( Showalter and Varner, 1989 ).

#### Γ) Χημική άμυνα

Τα φυτά περιέχουν δευτερογενείς μεταβολίτες με αντιμυκητιακή δραστηριότητα, όπως μη πρωτεϊνικά αμινοξέα, φαινολικά συστατικά και φυτοαλεξίνες. Αυτά τα συστατικά είναι πιθανόν σημαντικά στην άμυνα εναντίον των παθογόνων. Η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση, η ταχύτητα εισαγωγής, η επαφή μεταξύ παθογόνου και χημικών και

από το εάν το παθογόνο μπορεί να ανεχθεί, αποτοξικοποιήσει ή παρεμποδίσει τη σύνθεση αυτών των χημικών άμυνας. Για παράδειγμα, η φυτοαλεξίνη μαρουλίνη A συσσωρεύεται στο μαρούλι μετά τη μόλυνση από *Botrytis cinerea*. Όταν φύλλα μαρουλιού επωαστούν με κονίδια *Botrytis cinerea*, η συσσώρευση μαρουλίνης A συνδέεται με περιορισμένες βλάβες, περιορίζοντας την εξάπλωση της ασθένειας, αλλά όταν τα φύλλα επώαστηκαν με αιώρημα μυκηλίου, η συσσώρευση μαρουλίνης A εμφανίζεται να υπερνικείται από διαδικασίες αλλοίωσης και η ασθένεια εξαπλώνεται ( Bennett *et al.*, 1994 ).

Κάποια κολοκυνθοειδή είναι ικανά να παράγουν συστατικά που ονομάζονται κουκουρμπιτασίνες, οι οποίες παρεμποδίζουν τη λακκάση του μύκητα και έχουν σαν αποτέλεσμα μειωμένη μόλυνση των καρπών της αγγουριάς ( Viterbo *et al.*, 1992 ). Όταν οι κουκουρμπιτασίνες απουσιάζουν, ο ξενιστής μπορεί να είναι ανίκανος να σχηματίσει φράγματα έγκαιρα, για να σταματήσει την εξάπλωση του παθογόνου.

Είναι γνωστό ότι οι καρποί γίνονται πιο ευαίσθητοι στη σταχτιά σήψη καθώς ωριμάζουν. Μέρος της αυξημένης ευαισθησίας αναμφίβολα απορρέει από τη γήρανση και από την αλλοίωση των κυτταρικών τοιχωμάτων που συνδέεται με το μαλάκωμα των καρπών. Εντούτοις, η απώλεια πολυφαινολικών συστατικών, όπως οι τανίνες και οι προανθοκυανιδίνες, επίσης μπορούν να είναι σημαντική. Στα σταφύλια, προανθοκυανιδίνες παρεμποδίζουν ανταγωνιστικά τη δραστηριότητα μιας λακκάσης που παράγεται από τον *Botrytis cinerea* , αλλά μόνο παρουσία τανινών, οι οποίες ελαττώνονται κατά την ωρίμανση ( Pezet *et al.*, 1992 ).

### 13. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Η αντιμετώπιση της τεφράς σήψης που προκαλείται από τον μύκητα *Botrytis cinerea*, είναι εξαιρετικά δύσκολη εξαιτίας της ευκολίας του παθογόνου να δημιουργεί ανθεκτικά στελέχη σε πολλά μυκητοκτόνα, περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των χημικών επεμβάσεων. Για το λόγο αυτό προτείνεται η δημιουργία ολοκληρωμένων στρατηγικών αντιμετώπισης του παθογόνου, που περιλαμβάνουν τη χρησιμοποίηση ενός συνδυασμού καλλιεργητικών, βιολογικών και χημικών μεθόδων.

#### A) Καλλιεργητικές μέθοδοι

Συνιστάται η λήψη τους για τη διατήρηση του μολύσματος σε χαμηλά επίπεδα και για τη δημιουργία συνθηκών που είναι δυσμενής για την ανάπτυξη του παθογόνου.

Η διατήρηση καλής υγιεινής στις φυτείες, με την αφαίρεση και καταστροφή των προσβεβλημένων φυτών ή φυτικών οργάνων είναι απαραίτητη. Οι καλλιέργειες πρέπει να είναι απαλλαγμένες κατά το δυνατό από νεκρούς φυτικούς ιστούς και υπολείμματα φυτών, διότι αυτά αποτελούν εστίες μόλυνσης αλλά και σημεία εισόδου του παθογόνου.

Η μείωση της υγρασίας που ευνοεί την ανάπτυξη του παθογόνου είναι επίσης απαραίτητη. Στον αγρό αυτό επιτυγχάνεται με αραιή φύτευση και με φύτευση σε γραμμές κατευθυνόμενες από βορά προς νότο, ώστε καμία πλευρά του φυτού να μην βρίσκεται συνέχεια εκτεθειμένη σε σκιά. Στα θερμοκήπια να αποφεύγονται οι μεγάλες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, οι οποίες συντελούν στη συμπύκνωση των υδρατμών και στην επικάθηση των σταγονιδίων νερού στα φυτά. Οι χώροι αυτοί πρέπει να αερίζονται καλά, τα φυτά να είναι αραιοφυτεμένα και οι αρδεύσεις να γίνονται κατά το δυνατόν τις πρωινές ώρες, ώστε να έχουμε εξάτμιση του νερού από την επιφάνεια των φυτών( Παναγόπουλος, 1995 ).

Τέλος, η χρήση διαφόρων τύπων φιλμ πολυαιθυλενίου που απορροφούν την υπεριώδη ή την υπέρυθη ακτινοβολία, επηρεάζουν την παραγωγή σπορίων του *B. cinerea*, μειώνοντας κατ' αυτό τον τρόπο τη μόλυνση από σταχτιά σήψη ( Reuveni *et al.*, 1992; Vakanoulakis, 1992 ).

## B) Βιολογικές μέθοδοι

Η συμπεριφορά των ειδών του γένους *Botrytis* κατά τη προδιεισδυτική φάση της ανάπτυξής τους πάνω σε υγιείς φυτικές επιφάνειες και η σημασία των νεκρωτικών ιστών μέσα στην καλλιέργεια , σαν πηγές μολύσματος, καθορίζουν τις στρατηγικές του βιολογικού ελέγχου που είναι πιο πιθανό να είναι αποτελεσματικές. Τα είδη του γένους *Botrytis* είναι εξαιρετικά ευάλωτα στον ανταγωνισμό εξαιτίας της εξάρτησής τους από μια εξωγενή πηγή θρεπτικών συστατικών για βλάστηση, ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα και μόλυνση. Πάνω στη φυτική επιφάνεια, τα κονίδια και οι βλαστικοί σωλήνες είναι ευαίσθητα στην επίδραση αντιβιοτικών και λυτικών ενζύμων, που παράγονται από μικροοργανισμούς και τα οποία μπορούν να παρεμποδίσουν τη βλάστηση και να διαλύσουν τους βλαστικούς σωλήνες. Η καταστολή της ασθένειας μπορεί να βασίζεται σε μείωση της σαπροφυτικής

δραστηριότητας του παθογόνου, μείωση της διασποράς των σπορίων του, μειωμένη μολυσματικότητα ή σε επιφερόμενη ανθεκτικότητα στο φυτό ξενιστή ( Elad and Freeman, 2002 ).

Τα πρώτα παραδείγματα βιολογικού ελέγχου με τη χρήση κοινών μικροοργανισμών, προέρχονται από εργασίες των Newhook and Wood ( 1951 ), οι οποίοι εμβολίασαν γερασμένα φύλλα μαρουλιού με ανταγωνιστικούς μύκητες *Fusarium* spp. και *Penicillium claviforme* , οι οποίοι προέρχονταν από την ίδια καλλιέργεια και παρεμπόδισαν την άμεση εγκατάσταση του *Botrytis cinerea*. Ο Newhook ( 1957 ), αντιμετώπισε τη σταχτιά σήψη σε τομάτες θερμοκηπίου, ψεκάζοντας ένα αιώρημα σπορίων *Cladosporium herbarum* και *Penicillium* sp. πάνω σε ανθικά υπολείμματα προσκολλημένα σε καρπούς. Το *C. herbarum* αντιμετώπισε επίσης αποτελεσματικά τη σταχτιά σήψη σε φράουλες, προστατεύοντας τα άνθη κάτω από συνθήκες αγρού ( Bhatt and Vaughan, 1962 ). Επιπλέον, έχει αναφερθεί η ανταγωνιστική επίδραση βακτηρίων πάνω στον *Botrytis cinerea* , στο χρυσάνθεμο και σε φύλλα παντζαριού ( Blakeman and Fraser, 1971; Blakeman, 1972 ). Από τη δεκαετία του 1970, είδη *Trichoderma* spp. χρησιμοποιήθηκαν συχνά για τον έλεγχο του *B. cinerea* σε άνθη φασολιού, σταφύλια, φράουλες και διάφορες καλλιέργειες σε θερμοκήπια. Είδη *Ulocladium* έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για να καταστείλουν την παραγωγή κονιδίων *Botrytis* ( Kohl and Fokkema, 1993 ). Ζύμες, όπως *Pichia* και *Rhodotorula* και βακτήρια, όπως *Bacillus* και *Pseudomonas* έχει αναφερθεί ότι ήταν αποτελεσματικά στον έλεγχο του *B. cinerea* ( Redmond et al., 1987; Edwards and Seddon, 1992; Elad et al., 1994b ).

Αν και κατέχουν μόνο ένα μικρό ποσοστό της παγκόσμιας αγοράς μικροβιοκτόνων, τα βιο-μικροβιοκτόνα αυξάνονται και θα συνεχίσουν να αυξάνονται, έστω και με αργό ρυθμό. Κάποια από τα προϊόντα που είναι καταχωρημένα για χρήση εναντίον του *Botrytis* είναι τα ακόλουθα: **Plantshield** ( Bioworks Inc., USA ), βασίζεται στο *Trichoderma harzianum* ( T22 ) , **Serenade** ( Agra Quest, USA ), βασίζεται στον *Bacillus subtilis*, **Trichodex** ( Makhteshim, Israel ), βασίζεται στο *T. harzianum* και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του *Botrytis cinerea* στο αμπέλι και σε καλλιέργειες θερμοκηπίου, **Botry-Zen** ( Botry-Zen Ltd, New Zealand ), βασίζεται σε ένα στέλεχος του *Ulocladium oudemansii* και συνιστάται για τον έλεγχο της σταχτιάς σήψης στο αμπέλι, **Aspire** ( Ecogen, USA ), περιέχει τη ζύμη *Candida oleophila* και χρησιμοποιείται για μετασυλλεκτικό έλεγχο του *B. cinerea* σε

καρπούς, **Bio-save** ( Eco Science Corp., USA ), περιέχει *Pseudomonas syringae* και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο μετασυλλεκτικών σήψεων σε καρπούς.

### Γ) Χημικές μέθοδοι

Η χημική καταπολέμηση παραμένει ο κύριος τρόπος για την αντιμετώπιση των προσβολών από *B. cinerea* στις κυριότερες καλλιέργειες. Συνήθως εφαρμόζεται ψεκασμός όλων των εναέριων μερών των φυτών με μυκητοκτόνα. Οι εφαρμοζόμενες δόσεις ποικίλουν, ενώ ο αριθμός των μεταχειρίσεων κυμαίνεται από 1-2 μέχρι και είκοσι, κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Μεταχειρίσεις σπόρων ή βολβών, καθώς και εφαρμογές μετά τη συγκομιδή των καρπών, επίσης συνίστανται. Η χημική καταπολέμηση του *B. cinerea* περιορίζεται εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα διάφορα μυκητοκτόνα, αλλά και λόγω της δημόσιας αντίληψης σχετικά με την ασφάλεια των μικροβιοκτόνων.

Διάφορες οικογένειες μυκητοκτόνων είναι διαθέσιμες και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν μυκητοκτόνα με μη εξειδικευμένη δράση ( multi-site ), όπως τα: thiram, captan, dichlofluanid και chlorithalonil, για τον έλεγχο της σταχτιάς σήψης σε πολλές καλλιέργειες, όπως οπωρώνες, κηπευτικά και καλλωπιστικά φυτά. Αυτά τα μυκητοκτόνα παρέχουν προστατευτική δράση και χρειάζονται συχνές εφαρμογές και υψηλές δόσεις. Τα περισσότερα από αυτά δρουν κυρίως ως παρεμποδιστές της βλάστησης των κονιδίων και δευτερευόντως της ανάπτυξης του μυκηλίου. Φαίνεται ότι παρεμποδίζουν τη βλάστηση των κονιδίων παρεμποδίζοντας διάφορα ένζυμα που περιέχουν θειόλη και επιδρούν στην αναπνοή ( Corbett *et al.*, 1984; Pollastro *et al.*, 1996; Slawewski *et al.*, 2002 ).

Τα πρώτα μυκητοκτόνα εξειδικευμένης θέσης που χρησιμοποιήθηκαν για την αντιμετώπιση του *B. cinerea*, ήταν τα βενζιμιδαζολικά ( carbendazim, thiabendazole ), στο τέλος της δεκαετίας του 1960. Αυτά δεν εμποδίζουν τη βλάστηση των κονιδίων, αλλά σε χαμηλές συγκεντρώσεις παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των υφών και προκαλούν εκφυλισμό των βλαστικών σωλήνων ( Leroux *et al.*, 1999 ). Αυτές οι επιδράσεις είναι πιθανές σαν συνέπεια της διατάραξης στη λειτουργία των κυτταρικών μικροσωληνίσκων, εξαιτίας της δέσμευσης των βενζιμιδαζολών στις υπομονάδες της β- τουμπουλίνης του μύκητα ( Davidse and Ishii, 1995 ). Πολύ γρήγορα όμως, μετά την εφαρμογή των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων αναφέρθηκαν διάφορες περιπτώσεις ανθεκτικότητας, κυρίως στους αμπελώνες της Ευρώπης, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της εφαρμογής τους. Τα περισσότερα

στελέχη με υψηλού βαθμού ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, παρουσιάζονται ταυτοχρόνως ως πολύ ευαίσθητα στα N- φαινυλοκαρβαμιδικά, όπως το diethofencarb. Η ανακάλυψη αυτής της αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας οδήγησε στη δημιουργία ενός μίγματος carbendazim και diethofencarb στα τέλη της δεκαετίας του 1980. Όμως στο Ισραήλ, πληθυσμοί *Botrytis cinerea* ανθεκτικοί στο μίγμα βρέθηκαν αμέσως με το ξεκίνημα της εμπορικής χρήσης του σε θερμοκήπια αγγουριού ( Kattan *et al.*, 1989 ). Έρευνες που έγιναν σε υπό κάλυψη καλλιέργειες στην Ελλάδα, αποκάλυψαν πολλές μολύνσεις που δημιουργήθηκαν από απομονώσεις με υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα ( BenHR ). Οι απομονώσεις αυτές ήταν πάντα ευαίσθητες στο diethofencarb ( PcmS ) ( Pappas and Elena, 1988 ). Σε περιοχές με χαμηλή αποτελεσματικότητα του μίγματος carbendazim + diethofencarb,είχαμε σήψεις καρπών από μολύνσεις που δημιουργήθηκαν είτε από απομονώσεις BenHR PcmS, είτε από απομονώσεις BenS PcmHR. Αυτό ήταν αναπάντεχο, επειδή απομονώσεις με ταυτόχρονη μέτρια ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και υψηλή ανθεκτικότητα στα φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα ( BenMR PcmHR ), ανακαλύφθηκαν σε άλλες τοποθεσίες της Ελλάδας ( Laskaris *et al*, 1996 ). Το μίγμα carbendazim + diethofencarb έδωσε πιθανόν ανεπιτυχή αντιμετώπιση εξαιτίας της αποτυχίας του να παρεμποδίσει την ανάπτυξη και τον σχηματισμό κονιδίων των BenHR PcmS απομονώσεων, των οποίων τα σπόρια βλάστησαν απουσία μυκητοκτόνου. Το μίγμα ήταν επίσης ανεπαρκώς αποτελεσματικό σε όλα τα BenMR στελέχη ( Pappas, 1997 ).

Τα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα, όπως τα iprodione, procymidone και vinclozolin, αντικατέστησαν τα βενζιμιδαζολικά στα τέλη της δεκαετίας του 1970. Αυτά παρεμποδίζουν τη βλάστηση των κονιδίων, αλλά κυρίως την ανάπτυξη του μυκηλίου και προκαλούν μορφολογικές μετατροπές στους βλαστικούς σωλήνες ( φουσκώματα, διακλαδώσεις ). Ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί και η θέση- στόχος δεν είναι ακόμα γνωστή. Και στην περίπτωση όμως των δικαρβιξιμιδικών μυκητοκτόνων είχαμε την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών. Σε έρευνες σε υπό κάλυψη καλλιέργειες στη Ελλάδα ανιχνεύτηκαν μολύνσεις που δημιουργήθηκαν από απομονώσεις ανθεκτικές στα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα. Όλες οι ανθεκτικές στα δικαρβοξιμιδικά απομονώσεις είχαν χαμηλή ανθεκτικότητα στο iprodione ( DicMR ), ενώ δεν ανιχνεύτηκαν μολύνσεις από απομονώσεις με υψηλή ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα ( Panagiotakou and Malathrakis, 1983; Pappas, 1997 ).



Στα μέσα της δεκαετίας του 1990 κάποια νέα βοτρυδιοκτόνα, που ανήκουν σε πρόσφατα αναπτυσσόμενες ομάδες μυκητοκτόνων, με διαφορετικό τρόπο δράσης, καταχωρήθηκαν για χρήση και εντάχθηκαν σε προγράμματα ψεκασμών για τον έλεγχο του *Botrytis cinerea* σε καλλιέργειες κηπευτικών, παγκοσμίως. Αυτά τα νέα μυκητοκτόνα είναι οι ανιλνοπυριμιδίνες ( pyrimethanil, cyprodinil ), το υδροξυανιλίδιο fenhexamid και η φαινυλπυρρόλη fludioxonil. Οι ανιλνοπυριμιδίνες μοιράζονται έναν κοινό τρόπο δράσης αποτελούμενο από παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της μεθειονίνης και άλλων αμινοξέων, ενώ επίσης παρεμποδίζουν την έκκριση υδρολυτικών ενζύμων που εμπλέκονται στη διαδικασία μόλυνσης. Οι ανιλνοπυριμιδίνες καταχωρήθηκαν στην Ελλάδα για χρήση εναντίον της σταχτιάς σήψης σε καλλιέργειες κηπευτικών από το 1998. Παρεμποδίζουν την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα και την ανάπτυξη του μυκηλίου. Το cyprodinil χρησιμοποιήθηκε σε μίγμα με το μυκητοκτόνο fludioxonil, της ομάδας των φαινυλπυρρολών. Αν και ο μηχανισμός δράσης δεν είναι πλήρως κατανοητός, υποτίθεται ότι οι φαινυλπυρρόλες παρεμβαίνουν στο μονοπάτι της μετατροπής του οσμωτικού σήματος, έχοντας σαν αποτέλεσμα μια αφύσικη συσσώρευση γλυκερόλης. Η βιολογική δράση του fludioxonil συνιστάτε από παρεμπόδιση της βλάστησης των σπορίων και της ανάπτυξης των υφών. Δεν έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα του παθογόνου σε συνθήκες αγρού. Το fenhexamid παρουσιάζει υψηλή προστατευτική δράση ενάντια στον *Botrytis cinerea* σε διάφορες καλλιέργειες. Είναι διαθέσιμο για χρήση στην Ελλάδα από το 1999, για την αντιμετώπιση της σταχτιάς σήψης σε αμπέλια και κηπευτικά. Παρεμποδίζει την επιμήκυνση των βλαστικών σωλήνων και την ανάπτυξη του μυκηλίου σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, επεμβαίνοντας στην C-4 απομεθυλίωση του μονοπατιού της βιοσύνθεσης των στερολών. Παρά το γεγονός ότι στελέχη *Botrytis cinerea* με μειωμένη ευαισθησία στο fenhexamid έχουν ανιχνευτεί σε μερικές περιπτώσεις, αυτό δεν οδηγεί σε συνολική αποτυχία του ελέγχου στον αγρό ( Heye *et al*, 1994; Masner *et al*, 1994; Debieu *et al*, 2001; Leroux *et al*, 2002; Myresiotis *et al*, 2007 ).

Μυκητοκτόνα που παρεμποδίζουν τη μυτοχονδριακή αναπνοή δεσμευόμενα στο κυτόχρωμα b, ένα μέρος του συμπλέγματος bc1 ( σύμπλεγμα III ), εισήχθησαν για πρώτη φορά στην αγορά το 1996. Τα περισσότερα από αυτά προέρχονται από φυσικές στρομπιλουρίνες, όπως η strobilurin A και παράγονται από διάφορους Βασιδιομύκητες. Οι στρομπιλουρίνες είναι μέλη των παρεμποδιστών της quinone ( Qo1o ) εξαιτίας της δέσμευσής τους στη θέση Qo του κυτοχρώματος b ( Bartlett *et*

*al.*, 2002 ). Κάποιες από αυτές, όπως η azoxystrobin και η metaminostrobin καταπολεμούν τον *Botrytis cinerea* σε διάφορες καλλιέργειες, όπως κηπευτικά, διακοσμητικά φυτά και φράουλες ( Dacol et al, 1998 ).

Τέλος , το boscalid είναι ένα νέο ευρέως φάσματος καρβοξαμιδικό ( ανιλίδιο ) μυκητοκτόνο, πολύ αποτελεσματικό εναντίον του *Botrytis cinerea*, που χρησιμοποιήθηκε σε αμπέλια το 2004. Δρα σαν παρεμποδιστής του ενζυμικού συμπλόκου της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέως ( SDH ), με αποτέλεσμα τη διακοπή της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το ηλεκτρικό οξύ στο συνένζυμο Q, τη συσσώρευση ηλεκτρονίων και την παρεμπόδιση του κύκλου του Krebs και, συνεπώς, της αναπνοής. Σε μια εξέταση πληθυσμών *Botrytis cinerea*, από αμπέλια στην περιοχή της Καμπανίας, δεν ανιχνεύτηκαν στελέχη μετρίως ή υψηλά ανθεκτικά στο boscalid, ενώ δεν υπήρξε και διασταυρωτή ανθεκτικότητα με βενζιμιδαζολικά, φαινυλκαρβαμιδικά και ανιλινοπυριμιδίνες ( Leroux *et al.*, 2003 ).

#### 14. ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Όπως όλες οι ιδιότητες των οργανισμών, έτσι και η ευαισθησία στις τοξικές ουσίες μπορεί να μεταβληθεί με μεταλλαγή ή με επιλογή από τον φυσικό πληθυσμό του παθογόνου. Αν με μια ή περισσότερες μεταλλαγές μειωθεί σημαντικά η ευαισθησία σε μια ένωση, που χρησιμοποιούμε για την καταπολέμηση ενός παθογόνου, θα προκύψει ένα ανθεκτικό στέλεχος, που θα επιλέγεται συνεχώς από την εφαρμογή του παρεμποδιστή μέχρι που να επικρατήσει, οπότε θα έχουμε αποτυχία της καταπολέμησης.

