

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΜΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

με τίτλο:

Μοριακός χαρακτηρισμός, παθογένεια και
αντιμετώπιση του Καμαροσποριου της
φιστικιάς



Παλαβούζης Χ. Σταύρος

ΑΘΗΝΑ 2011

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ, ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΜΑΡΟΣΠΟΡΙΟΥ ΤΗΣ ΦΙΣΤΙΚΙΑΣ

ΣΤΑΥΡΟΣ Χ. ΠΑΛΑΒΟΥΖΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Υποβληθείσα στο
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας
Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Εξεταστική Επιτροπή:

ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ ΠΑΠΛΩΜΑΤΑΣ

Καθηγητής
Επιβλέπων

ΠΟΛΥΜΝΙΑ ΑΝΤΩΝΙΟΥ

Επίκουρος Καθηγήτρια
Μέλος

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΤΣΙΤΣΙΓΙΑΝΝΗΣ

Λέκτορας
Μέλος

ΑΘΗΝΑ, 2011

Πρόλογος

Η μελέτη αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Παπλωματά Επαμεινώνδα.

Θέλω να εκφράσω την βαθιά ευγνωμοσύνη μου στον Δρ. Παπλωματά που με καθοδήγησε και επέβλεψε για πολλά χρόνια από την πτυχιακή μου μελέτη μέχρι και την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής και με εμπιστεύτηκε αναθέτοντάς μου ένα σύγχρονο και ενδιαφέρον θέμα. Με εμπιστεύτηκε, προσφέροντάς μου απλόχερα τις γνώσεις και την εμπειρία του, η δε συνεχής και άμεση καθοδήγηση του με βοήθησε αποτελεσματικά στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μελέτης.

Ευχαριστώ,

Την Επίκουρο Καθηγήτρια Πολύμνια Αντωνίου και τον Λέκτορα Δημήτρη Τσιτσιγιάννη για την βοήθεια και καθοδήγησή τους στην εκπόνηση της διατριβής καθώς και την τιμή που μου έκαναν συμμετέχοντας στην εξεταστική επιτροπή.

Τον Ομότιμο Καθηγητή Ελευθέριο Τζάμο που με δέχθηκε στο εργαστήριο, αφιέρωσε πολύτιμο χρόνο και βοήθησε με την αφυπνιστική κριτική του.

Την Επίκουρο Καθηγήτρια Ελισάβετ Χατζηβασιλείου για την απομονώσεις του μύκητα που μου προσέφερε.

Τον Καθηγητή Παναγιώτη Κατινάκη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για την παραχώρηση εργαστηριακού εξοπλισμού που συνέβαλε στην περάτωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Την ΕΕΔΙΠ Μυρτώ Δημακοπούλου για την βοήθεια της στο πειραματικό μέρος της διατριβής και τις συμβουλές της.

Τον Λέκτορα Σωτήρη Τζάμο για την βοήθειά του καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος.

Την Δρ. Αλίκη Τζίμα για την προσφορά της σε γνώσεις, συμβουλές και την πάντα καλή της διάθεση.

Τέλος, ευχαριστώ τους όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την καλή συνεργασία και συνύπαρξη.

*Στην οικογένειά μου,
Για την αμέριστη συμπαράσταση και αγάπη τους*

Περιεχόμενα

Πρόλογος	iv
Περιεχόμενα	vi
Περίληψη	1
Abstract.....	3
1 Εισαγωγή.....	5
1.1 Το παθογόνο	5
1.1.1 Γενικά στοιχεία	5
1.1.2 Φυλογενετικές σχέσεις του γένους <i>Botryosphaeria sp.</i>	6
1.1.3 Μορφολογία του μύκητα	10
1.1.4 Μορφολογικοί και μοριακοί χαρακτήρες.....	12
1.1.4.1 Επιλογή του κατάλληλου μοριακού δείκτη	15
1.1.4.2 Γονίδια που χρησιμοποιούνται στην φυλογένεση	17
1.1.4.3 Παράγοντας επιμήκυνσης EF1-α	17
1.1.4.4 Πυρηνικοί γενετικοί τόποι	18
1.1.4.5 Ριβοσωμικά γονίδια (rDNA).....	18
1.1.4.5.1 Δομή ριβοσωμάτων	18
1.1.4.5.2 Ρυθμοί εξέλιξης του rDNA	19
1.1.5 Περιγραφή της ασθένειας	22
1.1.6 Κύκλος της ασθένειας και επιδημιολογία	24
1.1.6.1 Διαχειμάζουσες πηγές του παθογόνου	24
1.1.6.2 Διασπορά	25
1.1.6.3 Μόλυνση	26
1.1.7 Έλεγχος της ασθένειας.....	28
1.1.7.1 Καλλιεργητικές πρακτικές.....	28
1.1.7.2 Χρήση μυκητοκτόνων	29
1.1.7.3 Ολοκληρωμένη διαχείριση	31
1.2 Σκοποί της παρούσας μελέτης.....	33
2 Υλικά και μέθοδοι.....	34
2.1 Βιολογικό υλικό	34
2.1.1 Απομονώσεις	34

2.1.2	Θρεπτικά υλικά και διαδικασίες απομόνωσης και ανάπτυξης του μύκητα	36
2.1.2.1	Υλικό Potato Dextrose Agar	36
2.1.2.2	Υλικό M-Green Yeast & Mold broth.....	37
2.1.2.3	Υλικό Littman Oxgall Agar	38
2.1.3	Καλλιέργεια, διατήρηση και ανανέωση των απομονώσεων	39
2.1.4	Παραγωγή βιομάζας για εξαγωγή DNA.....	39
2.1.4.1	Εξαγωγή DNA με την μέθοδο Lee & Taylor	40
2.1.4.2	Εξαγωγή DNA με μικροκύματα.....	40
2.1.5	Μέτρηση νουκλεϊκών οξέων –DNA	41
2.1.6	Παραγωγή εναιωρήματος μυκηλίου για τεχνητές μολύνσεις φύλλων και δοκιμών ευαισθησίας σε μυκητοκτόνα	41
2.2	Μοριακός χαρακτηρισμός	41
2.2.1	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	41
2.2.2	Καθαρισμός της πολλαπλασιασμένης αλληλουχίας	48
2.2.3	Αλληλούχηση του ενισχυμένου τμήματος DNA – sequencing.....	49
2.2.4	Επεξεργασία αλληλουχιών	51
2.2.4.1	Στατιστική σύγκριση αλληλουχιών –BLAST	51
2.2.4.2	Ποιοτικός έλεγχος ηλεκτροφερογραφημάτων	52
2.2.5	Διαδικασία κατασκευής φυλογενετικών δέντρων	53
2.2.5.1	Στοίχιση αλληλουχιών	53
2.2.5.2	Έλεγχος ομοπλασίας – τεστ κορεσμού	54
2.2.5.3	Επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου εξέλιξης.....	55
2.2.5.3.1	Οι βασικές παράμετροι των μοντέλων.....	55
2.2.5.3.2	Συνοπτική περιγραφή των μοντέλων	57
2.2.5.3.3	Κοινές υποθέσεις μεταξύ των μοντέλων.....	58
2.2.5.4	Ανεξάρτητη ή συνδυασμένη ανάλυση	60
2.2.5.5	Αξιολόγηση της κατάλληλης μεθόδου	61
2.2.5.6	Μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης.....	62
2.2.5.6.1	Μέθοδοι αποστάσεων.....	63
2.2.5.6.2	Διακριτές μέθοδοι	66
2.2.5.7	Αξιοπιστία των δέντρων	72
2.3	Παθογένεια απομονώσεων καμαροσπορίου φιστικιάς.....	74
2.3.1	Τεχνητές μολύνσεις φύλλων.....	74
2.3.2	Τεχνητές μολύνσεις κλάδων	75

2.4	Αντιμετώπιση Καμαροσπορίου Φιστικιάς.....	76
2.4.1	Περιγραφή μυκητοκτόνων.....	77
2.4.1.1	Neotopsin.....	77
2.4.1.2	Stroby.....	77
2.4.1.3	Quadris.....	78
2.4.1.4	Signum.....	79
2.4.1.5	Switch.....	79
2.4.2	Δοκιμές ευαισθησίας στελεχών.....	80
2.4.2.1	Μεθοδολογία.....	81
3	Αποτελέσματα	83
3.1	Ανάλυση γενετικών τόπων ITS1, 5.8S, ITS2	83
3.1.1	Σχολιασμός φυλογενετικών σχέσεων.....	92
3.2	Μελέτη παθογένειας	93
3.2.1	Μελέτη παθογένειας σε φύλλα φιστικιάς.....	93
3.2.2	Μελέτη παθογένειας σε κλάδους φιστικιάς	96
3.3	Αντιμετώπιση & μελέτη ανθεκτικότητας καμαροσπορίου φιστικιάς σε μυκητοκτόνα	99
3.3.1	Διαφορές ανάπτυξης βάση μετρήσεων.....	108
3.3.2	Σύγκριση των μυκητοκτόνων βάση μορφολογίας και ανάπτυξης	110
4	Συζήτηση – Συμπεράσματα	112
4.1	Φυλογενετική ανάλυση απομονώσεων καμαροσπορίου φιστικιάς.....	112
4.1.1	Μελέτες του γένους <i>Botryosphaeria</i> – σύγκριση	112
4.2	Μελέτη παθογένειας απομονώσεων καμαροσπορίου φιστικιάς.....	113
4.3	Μελέτη ανθεκτικότητας καμαροσπορίου φιστικιάς σε μυκητοκτόνα	113
	Βιβλιογραφία	115

Περίληψη

Οι μύκητες του γένους *Botryosphaeria*. προσβάλλουν πολλά είδη φυτών, μεταξύ των οποίων σημαντική είναι η προσβολή στην φιστικιά. Τα είδη που έχουν βρεθεί στην φιστικιά παλαιότερα θεωρείτο ότι ανήκαν στο γένος *Camarosporium*. ωστόσο νέα ταξινόμηση τα εισάγει στα γένη *Neofusicoccum* ή *Fusicoccum*. Η τέλεια μορφή δεν έχει βρεθεί στην φιστικιά, ωστόσο με βάση τους χαρακτήρες της ατελούς μορφής το παθογόνο της φιστικιάς στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ έχει ονομαστεί *Botryosphaeria dothidea*.

Σκοποί της παρούσας μελέτης ήταν ο μοριακός χαρακτηρισμός απομονώσεων καμαροσπορίου από διάφορους ξενιστές βάση των περιοχών ITS, η ανάλυση στελεχών βάση της παθογόνου δύναμης και η διερεύνηση της χρήσης των πιο κατάλληλων μυκητοκτόνων για τον έλεγχο της ασθένειας.

Για τον μοριακό χαρακτηρισμό χρησιμοποιήθηκαν 10 απομονώσεις από 5 ξενιστές: φιστικιά, ελιά, αμπέλι, δαμασκηλιά και σοφόρα. Η πειραματική προσέγγιση περιελάμβανε τον πολλαπλασιασμό αλληλουχιών με PCR, τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των και τη στατιστική και φυλογενετική ανάλυσή τους. Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τους πυρηνικούς γονιδιακούς τόπους ITS1, 5.8S και ITS2 οι οποίοι είναι από τους πιο διαδεδομένους δείκτες για μελέτες σε επίπεδο γενών και ειδών. Το τελικό σύνολο των στοιχισμένων αλληλουχιών, μετά την αφαίρεση τμημάτων από την αρχή και το τέλος τους, είχε μήκος 566 βάσεων.

Σε γενικές γραμμές οι 10 απομονώσεις διαχωρίζονται ανά ξενιστή, με την εξαίρεση των απομονώσεων από ελιά, σοφόρα και δαμασκηλιά που είναι σχεδόν όμοιες. Από την μοριακή ανάλυση των απομονώσεων, οι 5 από φιστικιά κατετάγησαν στο είδος *Neofusicoccum vitifusiforme*, ανεξαρτήτως γεωγραφικής προέλευσης (Αττική ή Φθιώτιδα). Στο είδος *Botryosphaeria dothidea* ταυτοποιήθηκαν 3 απομονώσεις: 1 από σοφόρα, 1 από ελιά και 1 από δαμασκηλιά. Οι 2 απομονώσεις από αμπέλι ανήκαν στο είδος *Botryosphaeria obtusa*. Στο φυλογενετικό δέντρο όλες οι απομονώσεις από φιστικιά ομαδοποιήθηκαν στον ίδιο κλάδο που διαχωριζόταν από τον κλάδο που συμπεριελάμβανε τις απομονώσεις του είδους *Botryosphaeria dothidea* (και από τους τρεις ξενιστές) με διαφοροποίηση 3%. Οι απομονώσεις από αμπέλι ομαδοποιήθηκαν σε διαφορετικό κλάδο και διέφεραν κατά 6% από τις απομονώσεις των άλλων δυο κλάδων.

Η ανάλυση στελεχών βάση της παθογόνου δύναμης πραγματοποιήθηκε με τεχνητές μολύνσεις σε αποκομμένα φύλλα φιστικιάς και σε κλαδίσκους φιστικιάς in planta. Για τα φύλλα υπολογίστηκε το σχετικό εμβαδό κάτω από την καμπύλη ασθένειας και για τους κλάδους το μήκος του μεταχρωματισμού στο ξύλο. Γενικά δεν βρεθήκαν σημαντικές διαφορές στην παθογένεια εκτός της απομόνωσης από αμπέλι που είχε σημαντικά μικρότερη παθογόνο δύναμη σε σχέση με τις

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

υπόλοιπες απομονώσεις καθώς και διαφορές μεταξύ απομονώσεων από φυσικιά. Επίσης, και στις μολύνσεις φύλλων και κλαδίσκων οι απομονώσεις ελιάς και σοφόρας είχαν παρόμοια παθογόνο δύναμη.

Για την δοκιμή ευαισθησίας σε διάφορες δραστικές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν 4 απομονώσεις που προερχόταν από πειραματικούς αγρούς στους οποίους είχε γίνει επέμβαση με τα μυκητοκτόνα Strobry (kresoxim methyl), Signum (pyraclostrobin και boscalid), Switch (cyprodinil και fludioxonil) και Quadris (azoxystrobin) συν μια από δέντρο που δεν είχε ψεκαστεί με μυκητοκτόνο. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ανάπτυξης μυκηλίου σε τρυβλία με υλικό PDA στο οποίο είχε ενσωματωθεί μυκηκτόνο. Τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα 4 ανωτέρω συν το Neotopsin (thiophanate methyl) που ψεκάζεται μια φορά την Άνοιξη. Για κάθε μυκητοκτόνο χρησιμοποιήθηκαν 11 διαδοχικές συγκεντρώσεις με λόγο 3:1 και η μέγιστη συγκέντρωση ήταν η συνιστώμενη για ψεκασμό. Από την ανάλυση δεν προέκυψαν ιδιαίτερες διαφορές στο EC_{50} μεταξύ των στελεχών εκτός της απομόνωσης που προήλθε από δέντρο που είχε ψεκαστεί με *Quadris* σε PDA που είχε ενσωματωθεί το ίδιο μυκητοκτόνο (*Quadris*). Σε αυτήν την περίπτωση, το EC_{50} του στελέχους αυτού ήταν περίπου 3ppm και δεκαπλάσιο από τις υπόλοιπες 4 απομονώσεις.

Abstract

The fungi of the genus *Botryosphaeria* is a very important pathogen regarding pistachio, causing the “panicle and shoot blight”. The species that cause blights to pistachio plants were known as *Camarosporium* sp. but new classifications associate it with *Neofusicoccum* or *Fusicoccum* genera. The teleiomorph on pistachio has not been found yet, however based on the characters of the anamorph it is assumed to belong to the genus *Botryosphaeria* sp.

The goals of this project were 1)the molecular characterization of *Camarosporium* isolates based on rDNA ITS regions, 2)the characterization of isolates based on their pathogenicity and 3)the determination of the performance of the most appropriate fungicides for the control of the disease.

For the molecular characterization 10 isolates out of 5 hosts (pistachio, olive, grapevine, plum & sophora) were used. The regions of the rDNA repeat from the 3' end of the 18s gene to the 5' end of the 28s gene were amplified using ITS4 and ITS5 primers, and their individual sequences were determined via automatic sequencing. These sequences were later compared to each other in order to determine their phylogenetic relations.

Based on the phylogenetic data, the 10 isolates are grouped by host, with the exception of the isolates from olive, sophora & plum which are almost identical. Five of the isolates, which are all from pistachio, belong to the species *Neofusicoccum vitifusiforme*, regardless of region (Attiki, Fthiotida). The isolates from olive, sophora & plum are all classified as *Botryosphaeria dothidea* and the isolates from grapevine as *Botryosphaeria obtusa*. The subclades of species *Neofusicoccum vitifusiforme* & *Botryosphaeria dothidea* differ from each other 3% and form a clade that differs 6% from the clade of grapevine isolates.

The characterization of isolates concerning their pathogenicity was accomplished with pistachio detached leaf assays and shoot inoculation with mycelial plug. Relative AUDPC was calculated for the detached leaves and there were no notable differences with the exception of the reduced pathogenicity of the grapevine isolate and minor differences between pistachio isolates. Concerning the shoots inoculations the differences were less significant but the grapevine isolate still had reduced pathogenicity. Likewise, the pathogenicity of the sophora and olive isolates was almost the same.

As for the fungicide assay, isolates were obtained from pistachio orchards on which 4 different fungicide sprays were applied. These fungicides were *Stroby* (kresoxim methyl), *Signum* (pyraclostrobin and boscalid), *Switch* (cyprodinil and fludioxonil) and *Quadris* (azoxystrobin). The same fungicides plus *Neotospin* (thiophanate methyl) that was applied in all orchards before bloom

Abstract

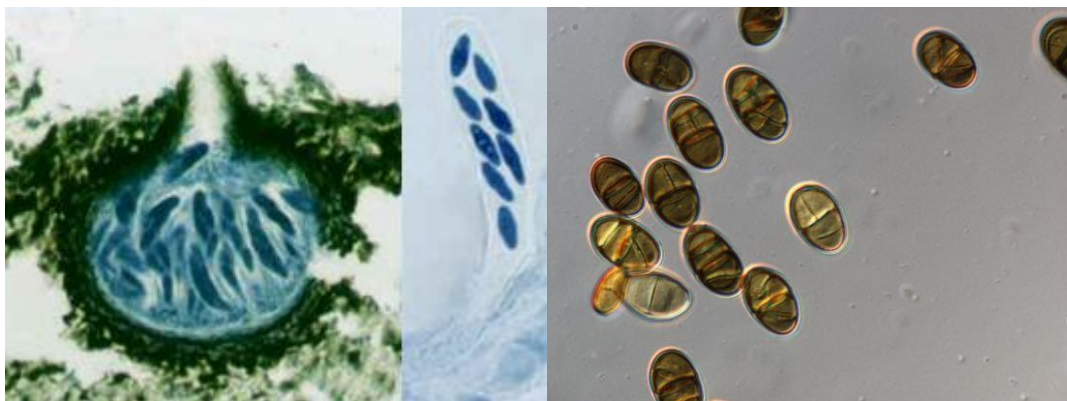
were tested in vitro for their effect on mycelial growth inhibition. The total isolates used were 5, one from each orchard on which different fungicide was applied and one from an orchard where no fungicide was applied. For every fungicide a total of 11 threefold dilution concentrations were used with the highest, which is recommended for application in planta. From the assay there were no significant differences except from the fungicide *Quadris* where the isolate from trees sprayed with *Quadris* had $EC_{50}=3\text{ppm}$ azoxystrobin which was ten times greater than the rest of isolates.

1 Εισαγωγή

1.1 Το παθογόνο

1.1.1 Γενικά στοιχεία

Ο μύκητας *Botryosphaeria* sp. είναι πολύ σημαντικό φυτοπαθογόνο καθώς προσβάλλει πλήθος φυτών. Οι μύκητες του γένους αυτού είναι από τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς που προκαλούν σύγχυση όσον αφορά την ταυτοποίηση και κατάταξή τους, όχι μόνο λόγω της ομοιότητας που παρουσιάζουν τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά στους διάφορους ξενιστές που προσβάλλουν (Smith et al., 2001) αλλά και από το γεγονός ότι η τέλεια μορφή εμφανίζεται σπάνια στην φύση και παρουσιάζει μικρή διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών. Έχει βρεθεί τα τελευταία χρόνια σε 34 γένη τα οποία εκτείνονται σε 20 οικογένειες. Είναι γνωστό από τις αρχές της δεκαετίας του 1900 ότι ο μύκητας προσβάλλει και προκαλεί μαρασμό σε πολλά φυτικά είδη. Στην Ελλάδα έχει βρεθεί σε φιστικιές, όπου είναι πολύ σημαντικό παθογόνο, στην ελιά (όπου χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι η βούλα), το αμπέλι, τα πυρηνόκαρπα, τα μηλοειδή, τις βατομουριές του γένους *Vaccinium*, την ιτιά, την φτελιά, την ροδιά και άλλα είδη. Η τέλεια μορφή στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ έχει βρεθεί στο αβοκάντο, την ελιά, το βατόμουρο, τον πυράκανθο και την σεκόια. Συνήθως η τέλεια μορφή δεν παρατηρείται στους προσβεβλημένους ιστούς αλλά ειδικά στην φιστικιά μέχρι σήμερα έχει βρεθεί μόνο η ατελής μορφή. Η ζημιά που προκαλεί ο μύκητας σε πολλά είδη φυτών αλλά ιδίως στην φιστικιά είναι πολύ σημαντική (Michailides & Morgan, 2004).