Τα προστατευτικά μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνταν μέχρι τη δεκαετία του 1960 δρουν κατά κανόνα σαν μη εξειδικευμένοι παρεμποδιστές με αποτέλεσμα η πιθανότητα για ανάπτυξη ανθεκτικότητας να είναι μικρότερη. Με την εισαγωγή όμως των διασυστηματικών μυκητοκτόνων που δρουν σαν εξειδικευμένοι παρεμποδιστές είχαμε μεγάλη αύξηση στη δημιουργία ανθεκτικότητας, που πλέον έγινε ο κανόνας και όχι η εξαίρεση.

Η ευαισθησία σε μια τοξική ουσία μπορεί να μεταβληθεί με μεταλλαγή χρωματοσωματικού ή εξωχρωματοσωματικού γόνου. Στους μύκητες , όταν μιλάμε για εξωχρωματοσωματικούς γόνους, εννοούμε τους γόνους του μιτοχονδριακού DNA. Η ανθεκτικότητα των παθογόνων στα μυκητοκτόνα περιγράφεται σαν ανθεκτικότητα μειζόνων γόνων ή ολιγογονική και σαν πολυγονική. Στην πρώτη

περίπτωση επιτυγχάνεται μεγάλο επίπεδο ανθεκτικότητας με μια μόνο μεταλλαγή. Το επίπεδο ανθεκτικότητας μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το ποιος γόνος έχει υποστεί μεταλλαγή. Στα διπλοειδή κύτταρα ο ανθεκτικός αλληλόμορφος μπορεί να συμπεριφέρεται σαν κυρίαρχος, ημικυρίαρχος ή υπολειπόμενος. Στην περίπτωση της πολυγονικής ανθεκτικότητας, η επίδραση του κάθε γόνου στον φαινότυπο είναι πολύ μικρή και δύσκολα αναγνωρίζεται σε συνθήκες αγρού. Όταν όμως στο ίδιο απλοειδές κύτταρο του μύκητα μεταλλάξουν περισσότεροι από ένας γόνους για ανθεκτικότητα στο ίδιο μυκητοκτόνο, το επίπεδο αντοχής μπορεί να ανεβεί πολύ. Αυτό έχει πρακτική σημασία, γιατί συνεχίζοντας τη χρήση του μυκητοκτόνου μπορεί να καταλήξουμε σε στελέχη με πολύ μικρή αντοχή. Αν η ανθεκτικότητα είναι ολιγονική ή πολυγονική εξαρτάται από το μυκητοκτόνο και όχι από τον μύκητα που εκτίθεται σε αυτό.

Ο πιο εύκολος τρόπος για την εμφάνιση ανθεκτικότητας, αλλά και ο πιο αποτελεσματικός, είναι η αλλαγή στην ευαίσθητη θέση, δηλαδή στο κυτταρικό συστατικό ( ένζυμο ή άλλο ) που αντιδρά με το φάρμακο. Ένας άλλος μηχανισμός είναι η μείωση της εισόδου του τοξικού μορίου στο κύτταρο του παθογόνου, ενώ αξίζει να αναφερθεί και ο μηχανισμός της αποτοξικοποίησης ( detoxification ), δηλαδή της εξουδετέρωσης της τοξικότητας του ξένου μορίου ( Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992 ). .

Ο *Botrytis cinerea* είναι ένα υψηλού κινδύνου παθογόνο για ανάπτυξη ανθεκτικότητας εξαιτίας της υψηλής γενετικής μεταβλητότητας και της ευκαμψίας του, της άφθονης παραγωγής σπορίων, της πολυκυκλικής φύσης της ασθένειας που προκαλεί, του μεγάλου φάσματος ξενιστών του και του υψηλού αριθμού εφαρμογών με μυκητοκτόνα που απαιτούνται για τον επιτυχημένο έλεγχό του. ( Brent and Hollomon, 1998 ).

## **15. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ BENZIMIDAZOLIKA ΚΑΙ ΣΤΑ ΦΑΙΝΥΛΟΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ**

Τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα αναπτύχθηκαν τη δεκαετία του 1960. Αμέσως μετά την εισαγωγή τους για χρήση εναντίον του *Botrytis cinerea*, διάφορες περιπτώσεις ανθεκτικότητας καταγράφηκαν, με πρώτη αναφορά σε θερμοκήπια κυκλάμινων στην Ολλανδία, μετά από 2 χρόνια χρήσης. Μια παρόμοια κατάσταση παρουσιάστηκε και στους αμπελώνες στην Ευρώπη και μετά από μόνο 3 ή 4

περιόδους, η χρήση των βενζιμιδαζολικών σταμάτησε στη Ν. Ευρώπη. Πολλές άλλες καλλιέργειες επηρεάστηκαν και σε κάποιες χώρες τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα δεν πήραν έγκριση για τον έλεγχο του *Botrytis cinerea* εξαιτίας του παρατηρούμενου κινδύνου για ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Bollen and Scholten, 1971; Leroux and Clerjeau, 1985; Smith, 1988 )

Τα περισσότερα, ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά, στελέχη ήταν ταυτόχρονα ευαίσθητα στα Ν- φαινυλοκαρβαμιδικά, όπως το diethofencarb ( φαινότυπος Ben R1 ). Αυτή η αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα οδήγησε στη χρήση ενός μίγματος carbendazim και diethofencarb στα τέλη της δεκαετίας του 1980. Στο Ισραήλ, πληθυσμοί *Botrytis cinerea* ανθεκτικοί στο μίγμα βρέθηκαν αμέσως μετά την εμπορική χρήση του σε θερμοκήπια αγγουριού ( Katan *et al*, 1989 ) Στην Καμπανία, μετά από 2 χρόνια χρήσης του μίγματος, ανιχνεύτηκαν στελέχη που ήταν ταυτόχρονα ανθεκτικά και στα δύο μυκητοκτόνα ( φαινότυπος Ben R2 ) ( Leroux *et al*, 1999 ). Ένας τέτοιος φαινότυπος, ο οποίος ανιχνεύτηκε σε άλλες χώρες και σε διάφορες καλλιέργειες, ήταν μέτρια ανθεκτικός στα βενζιμιδαζολικά ( Yarden and Katan, 1993; Laskaris *et al*, 1996; Nakazawa and Yamada, 1997; Pappas, 1997 ). Η ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και στους δύο φαινοτύπους απονέμονταν από αλληλόμορφους του ίδιου γονιδίου, που ονομάστηκε Mbc1 ή Ben A, κωδικοποιημένο για τη β-τουμπουλίνη. ( Faretra and Pollastro, 1991 ). Οι αλλαγές σε σχέση με τον άγριο τύπο ( WT ), ήταν για τον φαινότυπο Ben R1, η αντικατάσταση ενός γλουταμινικού οξέος από μια αλανίνη στη θέση 198 και για τον φαινότυπο Ben R2, στη θέση 200 η αντικατάσταση μιας φαινυλαλανίνης από μία τυροσίνη. Δύο επιπλέον μεταλλάξεις στη θέση 198 ανιχνεύτηκαν από στελέχη ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά που απομονώθηκαν από κηπευτικά. Η πρώτη μετάλλαξη ήταν αποτέλεσμα της αντικατάστασης ενός γλουταμινικού οξέος από μια λυσίνη και έδωσε υψηλή ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και στα φαινυλοκαρβαμιδικά ( Yarden and Katan, 1993 ). Η άλλη μετάλλαξη, στην οποία είχαμε αντικατάσταση ενός γλουταμινικού οξέος από μία βαλίνη, απένειμε μια ασθενή ανθεκτικότητα στο diethofencarb.

Κάτω από συνθήκες εργαστηρίου, πολλές μεταλλάξεις στο γονίδιο της τουμπουλίνης μπορούν να απονείμουν ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. Σε συνθήκες αγρού όμως, αυτές περιορίζονται στις θέσεις 198 και 200 ( Davidse and Ishii, 1995 ).

Γενικά, τα ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα ,στελέχη είναι το ίδιο ανταγωνιστικά με τα ευαίσθητα στελέχη και μπορούν να βρεθούν σε πληθυσμούς ακόμα και μετά τη μετακίνηση της πίεσης επιλογής από το μυκητοκτόνο. Αποτελέσματα από μελέτες σε θερμοκήπια και αγρούς έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά είναι γενικά σταθερή μετά το σταμάτημα των επεμβάσεων. Μια έρευνα που έγινε στην Καμπανία, σε αμπελώνες, κατέδειξε το φαινόμενο στον *Botrytis cinerea* για τον φαινότυπο Ben R1 ( Leroux, 1995 ). Από την άλλη, το γεγονός της μείωσης της συχνότητας των στελεχών με φαινότυπο Ben R2, απουσία ψεκασμών με μίγμα carbendazim + diethofencarb, έδειξε ότι η παρουσία τυροσίνης στη θέση 200 επεμβαίνει στην προσαρμοστικότητα αυτών των μεταλλάξεων. Επιπλέον, η γενίκευση προγραμμάτων που περιλαμβάνουν μια ετήσια εφαρμογή του μίγματος διατηρεί μια υψηλή αναλογία Ben R2 στελεχών.

## 16. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΔΙΚΑΡΒΟΞΙΜΙΔΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

Πολλές μελέτες έχουν γίνει πάνω σε ανθεκτικά στα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα, στελέχη *Botrytis cinerea*, προκαλούμενα στο εργαστήριο ή συλλεγόμενα από αγρούς. Εργαστηριακές μεταλλάξεις έδειξαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στα δικαρβοξιμιδικά, ενώ η παρακολούθηση διαφορετικών καλλιεργειών έδειξε την παρουσία μετρίως ανθεκτικών στελεχών. Οι Faretra and Pollastro ( 1991 ), έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά καθορίζεται από ένα πολυμορφικό γονίδιο που ονομάζεται *BcOS1* ή *Bos1* και κωδικοποιεί μια ιστιδίνη – κινάση.

Στα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη προερχόμενα από τον αγρό, μια σημειακή μετάλλαξη στη θέση 365 η οποία κωδικοποιεί μια ισολευκίνη στα άγρια στελέχη, αντικαθίσταται από μία σερίνη. Σε αμπελώνες στη Γαλλία , αργινίνη ή ασπαραγίνη βρέθηκαν αντί της σερίνης ( Oshima *et al.*, 2002; Leroux *et al.*, 2002a ). Σε πληθυσμούς *Botrytis cinerea* στην Ιαπωνία, συγκεκριμένα στην περιοχή της Οσάκα, απομονώθηκαν επιπλέον δύο ομάδες γενοτύπων, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν από είτε από τρεις αντικαταστάσεις αμινοξέων στις θέσεις 368 ( βαλίνη από φαινυλαλανίνη ), 369 ( ιστιδίνη από γλυσίνη ) και 447 ( θρεονίνη από σερίνη ), είτε από δύο αντικαταστάσεις στις θέσεις 369 ( γλυσίνη από προλίνη ) και 373 ( ασπαραγίνη από σερίνη ). Τα περισσότερα, ανθεκτικά στα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα, στελέχη

αγρού, είχαν μεταλλάξεις στην περιοχή μεταξύ των θέσεων 365 και 369 , του γονιδίου *BcOS1*, προτείνοντας ότι μεταλλάξεις σε αυτή την περιοχή απονέμουν ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά, στον *Botrytis cinerea* ( Sierotzki and Gisi, 2003 ).

Οι πρώτες απομονώσεις ανθεκτικών στελεχών αγρού βρέθηκαν σε αμπελώνες στη Γερμανία το 1978, τρία χρόνια μετά την πρώτη έγκριση των δικαρβοξιμιδικών. Το 1980 το φαινόμενο παρατηρήθηκε σε πολλούς Ευρωπαϊκούς αμπελώνες, αλλά εξαιτίας της απουσίας εναλλακτικών μυκητοκτόνων η χρήση των δικαρβοξιμιδικών συνεχίστηκε και ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών αυξήθηκε σε αυτές τις περιοχές. Επιπλέον αναφορές ανθεκτικών στελεχών αφορούσαν φράουλες, κηπευτικά και θερμοκηπιακές καλλιέργειες ( Lorenz, 1988 ).

Παρακολούθηση διαφόρων καλλιεργειών έδειξε μια ελάττωση των ανθεκτικών απομονώσεων όταν εφαρμόστηκαν διακοπτόμενες εφαρμογές. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να αντιπροσωπεύει μια μειωμένη προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στα δικαρβοξιμιδικά, στελεχών. Αυτό το φαινόμενο συμβαίνει κατά τη σαπροφυτική παρά κατά την παρασιτική φάση του κύκλου ζωής του *Botrytis cinerea* ( Raposo *et al.*, 2000 ). Τα σκληρώτια των ανθεκτικών απομονώσεων δεν επιβιώνουν τόσο καλά όσο τα σκληρώτια των ευαίσθητων απομονώσεων, ενώ όσον αφορά την ανάπτυξη του μυκηλίου δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων απομονώσεων. Τα ανθεκτικά στελέχη συνδέονται επίσης με μειωμένη παραγωγή σπορίων.

Όπως παρατηρήθηκε, για τον *Botrytis cinerea* σε αμπελώνες, η πίεση επιλογής για ανθεκτικότητα σχετίζεται με τον αριθμό των ψεκασμών. Συνιστάτε ο αριθμός των εφαρμογών με δικαρβοξιμιδικά να περιορίζεται σε μία με δύο ανά καλλιέργεια και ανά περίοδο ( Pappas, 1982; Panagiotakou and Malathrakis, 1983).

## **17. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΣΑΝ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ III ( QoIs )**

Τα μυκητοκτόνα της ομάδας αυτής εισήχθησαν στην αντιμετώπιση του *Botrytis cinerea* το 1996. Η μυκοτοξικότητά τους βασίζεται στην παρεμπόδιση της μιτοχονδριακής αναπνοής, δεσμευόμενοι στο οξειδωτικό κέντρο της ubiquinone ( Qo θέση ) του κυτοχρώματος *b*. Παρέχουν προστατευτική και θεραπευτική δράση

παρεμποδίζοντας τη βλάστηση των σπορίων, την ανάπτυξη του μυκηλίου και την παραγωγή σπορίων του μύκητα.

Διάφοροι QoIs, όπως η αζοξιστρομπίνη, η πυρακλοστρομπίνη και η μεταμινostroμπίνη, έδειξαν ότι είναι αποτελεσματικές στην αντιμετώπιση του *Botrytis cinerea* σε διάφορες καλλιέργειες, όπως φράουλες, κηπευτικά και καλλωπιστικά φυτά. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα με εξειδικευμένο μηχανισμό δράσης, όπως οι QoIs, είναι ένα πολύ σοβαρό πρόβλημα στον έλεγχο του *Botrytis cinerea*. Για τις στρομπιλουρίνες, αλλά και γενικότερα για τους παρεμποδιστές του ενζυμικού συμπλόκου III, ο έμφυτος κίνδυνος για ανάπτυξη ανθεκτικότητας υπολογίστηκε ότι είναι μέτριος ( Brent and Hollomon, 1998 ).

Βιοχημικές και μοριακές μελέτες έδειξαν ότι ανθεκτικότητα στους QoIs μπορεί να εμφανιστεί είτε από μια μεταλλαγή της θέσης στόχου δια μέσου σημειακών μεταλλάξεων στη θέση Qo του κυτοχρώματος *b* (Di Rago and Colson, 1989; Zheng and Koller, 1997; Zheng *et al.*, 2000 ), είτε από την αύξηση της μεταφοράς ηλεκτρονίων δια μέσου της μεταβολικής οδού της εναλλακτικής οξειδάσης ( Ziogas *et al.*, 1997; Olaya and Koller, 1999; Tamura *et al.*, 1999 ). Εντούτοις, η εναλλακτική αναπνοή φαίνεται ότι δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των φυσικών πληθυσμών του παθογόνου που ελέγχονται με αυτά τα μυκητοκτόνα πιθανόν εξαιτίας φλαβονών που απελευθερώνονται κατά τη μόλυνση και παρεμβαίνουν στην εισαγωγή αυτής της διαδικασίας ( Zheng *et al.*, 2000 ).

Το κυτόχρωμα *b* είναι μια πρωτεΐνη μεμβράνης, η οποία σχηματίζει τον πυρήνα του μιτοχονδριακού συμπλόκου *bc1* στην αναπνευστική αλυσίδα και το γονίδιο αυτής της πρωτεΐνης είναι τοποθετημένο στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Αντικαταστάσεις αμινοξέων στο κυτόχρωμα *b*, οι οποίες απονέμουν ανθεκτικότητα στους QoIs, έχουν βρεθεί σε διάφορα παθογόνα φυτών. Εντούτοις, λίγες περιπτώσεις QoIs- ανθεκτικών μεταλλάξεων έχουν βρεθεί σε απομονώσεις αγρού. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ανθεκτικότητα απονέμεται από μονή σημειακή μετάλλαξη στη θέση 143 ( G143A ) του γονιδίου του κυτοχρώματος *b* στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, η οποία οδήγησε σε αντικατάσταση της γλυσίνης από αλανίνη. Κάποια παθογόνα, μεταξύ αυτών και ο *Botrytis cinerea*, περιέχουν ένα ‘ **intron** ’ μεταξύ των θέσεων 143 και 144 ( bi-143/144 ). QoIs- ανθεκτικές απομονώσεις αγρού με G143A μετάλλαξη, βρέθηκαν μόνο σε είδη χωρίς το bi-143/144 ‘ **intron** ’ ( Grasso *et al.*, 2006; Sierotzki *et al.*, 2007; Banno *et al.*, 2009 ).

Πειράματα πάνω στη σταθερότητα των ανθεκτικών στην pyraclostrobin φαινοτύπων, έδειξαν μια μείωση της ανθεκτικότητας, κυρίως σε μέτρια ανθεκτικά στελέχη, όταν οι μεταλλάξεις αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα χωρίς παρεμποδιστή. Εντούτοις, ανάκτηση του επιπέδου ανθεκτικότητας παρατηρήθηκε όταν οι μεταλλάξεις επέστρεψαν σε ένα επιλεγμένο υπόστρωμα. Μελέτες πάνω στην ικανότητα ανταγωνισμού των μεταλλαγμένων απομονώσεων σε σχέση με τα άγρια στελέχη – γονείς, με εφαρμογές κονιδίων μικτού πληθυσμού, έδειξαν ότι, *in vitro*, όλες οι μεταλλάξεις ήταν λιγότερο ανταγωνιστικές σε σχέση με τα άγρια στελέχη. Επιπλέον, η ανταγωνιστική ικανότητα των υψηλά ανθεκτικών μεταλλάξεων ήταν υψηλότερη σε σχέση με τις μέτρια ανθεκτικές. Δοκιμές παθογένεσης πάνω σε φυτάρια αγγουριάς, έδειξαν ότι όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη εμφάνισαν μια ικανότητα μόλυνσης όμοια με τα άγρια στελέχη. Τέλος, μελέτη των παραμέτρων προσαρμοστικότητας, μεταξύ άγριου τύπου και ανθεκτικών στην pyraclostrobin, στελεχών, έδειξαν μια σημαντική μείωση στην παραγωγή σπορίων, βλάστηση κονιδίων και παραγωγή σκληρωτίων, των ανθεκτικών στελεχών ( Markoglou et al, 2006 ).

## 18. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ BOSCALID

Το boscalid, όπως αναφέραμε είναι ένα νέο, ευρέως φάσματος καρβοξαμιδικό μυκητοκτόνο ( ανιλίδιο ), και η δράση του οφείλεται στην παρεμπόδιση της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος ( σύμπλεγμα II ). Η εισαγωγή του για χρήση εναντίον του *Botrytis cinerea* έγινε σχετικά πρόσφατα, συγκεκριμένα το 2004 σε αμπελώνες στη Γαλλία, όπου δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Σε πιο πρόσφατα όμως πειράματα που έγιναν στην Κίνα, όπου δεν είχε ξαναχρησιμοποιηθεί, υποδηλώθηκε ο κίνδυνος ανάπτυξης μέτριας ανθεκτικότητας και σε αυτό το μυκητοκτόνο ( Zhang et al, 2007; Myresiotis et al, 2008 ).

Η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος, αποτελείται από δύο κύριες υπομονάδες : μια φλαβοπρωτεΐνη ( CII1 ) και μια πρωτεΐνη σιδήρου – θείου ( Ip), οι οποίες μαζί με δύο πρωτεΐνες ( CII3, CII4 ), που είναι αγκυροβολημένες στη μεμβράνη, κάνουν το σύμπλεγμα II. Το boscalid εμποδίζει την μεταφορά ηλεκτρονίων από το ηλεκτρικό οξύ στην ουμπικουϊνόνη, πιθανώς παρεμβάλλοντας μεταξύ των υπομονάδων Ip και CII3 ( White and Georgopoulos, 1992 ). Η ανθεκτικότητα σχετίζεται με μια



αντικατάσταση αμινοξέος στο γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα Ip, όπου μια ισολευκίνη αντικαθίσταται από μια λευκίνη ή τυροσίνη ( Broomfield and Hargreaves, 1992 ).

Σε πειράματα που έγιναν στην Κίνα, μελετήθηκαν μεταλλάξεις που προέκυψαν από μεταλλαξηγένεση με UV ακτινοβολία. Όλες οι ανθεκτικές μεταλλάξεις αναπτύχθηκαν φυσιολογικά σε υπόστρωμα PDA χωρίς boscalid, ενώ δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των ανθεκτικών μεταλλάξεων και των άγριου τύπου ευαίσθητων γονέων τους. Μια παρόμοια κατάσταση παρατηρήθηκε και για την βλάστηση των σπορίων. Εντούτοις, οι ανθεκτικές μεταλλάξεις έδειξαν μια σημαντική μείωση στην παραγωγή σπορίων *in vitro* και στην παθογένεση. Αυτό το αποτέλεσμα προτείνει ότι οι ανθεκτικές μεταλλάξεις ήταν μειωμένης προσαρμοστικότητας ( Zhang *et al.*, 2007 ).

Επειδή το boscalid δεν παρουσιάζει διασταυρωτή ανθεκτικότητα με τα δικαρβοξυμιδικά, τα βενζιμιδαζολικά και τις ανιλινοπυριμιδίνες, αλλά και εξαιτίας του γεγονότος της επιτυχούς εφαρμογής του για την αντιμετώπιση του *Botrytis cinerea*, μέχρι σήμερα, είτε μόνο του, είτε σε μίγμα με κάποιους QoIs, θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω η πιθανότητα κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε αυτό το νέο μυκητοκτόνο ( Myresiotis *et al*, 2008 ).

## **II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τεφρά σήψη που προκαλείται από τον μύκητα *Botrytis cinerea* είναι μια σοβαρή ασθένεια με σημαντικές απώλειες στην παραγωγή των καλλιεργειών κηπευτικών σε θερμοκήπια, σ' όλη τη λεκάνη της Μεσογείου. Από τη στιγμή που δεν υπάρχουν ανθεκτικές ποικιλίες γι' αυτές τις καλλιέργειες, η αντιμετώπιση της ασθένειας βασίζεται κυρίως στην εφαρμογή ψεκασμών με μυκητοκτόνα, σε συνδυασμό με διάφορες καλλιεργητικές μεθόδους ( Myresiotis *et.al.*, 2008).

Τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της τεφράς σήψης ανήκουν σε διάφορες ομάδες. Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1990, ο έλεγχος της ασθένειας επιτυγχάνονταν κυρίως με εφαρμογές μυκητοκτόνων που δρουν σε εξειδικευμένες θέσεις και ανήκουν στις ομάδες των βενζιμιδαζολικών, δικαρβοξιμιδικών και N-φαινυλοκαρβαμιδικών, ενώ παρεμποδιστές πολλαπλών θέσεων όπως τα chlorothalonil, captan, imidactodine και dichlofluanid χρησιμοποιήθηκαν σε μίγματα ή σε εναλλαγή με μυκητοκτόνα εξειδικευμένης θέσης. Στο πρόσφατο παρελθόν, νέα βοτρυδιοκτόνα, με νέους μηχανισμούς δράσης αναπτύχθηκαν και καταχωρήθηκαν για χρήση εναντίον της τεφράς σήψης παγκοσμίως. Αυτά τα νέα βοτρυδιοκτόνα ήταν οι ανιλινοπυριμιδίνες ( cyprodinil, pyrimethanil ), παράγωγα των φαινυλπυρολών ( fludioxonil ) και παράγωγα των υδροξυανιλιδίων ( fenhexamid ). Εντούτοις, η εντατική χρήση αυτών των, εξειδικευμένης θέσης, παρεμποδιστών οδήγησε σε μια γρήγορη επιλογή ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου στα βενζιμιδαζολικά, δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα και στις ανιλινοπυριμιδίνες τόσο στην Ελλάδα όσο και σε άλλες χώρες παγκοσμίως ( Panagiotakou and Malathrakis, 1983; Elad *et. al.*, 1992; Moorman and Lease, 1992; Elad *et. al.*, 1995; Rosslenbroich and Stuebler, 2000 ). Σ' αυτές τις περιπτώσεις, η εισαγωγή σε προγράμματα ψεκασμών νέων μυκητοκτόνων που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες, χωρίς διασταυρωτή ανθεκτικότητα με τα βοτρυδιοκτόνα που ήδη χρησιμοποιούνται, βοήθησε ώστε να ξεπεραστούν οι περιορισμοί στον έλεγχο της ασθένειας εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα. Δύο νέα δραστικά συστατικά, το pyraclostrobin και το boscalid, μπορούν να παίξουν έναν τέτοιο ρόλο.

Το pyraclostrobin είναι μεταξύ των νεότερων μελών της ομάδας των εξωτερικών παρεμποδιστών της κινόνης ( QoIs ), μιας κλάσης μυκητοκτόνων που

αναπτύχθηκε από φυσικά παράγωγα μυκήτων όπως η strobilurin A και η oudemansin A. Ο μηχανισμός δράσης αυτής της κλάσης μυκητοκτόνων είναι η παρεμπόδιση της μιτοχονδριακής αναπνοής, συγκεκριμένα στη θέση III του κυτοχρώματος b, δημιουργώντας παρεμπόδιση της μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ κυτοχρώματος b και κυτοχρώματος c<sub>1</sub>. Η παρεμπόδιση της μιτοχονδριακής αναπνοής οδηγεί σε διάρρηξη του ενεργειακού κύκλου. Το pyraclostrobin έχει ένα ευρύ φάσμα δράσης, περιλαμβάνοντας είδη μυκήτων όπως ο *B. cinerea*. Εντούτοις, μελέτες με τον μύκητα *Septoria tritici* έδειξαν ότι η προσπέλαση της θέσης δράσης με τη λειτουργία του εναλλακτικού ‘μονοπατιού’ της αναπνοής είναι ένας αποτελεσματικός μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας στην azoxystrobin ( Ziogas, B. N. *et. al.*, 1997 ), ένα μέλος της ίδιας ομάδας μυκητοκτόνων. Για το λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη έγιναν δοκιμές μίγματος pyraclostrobin με salicylhydroxamic acid ( SHAM ) για την ανίχνευση ανθεκτικότητας. Το SHAM δρα σαν παρεμποδιστής του εναλλακτικού ‘μονοπατιού’ της αναπνοής. Έχει μελετηθεί η δράση του σαν παρεμποδιστή του εναλλακτικού ‘μονοπατιού’ της αναπνοής σε δοκιμές μιας συνδυασμένης μυκοτοξικής δράσης μεταξύ SHAM και παρεμποδιστών του μονοπατιού των κυτοχρωμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας, όπως παράγωγα methoxyacrylate ή antimycin A. Ένας αξιόλογος συνεργισμός μυκοτοξικής δράσης εμφανίστηκε στον *B. cinerea*. Ο συνεργισμός μπορεί να προκύψει από την εισαγωγή του εναλλακτικού ‘μονοπατιού’ από προηγούμενους παρεμποδιστές και την παρεμπόδιση του εισαγόμενου εναλλακτικού μονοπατιού από το SHAM, ( Hayashi, K. *et al*, 1996 ).

Το boscalid είναι ένα νέο, ευρέος φάσματος μυκητοκτόνο που ανήκει στην κλάση των καρβοξαμιδικών ( ανιλίδια ). Αυτά τα μυκητοκτόνα έχουν ένα διαφορετικό τρόπο δράσης, την παρεμπόδιση του ενζυμικού συμπλόκου της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος ( SDH ) ή αλλιώς σύμπλοκο II, που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Το ένζυμο παίζει έναν αποφασιστικό ρόλο στον τρι-καρβοξυλικό κύκλο και τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς και η παρεμπόδισή του οδηγεί σε διακοπή του ενεργειακού κύκλου του κυττάρου και, συνεπώς, της αναπνοής ( Matheron and Porchas, 2004; Stammeler and Speakman, 2006 ).

Τα δύο αυτά νέα μυκητοκτόνα μπορούν να παίξουν ένα σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση της ασθένειας και στη διαχείριση της ανθεκτικότητας που αναπτύσσεται στις άλλες κλάσεις μυκητοκτόνων. Εντούτοις, ο *B. cinerea* είναι ένα υψηλού κινδύνου παθογόνο, για ανάπτυξη ανθεκτικότητας, εξαιτίας της υψηλής

γενετικής μεταβλητότητας, της άφθονης παραγωγής σπορίων, του μικρού χρόνου συμπλήρωσης του βιολογικού κύκλου και του μεγάλου εύρους ξενιστών. Επίσης, πρόσφατες μελέτες έδειξαν έναν υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη ανθεκτικότητας αυτού του παθογόνου στο pyraclostrobin ( Markoglou, *et al*, 2006 ) και έναν μέτριο κίνδυνο για ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο boscalid ( Zhang, *et al*. 2007 ).

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε για να καταδείξουμε την ύπαρξη ή όχι ανθεκτικότητας διαφόρων απομονώσεων *B. cinerea*, επιλεγμένων από υπό κάλυψη και από υπαίθριες καλλιέργειες μαρουλιού στα μυκητοκτόνα iprodione, carbendazim, boscalid και pyraclostrobin, καθώς και τη δράση του SHAM σαν παρεμποδιστή τυχόν εισαγωγής του εναλλακτικού ‘μονοπατιού’ της αναπνοής κατά την εφαρμογή του pyraclostrobin.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Όλες οι απομονώσεις διατηρήθηκαν και αναλύθηκαν σε υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA). Για την παρασκευή του PDA ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: σε μια κωνική φιάλη βάζουμε 1lt απιονισμένο νερό και αφού το θερμάνουμε κατάλληλα ( όχι βρασμός ) προσθέτουμε 39gr σκόνης PDA ( Oxoid – CM 0139 ) και αναμιγνύουμε καλά με μια σπάτουλα μέχρι να γίνει πλήρης διάλυση και τήξη της σκόνης. Μόλις το μίγμα είναι έτοιμο το εγχύνουμε σε γυάλινες θερμοανθεκτικές φιάλες και δοκιμαστικούς σωλήνες, πριν προλάβει να στερεοποιηθεί. Τέλος, αποστειρώνουμε τοποθετώντας τις φιάλες και τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε αυτόκαυστο, σε θερμοκρασία 121°C για 15 min και πίεση 1.2 atm.

### ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ

Οι απομονώσεις του *Botrytis cinerea* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, απομονώθηκαν από προσβεβλημένα φυτά μαρουλιού που συλλέχθηκαν από υδροπονική καλλιέργεια σε θερμοκήπιο και από υπαίθριες καλλιέργειες. Συγκεκριμένα, έγινε συλλογή δειγμάτων από προσβεβλημένα φυτά μαρουλιού ( φύλλα και ολόκληρα φυτά ) από το θερμοκήπιο Crocus Flora AE στο χωριό Κρόκιο, στην περιοχή Αλμυρού, Βόλου και από υπαίθριες καλλιέργειες σε αγρόκτημα στο χωριό Αϊδίσι, στην περιοχή Αλμυρού, Βόλου και σε αγρόκτημα στην περιοχή Κεφαλόβρυσο, Τρικάλων. Από το θερμοκήπιο κάναμε τρεις δειγματοληψίες,

συγκεκριμένα κατά τις ημερομηνίες 6/3/2009, 2/4/2009 και 6/5/2009. Από τα αγροκτήματα κάναμε από μία δειγματοληψία, συγκεκριμένα στις 18/3/2009 από το αγρόκτημα στο Αϊδίνοι και στις 31/3/2009 από το αγρόκτημα στο Κεφαλόβρυσο, Τρικάλων. Το πρόγραμμα δειγματοληψιών φαίνεται αναλυτικά στον πίνακα 1. Τα προσβεβλημένα δείγματα που συλλέχθηκαν από το θερμοκήπιο Crocus Flora A.E. είχαν δεχτεί εφαρμογή ψεκασμών με μυκητοκτόνα εναντίον της ασθένειας. Το πλήρες πρόγραμμα ψεκασμών με μυκητοκτόνα που εφαρμόστηκε φαίνεται στον πίνακα 2. Στα δείγματα που πήραμε από τα αγροκτήματα με τις υπαίθριες καλλιέργειες δεν έγινε καμία επέμβαση εναντίον της ασθένειας. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο μέσα σε ξεχωριστούς σάκους πολυαιθυλενίου, περιέχοντες υγρασία ( σταγόνα ύδατος ) και επώαστηκαν όλη τη νύχτα για τη δημιουργία κονιδίων. Με τη χρήση αποστειρωμένης βελόνας και την απλή επαφή της πάνω στα μολυσμένα τμήματα των δειγμάτων, σπόρια μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν Potato Dextrose Agar ( PDA ) σε κλίση. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25°C στο σκοτάδι για 5 ημέρες ( για το σχηματισμό άφθονων καρποφοριών ) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στο ψυγείο στους 4°C για διατήρηση μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Συνολικά, δημιουργήσαμε 300 απομονώσεις, αναλυτικά: 105 απομονώσεις από δειγματοληψία στο θερμοκήπιο Crocus Flora AE στις 6/3/2009, 60 απομονώσεις από δειγματοληψία στο θερμοκήπιο Crocus Flora AE στις 2/4/2009, 55 απομονώσεις από δειγματοληψία στο θερμοκήπιο Crocus Flora AE στις 6/5/2009, 30 απομονώσεις από δειγματοληψία στο αγρόκτημα του Αϊδινίου στις 18/3/2009 και 50 απομονώσεις από δειγματοληψία στο αγρόκτημα του Κεφαλόβρυσου, Τρικάλων στις 31/3/2009. Από τις απομονώσεις αυτές, στις 17/6/2009 χρησιμοποιήσαμε τις πιο εύρωστες και χωρίς επιμολύνσεις, για να δημιουργήσουμε καθαρές υποκαλλιέργειες. Πάλι με τη χρήση αποστειρωμένης βελόνας και με απλή επαφή πάνω στις καρποφορίες της κάθε απομόνωσης, μεταφέραμε σπόρια του μύκητα σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν PDA σε κλίση, τους οποίους στη συνέχεια τοποθετήσαμε σε θάλαμο επώασης, στους 25°C στο σκοτάδι, για 4 ημέρες. Συνολικά, δημιουργήσαμε 30 καθαρές υποκαλλιέργειες από κάθε δειγματοληψία, από τις οποίες χρησιμοποιήσαμε τελικά τις 20 για την πραγματοποίηση της μελέτης μας. Χρησιμοποιήθηκαν δηλαδή συνολικά 100 καθαρές απομονώσεις για την ανίχνευση της ύπαρξης ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα.

Πίνακας 1. Πρόγραμμα δειγματοληψιών, απομονώσεων *B. cinerea* που δοκιμάστηκαν για ανθεκτικότητα σε διάφορα μυκητοκτόνα, *in vitro*.

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ
CrFl A (A)	Crocus Flora A.E., Κρόκιο, Βόλος	105 (20)*	6/3/2009
CrFl B (B)	.Crocus Flora A.E. Κρόκιο, Βόλος	60 (20)*	2/4/2009
CrFl C (C)	Crocus Flora A.E. Κρόκιο, Βόλος	55 (20)*	6/5/2009
AID	Αϊδίνι. Βόλος	30 (20)*	18/3/2009
TR	Κεφαλόβρυσο, Τρίκαλα	50 (20)*	31/3/2009

\*: Ο αριθμός των απομονώσεων που τελικά χρησιμοποιήθηκαν

#### ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

Τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας ήταν οι εμπορικές συσκευασίες των iprodione ( Rovral 50% WP, Rhone – Poulenc, France ), carbendazim ( Derozal 50% WP, Hoechst, Germany ), boscalid ( BAS 510 50% WG, BASF, Germany ) και pyraclostrobin ( F 500 25% EC, BASF, Germany ). Τα μυκητοκτόνα διαλύθηκαν σε διμεθυλοσουλφοξείδιο ( DMSO ) και προετοιμάστηκαν πυκνά διαλύματα συγκέντρωσης 1000μg/ml δ.ο. Για να επιτύχουμε τις επιθυμητές συγκεντρώσεις ( μg δραστικού συστατικού ανά ml υποστρώματος ανάπτυξης ), προετοιμάστηκαν υποπολλαπλάσια από τα αποθέματα διαλυμάτων σε DMSO. Η τελική συγκέντρωση διαλύματος δραστικού συστατικού ή μόνο διαλύτη στο υπόστρωμα ανάπτυξης είναι πάντα 1%.

Πίνακας 2. Πρόγραμμα εφαρμογής ψεκασμών με μυκητοκτόνα για τον έλεγχο της σταχτιάς σήψης που δημιουργείται από τον μύκητα *B. cinerea* κατά την χειμερινή καλλιεργητική περίοδο ( Φεβρουάριος-Απρίλιος ) 2009.

ΠΕΡΙΟΧΗ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ	ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ
Crocus Flora ΑΕ, Κρόκιο, Βόλου	2/2/2009	Teldor 50% WG (fenhexamid)
	2/2/2009	Signum WG ( boscalid 26.7% + pyraclostrobin 6.7% )
	7/2/2009	Rovral 50% SC ( iprodione )
	25/2/2009	Teldor 50% WG (fenhexamid)
	6/3/2009	Rovral 50% SC (iprodione)
	20/3/2009	Signum WG (boscalid 26.7% +pyraclostrobin 6.7%)
	5/4/2009	Teldor 50 % WG
	24/4/2009	Switch WG ( fludioxonil 25% + cyprodinil 37.5% )
Αϊδίτι, Βόλου	-	Αψέκαστο
Κεφαλόβρυσο, Τρίκαλα	-	Αψέκαστο

#### ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

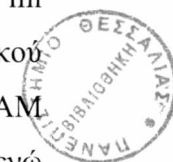
Η ανίχνευση ανθεκτικότητας των 100 επιλεγμένων απομονώσεων του *B. cinerea* εκτιμήθηκε με την κατάλληλη τροποποίηση της μεθόδου εμβολιασμού σε σημείο ( point inoculation method, Pappas, 1997 ). Στις 22/6/2009 οι δοκιμαστικοί σωλήνες με τις καθαρές υποκαλλιέργειες ηλικίας 5 ημερών μεταφέρθηκαν σε black light, όπου αφέθηκαν για 20-24h. Με τη βοήθεια αποστειρωμένης βελόνας, 10 μάζες



σπορίων, όσων μπορεί να μεταφέρει η άκρη της βελόνας με μια απλή επαφή πάνω στις καρποφορίες που έχουν δημιουργηθεί, πάρθηκαν από έναν ισοδύναμο αριθμό απομονώσεων και τοποθετήθηκαν σε προσημειωμένες θέσεις, στην περιφέρεια τρυβλίων Petri που περιείχαν PDA εμπλουτισμένο με ένα εύρος 13 διαφορετικών συγκεντρώσεων μυκητοκτόνων. Μυκητοκτόνα διαλυμένα σε DMSO, προστέθηκαν σε 100ml, αποστειρωμένο σε αυτόκαυστο, PDA που περιέχονταν σε πεπλατυσμένα θερμοανθεκτικά μπουκάλια και το οποίο είχε 45°C, περίπου. Τα μπουκάλια ανακινήθηκαν καλά και το περιεχόμενό τους διασκορπίστηκε ισοδύναμα σε 10 τρυβλία Petri έκαστο. Δημιουργήθηκαν επίσης 10 τρυβλία μάρτυρες, περιέχοντα PDA που περιέχει μόνο DMSO 1%, καθώς και 10 τρυβλία περιέχοντα PDA με salicylhydroxamic acid ( SHAM ) συγκέντρωσης 100μg/ml, διαλυμένο σε DMSO. Οι συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες: iprodione 3μg και 10μg δραστικού συστατικού ανά ml υποστρώματος ανάπτυξης, carbendazim 10μg και 100μg δραστικού συστατικού ανά ml υποστρώματος ανάπτυξης, boscalid 0.1μg, 1μg και 10μg δραστικού συστατικού ανά ml υποστρώματος ανάπτυξης, pyraclostrobin 0.1μg, 1μg και 10μg δραστικού συστατικού ανά ml υποστρώματος ανάπτυξης, pyraclostrobin ( 0.1μg, 1μg και 10μg ) + SHAM 100μg δραστικού συστατικού ανά ml υποστρώματος ανάπτυξης, ενώ χρησιμοποιήθηκε και μόνο SHAM 100μg δραστικού συστατικού ανά ml υποστρώματος ανάπτυξης. Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25°C στο σκοτάδι, για 20-24h και στη συνέχεια εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο ( X 100 ) για να παρατηρήσουμε βλάστηση ή όχι των σπορίων. Μετά από 2 ημέρες από την πρώτη παρατήρηση έγινε έλεγχος των τρυβλίων για τη δημιουργία ή όχι αποικίας. Ένα σπόριο θεωρείται ότι βλάστησε αν ο βλαστικός του σωλήνας έχει μέγεθος τουλάχιστο το μισό του μεγέθους του σπορίου.

### 3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο S.P.S.S. 13 ( ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι).



#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

**Ευαισθησία στο iprodione:** Από τις 100 απομονώσεις *Botrytis cinerea* που ελέγχθηκαν για ευαισθησία στο iprodione, με βάση τη βλάστηση των σπορίων τους, στις 85 είχαμε πλήρη παρεμπόδιση της βλάστησης στη συγκέντρωση των 3μg/ml, οπότε θεωρήθηκαν ευαίσθητες ( DicS ), ενώ στις 15 είχαμε βλάστηση των σπορίων τους οπότε θεωρήθηκε ότι παρουσιάζουν κάποιο επίπεδο ανθεκτικότητας ( DicR ). Από αυτές οι 6 βλάστησαν και στη συγκέντρωση των 10μg/ml, ο βλαστικός σωλήνας όμως που σχηματίστηκε ήταν πολύ βραχύς σε σχέση με τον μάρτυρα ( Πίνακας 3, Διάγραμμα 1 ).

Πίνακας 3 : Ευαισθησία/ανθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα, αντιπροσωπευτικών απομονώσεων *Botrytis cinerea*

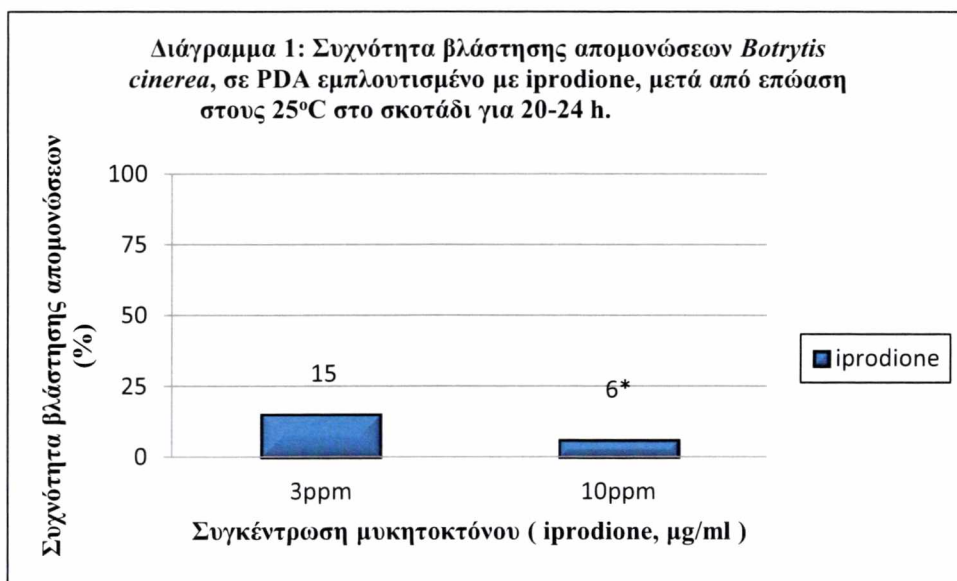
Συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων (μg/ml)

Απομονώσεις	Πηγή προέλευσης	Iprodione		Carbendazim	
		3	10	10	100
A10	CrFl A ( 6/3/2009 )	+	-	+	+
A18	>>	+	-	+	+
B9	CrFl B ( 2/4/2009 )	+	+/-	+	+
B11	>>	-	-	+	+
B12	>>	+	+/-	+	+
B13	>>	+	+/-	+	+
B15	>>	+	+/-	+	+
B17	>>	+	-	+	+
C1	CrFl C ( 6/5/2009 )	+	-	+/-	+/-
C6	>>	+	-	+	+
C11	>>	+	-	+	+
C12	>>	+	-	+	+
C13	>>	-	-	+	+
C14	>>	+	-	+	+/-
C15	>>	+	+/-	+	+
C18	>>	+	-	+	+
C20	>>	+	+/-	+	+
AID15	Αϊδίσι	-	-	+	+
AID16	>>	-	-	+	+
TR12	Κεφαλόβρυσο	-	-	+	+
TR17	>>	-	-	+	+

+: φυσιολογική βλάστηση σπορίων και ανάπτυξη τυπικού βλαστικού σωλήνα

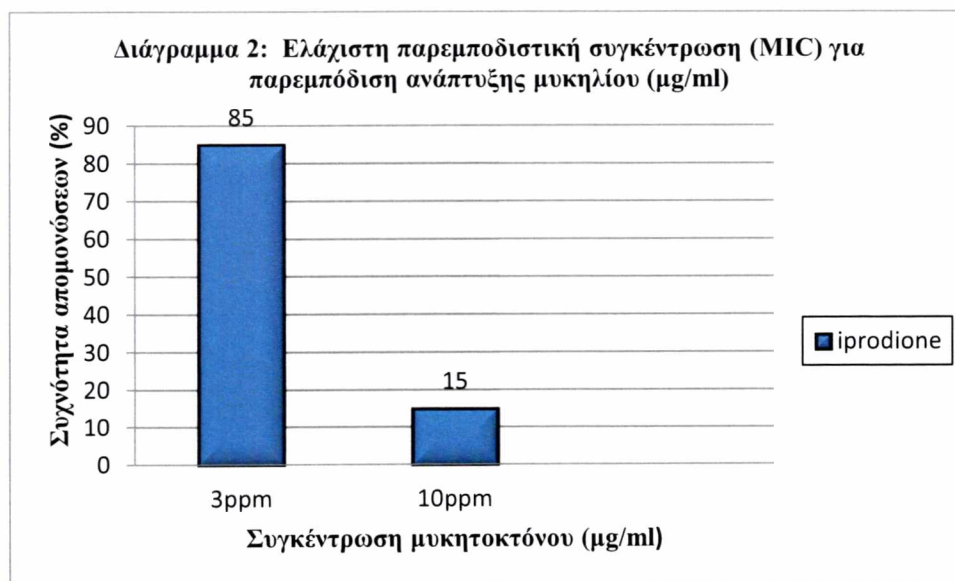
+/-: βλάστηση σπορίων με βραχύ ή παραμορφωμένο βλαστικό σωλήνα

-: μη βλάστηση σπορίων μετά από επώαση στους 25°C στο σκοτάδι για 20-24h

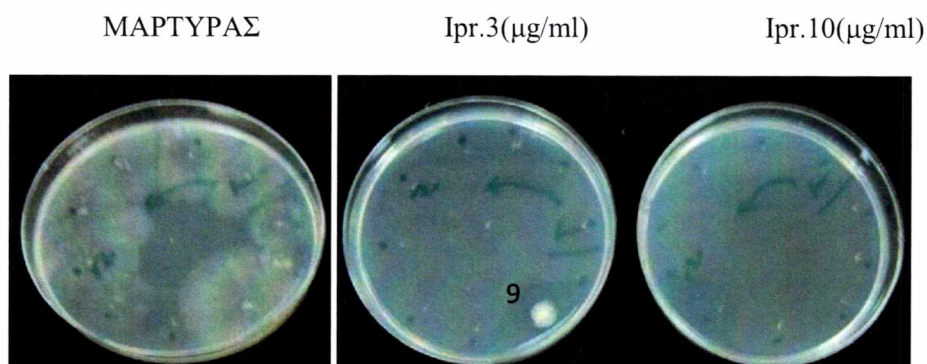


\*Βλάστηση σπορίων με βραχείς βλαστικούς σωλήνες

Σχετικά με την αντίδραση της ανάπτυξης μυκηλίου στο iprodione μετά από επώαση στους 25<sup>0</sup>C στο σκοτάδι για 72h, από τις 100 απομονώσεις που ελέγχθηκαν στις 85 είχαμε πλήρη παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με iprodione στη συγκέντρωση των 3µg/ml ( MIC ) . Οι υπόλοιπες 15 απομονώσεις σχημάτισαν μυκήλιο στη συγκέντρωση των 3µg/ml όχι όμως και στη συγκέντρωση των 10µg/ml ( MIC ) ( Διάγραμμα 2 ) .