Εικόνα 1 Αριστερά: Ασκώματα και ασκοί του μύκητα *Botryosphaeria* spp. (Phillips, 2010)
 Δεξιά: Κονίδια του μύκητα *Camatosporium* spp. – διακρίνονται τα εγκάρσια και διαμήκη χωρίσματα (Mycobank.org, 2006)

Ο μύκητας *Botryosphaeria* sp. ανήκει στους ασκομύκητες (οικογένεια Botryosphaeriaceae). Ειδικότερα, η συστηματική κατάταξη του γένους έχει ως εξής:

Διαίρεση: Ascomycota

Κλάση: Dothideomycetes

Τάξη: Botryosphaeriales

Οικογένεια: Botryosphaeriaceae

Γένος: *Botryosphaeria*

Τα διάφορα είδη του γένους *Botryosphaeria*, τα σημαντικότερα των οποίων είναι τα *B. dothidea*, *B. obtusa*, *B. parva*, *B. ribis*, *B. australis* και *B. protearum* (Εικόνα 3), εκτός από την ικανότητά τους να προσβάλλουν πλήθος ξενιστών, προκαλούν σημαντικές ζημιές στους ξενιστές. Στην Ελλάδα, το είδος *B. dothidea* προσβάλλει πολλά είδη φυτών και τα είδη στα οποία προκαλούν τις σημαντικότερες προσβολές και απώλειες είναι: την φιστικιά μειώνοντας την παραγωγή σε αρκετό βαθμό, τα μηλοειδή προκαλώντας έλκη στους κλάδους και καταστροφή καρπών, την ελιά προκαλώντας την βούλα στους καρπούς, τα πυρηνόκαρπα προκαλώντας έλκη στους κλάδους και τον κορμό και το αμπέλι προκαλώντας έλκη σε βραχίονες.

Η εγγενής μορφή σχηματίζει ασκούς που έχουν δυο τοιχώματα σε ασκώματα – ψευδοθήκια με οστιόλη. Αυτά τα ψευδοθήκια είναι δυνατόν να είναι μέσα στον φυτικό ιστό ή να εξέρχονται ελαφρώς. Η μορφή των ασκωμάτων διαφέρει αναλόγως των συνθηκών ανάπτυξης του μύκητα. Οι ασκοί έχουν και αυτοί δυο τοιχώματα και κάθε ένας περιέχει 8 υαλοειδή, μονοκύτταρα και ωειδή ασκοσπόρια (Εικόνα 1). Στο γένος *Botryosphaeria* αντιστοιχούν οι ατελείς μορφές *Botryodiplodia*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Fusicoccum* ή *Neofusicoccum*, *Lasiodiplodia*, *Macrophoma*, *Macrophomopsis*, *Sphaeropsis* (Phillips, 2010). Το όνομα της ατελής μορφής *Camarosporium* spp (Ζάχος et al., 1974-1977) πιθανόν προέρχεται από τα πυκνιδιοσπόρια του που έχουν σχήμα τοξοειδούς αψίδας και μοιάζουν με αυτά του μύκητα *Fusicoccum* spp. (Ma & Michailides, 2002). Πλέον έχει αλλάξει η ονομασία και το παθογόνο που προκαλεί την ασθένεια στην φιστικιά στην Ελλάδα θεωρείται πως ανήκει στα γένη *Fusicoccum* ή *Neofusicoccum*.

1.1.2 Φυλογενετικές σχέσεις του γένους *Botryosphaeria* sp.

Όπως έχει αναφερθεί, ο μύκητας *Botryosphaeria* sp. είναι ένα παθογόνο που προσβάλλει πλήθος διαφορετικών ειδών και υπάρχει σε πολλές περιοχές του κόσμου (Barr, 1987). Τα είδη μπορούν να είναι σαπροφυτικά, παρασιτικά ή και ενδοφυτικά και να προκαλούν μεταξύ άλλων μαρασμό με κατεύθυνση από πάνω προς τα κάτω και έλκη σε ξυλώδεις ιστούς. Απαντώνται σε μεγάλο εύρος μονοκοτυλήδων, δικοτυλήδων και γυμνόσπερμων ξενιστών, σε κλάδους, φύλλα, βλαστούς, ταξιανθίες, καρπούς και άλλα τμήματα των φυτών (Barr, 1987). Οι άριστες θερμοκρασίες

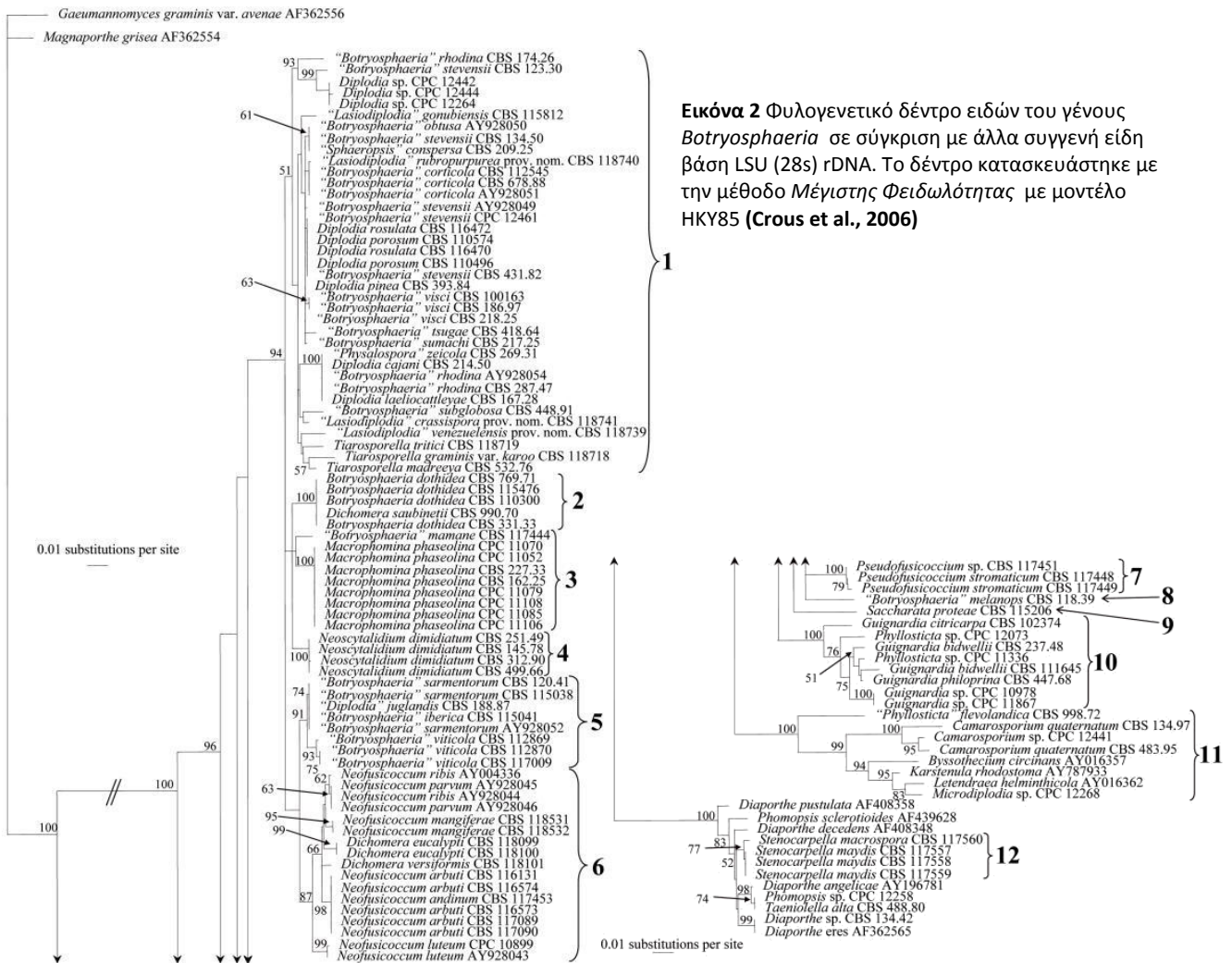
ανάπτυξης κυμαίνονται ανά είδος αλλά γενικά είναι μεταξύ 23 – 37 °C με τα όρια να είναι 7...39 °C (Úrbez-Torres et al., 2006).

Η ταξινόμηση του γένους *Botryosphaeria* είναι προβληματική σε πολλά επίπεδα ταξινόμησης. Μέχρι πρόσφατα η θέση του γένους σε ανώτερο ταξινομικό επίπεδο των ασκομυκήτων δεν ήταν γνωστή. Μια άλλη αβεβαιότητα για στο μύκητα *Botryosphaeria* sp. αφορά την κατανομή των ειδών στο γένος. Υπάρχουν πολλοί λόγοι γι 'αυτό το γεγονός. Οι τέλειες μορφές εμφανίζονται σχετικά σπάνια στην φύση (Shoemaker, 1964) & (Jacobs & Rehner, 1998), ή είναι δύσκολη η ανάπτυξή τους σε καλλιέργεια καθώς και υπάρχει μη επαρκής ποικιλομορφία για να επιτρέψει την αμφιμονοσήμαντη διαφοροποίηση τους σε επίπεδο είδους (Shoemaker, 1964). Έτσι, η ταξινόμηση του γένους *Botryosphaeria* εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ταξινόμηση των ατελών μορφών οι οποίες είναι πολύ πιο συχνές στην φύση.

Η σχετικά πρόσφατη εφαρμογή των μοριακών τεχνικών στην χρήση rRNA γονιδίων στην φυλογενετική ανάλυση έχει βοηθήσει πολύ στην ταξινόμηση των ειδών του γένους. Ειδικά οι περιοχές ITS1 και ITS2 του rDNA έχουν χρησιμοποιηθεί για πλήθος αναλύσεων για την σύνδεση τέλειων με ατελών μορφών του μύκητα *Botryosphaeria*. Για την ανάλυση σε πιο γενικό επίπεδο χρησιμοποιείται το LSU (28s) τμήμα του rDNA (Εικόνα 2).