Εικόνα 1: Ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων *Botrytis cinerea* B1-B10 σε PDA ενισχυμένο με iprodione μετά από επώαση στο σκοτάδι για 72h



\*Διακρίνεται η χαμηλής ανθεκτικότητας απομόνωση B9

Κάνοντας μια σύγκριση μεταξύ των απομονώσεων που προέρχονται από θερμοκήπιο και αυτών που προέρχονται από χωρίς κάλυψη αγροτεμάχια διαπιστώνουμε ότι όλες οι ανθεκτικές στο iprodione απομονώσεις προήλθαν από το θερμοκήπιο. Αυτό οφείλεται ενδεχομένως στο γεγονός ότι στο θερμοκήπιο είχαμε εφαρμογές ψεκασμών με iprodione. Μάλιστα, διαπιστώνουμε ότι στις απομονώσεις που προήλθαν από την δεύτερη ( CrFI B) και την τρίτη δειγματοληψία (CrFI C), όπου εφαρμόστηκαν δύο ψεκασμοί με iprodione (Rovral), είχαμε μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικότητας, 25% και 40% αντίστοιχα, έναντι 10% της πρώτης δειγματοληψίας (CrFI A). ( Πίνακας 4 , Πίνακας 5 )

. Πίνακας 4: Ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα σε θερμοκήπιο και σε αγροτεμάχια χωρίς κάλυψη

Καλλιεργητικό σύστημα	Αριθμός απομονώσεων	% Απομονώσεις ανθεκτικές στα			
		Iprodione 3μg/ml	Carbendazim 10μg/ml	Boscalid 10μg/ml	Pyraclostrobin 10μg/ml + SHAM 100μg/ml
Θερμοκήπιο	60	25	26,66	6,66	11,66
Αγροτεμάχια χωρίς κάλυψη	40	0	10	0	2,5
Σύνολο	100	15	20	4	8

\*Βλέπε υλικά και μέθοδοι

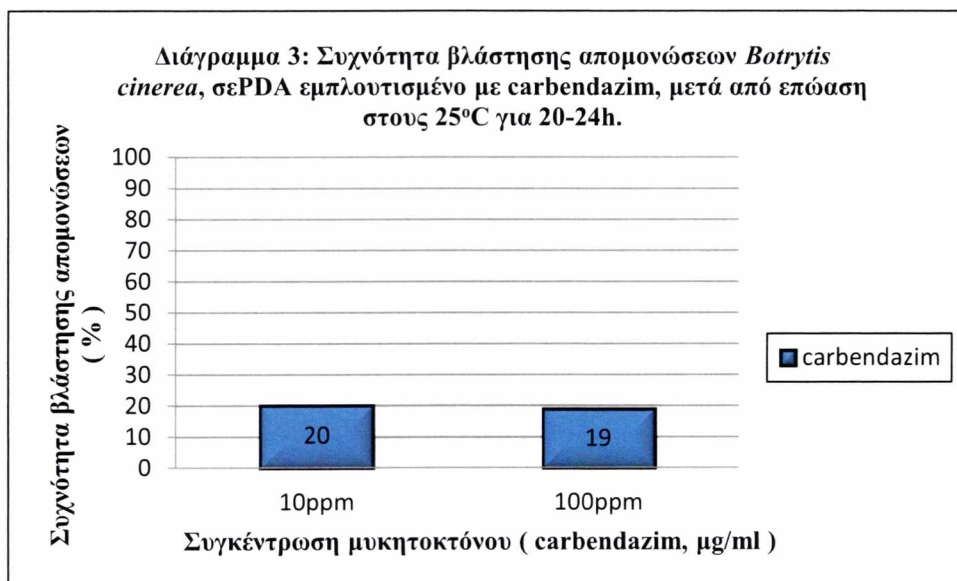
Πίνακας 5: Ποσοστό (%) ανθεκτικών απομονώσεων στα μυκητοκτόνα, για καθεμιά από τις 5 δειγματοληψίες

Περιοχή	Κωδικός	Αριθμός απομονώσεων	% ανθεκτικότητα στο iprodione 3μg/ml	% ανθεκτικότητα στο carbendazim 10μg/ml	% ανθεκτικότητα στο boscalid 10μg/ml	% ανθεκτικότητα στην pyraclostrobin 10μg/ml+SHAM 100μg/ml
Crocus Flora AE	CrFl A	20	10	10	0	0
Crocus Flora AE	CrFl B	20	25	30	5	5
Crocus Flora AE	CrFl C	20	40	40	15	30
Αϊδίι	AID	20	0	10	0	0
Κεφαλόβρυσο	TR	20	0	10	0	5

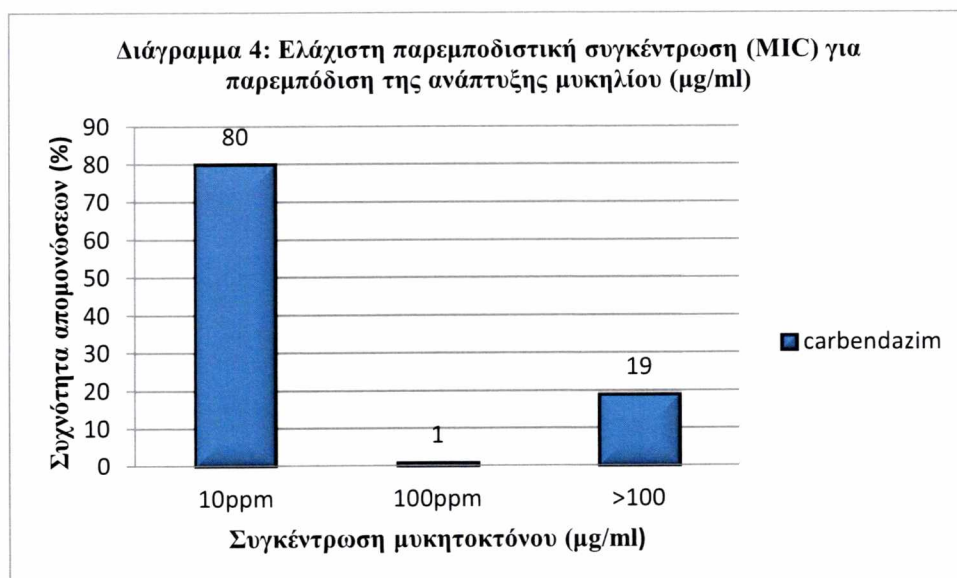
\*Βλέπε υλικά και μέθοδοι

Από τις απομονώσεις που εμφάνισαν ανθεκτικότητα καμία δεν ήταν ανθεκτική μόνο στο iprodione, οι 11 παρουσίασαν διπλή ανθεκτικότητα στο iprodione και στο carbendazim, 3 παρουσίασαν πολλαπλή ανθεκτικότητα στο iprodione, carbendazim και pyraclostrobin, ενώ 1 παρουσίασε πολλαπλή ανθεκτικότητα στο iprodione, pyraclostrobin και boscalid ( Πίνακας 6 )

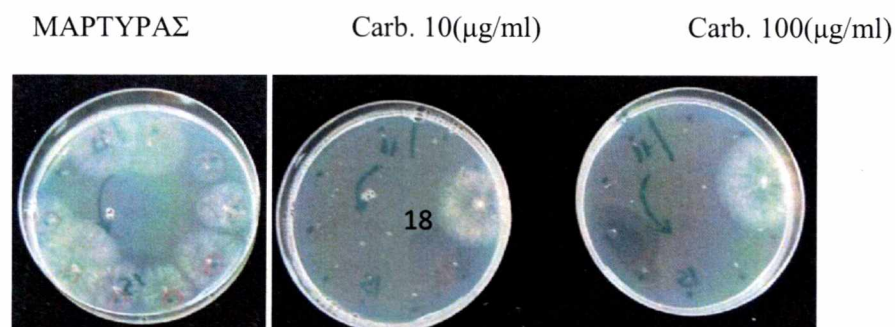
**Ευαισθησία στο carbendazim:** Το carbendazim δεν προκάλεσε την παρεμπόδιση της βλάστησης των σπορίων, προκάλεσε όμως παραμόρφωση των βλαστικών τους σωλήνων. Από τις 100 απομονώσεις που ελέγχθηκαν για ευαισθησία στο carbendazim με βάση τη βλάστηση των σπορίων τους οι 80 βλάστησαν σχηματίζοντας παραμορφωμένους βλαστικούς σωλήνες στη συγκέντρωση των 10μg/ml και θεωρήθηκαν ευαίσθητες (BenS). Από τις υπόλοιπες 20 απομονώσεις που θεωρήθηκαν ως ανθεκτικές (BenR), οι 19 βλάστησαν, σχηματίζοντας τυπικούς βλαστικούς σωλήνες και στη συγκέντρωση των 100μg/ml και θεωρήθηκαν υψηλά ανθεκτικές (BenHR), ενώ 1 βλάστησε, σχηματίζοντας τυπικούς βλαστικούς σωλήνες, μόνο στη συγκέντρωση των 10μg/ml και θεωρήθηκε μέτρια ανθεκτική (BenMR) (Πίνακας 3, Διάγραμμα 3).



Όσον αφορά την ανάπτυξη μυκηλίου στο carbendazim μετά από επώαση στους 25<sup>0</sup>C στο σκοτάδι για 72h, οι παρατηρήσεις μας ήταν παρόμοιες. Στις 80 απομονώσεις παρατηρήθηκε πλήρης παρεμπόδιση της ανάπτυξης μυκηλίου στη συγκέντρωση των 10µg/ml (MIC) (ευαίσθητες), ενώ από τις υπόλοιπες η 1 ανέπτυξε μυκήλιο μόνο στη συγκέντρωση των 10 µg/ml (μέτρια ανθεκτική) και οι 19 ανέπτυξαν μυκήλιο και στη συγκέντρωση των 100µg/ml (υψηλά ανθεκτικές) (Διάγραμμα 4).



Εικόνα 2: Ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων *Botrytis cinerea* A11-A20 σε PDA εμπλουτισμένο με carbendazim μετά από επώαση στο σκοτάδι για 72h



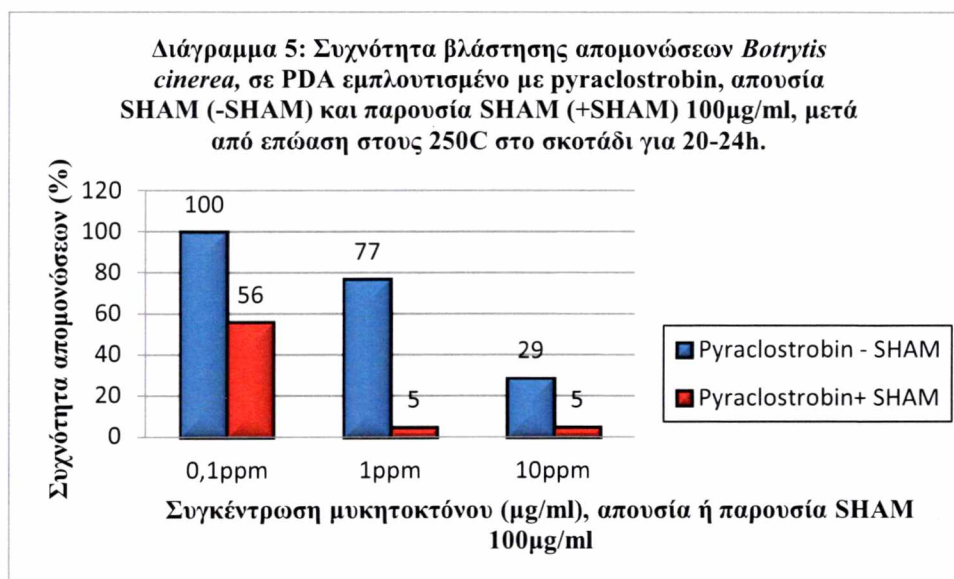
\*Διακρίνεται η υψηλής ανθεκτικότητας απομόνωση A18

Από τον Πίνακα 4 παρατηρούμε ότι το ποσοστό των ανθεκτικών απομονώσεων είναι μεγαλύτερο για απομονώσεις που προήλθαν από θερμοκήπιο ( 26,66%) σε σχέση με αυτές που προήλθαν από αγροτεμάχια χωρίς κάλυψη (10%). Από τις απομονώσεις που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο carbendazim, οι 5 ήταν ανθεκτικές μόνο στο carbendazim, 11 παρουσίασαν διπλή ανθεκτικότητα στο carbendazim και στο iprodione, 1 παρουσίασε διπλή ανθεκτικότητα στο carbendazim και στο pyraclostrobin, ενώ 3 παρουσίασαν πολλαπλή ανθεκτικότητα στο carbendazim, iprodione και pyraclostrobin ( Πίνακας 6 ).

**Ευαισθησία στο pyraclostrobin:** Οι 100 απομονώσεις ελέγχθηκαν για ευαισθησία στο pyraclostrobin παρουσία ή απουσία salicylhydroxamic acid (SHAM) σε συγκέντρωση 100μg/ml, ενός παρεμποδιστή της εναλλακτικής αναπνοής η οποία ενεργοποιείται στον μύκητα *Botrytis cinerea* σαν αντίδραση στην παρεμποδιστική επίδραση του μυκητοκτόνου.

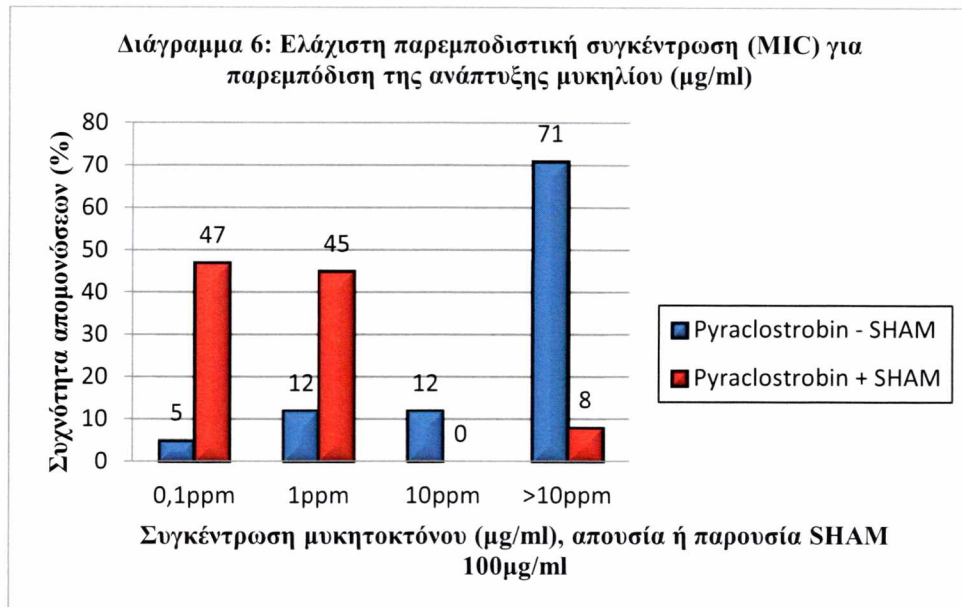
Κατά το στάδιο της βλάστησης των σπορίων, απουσία SHAM, παρατηρήθηκε βλάστηση σε όλες τις απομονώσεις στη συγκέντρωση των 0,1μg/ml, 77 απομονώσεις βλάστησαν στη συγκέντρωση του 1μg/ml και 29 απομονώσεις βλάστησαν στη συγκέντρωση των 10μg/ml. Το ποσοστό βλάστησης των σπορίων καθώς και το μέγεθος του βλαστικού σωλήνα των περισσότερων απομονώσεων έτειναν μειούμενα καθώς αυξάνονταν η συγκέντρωση του μυκητοκτόνου.

Παρουσία του παρεμποδιστή SHAM, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του αριθμού των απομονώσεων που βλάστησαν. Πιο συγκεκριμένα, στη συγκέντρωση των 0,1μg/ml είχαμε βλάστηση σπορίων σε 56 απομονώσεις, στη συγκέντρωση του 1μg/ml σε 5 απομονώσεις, στις οποίες παρατηρήθηκε βλάστηση των σπορίων και στη συγκέντρωση των 10μg/ml. Στις 5 αυτές απομονώσεις ( C1,C2,C3,C15,C20) το ποσοστό των σπορίων που βλάστησαν ήταν υψηλό ( Διάγραμμα 5).

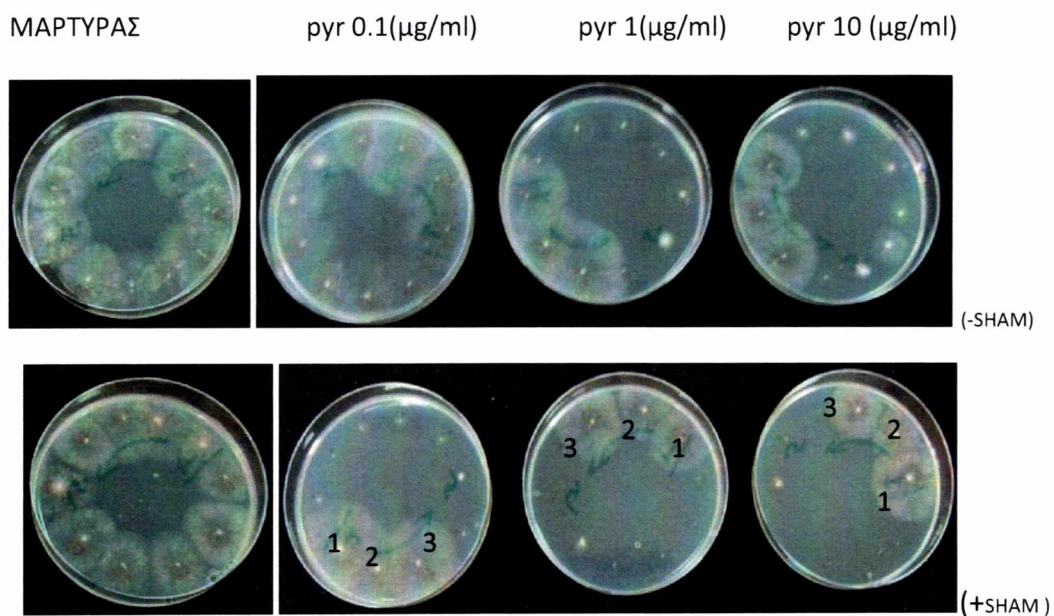


Κατά το στάδιο της ανάπτυξης μυκηλίου, απουσία SHAM, οι περισσότερες απομονώσεις σχημάτισαν μυκήλιο και στη συγκέντρωση των 10μg/ml καθώς η εναλλακτική αναπνοή ενεργοποιείται περισσότερο σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης. Παρουσία του παρεμποδιστή SHAM, στις περισσότερες απομονώσεις είχαμε παρεμπόδιση του σχηματισμού μυκηλίου στις συγκεντρώσεις των 0,1μg/ml και 1μg/ml κατανεμημένη ομοιόμορφα μεταξύ των δύο αυτών συγκεντρώσεων. Οι απομονώσεις αυτές χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες. Όμως 8 απομονώσεις σχημάτισαν μυκήλιο ακόμα και στη συγκέντρωση των 10μg/ml και χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικές. Από αυτές οι 5 (C1,C2,C3,C15,C20), ανέπτυξαν μυκήλιο παρόμοιο με του μάρτυρα, ενώ οι υπόλοιπες 3 (B6,C14,TR12), ανέπτυξαν αραιό και πιο περιορισμένο μυκήλιο. (Διάγραμμα 6).





Εικόνα 3: Ανάπτυξη μυκηλίου των απομονώσεων *Botrytis cinerea* C1-C10 σε PDA εμπλουτισμένο με pyraclostrobin, απουσία SHAM και παρουσία SHAM 100μg/ml, μετά από επώαση στο σκοτάδι για 72h



\*Διακρίνονται οι ανθεκτικές απομονώσεις C1, C2,C3

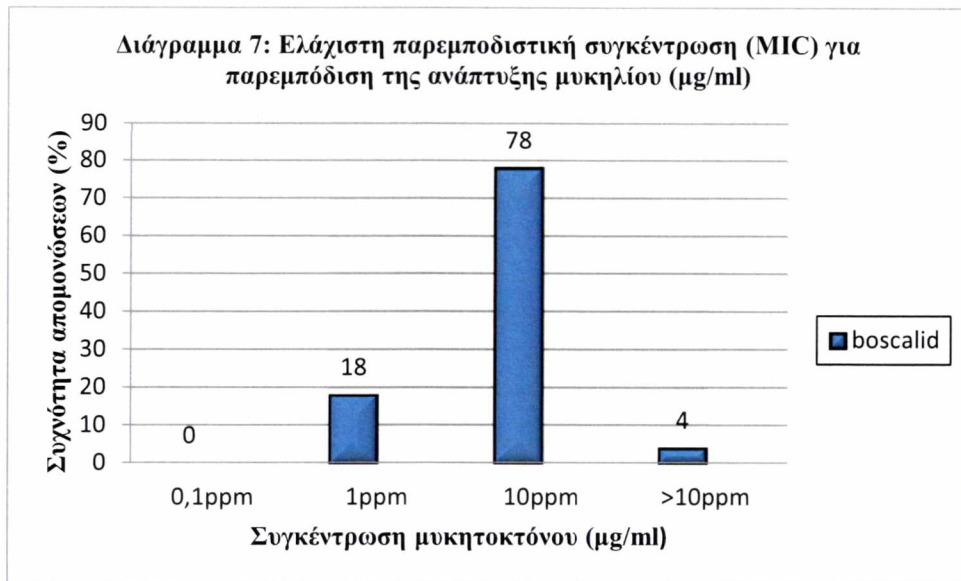
Από τους Πίνακες 4 και 5 διαπιστώνουμε ότι ανθεκτικότητα παρουσιάστηκε κατά το πλείστον σε απομονώσεις που προήλθαν από θερμοκήπιο, όπου το ποσοστό των ανθεκτικών απομονώσεων ήταν 11,66% έναντι 2,5% αυτών που προήλθαν από

αγροτεμάχια χωρίς κάλυψη, καθώς και ότι αυτές οι απομονώσεις προήλθαν από την δεύτερη (CrFl B) και την τρίτη (CrFl C) δειγματοληψία, οπότε και είχαν εφαρμοστεί 2 ψεκασμοί με μυκητοκτόνο που περιείχε το pyraclostrobin ( Signum ).

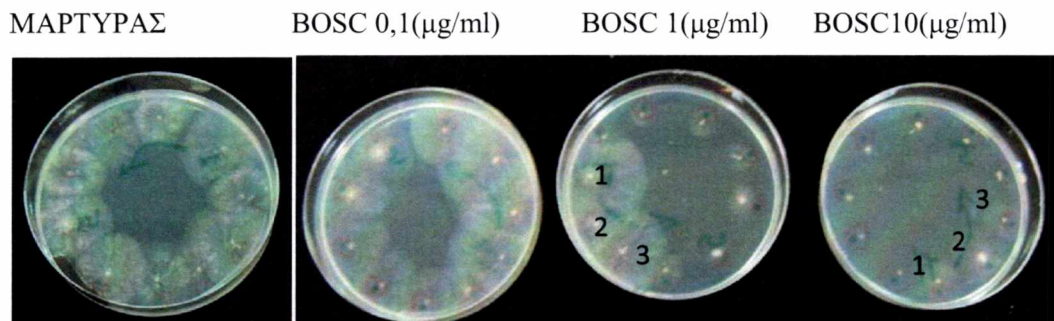
Από τις απομονώσεις που παρουσίασαν ανθεκτικότητα καμία δεν ήταν ανθεκτική μόνο στο pyraclostrobin, 1 παρουσίασε διπλή ανθεκτικότητα στο pyraclostrobin και στο carbendazim, 3 παρουσίασαν διπλή ανθεκτικότητα στο pyraclostrobin και στο boscalid, 3 παρουσίασαν πολλαπλή ανθεκτικότητα στο pyraclostrobin, iprodione και carbendazim και 1 παρουσίασε πολλαπλή ανθεκτικότητα στο pyraclostrobin, iprodione και boscalid ( Πίνακας 6 ).

**Ευαισθησία στο boscalid** : Κατά τον έλεγχο της ευαισθησίας στο boscalid, στο στάδιο της βλάστησης των σπορίων, σε όλες τις απομονώσεις παρατηρήθηκε κανονική βλάστηση στη συγκέντρωση των 0,1μg/ml. Στις συγκεντρώσεις των 1μg/ml και 10μg/ml η βλάστηση των σπορίων δεν παρεμποδίστηκε πλήρως, αλλά είχαμε σχηματισμό βραχέων βλαστικών σωλήνων και μικρότερα ποσοστά βλάστησης όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του μυκητοκτόνου. Σε 3 απομονώσεις (C1,C2,C3), η βλάστηση των σπορίων δεν διέφερε από αυτή του μάρτυρα ακόμα και στη συγκέντρωση των 10μg/ml.

Όσον αφορά την ανάπτυξη μυκηλίου, όλες οι απομονώσεις σχημάτισαν μυκήλιο παρόμοιο με του μάρτυρα στη συγκέντρωση των 0,1μg/ml. Στη συγκέντρωση του 1μg/ml είχαμε πλήρη παρεμπόδιση της ανάπτυξης μυκηλίου σε ένα μικρό ποσοστό απομονώσεων (18%), ενώ οι υπόλοιπες απομονώσεις σχημάτισαν μυκήλιο κατά το πλείστον με καθυστερημένη ανάπτυξη και πιο αραιό σε σχέση με το μάρτυρα. Στην πλειονότητα των απομονώσεων πλήρης παρεμπόδιση της ανάπτυξης μυκηλίου παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση των 10μg/ml. Οι απομονώσεις αυτές χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητες. Όμως, 4 απομονώσεις (B6,C1,C2,C3), ανέπτυξαν μυκήλιο, με λίγο πιο περιορισμένη ανάπτυξη σε σχέση με τον μάρτυρα, και στη συγκέντρωση των 10μg/ml και χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικές ( Διάγραμμα 7 ).



Εικόνα 4: Ανάπτυξη απομονώσεων *Botrytis cinerea* σε PDA εμπλουτισμένο με boscalid μετά από επώαση στο σκοτάδι για 72h



\*Διακρίνονται οι ανθεκτικές απομονώσεις C1, C2, C3

Όλες οι απομονώσεις που παρουσίασαν ανθεκτικότητα στο boscalid προέρχονταν από το θερμοκήπιο και από τις από δειγματοληψίες CrFI B και CrFI C που έγιναν μετά την εφαρμογή και δεύτερου ψεκασμού με μυκητοκτόνο που περιείχε τη δραστική ουσία (Signum). ( Πίνακες 4 και 5 ).

Από τις απομονώσεις που εμφάνισαν ανθεκτικότητα καμία δεν ήταν ανθεκτική μόνο στο boscalid, 3 παρουσίασαν διπλή ανθεκτικότητα στο boscalid και στο pyraclostrobin, ενώ 1 παρουσίασε πολλαπλή ανθεκτικότητα στο boscalid, iprodione και pyraclostrobin ( Πίνακας 6 ).

Πίνακας 6: Ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα, απομονώσεων *Botrytis cinerea*

ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	Ευαισθησία στα μυκητοκτόνα			
	IPRODIONE 3μg/ml	CARBENDAZIM 10μg/ml	PYRACLOSTROBIN 10μg/ml +SHAM 100μg/ml	BOSCALID 10μg/ml
A10	R	R	S	S
A18	R	R	S	S
B6	S	S	R	R
B9	R	R	S	S
B11	S	R	S	S
B12	R	R	S	S
B13	R	R	S	S
B15	R	R	S	S
B17	R	R	S	S
C1	R	S	R	R
C2	S	S	R	R
C3	S	S	R	R
C6	R	R	S	S
C11	R	R	S	S
C12	R	R	S	S
C13	S	R	S	S
C14	R	R	R	S
C15	R	R	R	S
C18	R	R	S	S
C20	R	R	R	S
AID15	S	R	S	S
AID16	S	R	S	S
TR12	S	R	R	S
TR17	S	R	S	S

\*R: ανθεκτικές απομονώσεις

S: ευαίσθητες απομονώσεις

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* είναι ένα κλασικό παθογόνο ‘ υψηλού κινδύνου’ για ανάπτυξη ανθεκτικότητας εξαιτίας της υψηλής γενετικής μεταβλητότητας, της άφθονης σποριοποίησης, του μεγάλου εύρους ξενιστών, της πολυκυκλικής φύσης της ασθένειας που προκαλεί και του υψηλού αριθμού ψεκασμών με μυκητοκτόνα που απαιτούνται για την καταπολέμησή του (Brent and Hollomon, 1998 ).

Η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε βοτρυδιοκτόνα, όπως τα δικαρβοξιμιδικά και τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, αποτέλεσε έναν σημαντικό περιοριστικό παράγοντα για την καταπολέμηση της τεφράς σήψης που προκαλείται από τον μύκητα *B. cinerea* σε καλλιέργειες κηπευτικών παγκοσμίως. Η ανάπτυξη νέων μυκητοκτόνων με καλή αποτελεσματικότητα εναντίον της ασθένειας και με νέους βιοχημικούς μηχανισμούς δράσης και η εισαγωγή τους σε εφαρμογή προγραμμάτων ψεκασμών εναντίον της τεφράς σήψης είναι προαπαιτούμενη για την επιτυχή διαχείριση της ασθένειας, ιδιαίτερα σε καλλιέργειες με υψηλή πίεση της ασθένειας και εκεί όπου εμφανίζονται προβλήματα ανθεκτικότητας σε εξειδικευμένης θέσης μυκητοκτόνα ( Myresiotis *et al.*, 2008 ).

Στην παρούσα μελέτη έγινε έλεγχος ευαισθησίας στο δικαρβοξιμιδικό μυκητοκτόνο iprodione, στο βενζιμιδαζολικό μυκητοκτόνο carbendazim, αλλά και σε δύο νέες δραστικές ουσίες, το pyraclostrobin της ομάδας των στρομπιλουρινών που είναι παρεμποδιστές του συμπλόκου III και το boscalid, ένα ανιλίδιο που δρα σαν παρεμποδιστής του συμπλόκου II. Χρησιμοποιήθηκαν απομονώσεις που συλλέχθηκαν από καλλιέργειες μαρουλιού σε θερμοκήπιο ( υδροπονική καλλιέργεια ) και σε αγροτεμάχια χωρίς κάλυψη στην περιοχή της Θεσσαλίας, κατά την περίοδο της άνοιξης του 2009. Στο μεν θερμοκήπιο πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες, όπου πριν την πρώτη δειγματοληψία είχε εφαρμοστεί ένας ψεκασμός με Rovral 50%SC ( iprodione ) και ένας ψεκασμός με Signum WG ( boscalid 26,7% + pyraclostrobin 6,7% ) και πριν από τις άλλες δύο δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκε και δεύτερος ψεκασμός με τα πιο πάνω μυκητοκτόνα. Στα αγροτεμάχια οι απομονώσεις συλλέχθηκαν χωρίς να έχει προηγηθεί εφαρμογή προγράμματος ψεκασμών. Ο έλεγχος της ευαισθησίας των απομονώσεων βασίστηκε σε παρατηρήσεις που έγιναν κατά το στάδιο της βλάστησης των σπορίων και της

ανάπτυξης μυκηλίου με την εφαρμογή της μεθόδου εμβολιασμού σε σημείο ( Pappas, 1997 ).

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώσαμε ποσοστό ανθεκτικών απομονώσεων στο iprodione 15% και στο carbendazim 20%. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν ευρήματα προηγούμενων μελετών που ανέφεραν ευρεία εμφάνιση ανθεκτικών απομονώσεων *B. cinerea* στα δικαρβοξιμιδικά και στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, σε θερμοκήπια κηπευτικών στην Κρήτη και τη Δ. Πελοπόννησο ( Panagiotakou and Malathrakis, 1983; Pappas, 1997; Myresiotis *et.al.*, 2007 ). Όλες οι ανθεκτικές στο iprodione απομονώσεις έδειξαν χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας, ενώ καμία από αυτές δεν ήταν υψηλά ανθεκτική. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες αναφορές ότι υψηλής ανθεκτικότητας στελέχη απομονώνονται σπάνια από τις καλλιέργειες και τα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη παρουσιάζουν μόνο χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας ( Katan, 1982; Panagiotakou and Malathrakis, 1983; Moorman *et.al.*, 1992; Yourman and Jeffers, 1999; Yourman *et.al.*, 2000; Myresiotis *et.al.*, 2007).

Ο Beaver (1983), αναφέρει ότι η αποκτούμενη ανθεκτικότητα στα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα συνδέεται με αυξημένη ευαισθησία σε υψηλή οσμωτική πίεση η οποία πιθανώς επηρεάζει την παθογένεια και την προσαρμοστικότητα των υψηλά ανθεκτικών στελεχών. Αυτό εντούτοις δεν φαίνεται να ισχύει στα μέτρια ανθεκτικά στελέχη ( Faretra and Pollastro, 1993 ). Οι μολύνσεις που προκαλούνται από μετρίως ανθεκτικές απομονώσεις συνήθως εξαφανίζονται μετά το σταμάτημα των ψεκασμών. Επιπλέον, μεταβολές προς αυξημένη ευαισθησία στα δικαρβοξιμιδικά μυκητοκτόνα παρατηρήθηκαν κατά το στάδιο του ληθάργου το καλοκαίρι ή της διαχείμανσης κατά τη σαπροφυτική φάση όταν δεν εφαρμόζονταν μυκητοκτόνα ( Katan,1985; Hunter *et.al.*, 1987; Pappas, 1997). Επίσης η Lonenz (1987), παρατήρησε μια παρόμοια ελάττωση των μέτρια ανθεκτικών πληθυσμών σε αμπέλια στη Γερμανία μετά τη διακοπή των ψεκασμών με μυκητοκτόνα κατά τον χειμώνα και την άνοιξη.

Η συχνότητα ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά παραμένει υψηλά παρά το γεγονός ότι μόνο σπάνια χρησιμοποιούνται μετά την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε αυτή την κλάση μυκητοκτόνων. Αυτή η μεγάλη εμμονή υψηλής συχνότητας ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα στελεχών, ακόμα και απουσία της πίεσης επιλογής, μπορεί να σχετίζεται με την υψηλή προσαρμοστικότητα αυτών των στελεχών ( Raposo *et.al.*, 1996; Yourman *et.al.*, 2000 ).

Από τις 15 απομονώσεις που ήταν ανθεκτικές στο iprodione οι 14 ήταν ανθεκτικές και στο carbendazim, παρατήρηση που επίσης συμφωνεί με παλαιότερες μελέτες που αναφέρουν ότι οι περισσότερες ανθεκτικές στα δικαρβοξιμιδικά απομονώσεις ήταν επίσης ανθεκτικές στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα ( Katan, 1982; Panagiotakou and Malathrakis, 1983; Pappas, 1997; Myresiotis *et.al.*, 2007 ).

Σχετικά με τον έλεγχο ευαισθησίας στο pyraclostrobin και στο boscalid, στη μελέτη μας ανιχνεύθηκαν ανθεκτικές απομονώσεις σε ποσοστά 8% και 4% αντίστοιχα. Το pyraclostrobin έδρασε περισσότερο αποτελεσματικά κατά το στάδιο της βλάστησης των σπορίων απ' ότι κατά το στάδιο της ανάπτυξης του μυκηλίου. Απαραίτητη εδώ είναι η ταυτόχρονη παρουσία του παρεμποδιστή SHAM ο οποίος παρεμποδίζει την εναλλακτική αναπνοή η οποία μπορεί να ενεργοποιείται σαν αντίδραση στην παρεμποδιστική δράση του pyraclostrobin. Το boscalid είναι ένας ισχυρός παρεμποδιστής της βλάστησης των σπορίων, χωρίς όμως να παρεμποδίζει πλήρως τη βλάστηση ακόμα και στην υψηλή συγκέντρωση των 10μg/ml. Ήταν όμως πιο αποτελεσματικό στο στάδιο της ανάπτυξης μυκηλίου. Αυτό δεν συμφωνεί με ευρήματα που παρουσιάστηκαν από τους Zhang *et.al.*, ( 2007 ) οι οποίοι ανέφεραν υψηλά επίπεδα ευαισθησίας του *B. cinerea* με βάση την παρεμπόδιση της βλάστησης των σπορίων σε σύγκριση με αυτά που παρατηρήθηκαν με βάση την παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης. Η ανίχνευση ανθεκτικών απομονώσεων σε αυτά τα δύο νέα μυκητοκτόνα επιβεβαιώνει πρόσφατες μελέτες που ανέφεραν έναν υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη ανθεκτικότητας του παθογόνου στο pyraclostrobin ( Markoglou *et.al.*, 2006 ) και έναν μέτριο κίνδυνο για ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο boscalid (Zhang *et.al.*, 2007 ).

Μελέτη των παραμέτρων προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών στο pyraclostrobin στελεχών έδειξε ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις παρουσίαζαν σημαντική μείωση στη σποριοποίηση, τη βλάστηση των κονιδίων και την παραγωγή σκληρωτίων. Πειράματα πάνω στη σταθερότητα των ανθεκτικών φαινοτύπων έδειξαν μια μείωση της ανθεκτικότητας, κυρίως σε μέτρια ανθεκτικά στελέχη, όταν οι μεταλλάξεις αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα χωρίς μυκητοκτόνο. Εντούτοις, μια γρήγορη ανάκαμψη του επιπέδου ανθεκτικότητας παρατηρήθηκε μετά την επιστροφή των μεταλλάξεων σε ένα επιλεκτικό υπόστρωμα. Μελέτη πάνω στην ανταγωνιστική ικανότητα μεταλλαγμένων απομονώσεων, έδειξαν ότι *in vitro*, όλες οι μεταλλάξεις ήταν λιγότερο ανταγωνιστικές σε σχέση με τα άγρια στελέχη. Τέλος, πειράματα παθογένειας πάνω σε φυτάρια αγγουριάς έδειξαν ότι όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη

εμφάνισαν ικανότητα μόλυνσης παρόμοια με τα άγρια στελέχη ( Markoglou *et.al.*, 2006 ).

Εργαστηριακές μεταλλάξεις στο boscalid αναπτύχθηκαν φυσιολογικά σε PDA χωρίς boscalid και δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών και των άγριου τύπου ευαίσθητων γονέων τους. Μια παρόμοια κατάσταση παρατηρήθηκε για τη βλάστηση των σπορίων. Εντούτοις, οι ανθεκτικές μεταλλάξεις έδειξαν σημαντική μείωση στη σποριοποίηση *in vitro* και στην παθογένεια. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι οι ανθεκτικές στο boscalid μεταλλάξεις είχαν μειωμένη προσαρμοστικότητα ( Zhang *et al.*, 2007 ).

Στη μελέτη μας παρατηρήσαμε επίσης ότι όλες οι ανθεκτικές στο boscalid απομονώσεις ήταν ταυτόχρονα ανθεκτικές και στο pyraclostrobin. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με πρόσφατη αναφορά των Markoglou *et.al.*, ( 2006 ) οι οποίοι ανέφεραν ότι οι ανθεκτικές στο pyraclostrobin μεταλλάξεις προερχόμενες από μεταλλαξηγένεση, έδειξαν αυξημένη ευαισθησία στο boscalid. Επίσης οι Myresiotis *et.al.*, (2008) ανέφεραν ότι δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ της ευαισθησίας στα δύο αυτά μυκητοκτόνα. Τα δεδομένα αυτών των μελετών προήλθαν χρησιμοποιώντας απομονώσεις που δεν είχαν εκτεθεί ποτέ σε αυτά τα δύο μυκητοκτόνα και δεν υπήρχε ανθεκτικότητα σε κανένα από αυτά. Επιπλέον, οι Zhang *et.al.*, (2007) σε μελέτη με άλλους Qo παρεμποδιστές όπως το kresoxim-methyl και το azoxystrobin παρατήρησαν ότι οι ανθεκτικές στο boscalid απομονώσεις ήταν ταυτόχρονα σημαντικά πιο ευαίσθητες στους Qo παρεμποδιστές σε σχέση με τους άγριου τύπου γονείς. Μια παρόμοια αρνητική συσχέτιση μεταξύ azoxystrobin και boscalid βρέθηκε σε μεταλλαγμένες απομονώσεις *Alternaria solani* ( Pasche *et.al.*, 2005 ).

Τέλος, στη μελέτη μας παρατηρήσαμε ότι 3 ανθεκτικές στο pyraclostrobin απομονώσεις ήταν επίσης ανθεκτικές στο iprodione, ενώ 1 απομόνωση ήταν ταυτόχρονα ανθεκτική στο pyraclostrobin, boscalid και iprodione. Αυτή η παρατήρηση είναι αντίθετη με προηγούμενα ευρήματα των Myresiotis *et.al.*, (2008) που δεν παρατήρησαν συσχέτιση ευαισθησίας μεταξύ pyraclostrobin ή boscalid και iprodione.

Ο εξειδικευμένος τρόπος δράσης αυτών των νέων μυκητοκτόνων υποδηλώνει έναν υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη ανθεκτικών φαινοτύπων μεταξύ των πληθυσμών του παθογόνου. Ανθεκτικότητα στον αγρό στις στρομπιλουρίνες αναπτύχθηκε σε διάφορα παθογόνα πιο γρήγορα απ' ότι αναμενόταν ( Ishii *et.al.*, 2001; Ma *et.al.*, 2003; Koller *et.al.*, 2004), ενώ ανθεκτικότητα στο boscalid έχει παρατηρηθεί σε



απομονώσεις αγρού *A. alternata* σε φιστίκια ( Avenot and Michailides, 2007 ). Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας στον αγρό σε αυτά τα δύο νέα μυκητοκτόνα μετά από τη χρησιμοποίησή τους σε προγράμματα ψεκασμών. Διαπιστώνουμε μάλιστα ότι ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος μετά την εφαρμογή και δεύτερου ψεκασμού με τα συγκεκριμένα μυκητοκτόνα. Εντούτοις η συχνότητα ανθεκτικών απομονώσεων παραμένει ακόμα σε χαμηλά επίπεδα.

Δεδομένης της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα δικαυβοξιμιδικά και στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα καθώς και της σπάνιας πλέον χρήσης των τελευταίων στην καταπολέμηση του παθογόνου, η χρησιμοποίηση των δύο αυτών νέων ομάδων μυκητοκτόνων είναι ένα σημαντικό όπλο για την καταπολέμηση του *B. cinerea*. Ο επιβεβαιωμένος όμως κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας στον αγρό και σε αυτά τα μυκητοκτόνα εντείνει την ανάγκη για στρατηγικές που μειώνουν αυτό τον κίνδυνο. Συνεπακόλουθα, απαιτείται επιπλέον έρευνα για τον σχεδιασμό πιο αποτελεσματικών προγραμμάτων ψεκασμών. Μια πρόταση θα ήταν η χρήση τους μεμονωμένα ή σε μίγματα μεταξύ τους μια φορά κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου και η εναλλαγή τους με άλλα μυκητοκτόνα με τα οποία δεν παρουσιάζουν σχέσης διασταυρωτής ανθεκτικότητας. Επίσης η χρήση των δικαυβοξιμιδικών πρέπει να συνεχίσει να εφαρμόζεται σε προγράμματα ψεκασμών από τη στιγμή που η αποκτούμενη σε αυτά ανθεκτικότητα είναι ασταθής.