Το γένος *Botryosphaeria* πρωτοεισήχθηκε το 1863 από τους *Cesati and De Notaris* που επέλεξαν ως είδος το *Botryosphaeria dothidea*. Πρωτύτερα, το γένος ήταν γνωστό ως *Sphaeria* sp και οι τέλειες μορφές δεν ήταν απόλυτα συνδεδεμένες με τις ατελείς. Έπειτα, τα γένη και τα είδη συγκρινόταν βάση μορφολογικών καθαρά χαρακτηριστικών και με διαρκείς αλλαγές στην οικογένεια και τάξη του μύκητα. Μέχρι πρόσφατα (δεκαετία του 1990 και 2000) υπήρξαν πολλές ανακατατάξεις στην ταξινόμηση και συσχέτιση τέλειων και ατελών μορφών του μύκητα. Τελευταία με τις μοριακές αναλύσεις των περιοχών ITS του rDNA έχει βρεθεί ότι τα είδη που ανήκουν στο γένος *Botryosphaeria* είναι λιγότερα απ' ότι θεωρούνταν στο παρελθόν (Denman et al., 2000).

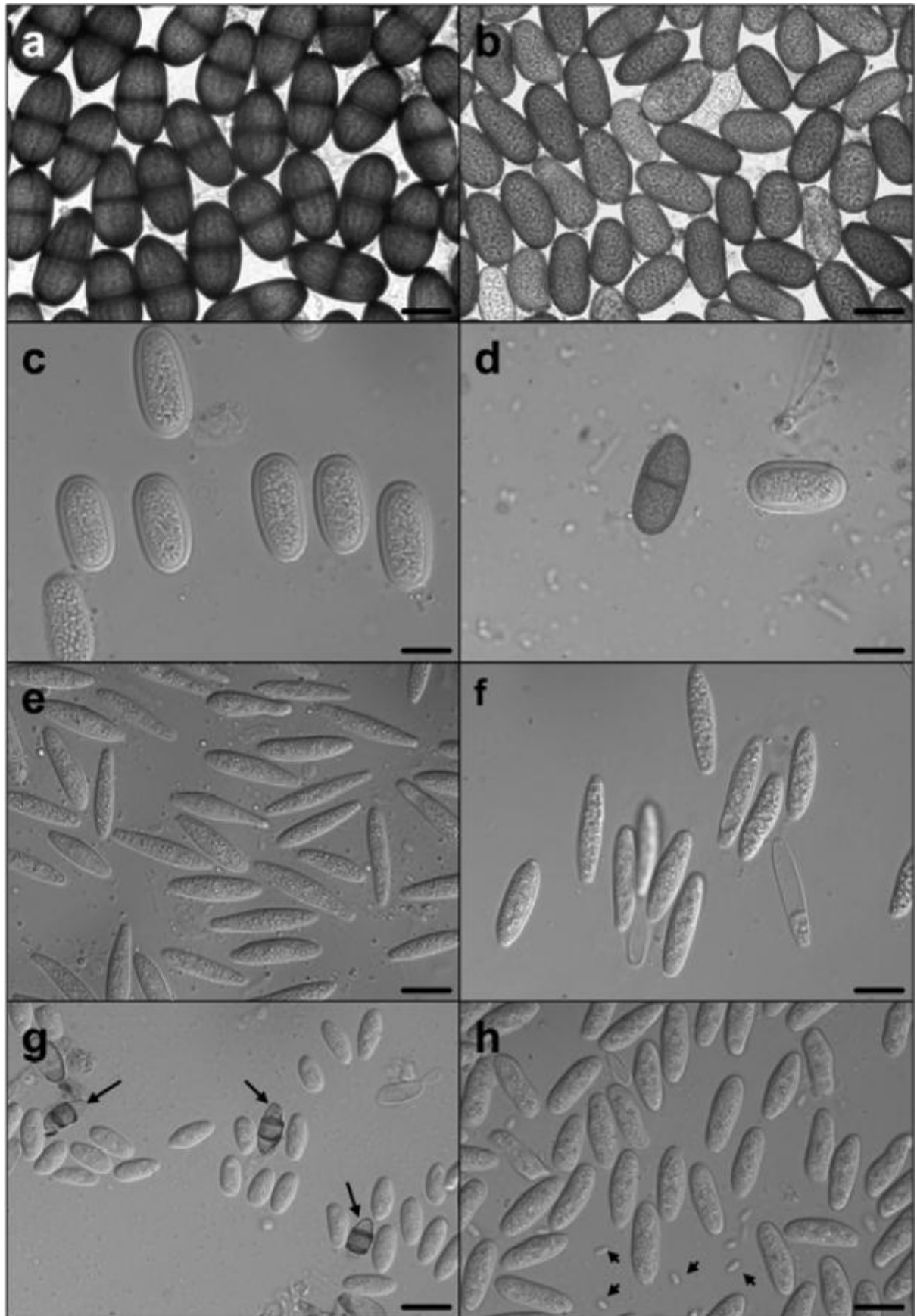
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Εικόνα 2 Φυλογενετικό δέντρο ειδών του γένους *Botryosphaeria* σε σύγκριση με άλλα συγγενή είδη βάση LSU (28S) rDNA. Το δέντρο κατασκευάστηκε με την μέθοδο Μέγιστης Φειδωλότητας με μοντέλο HKY85 (Crous et al., 2006)

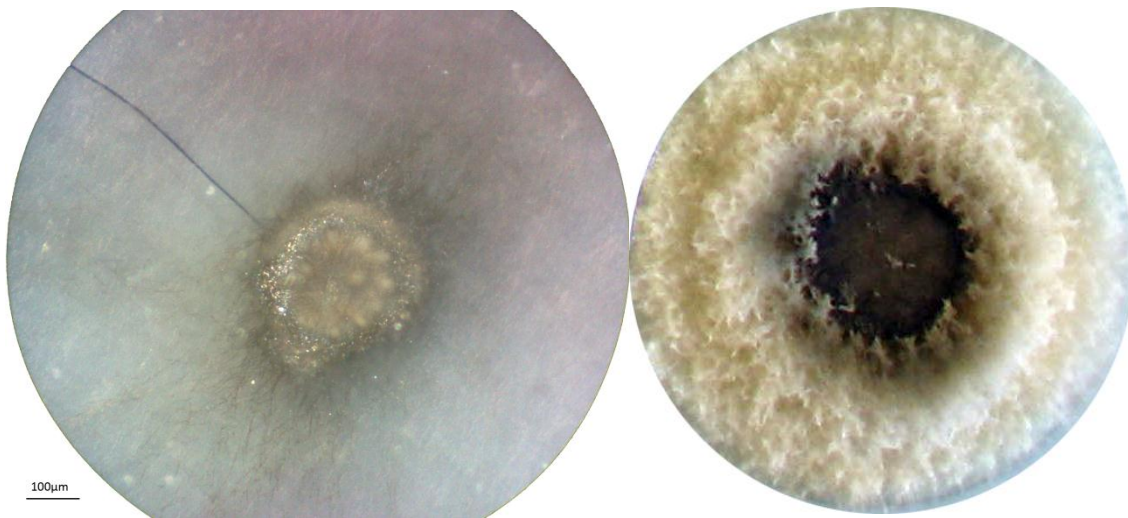
Λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας στην μορφή των σπορίων σε κάθε είδος, με την αλλαγή του τρόπου ταξινόμησης από αποκλειστικά βάση μορφολογικών χαρακτηριστικών σε βάση μοριακών δεδομένων, σε πολλά είδη άλλαξε η ταξινόμησή τους. Οι κυριότεροι λόγοι γι' αυτό είναι:

- πολλά μοριακά χαρακτηριστικά δεν εκφράζονται στο φαινότυπο και έτσι σε μορφολογική παρατήρηση δεν είναι δυνατόν να βρεθούν
- η αδυναμία εμφάνισης των ομοπλασιών, που οφείλεται είτε στην αδυναμία αναγνώρισης χαρακτήρων που είναι προϊόντα συγκλίνουσας ή αποκλίνουσας εξέλιξης, είτε στην λανθασμένη κωδικοποίηση χαρακτήρων που έχουν χαθεί δευτερογενώς
- η παραλλακτικότητα στην μορφολογία του μύκητα η οποία μάλιστα εξαρτάται και από την ηλικία, π.χ. ο αριθμός των σέπτων και το χρώμα των σπορίων αλλάζει με την ηλικία τους



Εικόνα 3 Μορφολογία κονιδίων του μύκητα *Botryosphaeria* sp. a: *B. rhodina*, b: *B. obtusa*, c & d: *B. stevensii*, e: *B. dothidea*, f: *B. australis*, g: *B. parva*, h: *B. lutea*. Μέγεθος κλίμακας 10μm (Úrbez-Torres et al., 2006)

1.1.3 Μορφολογία του μύκητα



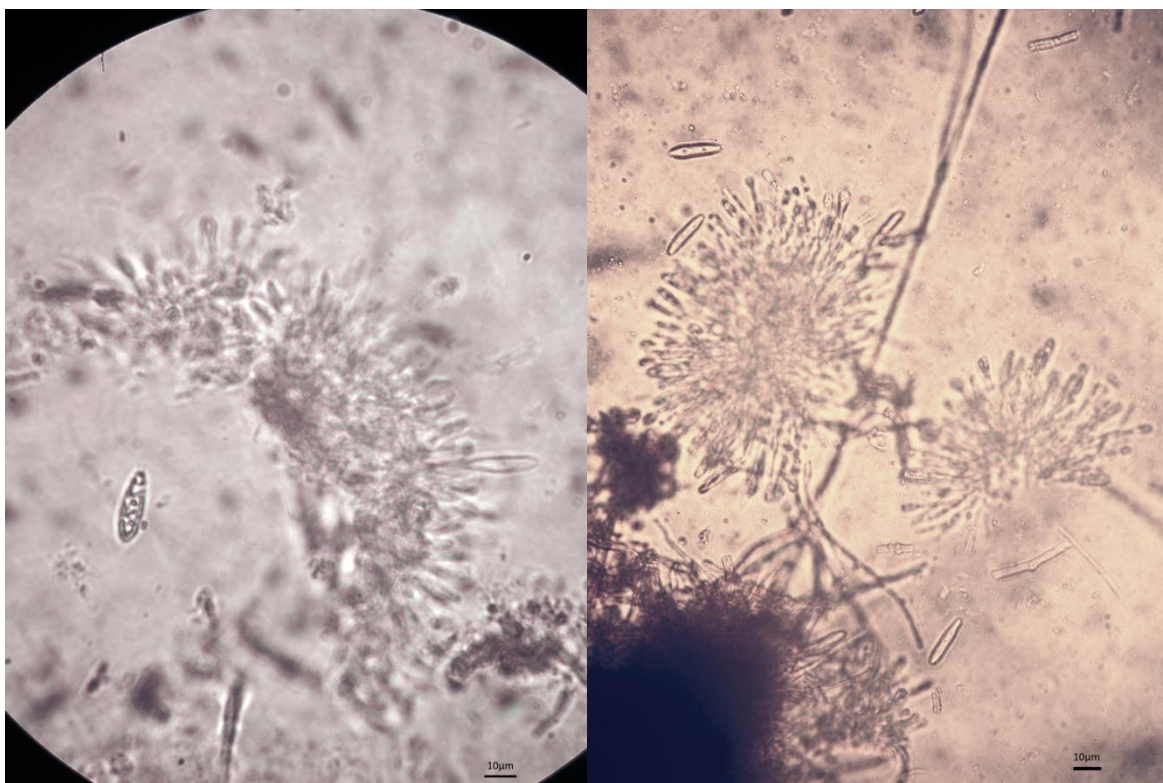
Εικόνα 4 Αριστερά: Πυκνίδιο από *Neofusicoccum vitifusiforme* σε PDA. Οι συνθήκες ανάπτυξης ήταν 12h/12h φωτοπερίοδος, 28°C, 80-100% RH
Δεξιά: 7 ημερών αποικία *Neofusicoccum vitifusiforme* σε τρυβλίο PDA (ανάπτυξη σε σκοτάδι, 28°C, 80-100% RH)

Πάνω σε κάθε προσβεβλημένο τμήμα του δέντρου μπορούν να παρατηρηθούν πυκνίδια τα οποία αποτελούν ατελή μορφή του μύκητα. Τα πυκνίδια αναπτύσσονται σε μεγάλο αριθμό επί των καρπών και δευτερευόντως επί των αξόνων της ταξικαρπίας. Κατά κανόνα αναπτύσσονται συγκεντρωμένα σε ομάδες των 5 – 10 με τα τοιχώματά τους να εφάπτονται των τοιχωμάτων γειτονικών πυκνιδίων, αν και είναι δυνατόν να υπάρξουν και μεμονωμένα. Στα αρχικά στάδια είναι καλυμμένα από την επιδερμίδα και έπειτα που αυτή διαρρηγνύεται τα πυκνίδια βγαίνουν στην επιφάνεια μέσω της οσιόλης. Το χρώμα των πυκνιδίων μέσα στους ιστούς είναι ανοικτό καστανό και με την έξοδό τους αλλάζει σε μελανό. Το σχήμα των πυκνιδίων είναι συνήθως σφαιρικό, ενίοτε ωοειδές και σπανιότερα κωνικό. Όσο αφορά το μέγεθος τους, έχουν πλάτος 170-420 μm (μέσος όρος 300μm) και μήκος 220-460 μm (μέσος όρος 320μm) (Εικόνα 4). Η οσιόλη έχει κατά κανόνα θηλοειδή και σπανιότερα κωνική μορφή και πλάτος 20-75μm (μέσος όρος 37 μm). Το περίδιο των πυκνιδίων είναι προσεγγυματικής υφής, πάχους 20-30 μm, αποτελούμενο από σκουρόχρωμα ακανόνιστου σχήματος κύτταρα. Εσωτερικά του περιδίου, ψευδοπαρεγγυματικό γόνιμο στρώμα κυττάρων μικρότερου μεγέθους, χρώματος ανοικτού και πάχους 15-25 μm δίνει γένεση σε υαλόχροα στηρίγματα μήκους 5-25 μm και πλάτους περίπου 1.5 μm, εκ των οποίων γεννώνται τα πυκνιδιοσπόρια. Αυτά είναι επιμήκη, ελλειψοειδή με αποστρογγυλεμένα άκρα ή ατρακτοειδή, ελαφρώς κεκαμμένα και έχουν μέγεθος [11-32]×[5-11]μm. Είναι συνήθως υαλώδη μονοκύτταρα, του τύπου *Macrophoma* ή *Fusicoccum*. Πιο σπάνια σχηματίζει πολυκύτταρα, με 1-6 εγκάρσια και 1-

2 κάθετα διαφράγματα (septa). Τα τελευταία είναι αυτά που χαρακτηρίζουν το γένος *Camarosporium* (Ζάχος et al., 1974-1977).

Αυτή η παρατήρηση είχε οδηγήσει τους Ζάχο, Τζαβέλλα – Κλωνάρη και Ρούμπο (1973) να μετονομάσουν τον μύκητα σε *Camarosporium pistaciae*. Το ποσοστό των πολυκύτταρων σπορίων είναι μικρό υπό συνθήκες ξηρασίας, αλλά ανέρχεται μέχρι 20% σε υγρή ατμόσφαιρα. Τα μονοκύτταρα σπόρια είναι υαλόχροα ή έχουν χρώμα ανοικτό πράσινο, και στα πολυκύτταρα πρασινοκίτρινο, κιτρινοκαστανό ή καστανό. Σε ατμόσφαιρα υψηλής υγρασίας, τα σπόρια εξέρχονται εκ της οσιόλης υπό μορφή συνεστραμμένων νημάτων κηρώδους υφής και χρώματος υπόλευκου (Εικόνα 14) (Ζάχος et al., 1974-1977). Τα πυκνιδιοσπόρια είναι μυξοσπόρια και μεταφέρονται με τα νερά της βροχής ή της άρδευσης με καταιονισμό, με έντομα και πουλιά (Ma & Michailides, 2002).

Οι άριστες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη του μύκητα είναι 27 – 30°C, ωστόσο γενικά αναπτύσσεται από 20 – 36 °C. Αρχικά οι αποικίες είναι λευκές, την 3^η με 4^η ημέρα αποκτούν χακί - γκρι χρώμα και στο τέλος γίνονται σχεδόν μαύρες. Ορισμένα στελέχη είναι δυνατόν να μην σχηματίζουν πυκνίδια σε καλλιέργεια PDA, αλλά μόνο σε φυτικό ιστό.



Εικόνα 5 Αριστερά: Κονίδια και γόνιμο στρώμα από *Neofusicoccum vitifusiforme* (φιστικιά)
Δεξιά: Κονίδια και γόνιμο στρώμα από *Botryosphaeria dothidea* (σοφόρα)

1.1.4 Μορφολογικοί και μοριακοί χαρακτήρες

Τα παλαιότερα χρόνια για να περιγραφούν οι σχέσεις μεταξύ οργανισμών χρησιμοποιούνταν μέθοδοι που είχαν δεδομένα που βασιζόταν στην συγκριτική μορφολογία, τη φυσιολογία και άλλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Μέχρι την δεκαετία του 1980, στις κλαδιστικές μελέτες χρησιμοποιούνταν σχεδόν αποκλειστικά μορφολογικοί χαρακτήρες. Το κυριότερο πλεονέκτημα των μορφολογικών χαρακτήρων είναι πως συνιστούν φαινοτυπικές εκδηλώσεις πολλών, συνήθως, γονιδίων. Επομένως, συμπυκνώνουν ποσό πληροφορίας που αντιστοιχεί σε μεγάλο τμήμα γενετικού υλικού. Ο φαινότυπος είναι, άλλωστε, από εξελικτική σκοπιά εκείνος που υπόκειται άμεσα στους νόμους της φυσικής επιλογής. Ακόμα, από πρακτική σκοπιά, είναι δυνατόν να συμπεριληφθεί αρκετά μεγάλο δείγμα ατόμων στην ανάλυση, μειώνοντας σημαντικά την πιθανότητα στατιστικών σφαλμάτων.

Η περιγραφή των μορφολογικών χαρακτήρων, όμως, εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την υποκειμενικότητα του ερευνητή, χωρίς να είναι πάντα δυνατή η σαφής διάκριση των καταστάσεων τους (Guarigo et al., 1999). Ακόμη, σε πολλές περιπτώσεις το πλήθος των διαθέσιμων χαρακτήρων είναι ανεπαρκές για την εξαγωγή ασφαλών φυλογενετικών υποθέσεων. Σημαντικό μειονέκτημα επίσης είναι η ποικιλομορφία ορισμένων ειδών σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά σε βαθμό που να είναι πολύ δύσκολη η αντικειμενική και σωστή ταξινόμηση. Ωστόσο, το σημαντικότερο μειονέκτημα που χαρακτηρίζει τους μορφολογικούς χαρακτήρες είναι η συχνή αδυναμία στον εντοπισμό ομοπλασιών (Morris, 2003). Η ομοπλασία, στους μορφολογικούς χαρακτήρες, μπορεί να οφείλεται είτε στην αδυναμία αναγνώρισης χαρακτήρων που είναι προϊόντα συγκλίνουσας ή αποκλίνουσας εξέλιξης, είτε στην λανθασμένη κωδικοποίηση χαρακτήρων που έχουν χαθεί δευτερογενώς.

Πριν την εισαγωγή των μοριακών μεθόδων, οι γενετικές μελέτες γινόταν κυρίως μέσω διασταυρώσεων ορισμένων ειδών που μπορούσαν να ελεγχθούν σε εργαστηριακές συνθήκες, όπως για παράδειγμα τα μωσχομπίζελα του Mendel, η δροσόφιλα *Drosophila melanogaster* (Goldstein et al., 1994), το βακτήριο *Escherichia coli* και το ποντίκι *Mus musculus*. (NIGMS, 2011) Τέτοιες μελέτες ήταν αδύνατον να αποκαλύψουν το υψηλό ποσοστό ποικιλότητας που έχει η πληθώρα ζωντανών οργανισμών στον πλανήτη. Αυτό το πρόβλημα λύθηκε με την εισαγωγή των μοριακών μεθόδων που μπορούν να έχουν εφαρμογή σε κάθε γονίδιο ή πρωτεϊνικό προϊόν των και μπορεί να εφαρμοστεί πρακτικώς σε οποιοδήποτε οργανισμό, από τους ιούς μέχρι τα μεγάλα θηλαστικά.