### **III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson, J.P., 1924. *Botrytis cinerea* in Alaska. *Phytopathology* **14**, 152-155
- 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.
- Aylor, D.E., 1978. Dispersal in time and space: aerial pathogens. In: Horsfall, J.G. and Cowling, E.B. (eds) *Plant Disease: an Advanced Treatise. Vol II* (pp. 159-180). Academic Press, New York, USA
- Aylor, D.E., 1990. The role of intermittent wind in the dispersal of fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **28**, 73-92
- Backhouse, D. and Willets, H.J., 1984. A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. *Canadian Journal of Microbiology* **30**, 171-178
- Banno, S., Yamashita, K., Fukumori, F., Okada, H., Takagaki, M., Kimura, M. and Fujimura, M., 2009. Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome b gene. *Plant Pathology* **58**,120-129
- Bar-Nun, N. and Mayer, A.M., 1990. Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **29**, 787-792
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M. and Parr-Dobrzanski, B., 2002. The strobilurin fungicides. *Pesticide Management Science* **58**, 659-662
- Beever, R. H., 1983. Osmotic sensitivity of fungal variants resistant to dicarboximide fungicides. *Transactions of the British Myc Society* **80**, 327-331
- Beniwal, S.P.S., Bayaa, B., Weigand, S., Makkouk, K.M. and Saxena, M.C., 1993. *Field Guide to Lentil Diseases and Insect Pests*. (pp. 1-107) ICARDA, Aleppo, Syria
- 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
- Bhatt, D.D. and Vaughan, E.K., 1962. Preliminary investigations on biological control of grey mould(*Botrytis cinerea*) of strawberries. *Plant Disease Reporter* **46**, 342-345
- Biddle, A.J., 2001. Botrytis Gray Mold. In: Kraft JM and Pflieger FL (eds) *Compendium of Pea Diseases and Pests. 2nd edition*. (pp. 31-32) American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA

- Blackman, V.H. and Welsford, E.J., 1916. Studies in the physiology of parasitism. II. Infection by *Botrytis cinerea*. *Annals of Botany* **30**, 389-398
- Blakeman, J.P., 1972. Effect of plant age on inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria on beetroot leaves. *Physiological Plant Pathology* **2**, 143-152
- Blakeman, J.P., 1980. Behaviour of conidia on aerial plant surfaces. In: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R. (eds) *The Biology of Botrytis*. (pp. 115-151) Academic Press, London, UK
- Blakeman, J.P. and Fraser, A.K., 1971. Inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria on the surface of chrysanthemum leaves. *Physiological Plant Pathology* **1**, 45-54
- 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
- Bollen, G.J. and Scholten, G., 1971. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **77**, 83-90
- Brent, K.J. and Hollomon, D.W., 1998. *Fungicide resistance: The assessment of risk*. In: FRAC Monograph No 2. (pp.1-48) Global Crop Protection Federation, Brussels, Belgium.
- Bretag, T.W., Mayfield, A. and Bull, B., 1996. Disease identification and control, grain vetch diseases. In: Lamb J and Poddar A (eds) *Grain Legume Handbook*, Update 1996 Grain Legume Handbook Committee, Riverton, South Australia, Australia
- Bristow, P.R., McNicol, R.J. and Williamson, B., 1986. Infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and its relevance to grey mould development. *Annals of Applied Biology* **109**, 545-554
- Brooks, C. and Cooley, J.S., 1917. Temperature relations of apple-rot fungi. *Journal of Agricultural Research* **8**, 139-164
- Broomfield, P.L.E. and Hargreaves, J., 1992. A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Current Genetic* **22**, 117-121
- Chardonnet, C.O., Sams, C.E., Trigiano, R.N. and Conway, W.S., 2000. Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. *Phytopathology* **90**, 769-774
- Clark, C.A. and Lorbeer, J.W., 1976. Comparative histopathology of *Botrytis squamosa* and *Botrytis cinerea* on onion leaves. *Phytopathology* **66**, 1279-1289

- Coertze, S. and Holz, G., 2002. Epidemiology of *Botrytis cinerea* on grape: wound infection by dry, airborne conidia. *South African Journal of Enology and Viticulture* **23**, 72-77
- Cole, L., Dewey, F.M. and Hawes, C.R., 1998. Immunocytochemical studies of the infection mechanisms of *Botrytis fabae*: II. Host cell wall breakdown. *New Phytologist* **139**, 611-622
- Coley-Smith, J.R., 1980. Sclerotia and other structures in survival. In: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R. (eds) *The Biology of Botrytis cinerea*. ( pp.85-114) Academic Press, London, UK
- Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R., 1980. *The Biology of Botrytis cinerea*. Academic Press, London, UK
- Commenil, P., Belingheri, L. and Dehorter, B., 1998. Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**, 1-14
- Commenil, P., Belingheri, L., Sancholle, M. and Dehorter, B., 1995. Purification and properties of an extracellular lipase from the fungus *Botrytis cinerea*. *Lipids* **30**, 351-356
- Corbett, J.R., Wright, K. and Baillie, A.C., 1984. *The Biochemical Mode of Action of Pesticides – 2nd Edition*. Academic Press, London, UK
- Dacol, L., Gibbard, M., Hodson, M.O. and Knight, S., 1998. Azoxystrobin: development on horticultural crops in Europe. *Brighton Crop Protection Conference. Pests and Diseases* pp. 843-848
- Davidse, L.C. and Ishii, H., 1995. Biochemical and molecular aspects of the mechanisms of action of benzimidazoles, N-phenylcarbamates and N-phenylformamidoximes and the mechanisms of resistance to these compounds in fungi. In: Lyr H (ed.) *Modern Selective Fungicides*. (pp. 305-322) Gustav Fisher Verlag, Jena, Germany
- De Kock, S.L. and Holz, G., 1992. Blossom-end rot of pears: systemic infection of flowers and immature fruit by *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* **135**, 317-327
- Debieu, D., Bach, J., Hugon, M., Malosse, C., and Leroux, P., 2001. The hydroxyanilide fenhexamid a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Management Science* **57**, 1060-1067

- Di Rago, J.P. and Colson, A.M., 1989. Molecular basis for resistance to myxothiazol, mucidin (strobilurin A), and stigmatellin. *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 14543–14548.
- Doss, R.P., Potter, S.W., Chastagner, G.A. and Christian, J.K., 1993. Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1786-1791
- Doss, R.P., Potter, S.W., Soeldner, A.H., Christian, J.K. and Fukunaga, L.E., 1995. Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 206-265
- Edwards, S.G. and Seddon, B., 1992. *Bacillus brevis* as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on protected Chinese cabbage. In: Verhoeff, K., Malathrakis, N.E. and Williamson, B. (eds) *Recent Advances in Botrytis Research*. (pp. 267-271) Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands
- Elad, Y., 1989. Effect of abiotic conditions on development of grey mould of rose and scanning electron microscopy. *Phytopathologia Mediterranea* **28**, 122-130
- Elad, Y., 2000. Changes in disease epidemics on greenhouse grown crops. *Acta Horticultural* No. **534**, 213-220
- Elad, Y. and Freeman, S., 2002. Biological control of fungal plant pathogens. In: Kempken F (ed.) *The Mycota, A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. Vol. XI. Agricultural Applications*. (pp. 93-109) Springer, Heidelberg, Germany
- Elad, Y. and Shtienberg, D., 1995. *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integrated Pest Management Reviews* **1**, 15-29
- Elad, Y. and Yunis, H., 1993. Effect of microclimate and nutrients on development of cucumber gray mold (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica* **21**, 257-268
- Elad, Y. Shtienberg, D. Yunis, H. and Mahler, Y., 1992. Epidemiology of grey mould caused by *Botrytis cinerea* in vegetable greenhouse. In *Recent Advances in Botrytis Research*, pp. 147-158. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Elad, Y., Gullino, M. L., Shtienberg, D., and Aloï, C., 1995. Managing *Botrytis cinerea* on tomatoes in greenhouses in the Mediterranean. *Crop Protection* **14**, 105-109.
- Elad, Y., Kohl, J. and Fokkema, N.J., 1994b. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology* **100**, 315-336

- Elad, Y., Yunis, H., and Katan, T., 1992. Multiple resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathology* **41**,41-46.
- Ellis, M.B. and Waller, J.M., 1974a. *Sclerotinia fuckeliana* (conidial state: *Botrytis cinerea*). C.M.I. *Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, No. **431**
- Engelbrecht, R., 2002. The role of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, in *Botrytis* bunch rot on grape. MScAgric thesis, University of Stellenbosch, Stellenbosch, South Africa
- 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
- Faretra, F. and Pollastro, S., 1993. Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) from nine countries. *Plant Pathology* **42**, 48-57
- Ferrer, J.B. and Owen, J.H., 1959. *Botrytis cinerea*, the cause of ghost-spot disease of tomato. *Phytopathology* **49**, 411-417
- Fitt, B.D.L., Creighton, N.F. and Bainbridge, A., 1985. Role of wind and rain in dispersal of *Botrytis fabae* conidia. *Transactions of the British Mycological Society* **85**, 307-312
- Germeier, C., Hedke, K. and von Tiedemann, A., 1994. The use of pH-indicators in diagnostic media for acid-producing plant pathogens. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **101**, 498-507
- Govrin, E.M. and Levine, A., 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* **10**, 751-757
- Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A., Gisi, U., 2006. Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science* **62**, 465-72
- Gregory, P.H., 1949. Studies on *Sclerotinia* and *Botrytis* II. De Bary's description and specimens of *Peziza fuckeliana*. *Transactions British Mycological Society* **30**, 1-13
- Groves, J.W. and Loveland, C.A., 1953. Connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycologia* **45**, 415-425
- Gueguen, Y., Chemardin, P., Arnaud, A. and Galzy, P., 1995. Purification and characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Botrytis cinerea*. *Enzyme and Microbial Technology* **17**, 900-906

- Hammer, P.E. and Evensen, K.B., 1994. Differences between rose cultivars in susceptibility to infection by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **84**, 1305-1312
- Hayashi, K., Watanabe, M., Tanaka. And Uesugi, Y., 1996. Cyanide-insensitive Respiration of Phytopathogenic Fungi Demonstrated by Antifungal Joint Action of Respiration Inhibitors. *Journal of Pesticide Science* **21**, 399-403
- Hancock, J.G., Millar, R.L. and Lorbeer, J.W., 1964a. Pectolytic and cellulolytic enzymes produced by *Botrytis allii*, *B. cinerea* and *B. squamosa* *in vitro* and *in vivo*. *Phytopathology* **54**, 928-931
- Hancock, J.G., Millar, R.L. and Lorbeer, J.W., 1964b. Role of pectolytic and cellulolytic enzymes in *Botrytis* leaf blight of onion. *Phytopathology* **54**, 932-935
- Hunter, T., Brent, K. J., Carter, G. A., and Hutcheon, J. A., 1987. Effects of fungicide spray regimes on incidence of dicarboximide resistance in grey mould (*Botrytis cinerea*) on strawberry plants. *Annals of Applied Biology* **110**, 515-525
- Heye, U. J., Speich, J., Siegle, H., Steinemann, A., Forster, B., Knauf-Beiter, G., Herzog, J., and Hubele, A., 1994. CGA 219417: A novel broad-spectrum fungicide. *Crop Protection* **13**, 541-549.
- Holz, G., 1999. Behaviour and infection pathways of diverse fungal pathogens on fruit. In: *Conference Handbook, 12th Biennial Australasian Plant Pathology Society Conference*, Canberra, Australia, p.257
- Ishii, H., Fraaije, B. A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T., and Hollomon, D. W., 2001. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* **91**, 1166-1171.
- Islam, S.Z., Honda, Y. and Sonhaji, M., 1998. Phototropism of conidial germ tubes of *Botrytis cinerea* and its implication in plant infection processes. *Plant Disease* **82**, 850-856
- Jarvis, W.R., 1962b. Splash dispersal of spores of *Botrytis cinerea* Pers. *Nature* **193**, 599
- Jarvis, W.R., 1977. *Botrytinia and Botrytis Species: Taxonomy, Physiology, and Pathogenicity*. A guide to the Literature. *Monograph No. 15*, Research Branch, Canada Department of Agriculture, Harrow, Ontario, Canada
- Jarvis, W.R., 1980a. Taxonomy. In: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R. (eds) *The Biology of Botrytis*. (pp. 1-18) Academic Press, London, UK



- Katan T., 1982. Resistance to 3,5-dichlorophenyl-N-cyclic imide (dicarboximide) fungicides in the grey mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops, *Plant Pathology* **31**, 133-141
- Katan, T., 1985. Effect of chlorothalonil on resistance of *Botrytis cinerea* to dicarboximides in cucumber glasshouses. *EPPO Bull* **15**, 365-369.
- 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
- Kobayashi, T., 1984. Infection of petals of ornamental woody plants with *Botrytis cinerea* and its role as infection sources. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **50**, 528-534
- Kohl, J. and Fokkema, N.J., 1993. Fungal interactions on living and necrotic leaves. In: Blakeman JP and Williamson B (eds) *Ecology of Plant Pathogens*. (pp. 321-334) CABI, UK
- 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
- Köller, W., Parker, D. M., Turechek, W. W., Avila-Adame, C., and Cronshaw, K., 2004. A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. *Plant Disease* **88**, 537-544.
- Laskaris, D., Pappas, A.C. and Kyriakopoulos, C.K., 1996. Occurrence of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. strains with coupling resistance to benzimidazoles and phenylcarbamates in protected crops, in Greece. 7<sup>th</sup> National Phytopathological Conference, Hellenic Phytopathological Society, Athens, Greece, 8-10 November 1994. *Phytopathologia Mediterranea*, **35**, 223
- Leroux, P., 1995. Progress and problems in the control of *Botrytis cinerea* in grapevine. *Pesticide Outlook*, October 1995, pp. 13-19
- Leroux, P. and Clerjeau, M., 1985. Resistance of *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola* to fungicides in French vineyards. *Crop Protection* **4**, 137-160
- Leroux, P., Chapeland, 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
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M. and Chapeland, F., 2002a. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* **58**, 876-888

- Leroux, P., Walker, A.S. and Senechal, Y., 2003. Etude de la sensibilité de *Botrytis cinerea* au boscalid. In: *7th International Conference on Plant Diseases* (cdROM; www.afpp.net). AFPP, Paris, France
- Lorenz, D.K. and Eichhorn, K.W., 1983. Investigations on *Botyotinia fuckeliana* Whetz., the perfect stage of *Botrytis cinerea* Pers. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **90**, 1-11
- Lorenz, G., 1987. Dicarboximide fungicides: History of resistance development and monitoring methods. *Proc. North American Fungicide Resistance Workshop*, 20-25 September, 1987, Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA.
- Lorenz, G., 1988. Dicarboximide fungicides: history of resistance development and monitoring methods. In Delp CJ (ed.) *Fungicide Resistance in North America*. (pp. 45-51). *American Phytopathological Society Press*, St. Paul, Minnesota, USA
- Louis, C., Girard, M., Kuhl, G. and Lopez-Ferber, M., 1996. Persistence of *Botrytis cinerea* in its vector *Drosophila melanogaster*. *Phytopathology* **86**, 934-939
- 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
- Markoglou, A.N., Malandrakis, A.A., Vitoratos, A.G., Ziogas, B.N., 2006. Characterization of laboratory mutants of *Botrytis cinerea* resistant to QoI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* **115**, 149-62.
- Masner, P., Muster, P., and Schmid, J., 1994. Methionine biosynthesis inhibition by pyrimidinamine fungicides in *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science* **42**, 163-166.
- Matheron, M. E. and Porchas, M., 2004. Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. *Plant Disease* **88**, 665-668.
- McClellan, W.D. and Hewitt, B., 1973. Early *Botrytis* rot of grapes: Time of infection and latency of *Botrytis cinerea* Pers. in *Vitis vinifera* L. *Phytopathology* **63**, 1151-1157
- McKeen, W.E., 1974. Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **64**, 461-467
- McNicol, R.J. and Williamson, B., 1989. Systematic infection of black currant flowers by *Botrytis cinerea* and its involvement in premature abscission of fruits. *Annals of Applied Biology* **114**, 243-254

- Moorman, G. W., and Lease, R. J., 1992. Benzimidazole and dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouse. *Plant Disease* **76**, 477-480.
- Movahedi, S. and Heale, J.B., 1990a. Purification and characterization of an aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers. ex. Pers. in culture and in infected carrots. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **36**, 289-302
- 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
- Myresiotis, C.K., Karaoglanidis, G.S. and Tzavella-Klonari, K., 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxylanilide, benzimidazole and dicarboximide fungicide. *Plant Disease* **91**, 407-413
- Nakazawa, Y. and Yamada, M., 1997. Chemical control of grey mould in Japan. A history of combating resistance. *Agrochemicals Japan* **71**, 2-6
- Newhook, F.J., 1951. Microbiological control of *Botrytis cinerea* Pers. II Antagonism by fungi and actinomycetes. *Annals of applied Biology* **35**, 185-202
- Newhook, F.J., 1957. The relationship of saprophytic antagonism to control of *Botrytis cinerea* Pers. on tomatoes. *New Zealand Journal of Science and Technology* **38**, 473-481
- Olaya, G. and Koller, W., 1999a. Diversity of kresoxim-methyl sensitivities in baseline populations of *Venturia inaequalis*. *Pesticide Science* **55**, 1083-1088
- 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
- Panagiotakou, M. and Malathrakis, N.F., 1983. Resistance of *Botrytis cinerea* to dicarboximide fungicides in protected crops. *Annals of Applied Biology* **102**, 293-299
- Pappas, A.C., 1982. Inadequate control of grey mould on cyclamen by dicarboximide fungicides in Greece. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **89**, 52-58
- Pappas, A.C., 1997. Evolution of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in protected crops in Greece. *Crop Protection* **16**, 257-263
- Pappas, A.C., 2000. Epidemiology and control of *Botrytis cinerea* in tomato crops grown under cover in Greece. *Bulletin OEPP/EPPO Bull.* **30**, 269-274

- Pappas, A.C. and Elena, K., 1988. Sensitivity to diethofencarb and control of *Botrytis cinerea* Pers. in greenhouse grown plants. *Proc. 5<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology*, 20-27 August 1988, Kyoto, Japan 336 (Abstr.)
- Pasche, J. S., Piche, L. M., and Gudmestad, N. C., 2005. Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration. *Plant Disease* **89**, 269-278.
- Pezet, R., Pont, V. and Hoang-Van, K., 1992. Enzymatic detoxification of stilbenes by *Botrytis cinerea* and inhibition by grape berries proanthocyanidins. In: Verhoeff K, Malathrakis NE and Williamson B(eds) *Recent Advances in Botrytis Research*. (pp. 87-92) Pudoc Scientific Publishers, Wageningen The Netherlands
- Pollastro, S., Faretra, F., Di Canio, V. and De Guido, A., 1996. Characterization and genetic analysis of field isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to dichlofluanid. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 607-613
- Prins, T.W., Tudzynski, P., Von Tiedemann, A., Tudzynski, B., Ten Have, A., Hansen, M.E., Tenberge, K. and Van Kan, J.A.L., 2000b. Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. In: Kronstad JW (ed.) *Fungal Pathology*. (pp. 33-64) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Pucheu-Plante, B. and Mercier, M., 1983. Etude ultrastructurale de l'interrelation hôte-parasite entre le raisin et le champignon *Botrytis cinerea*: exemple de la pourriture noble en Sauternais. *Canadian Journal of Botany* **61**, 1785-1797
- Punja, Z.K. and Zhang, Y.Y., 1993. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *Journal of Nematology* **25**, 526-540
- Raposo, R., Delcan, J., Gomez, V., and Melgarejo, P., 1996. Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. *Plant Pathology* **45**,497-505.
- Raposo, R., Gomez, V., Urrutia, T. and Melgarejo, P., 2000. Fitness of *Botrytis cinerea* associated with dicarboximide resistance. *Phytopathology* **90**, 1246-1249
- Raposo, R., Gomez, V., Urrutia, T. and Melgarejo, P., 2001. Survival of *Botrytis cinerea* in Southeastern Spanish greenhouses. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 229-236
- Redmond, J.C., Marois, J.J. and MacDonald, J.D., 1987. Biological control of *Botrytis cinerea* with epiphytic microorganisms. *Plant Disease* **71**, 799-802

- Reuveni, R. and Raviv, M., 1992. The effect of spectrally modified polyethylene films on the development of *Botrytis cinerea* in greenhouse grown tomato plants. *Biological Agriculture and Horticulture* **9**, 77-86
- 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
- Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K-M., Siewers, V., Tenberge, K.B., Tudzynski, B. and Tudzynski, P., 2004. Functional analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology* **5**, 17-27
- Rosslénbroich, H.J., Stuebler, D., 2000. *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* **19**, 557–561.
- Salinas, J., 1992. Function of cutinolytic enzymes in the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. PhD Thesis, University of Utrecht, The Netherlands
- Salinas, J., Glandorf, D.C.M., Picavet, F.D. and Verhoeff, K., 1989. Effects of temperature, relative humidity and age of conidia on the incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **95**, 51-64
- Sasaki, I. and Nagayama, H., 1994.  $\beta$ -Glucosidase from *Botrytis cinerea*: Its relation to the pathogenicity of this fungus. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **58**, 616-620
- Schouten, A., Tenberge, K.B., Vermeer, J., Stewart, J., Wagemakers, L., Williamson, B. and Van Kan, J.A.L., 2002a. Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* **3**, 227-238
- Showalter, A.M. and Varner, J.E., 1989. Plant hydroxyprolin-rich glycoproteins. In: *The Biochemistry of Plants, vol. 15*, (pp 485-520), *Molecular Biology*. Marcus, A. ed. Academic Press, San Diego, CA
- Shtienberg, D. and Elad, Y., 1997. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **87**, 332-340
- Sierotzki, H. and Gisi, U., 2003. Molecular diagnostics for fungicide resistance in plant pathogens. In: Voss G and Ramos G (eds) *Chemistry of Crop Protection*. (pp. 71-88) Wiley-VCH, Weinheim, Germany