Με την άνθιση νέων μοριακών τεχνικών, όπως η PCR από τον Kary Mullis το 1983 (Mullis et al., 1992), κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός αλληλουχιών DNA σε μεγάλη κλίμακα και οι μοριακοί χαρακτήρες άρχισαν να χρησιμοποιούνται συστηματικά στην φυλογενετική ανάλυση. Είναι αυτονόητο πως, αφού η φυλογένεση προσπαθεί να ερμηνεύσει όχι μόνο τα πρότυπα των εξελικτικών αλλαγών αλλά και την ροή της κληρονομικότητάς τους, οι γονιδιωματικές αλληλουχίες κατέχουν εξέχουσα θέση στις φυλογενετικές αναλύσεις. Η φυλογένεση με βάση τα μοριακά

δεδομένα έχει τύχει μεγάλης αποδοχής ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που οι μορφολογικοί χαρακτήρες αποτυγχάνουν να δώσουν ξεκάθαρη εικόνα για την εξελικτική ιστορία των μελετώμενων τάξεων. Μια από τις κυριότερες περιπτώσεις αυτού είναι όταν υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στα μορφολογικά στοιχεία, όπως το μέγεθος, το σχήμα και ο αριθμός σέπτων των σπορίων του μύκητα (Shah et al., 2010). Υπάρχουν πολλοί λόγοι για τους οποίους τα μοριακά δεδομένα και ειδικά οι αλληλουχίες DNA και πρωτεϊνών, είναι καταλληλότερα για εξελικτικές μελέτες σε σχέση με δεδομένα προερχόμενα από την μορφολογία ή/ και την φυσιολογία των μελετώμενων τάξεων. Οι κυριότεροι λόγοι είναι οι ακόλουθοι (Freeman & Herron, 2003) & (Graur & Li, 2000):

- i. *Γενετική*: Οι οντότητες του DNA και των πρωτεϊνών είναι αυστηρά κληρονομούμενες οντότητες. Βάση αυτού του γεγονότος, αφού η φυλογένεση ερμηνεύει την «ροή της κληρονομικότητας» είναι φανερό ότι μόνο γενετικώς κληρονομούμενοι χαρακτήρες θα παρέχουν πληροφορίες για τον υπολογισμό της. Αυτό δεν συμβαίνει για τα χαρακτηριστικά της φυσιολογίας και μορφολογίας ενός οργανισμού, τα οποία επηρεάζονται σε μικρό ή μεγάλο βαθμό από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, και συνεπώς η καταγραφόμενη ποικιλότητά τους δεν είναι η αυστηρά κληρονομούμενη αλλά η περιβαλλοντικώς καθοριζόμενη (Graur & Li, 2000).
- ii. *Υπαρξη διακυμάνσεων*: ένα πρόβλημα της ανάλυσης με μορφολογικούς χαρακτήρες είναι ότι σε είδη που μοιάζουν πολύ μεταξύ τους, είναι πολύ δύσκολη η εξαγωγή συμπερασμάτων. Στην φυλογενετική ανάλυση είναι απαραίτητοι πολλοί χαρακτήρες, διότι ορισμένοι μπορεί να έχουν συγκλίνουσα εξέλιξη δηλαδή να μην έχουν ομολογία. Αντίθετα, οι ακολουθίες DNA γενικά έχουν πλήθος χαρακτήρων (ζεύγη βάσεων), από τους οποίους οι περισσότεροι έχουν φυλογενετική σημασία και παραλλακτικότητα (Reed & Frankham, 2001) & (Graur & Li, 2000).
- iii. *Κανονικότητα*: η εξέλιξη στο επίπεδο των μορίων χαρακτηρίζεται από κανονικότητα, σε αντίθεση με τα μορφολογικά/ φυσιολογικά χαρακτηριστικά και συνεπώς παρέχουν πιο ξεκάθαρη εικόνα των σχέσεων μεταξύ των μελετώμενων τάξεων (Graur & Li, 2000).
- iv. *Ποσοτική ανάλυση*: τα μοριακά δεδομένα ενδείκνυται για ποσοτικές αναλύσεις και για τον λόγο αυτό πολλές μαθηματικές και στατιστικές θεωρίες έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυσή τους, σε αντίθεση με τα μορφολογικά δεδομένα που κυρίως εξετάζονται μέσω ποιοτικών αναλύσεων (Graur & Li, 2000).
- v. *Προσδιορισμός της ομολογίας*: Σε αντίθεση με τις μορφολογικές μεθόδους ανάλυσης, στις μοριακές μεθόδους ανάλυσης ο προσδιορισμός της ομολογίας είναι ευκολότερος, ωστόσο και στις δυο περιπτώσεις υπάρχουν προβλήματα. Όσον αφορά τα μορφολογικά

στοιχεία, καθώς δεν ξέρουμε ποια γονίδια εμπλέκονται για συγκεκριμένα (μορφολογικά) χαρακτηριστικά, είναι δυνατόν να θεωρήσουμε παρόμοιες δομές ως ίδιες και ομόλογες, ενώ στην πραγματικότητα κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και θα έπρεπε να θεωρηθούν ως διαφορετικές. Όσον αφορά την εξέλιξη του DNA, συχνά ένα γονίδιο αντιγράφεται δυο φορές και πλέον βρίσκεται στο γονιδίωμα ως δυο αντίγραφα και σε διαφορετική θέση το καθένα. Έτσι, με την ανάλυση των γονιδίων μπορεί τυχαία να συγκριθεί το αρχικό γονίδιο σε ένα είδος με το αντιγραμμένο γονίδιο σε ένα άλλο είδος, σύγκριση που οδηγεί σε λάθος συμπεράσματα. Επίσης μερικές φορές συμβαίνουν μεταλλαγές που προσθέτουν ή αφαιρούν ζεύγη βάσεων από ένα γονίδιο με αποτέλεσμα το ίδιο γονίδιο σε διαφορετικά είδη να έχει διαφορετικό μήκος. Ωστόσο αυτά τα μοριακά χαρακτηριστικά είναι σχετικά σπάνια γεγονότα και ως εκ τούτου μπορεί να τεκμηριωθεί η μονοφυλετικότητα (Freeman & Herron, 2003).

- vi. *Μελέτη απομακρυσμένων εξελικτικά οργανισμών*: τα μοριακά δεδομένα επιτρέπουν την μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ αρκετά απομακρυσμένων εξελικτικά οργανισμών, κάτι που λίγοι μορφολογικοί χαρακτήρες μπορούν να προσφέρουν. Γενικά η σχέση δυο οργανισμών βάση το DNA τους είναι πολύ πιο κοντινή σε σχέση με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Έτσι, είναι πιθανό στην μελέτη μεταξύ δυο απομακρυσμένων εξελικτικά οργανισμών τα κοινά μορφολογικά στοιχεία να είναι ελάχιστα ή τέτοια που να μην μπορεί να γίνει ασφαλής σύγκριση μεταξύ των. Αντίθετα, σε ανάλυση με μοριακές μεθόδους βασιζόμαστε στο ότι πολλοί διαφορετικοί οργανισμοί έχουν αρκετά κοινά μοριακά χαρακτηριστικά όπως για παράδειγμα γονίδια και ένζυμα που εμπλέκονται σε κεντρικά μεταβολικά μονοπάτια, και ως εκ τούτου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κοινοί μάρτυρες για την παράλληλη μελέτη αυτών των ομάδων (Avisé, 2004)
- vii. *Αφθονία μοριακών δεδομένων*: Σε αντίθεση με τα μορφολογικά δεδομένα, τα μοριακά δεδομένα είναι άφθονα. Αυτό το προσόν συνδέεται με την μελέτη απομακρυσμένων εξελικτικά οργανισμών καθώς με την πληθώρα μοριακών δεδομένων είναι πολύ ευκολότερη η σύγκριση. Τα γονιδιώματα έχουν τεράστιο πληροφοριακό περιεχόμενο. Για παράδειγμα, το γονιδίωμα του φυτού *Arabidopsis thaliana* αποτελείται από 100 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων. Το γονιδίωμα αποτελεί πηγή πληροφοριών, κωδικοποιεί όχι μόνο πρωτεΐνες αλλά και άλλα στοιχεία του κυτταρικού μηχανισμού και επίσης φέρει ως αρχείο στην νουκλεοτιδική του ακολουθία τις εξελικτικές σχέσεις του με άλλα γονιδιώματα (Graur & Li, 2000).

Επιπρόσθετα, τα μοριακά δεδομένα προσφέρουν νέους χαρακτήρες με βάση τους οποίους οι κατατάξεις των οργανισμών που στηρίχτηκαν σε παραδοσιακούς μορφολογικούς χαρακτήρες, μπορούν να δοκιμαστούν (Davis & Nixon, 1992).

Βέβαια, σε όλα αυτά υπάρχει και ο αντίλογος και πολλοί υποστηρίζουν ότι τα μοριακά δεδομένα σε ορισμένες περιπτώσεις δεν είναι κατάλληλα στην εκτίμηση φυλογενέσεων (Caruto, 1997). Οι αμφισβητήσεις για την χρήση μοριακών δεδομένων έχουν να κάνουν με το γεγονός ότι δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός πλησιόμορφων και απώμορφων καταστάσεων, αφού κάθε νουκλεοτιδική θέση έχει μόνο 4 δυνατές καταστάσεις, οι οποίες μπορούν να μεταλλάσσονται χωρίς να υπάρχει πρόβλημα επαναφοράς στην πρότερη κατάσταση. Επιπλέον, η στοιχισή κάθε θέσης με την ομόλογή της μεταξύ διαφορετικών ατόμων είναι συχνά δύσκολη – ειδικά όταν οι αλληλουχίες που θέλουμε να συγκρίνουμε είναι μεγάλου μήκους – και επηρεάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης, ενώ ο αριθμός των ατόμων κάθε πληθυσμού που μπορεί να αναλύσει κανείς είναι περιορισμένος. Το τελικό συμπέρασμα είναι ότι αυτή η διαμάχη τελικά δεν έχει νόημα (Hillis, 1987), γιατί αυτό που ενδιαφέρει έναν συστηματικό, είναι το αν οι εξεταζόμενοι χαρακτήρες έχουν την ποικιλομορφία που απαιτείται για να απαντηθούν τα ερωτήματα που έχει θέσει, αν οι μελετώμενοι χαρακτήρες έχουν μια ξεκάθαρη και ανεξάρτητη γενετική βάση και αν η μεθοδολογία ανάλυσης που ακολουθείται επιτρέπει την διαμόρφωση φυλογενετικών υποθέσεων (Moritz & Hillis, 1996) Έτσι, μέχρι σήμερα η σύγκριση των αλληλουχιών διάφορων γενετικών τόπων έχει εφαρμοστεί σε πολλές μελέτες, ανεξάρτητα από ομάδα οργανισμών ή ταξινομικής βαθμίδας.

1.1.4.1 Επιλογή του κατάλληλου μοριακού δείκτη

Κατά την διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, το πεδίο της μοριακής συστηματικής που χρησιμοποιεί ποικίλα μοριακά δεδομένα για την αποσαφήνιση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ διαφόρων τάξων έχει ραγδαία αναπτυχθεί και εξελιχθεί με την πρόοδο των μοριακών μεθόδων. Οι μοριακοί δείκτες βοηθούν τους ερευνητές να εντοπίσουν χρήσιμα γονίδια που είναι υπεύθυνα για κληρονομούμενα ποιοτικά χαρακτηριστικά, όπως την απόδοση, τη σύσταση και την συγκέντρωση πρωτεϊνών, την ανθεκτικότητα σε ασθένειες κ.α. (Zhu et al., 1999). Οι μοριακοί δείκτες είναι απλοί τρόποι για την ανίχνευση γενετικών διαφορών μεταξύ ατόμων ή πληθυσμών. Βοηθούν στον διαχωρισμό πληθυσμών με τη χρήση διαφόρων μεθόδων όπως τα RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNA), τα ISSRs (Internal Simple Sequence Repeats), τα RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), τα AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), τα SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), τα ESTs (Expressed Sequence Tags), τα STRs (Short Tandem Repeats) τα SSAPs (Sequence Specific Amplification Polymorphisms) και ITS (βάση του οποίου γίνεται αλληλούχηση). Με το πέρασμα του χρόνου, τόσο το κόστος όσο και ο χρόνος για την αλληλούχηση του DNA έχει μειωθεί και έτσι η ITS - PCR θεωρείται μια από τις καλύτερες για την εκτίμηση

γενετικών αποστάσεων συγκεκριμένων γονιδίων μεταξύ των προς μελέτη οργανισμών. Εξαιτίας των διαφορών στον εξελικτικό ρυθμό των προς ανάλυση γονιδίων, δεν είναι εύκολο να γίνουν γενικεύσεις σχετικά με το ποιοι μάρτυρες ή περιοχές γονιδίων είναι χρήσιμοι. Είναι δύσκολο να καθιερωθεί ένα γενικευμένο και ομοιόμορφο πλάνο που να αφορά εφαρμόσιμους και κατάλληλους μοριακούς δείκτες για κάθε επίπεδο της ταξινομικής ιεραρχίας. Μια σειρά από δεδομένα πρέπει πρώτα να ληφθούν υπόψη για την επιλογή του καταλληλότερου δείκτη, αλλιώς θα οδηγηθούμε σε λανθασμένα φυλογενετικά συμπεράσματα. Σύμφωνα με τον (Avise, 2004), οι ιδανικές και επιθυμητές ιδιότητες ενός μοριακού συστήματος κατάλληλου για φυλογενετική ανάλυση συνοψίζονται στα ακόλουθα:

- i. Να αποτελεί διακριτό χαρακτήρα, ευρέως κατανοημένο ώστε να μπορούν να γίνουν συγκρίσεις ομολογίας σε μεγάλο φάσμα οργανισμών
- ii. Να μπορεί να απομονωθεί και να εξεταστεί εύκολα
- iii. Να έχει απλή γενετική δομή χωρίς πολύπλοκα στοιχεία, όπως επαναλαμβανόμενο DNA, μεταθετά στοιχεία, ψευδογονίδια και ιντρόνια
- iv. Να έχει άμεσο τρόπο γενετικής μετάδοσης, χωρίς ανασυνδυασμούς ή άλλες γενετικές αναδιατάξεις
- v. Να παρέχει μια σειρά καταστάσεων ποιοτικού χαρακτήρα, των οποίων οι φυλογενετικές σχέσεις μπορούν να συναχθούν με βάση λογικά φειδωλά κριτήρια και
- vi. Να εξελίσσεται με ραγδαίο ρυθμό ώστε να εμφανίζονται νέες καταστάσεις χαρακτήρων ακόμα και κατά την διάρκεια ζωής ενός είδους, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες μικροεξέλιξης

	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Population
Nuclear rDNA								
SSU (16-18S)	—————				-----			
LSU (23-28S)			—————		-----			
5.8S	—————				-----			
IGS							—————	
ITS						—————	—————	
MtDNA								
rDNA								
12S		—————			-----			
16S					—————	-----		
Protein								
Coding genes								
ND1				-----	—————	—————		
ND2				-----	—————	—————		
COI				-----	—————	—————		
COII				-----	—————	—————		
Cytb				-----	—————	—————		
Control region							—————	
Gene arrangement	-----	—————						

Εικόνα 6 Οι μοριακοί δείκτες στις φυλογενετικές αναλύσεις (Hwang & Kim, 1999)

Για παράδειγμα, στις μελέτες των σχέσεων μεταξύ συγγενικών ειδών, η χρήση κωδικοποιών περιοχών πυρηνικού rRNA (όπως η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα SSU, η μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα LSU και το 5.8s rRNA) μπορούν να αποδειχθούν προβληματικά, ενώ γονίδια που κωδικοποιούν μιτοχονδιακές πρωτεΐνες (όπως Cytb, COI, COII, ND1 και ND2) και οι πυρηνικές rDNA περιοχές ITS και IGS, φαίνεται να παρουσιάζουν σε γενικές γραμμές λιγότερα προβλήματα σε χαμηλά ταξινομικά επίπεδα (Hwang & Kim, 1999), (Εικόνα 6).

1.1.4.2 Γονίδια που χρησιμοποιούνται στην φυλογένεση

1.1.4.3 Παράγοντας επιμήκυνσης EF1-α

Ο παράγοντας επιμήκυνσης EF1-α (Elongation factor EF1-α) είναι μια πρωτεΐνη που υπάρχει σε μεγάλο ποσοστό και έχει βρεθεί να είναι κατάλληλη για φυλογενετικές αναλύσεις. Μαζί με άλλους παράγοντες επιμήκυνσης, είναι υπεύθυνη για την ακριβή μετάφραση και είναι συντηρημένη σε υψηλό βαθμό, γεγονός που βοηθά στην καταλληλότητά της για χρήση σε φυλογενετικές αναλύσεις (Condeelis & Singer, 2005). Πολλά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες συμπεριλαμβανόμενων παραγόντων επιμήκυνσης (Hashimoto & Hasegawa, 1996), V-τύπου ATPσες (Gogarten et al., 1996), γλυκερ-αλδεϋδο-3-φωσφατο αφυδρογονάση (Martin et al., 1993), , α και β- τουμπουλίνη (Keeling & Doolittle, 1996) κ.ά. έχουν τελευταία εξελιχθεί ως δείκτες για φυλογενετική ανάλυση ευκαρυωτικών οργανισμών. Έχει αποδειχθεί (Hasegawa & Kishino, 1994) ότι τέτοια φυλογενετικά δέντρα προερχόμενα από γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μπορεί να είναι λιγότερο ευαίσθητα σε τεχνουργήματα όσον αφορά την σύνθεση βάσεων. Η χρήση της περιοχής EF1-α μαζί με περιοχές πυρηνικού rDNA όπως οι ITS & SSU για φυλογένεση μπορεί να βοηθήσει στην μεγαλύτερη «ευκρίνεια» στα τελικά φυλογενετικά δέντρα. Έχει γίνει σύγκριση της ανάλυση με δεδομένα από την EF1-α περιοχή και την SSU περιοχή του rDNA (Roger et al., 1999) και βρέθηκε ότι η περιοχή αυτή μπορεί να μας δώσει χρήσιμα φυλογενετικά δεδομένα, ωστόσο δεν είναι τόσο ικανοποιητικά όσο αυτά από SSU και ITS rDNA περιοχές καθώς τα συνολικά ζεύγη βάσεων είναι λιγότερα και οι πιθανότητες κάθε κλάδου με μέθοδο επαναδειγματοληψίας (bootstrap) στο φυλογενετικό δέντρο είναι μικρότερες. Ωστόσο, παραμένει ικανό εργαλείο για φυλογενετικές αναλύσεις, και συνήθως τα αποτελέσματα συνδυάζονται με αυτά από αναλύσεις των ITS περιοχών (Niekerk et al., 2004). Συχνά μάλιστα συνδυάζεται και με άλλα γονίδια, όπως της β-τουμπουλίνης, ώστε με πολλών τύπων αλληλουχίες η τελική φυλογενετική ανάλυση να είναι πιο αξιόπιστη (Slippers et al., 2004).

1.1.4.4 Πυρηνικοί γενετικοί τόποι

1.1.4.5 Ριβοσωμικά γονίδια (rDNA)

1.1.4.5.1 Δομή ριβοσωμάτων

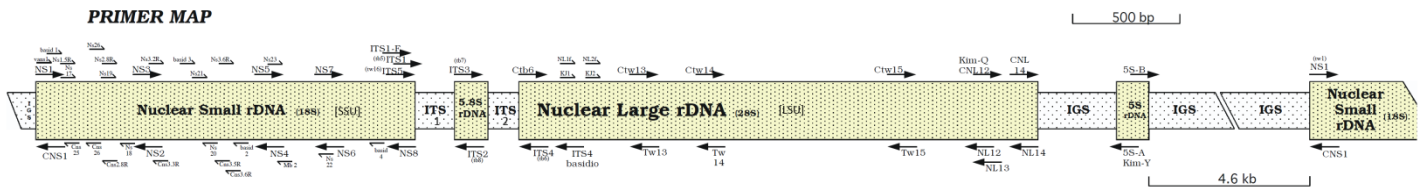
Τα ριβοσώματα είναι σύμπλοκα σωματίδια, που αποτελούνται από 1 έως 3 μόρια RNA και πάνω από 50 πρωτεΐνες. Η δομή τους έχει αναλυθεί με τον συντελεστή καθίζησης (sedimentation coefficient, *s*) των ριβοσωμικών κλασμάτων κατά τη φυγοκέντρωση σε διαβάθμιση πυκνότητας σουκρόζης. Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς το ριβόσωμα έχει δυο υπομονάδες: 30S και 50S που συνολικά αποτελούν την 70S). Αλλά και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με το 80S ριβόσωμα, οι ομάδες είναι δυο: 40S και 60S. Η μεγαλύτερη υπομονάδα και στους προκαρυωτικούς και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς έχει δυο μόρια rRNA, ένα μεγάλο και ένα μικρό. Το μεγάλο έχει S=23 για τους προκαρυωτικούς και S=28 για τους ευκαρυωτικούς, ενώ το μικρό μόριο rRNA έχει S=5.8 και για τους δυο. Η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα έχει ένα απλό μόριο rRNA με S=16 για τους προκαρυωτικούς και S=18 για τους ευκαρυωτικούς. Οι δυο υπομονάδες έχουν διαφορετικούς αριθμούς πρωτεϊνών (Alberts et al., 2002).

Η συσσωμάτωση μιας μεγάλης και μιας μικρής υπομονάδας σχηματίζει ένα ριβόσωμα, με μέγεθος 70S για τους προκαρυωτικούς οργανισμούς και 80s για τους ευκαρυωτικούς, καθώς οι συντελεστές καθίζησης δεν είναι προσθετικοί. Τα ριβοσώματα των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών μοιάζουν περισσότερο με αυτά των προκαρυωτικών (έχουν μέγεθος 70S), παρόλο που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών (Alberts et al., 2002). Το rRNA κωδικοποιείται από γονίδια που βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα στο πυρηνικό DNA των οργανισμών.

Τα αρχικά μόρια rRNA που συνθέτονται είναι μεγαλύτερα από τα ώριμα μόρια rRNA. Αυτό συμβαίνει και στους προκαρυωτικούς και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Τα πρόδρομα μόρια τεμαχίζονται σε μικρότερα με την δράση των νουκλεασών.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς υπάρχουν 2 εσωτερικά μεταγραφόμενα διαστήματα (ITS1, ITS2) που χωρίζουν τα ριβοσωμικά γονίδια 18s, 5.8s, 28s και μια εξωτερικά μεταγραφόμενη περιοχή που βρίσκεται πριν από το 18s. Οι περιοχές αυτές περιέχουν σήματα που καθοδηγούν το rRNA μετάγραφο. Τα γειτονικά αντίγραφα των rDNA μονάδων χωρίζονται από ένα μη μεταγραφόμενο διάστημα (NTS) (Εικόνα 7 και Εικόνα 8). Αυτή η περιοχή περιέχει στοιχεία που δρουν ως ενισχυτές της μεταγραφής (Hillis & Dixon, 1991).