- Sierotzki, H., Frey, R., Wullschleger, J., 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.
- 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
- Sirjusingh, C. and Sutton, J.C., 1996. Effects of wetness duration and temperature on infection of geranium by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* **80**, 160-165
- Slawecki, R.A., Ryan, E.P. and Young, D.H., 2002. Novel fungitoxic assays for inhibition of germination associated adhesion of *Botrytis cinerea* and *Puccinia recondita* spores. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 597-601
- Smith, C.M., 1988. History of benzimidazole use and resistance. In: Delp CJ (ed.) *Fungicide Resistance in North America*. (pp. 23-24) American Phytopathological Society Press, St. Paul Minnesota, USA
- Snow, D., 1949. The germination of mould spores at controlled humidities. *Annals of Applied Biology* **36**,1-13
- Sommer, N., 1985. Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology* **7**, 331
- Spotts, R.A., 1985. Environmental factors affecting conidial survival of five pear decay fungi. *Plant Disease* **69**, 391-392
- Spotts, R.A. and Holz, G., 1996. Adhesion and removal of conidia of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* from grape and plum fruit surfaces. *Plant Disease* **80**, 688-691
- Stammler, G. and Speakman, J., 2006. A microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to boscalid. *Journal of Phytopathology* **154**, 508-510.
- Tamura, H., Mizutani, A., Yukioka, H., Miki, N., Ohba, K. and Masuko, M., 1999. Effect of the methoxyiminoacetamide fungicide, SSF129, on respiratory activity of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science* **55**, 681–686
- Ten Have, A., Tenberge, K.B., Benen, J.A.E., Tudzynski, P., Visser, J. and Van Kan, J.A.L., 2002. The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogens. In: Kempken F (ed.) *The Mycota XI*, Agricultural Applications. (pp. 341-358) Springer-Verlag, Berlin, Germany

- Tenberge, K.B., Beckedorf, M., Hopp, e B., Schouten, A., Solf, M. and Von den Driesch, M., 2002. In situ localization of AOS in host-pathogen interactions. *Microscopy and Microanalysis* **8** (S2): 250-251
- Urbanek, H. and Zalewska-Sobczak, J., 1984. Multiplicity of cell wall degrading glycosidic hydrolases produced by apple infecting *Botrytis cinerea*. *Phytopathologische Zeitschrift* **110**, 261-271
- Urbasch, I., 1983. Über Entstehung und Keimung der Chlamydosporen von *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathologische Zeitschrift* **108**, 54-60
- Vakalounakis, D.J., 1992. Control of fungal diseases of greenhouse tomato under long-wave infrared-absorbing plastic film. *Plant Disease* **76**, 43-46
- Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C. and Boccara, M., 2003. Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene *Bcpme1* reduces virulence on several host plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 360-367
- Verhoeff, K., 1980. The infection process and host-pathogen interactions. In: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R. (eds) *The Biology of Botrytis*. (pp. 153-180) Academic Press, London, UK
- Verhoeff, K. and Warren, J.M., 1972. *In vitro* and *in vivo* production of cell wall degrading enzymes by *Botrytis cinerea* from tomato. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **78**, 179-185
- Verhoeff, K., Leeman, M., Van Peer, R., Posthuma, L., Schot, N. and Van Eijk, G.W., 1988. Changes in pH and the production of organic acids during colonisation of tomato petioles by *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* **122**, 327-336
- Viaud, M., Brunet-Simon, A., Brygoo, Y., Pradier, J.M. and Levis, C., 2003. Cyclophilin A and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin A inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Microbiology* **50**:1451-1465
- Viterbo, A., Yagen, B. and Mayer, A.M., 1993a. Cucurbitacins, 'attack' enzymes and laccase in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **32**, 61-65
- Vivier, M.A. and Pretorius, I.S., 2002. Genetically tailored grapevines for the wine industry. *Trends in Biotechnology* **20**, 472-478
- Volpin, H. and Elad, Y., 1991. Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose flowers to *Botrytis* blight. *Phytopathology* **81**, 1390-1394
- Walter, M., Boyd-Wilson, K.S.H., Perry, J.H., Elmer, P.A.G. and Frampton, C.M., 1999b. Survival of *Botrytis cinerea* conidia on kiwifruit. *Plant Pathology* **48**, 823-829

- Whetzel, H.H., 1945. A synopsis of the genera and species of the Sclerotiniaceae, a family of stromatic inoperculate Discomycetes. *Mycologia* **37**: 648-714
- White, G.A. and Georgopoulos, S.G., 1992. Target sites of carboxamides. In: Koller, W. (ed.) *Target Sites of Fungicide Action*. (pp. 1-29) CRC Press, Boca Raton, USA
- Williamson, B., Duncan, G.H., Harrison, J.G., Harding, L.H., Elad, Y. and Zimand, G., 1995. Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **99**, 1303-3010
- Wood, R.K.S., 1951. The control of diseases of lettuce by use of antagonistic microorganisms I The control of *Botrytis cinerea* Pers. *Annals of Applied Biology* **38**, 203-216
- Yarden, O. and Katan, T., 1993. Mutations leading to substitutions at amino-acids 198 and 200 of betatubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **83**, 1478-1483
- Yunis, H. and Elad, Y., 1989. Survival of *Botrytis cinerea* in plant debris during summer in Israel. *Phytopathology* **17**, 13-21
- Yunis, H., Shtienberg, D., Elad, Y. and Mahrer, Y., 1994. Qualitative approach for modelling outbreaks of grey mould epidemics in non-heated cucumber greenhouse. *Crop Protection* **13**, 99-104
- Yourman, L. F., and Jeffers, S. N., 1999. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* **83**, 569-575
- Yourman, L. F., Jeffers, S. N., and Dean, R. A., 2000. Genetic analysis of isolates of *Botrytis cinerea* sensitive and resistant to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology* **90**, 851-859
- 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
- Zheng, D. and Koller, W., 1997. Characterization of the mitochondrial cytochrome b gene from *Venturia inaequalis*. *Current Genetics* **32**, 361-366.
- Zheng, D., Olaya, G. and Koller, W., 2000. Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. *Current Genetics* **38**, 148-155
- Zimand, G., Elad, Y. and Chet, I., 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* **86**, 1255-1260



Ziogas, B.N., Baldwin, B.C. and Young, J.E., 1997. Alternative respiration: A biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pesticide Science* **50**, 28–34

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γεωργόπουλος, Σ.Γ., 1984. *Βασικές γνώσεις Φυτοπαθολογίας*. Αθήνα

Γεωργόπουλος, Σ.Γ. και Ζιώγας, Β.Ν., 1992. *Αρχές και μέθοδοι καταπολέμησης των ασθενειών των φυτών*. Αθήνα

Παναγόπουλος, Χ.Γ., 1995. *Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών*. Αθήνα-Πειραιάς

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

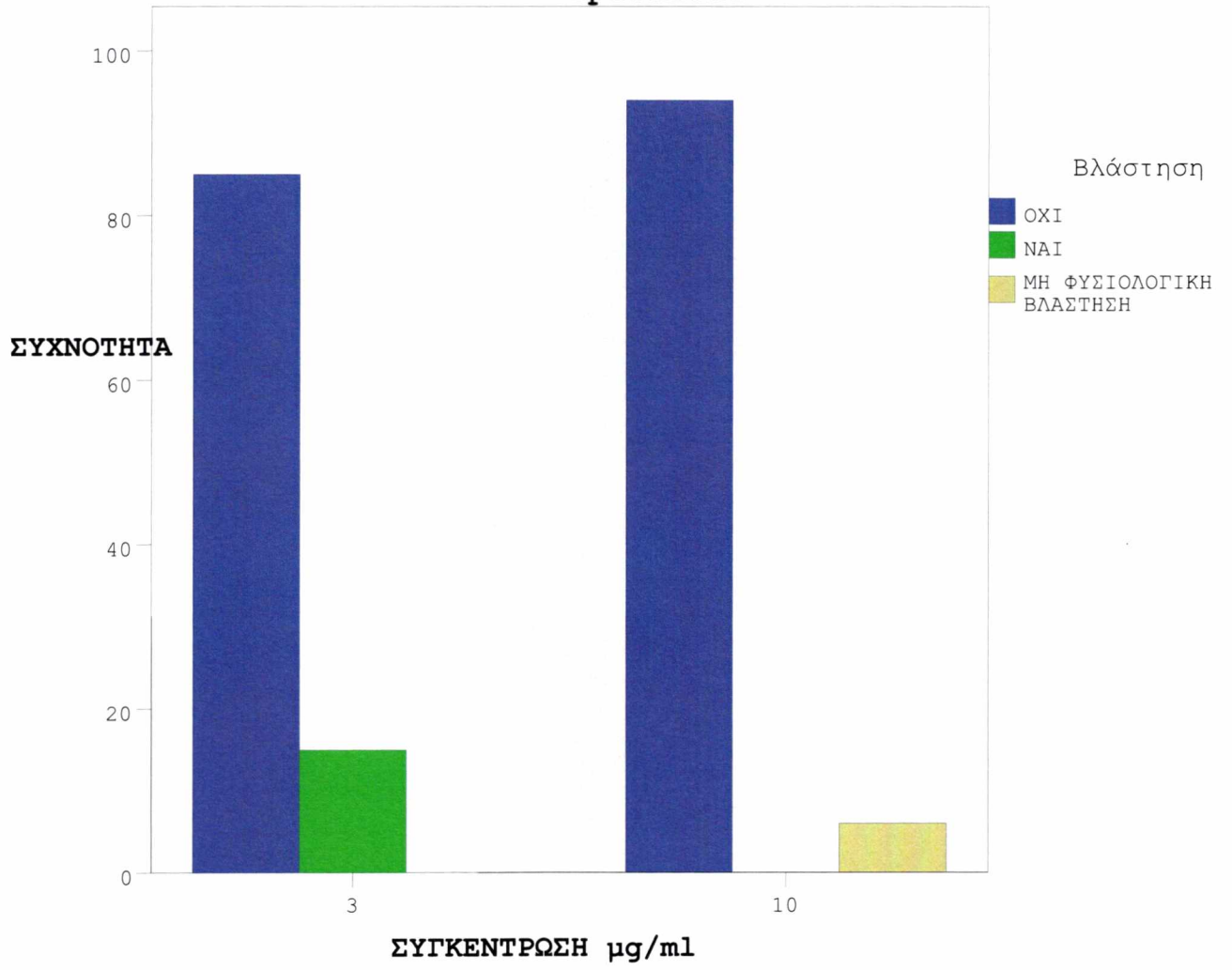
### Crosstabs

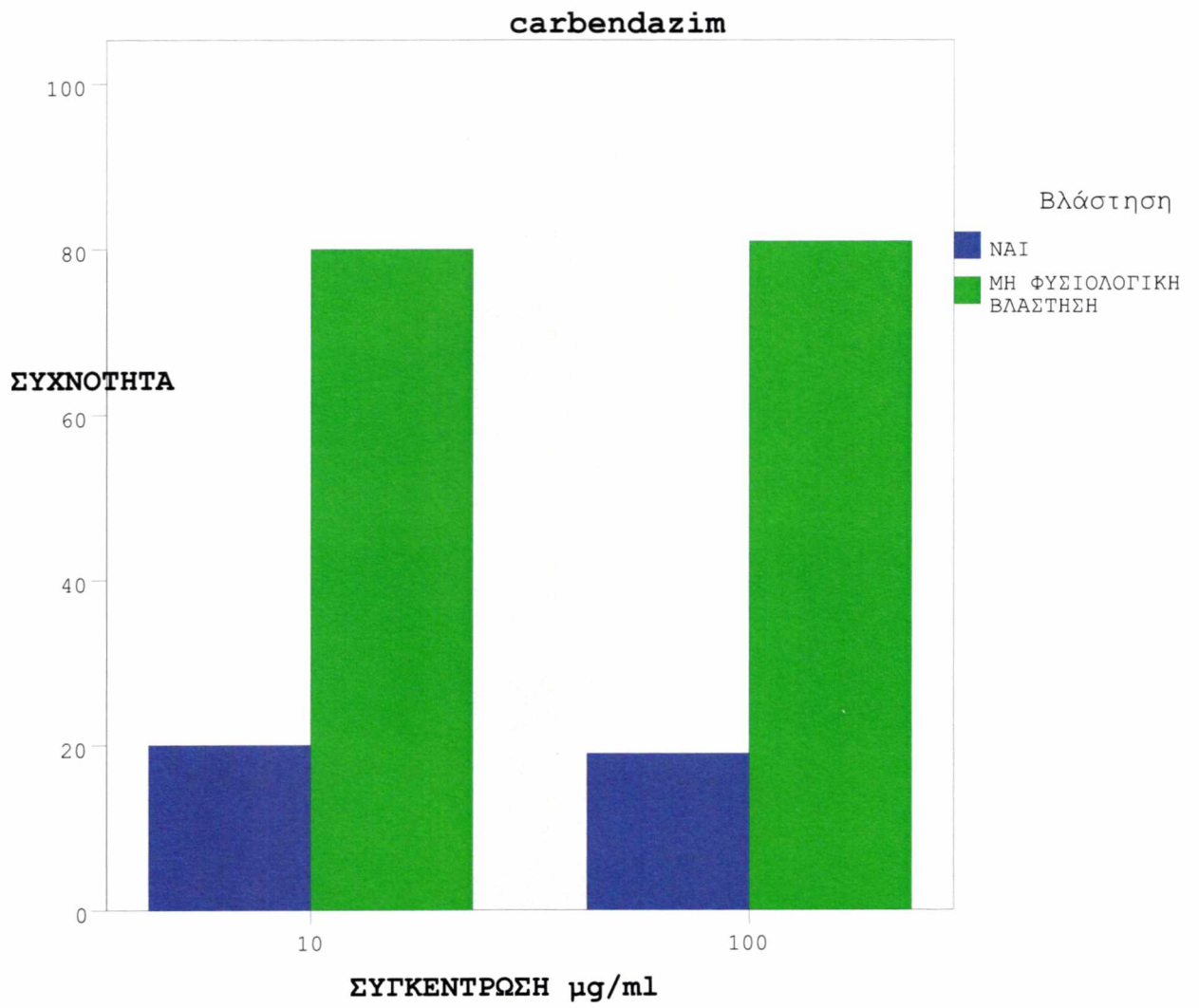
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml \* Βλάστηση \* Μυκητοκτόνο Crosstabulation

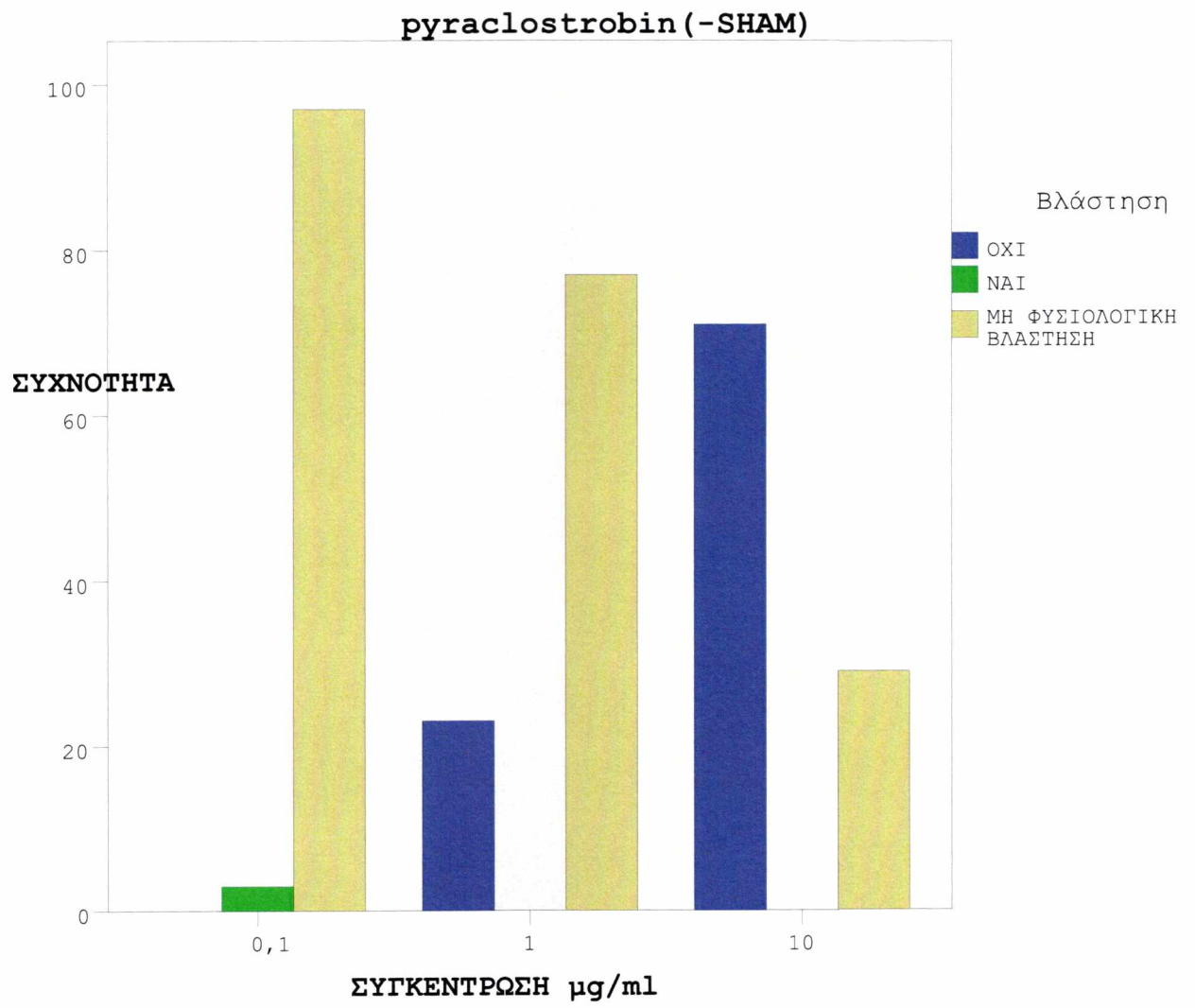
Count

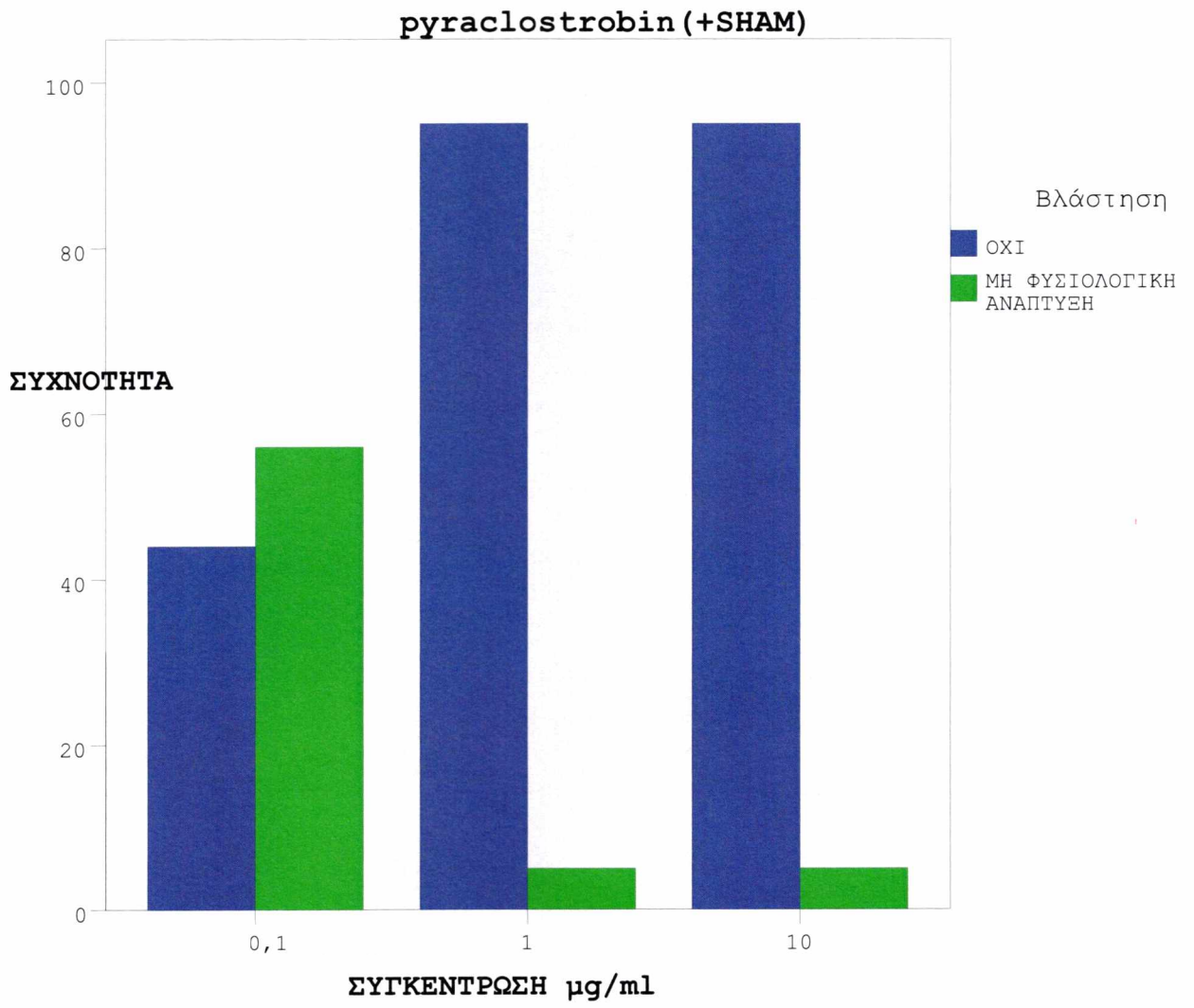
Μυκητοκτόνο			Βλάστηση			Total
			0	1	2	0
1	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml	3	85	15	0	100
		10	94	0	6	100
	Total			179	15	6
2	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml	10		20	80	100
		100		19	81	100
	Total			39	161	200
3	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml	0,1	0	3	97	100
		1	23	0	77	100
		10	71	0	29	100
	Total			94	3	203
4	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml	0,1	44		56	100
		1	95		5	100
		10	95		5	100
	Total			234		66
5	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml	0,1		100	0	100
		1		0	100	100
		10		0	100	100
	Total			100	200	300
6	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml	100		100		100
	Total			100		100
7	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml	0		100		100
	Total			100		100

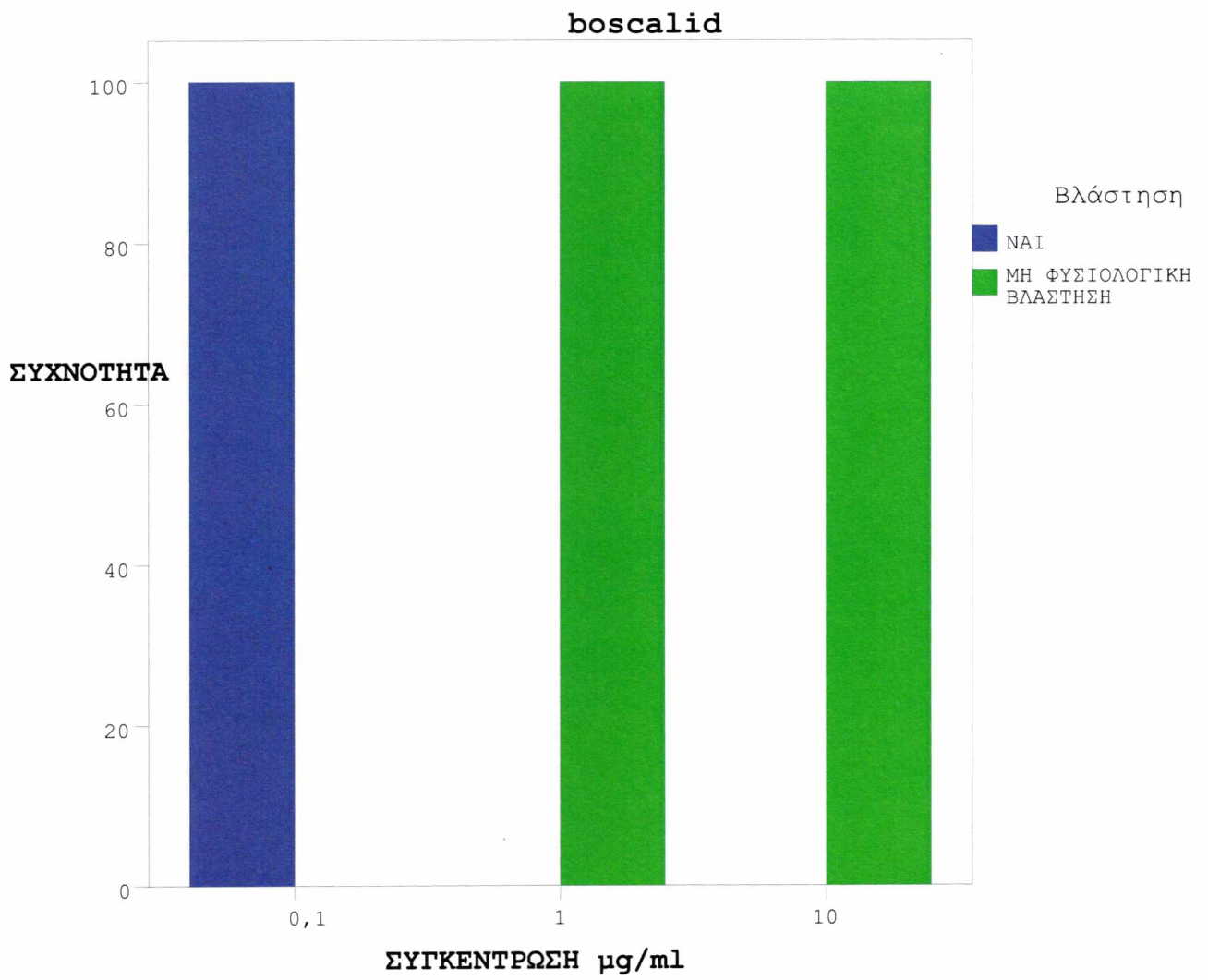
### iprodione











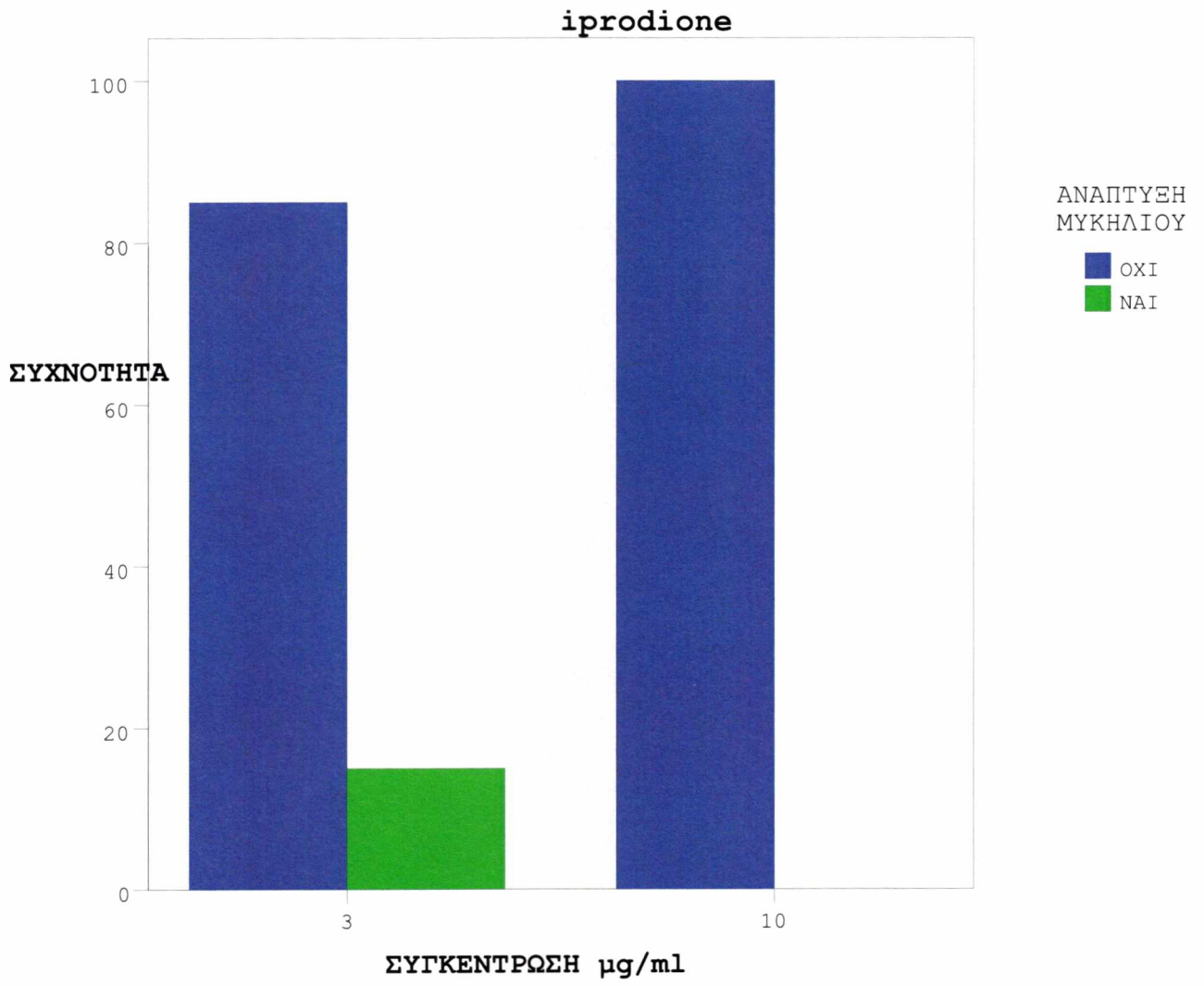
## Crosstabs

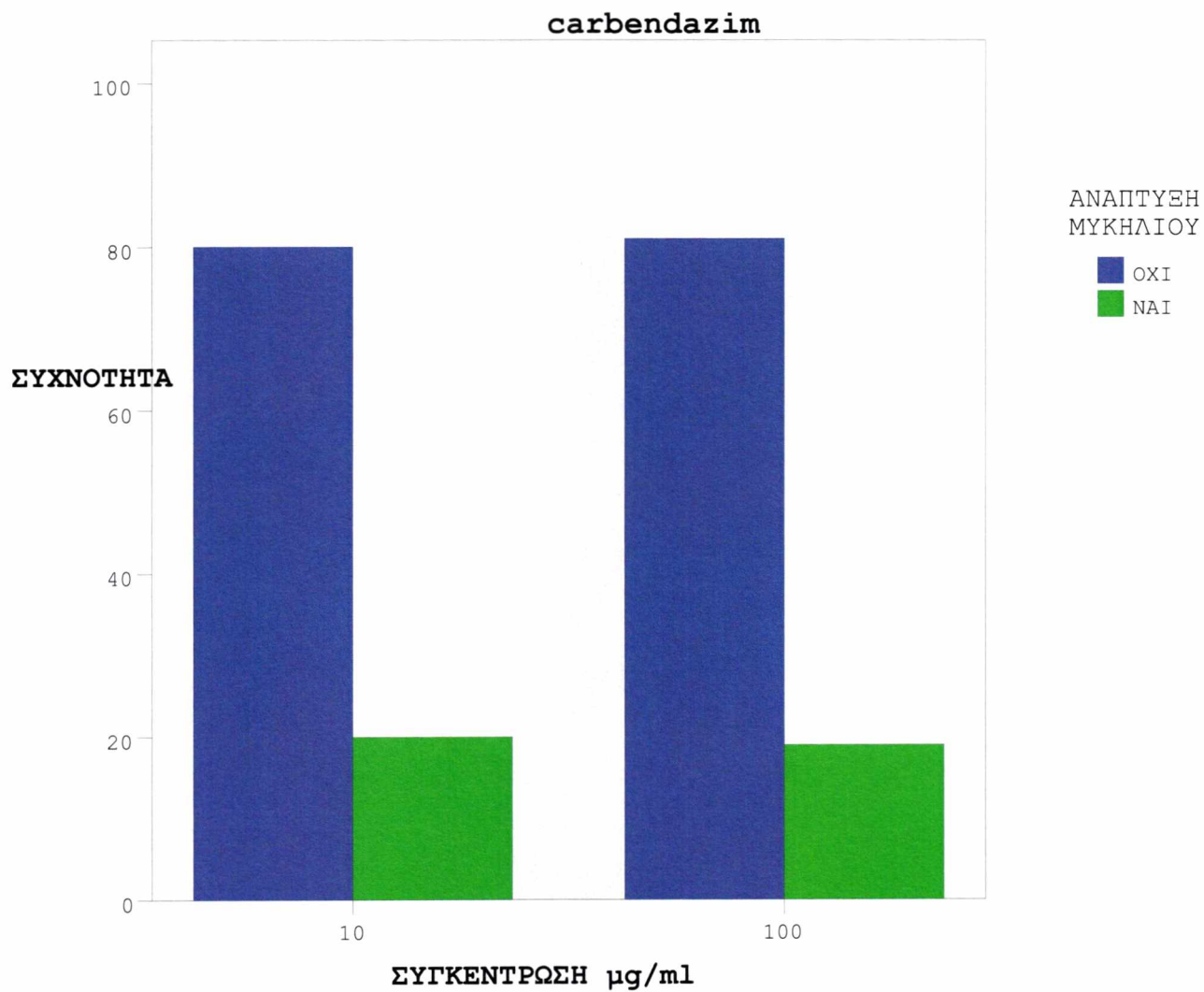
### ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml \* ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΚΗΛΙΟΥ \* Μικητοκτόνο Crosstabulation

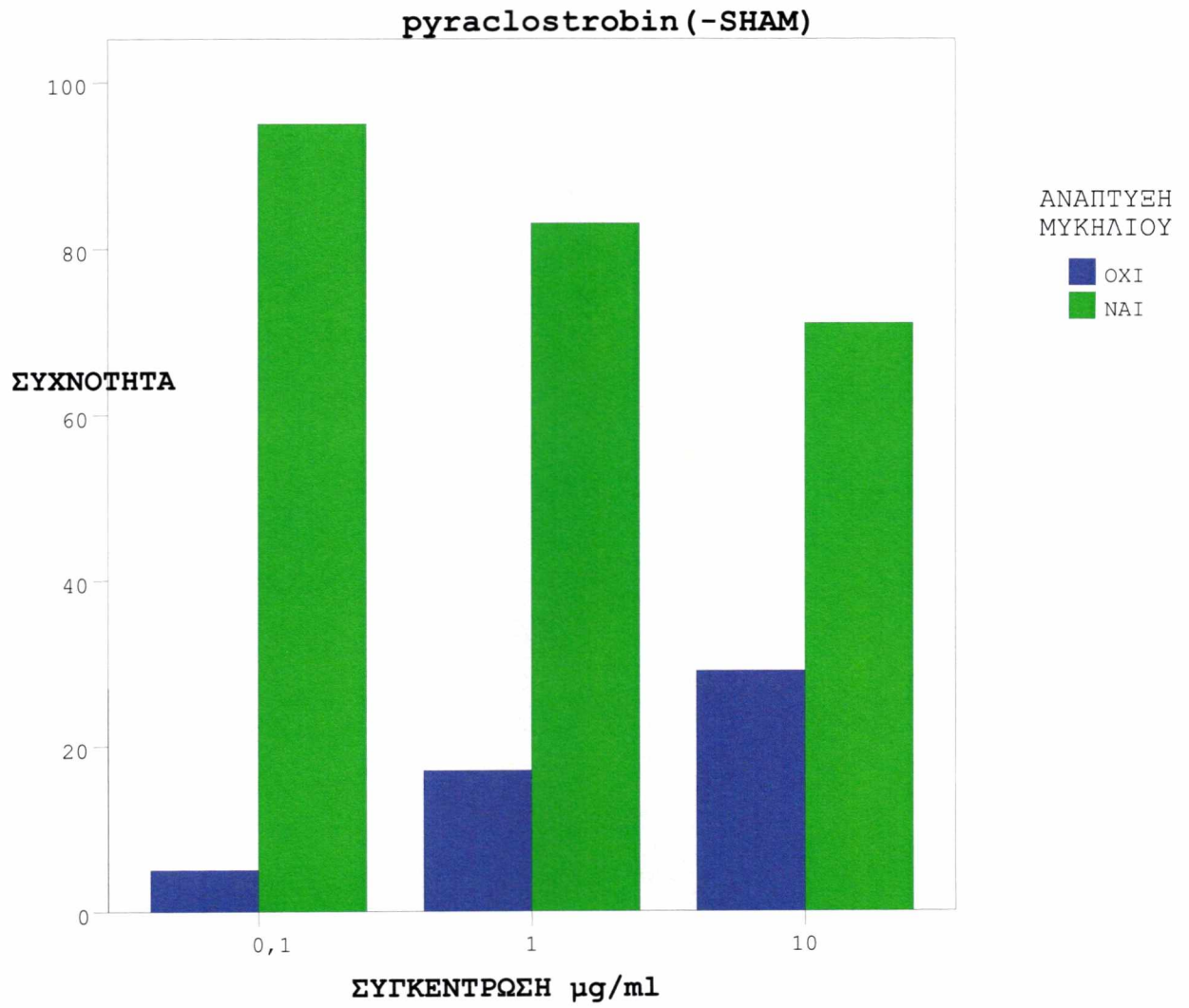
Count

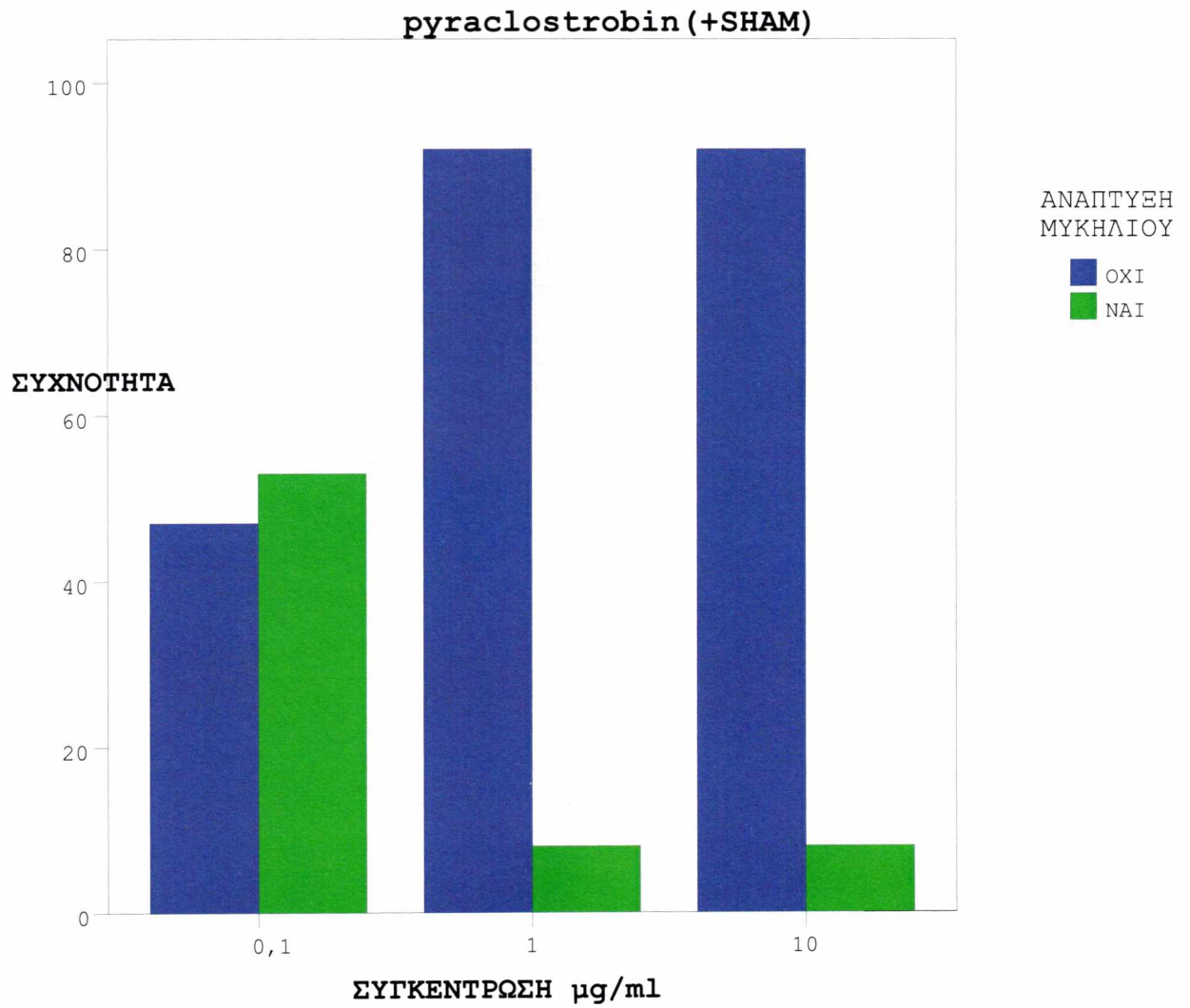
Μικητοκτόνο			ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΚΗΛΙΟΥ		Total
			0	1	0
1	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml	3	85	15	100
		10	100	0	100
	Total		185	15	200
2	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml	10	80	20	100
		100	81	19	100
	Total		161	39	200
3	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml	0,1	5	95	100
		1	17	83	100
		10	29	71	100
	Total		51	249	300
4	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml	0,1	47	53	100
		1	92	8	100
		10	92	8	100
	Total		231	69	300
5	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml	0,1	0	100	100
		1	19	81	100
		10	96	4	100
	Total		115	185	300
6	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml	100		100	100
	Total			100	100
7	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ µg/ml	0		100	100
	Total			100	100

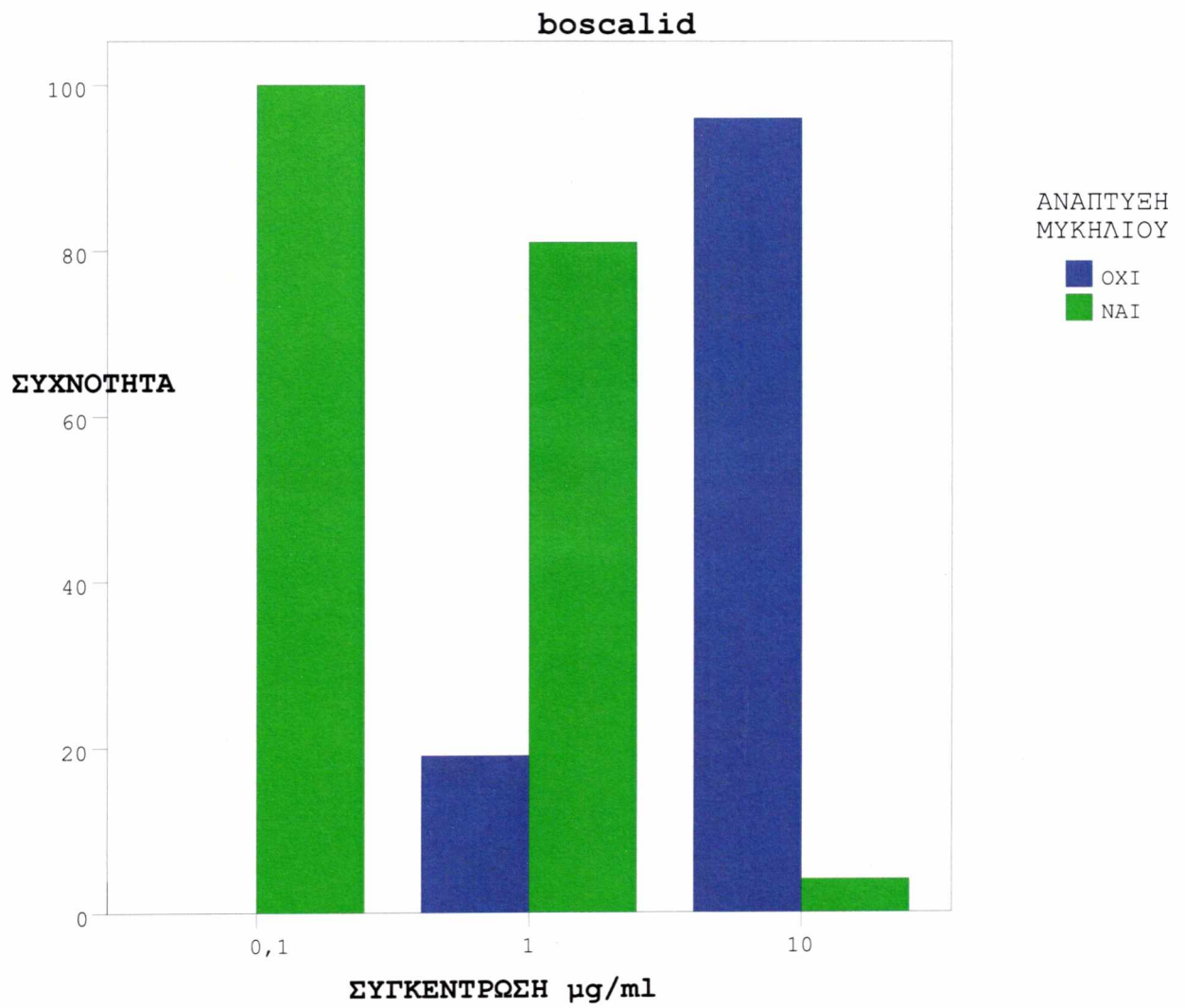


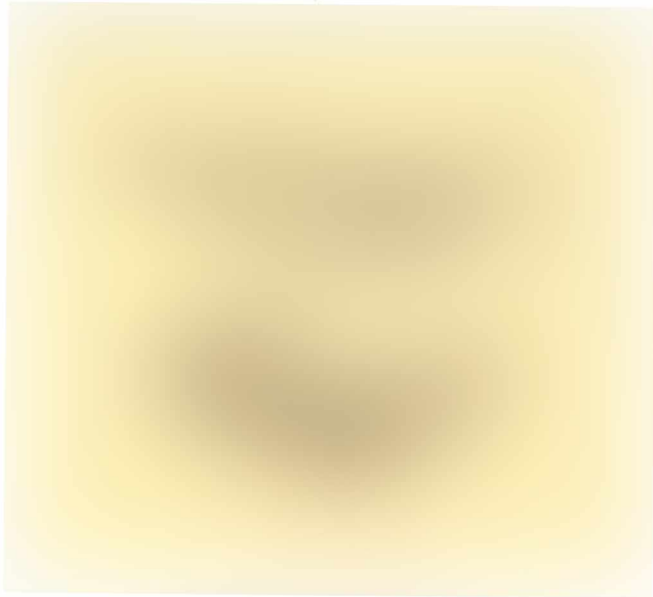












ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000105389