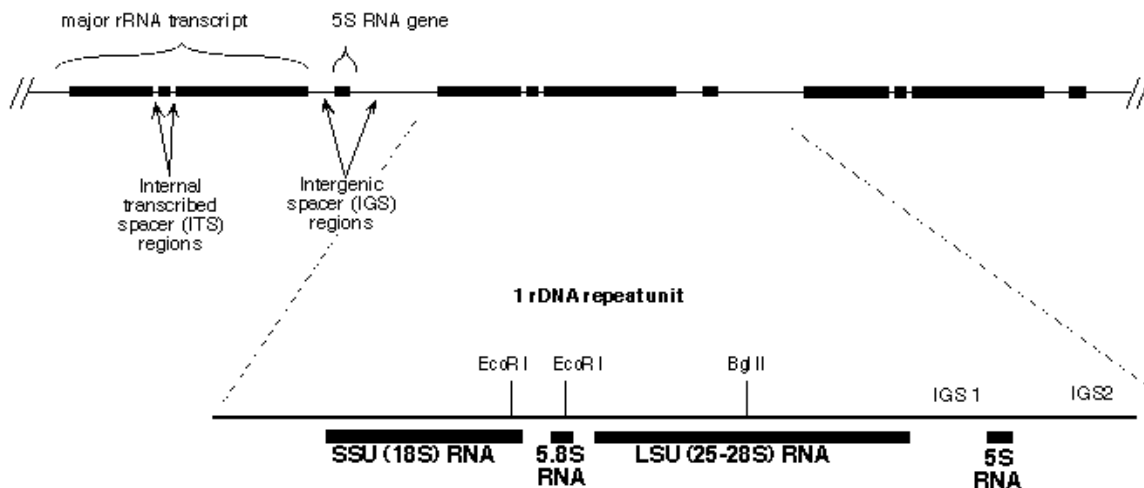
1.1.4.5.2 Ρυθμοί εξέλιξης του rDNA



Εικόνα 7 Χάρτης rDNA με τις θέσεις των κυρίων εκκινητών (από plantbio.berkeley.edu/~bruns/picts/results/map.pdf)

Ένας από τους λόγους που το rDNA είναι χρήσιμος δείκτης για τη φυλογενετική ανάλυση είναι ότι οι διαφορετικές περιοχές των επαναλαμβανόμενων μονάδων rDNA εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς. Επίσης ιδιαίτερα συντηρημένες περιοχές μέσα στα rRNA γονίδια αποδεικνύονται χρήσιμες για την κατασκευή κοινών εκκινητών που μπορούν να πολλαπλασιάσουν περιοχές ενδιαφέροντος από διαφορετικά είδη (Hillis & Dixon, 1991).

Τα πυρηνικά rDNA διαστήματα εξελίσσονται πιο γρήγορα από τις πυρηνικές κωδικές περιοχές, γιατί οι υποκαταστάσεις που μπορεί να συμβούν στα διαστήματα (ITS,ETS) δεν έχουν θανατηφόρες συνέπειες στον οργανισμό και γι' αυτό στις περιοχές αυτές παρατηρείται πιο γρήγορος εξελικτικός ρυθμός. Αντίθετα, μεταλλάξεις στα rRNA γονίδια μπορεί να εμποδίσουν το σχηματισμό ριβοσωμάτων, γεγονός που επιδρά στο μηχανισμό πρωτεϊνοσύνθεσης.



Εικόνα 8 Χάρτης rDNA (από <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>)

Η μικρή ριβοσωμική μονάδα (SSU – 18s) είναι από τις πιο συντηρημένες DNA περιοχές και χρησιμοποιείται για φυλογενετικές σχέσεις σε επίπεδο βασιλείων, τάξεων και φύλων. Ο βαθμός συντηρητικότητας του 5.8s rDNA, που είναι και το μικρότερο τμήμα του, είναι παρόμοιος με αυτόν του SSU rDNA αλλά το μήκος του (150 ζεύγη βάσεων περίπου) είναι μικρό και συνήθως δεν περιέχει ικανοποιητική γενετική πληροφορία. Η μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα (LSU- 28s) είναι μεγαλύτερη

σε μήκος και έχει μεγαλύτερη ποικιλότητα στο ρυθμό εξέλιξης των διαφορετικών τομέων της σε σχέση με την SSU και το μέγεθος των γονιδίων ποικίλει σημαντικά μεταξύ των φύλων. Η φυλογενετική της χρησιμότητα έγκειται σε χαμηλότερα ταξινομικά επίπεδα, όπως αυτά των τάξεων και των οικογενειών. Η δευτεροταγής δομή των μεταβλητών περιοχών των πυρηνικών SSU & LSU rDNA έχει αποδειχθεί χρήσιμο εργαλείο σε ανώτερα ταξινομικά επίπεδα. Μελέτες δείχνουν ότι η πλειονότητα των δευτεροταγών δομών του rRNA είναι ισχυρά συντηρημένα παρά την συνεχή εξέλιξη των αρχικών αλληλουχιών και αυτό γιατί παρατηρείται δημιουργία συμπληρωματικών μεταλλάξεων μεταξύ των ζευγών των νουκλεοτιδίων (Baldridge et al., 1992).

Τα εσωτερικά μεταγραφόμενα διαστήματα (ITS1 και ITS2) χρησιμοποιούνται για την επίλυση ταξινομικών προβλημάτων σε χαμηλότερα επίπεδα όπως γένη και είδη. Τα ITS μεταγραφόμενα διαστήματα διαφέρουν σε αρκετό βαθμό από είδος σε είδος ακόμα και όταν πρόκειται περί γενετικά κοντινών ειδών. Το μέγεθος των IGS είναι πολύ μεγαλύτερο (4-5 kb) αυτού των ITS. Μάλιστα στην περίπτωση των ITS, το μέγεθός του εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία, ενώ προτιμώνται σε σχέση με το IGS για μελέτες, εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους του δεύτερου. Ο κύριος λόγος για την σημαντική διαφοροποίηση των ITS περιοχών μεταξύ ειδών βασίζεται ότι καθώς είναι μη – κωδικοποιούσες, δεν υφίστανται «πίεση πληθυσμού» και έτσι διαφέρουν πολύ παραπάνω από άλλα τμήματα του DNA (Hillis & Dixon, 1991) & (Ciardo et al., 2006).

Καθώς μελετούνταν τα πυρηνικά rRNA γονίδια, έγινε φανερό ότι τα πολλαπλά αντίγραφα δεν εξελίσσονταν ανεξάρτητα αλλά σε συμφωνία μεταξύ τους. Με άλλα λόγια κάθε αντίγραφο από μια rRNA υπομονάδα είναι συνήθως σε μεγάλο βαθμό όμοιο με άλλα αντίγραφα μέσα στο άτομο και στο είδος, παρά το γεγονός ότι οι διαφορές μεταξύ των ειδών συσσωρεύονται γρήγορα σε κάποια μέρη της υπομονάδας. Οι διαφορές μεταξύ των υπομονάδων μέσω στο άτομο έχουν να κάνουν κυρίως με το μήκος των NTS διαστημάτων. Ωστόσο η μικρή ποικιλότητα μεταξύ των rDNA υπομονάδων μέσα στο ίδιο άτομο υποδηλώνει ότι τα πολλαπλά αντίγραφα είναι ομοιογενή τόσο μεταξύ ομόλογων όσο και μεταξύ μη ομόλογων χρωματοσωμάτων που περιέχουν rDNA επαναλήψεις. Αυτό το φαινόμενο της ομοιογένειας καλείται εναρμονισμένη εξέλιξη (concerted evolution). Πολλοί μηχανισμοί φαίνεται να ευθύνονται για το φαινόμενο αυτό, αλλά οι σημαντικότεροι είναι ο άνισος ανασυνδυασμός (unequal crossing over) και η μετατροπή γονιδίων (gene conversion), με τον πρώτο να υποστηρίζεται ως πιο σημαντικός αφού καταλήγει σε διπλασιασμό ή απαλοιφή πολλών επαναλήψεων, ενώ ο δεύτερος επηρεάζει πολύ λίγες επαναλήψεις. Όποιοι και να είναι οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την παρατηρούμενη εξέλιξη του rDNA, αυτό το φαινόμενο μπορεί να έχει πολλές συνέπειες για τις φυλογενετικές μελέτες. Ένας ιδανικός φυλογενετικός δείκτης θα εξελισσόταν μεταξύ των ειδών αλλά θα παρουσίαζε μικρή ενδοειδική ποικιλότητα σε σχέση με την διαειδική ποικιλότητα. Για τα περισσότερα γονίδια που

έχουν μόνο ένα αντίγραφο, η μεγάλου βαθμού ποικιλότητα μεταξύ των ειδών συνήθως συνοδεύεται από μεγάλη ποικιλότητα εντός των ειδών, και έτσι απαιτείται εκτεταμένη δειγματοληψία για να χαρακτηριστεί ένα είδος. Στα rDNA γονίδια παρόλο που υπάρχει ενδοειδική ποικιλότητα, είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με την αναμενόμενη λόγω της εναρμονισμένης εξέλιξης (Hillis & Dixon, 1991).

1.1.5 Περιγραφή της ασθένειας

Στην Ελλάδα αλλά σε άλλες περιοχές με μεσογειακό κλίμα η φιστικιά, που είναι δίοικο φυτό, η νέα βλάστηση αρχίζει να εκπτύσσεται τέλη Μαρτίου και η ανάπτυξή της συμπληρώνεται τέλη Απριλίου με αρχές Μαΐου. Στην Ελλάδα οι κυριότεροι φιστικεώνες είναι στους νομούς Αττικής, Βοιωτίας, Φωκίδας και Φθιώτιδας. Ο έλεγχος του παθογόνου χωρίς μυκητοκτόνα είναι πολύ δύσκολος, καθώς οι απώλειες φτάνουν το 40 – 100%. Η ασθένεια που προκαλεί ο μύκητας στην φιστικιά ονομάζεται «μαρασμός ταξιανθιών και βλαστών» (panicle and shoot blight).



Εικόνα 9 (Αριστερά:) Αρχική προσβολή κλαδίσκων από τον *Botryosphaeria* sp. (Δεξιά) Προσβολή νεαρής ανθοταξίας από τον μύκητα (Michailides & Morgan, 2004)

Η ατελής μορφή του μύκητα που προκαλεί την ασθένεια στη φιστικιά στην Ελλάδα ανήκει στα γένη *Fusicoccum* ή *Neofusicoccum*. Η τέλεια μορφή του μύκητα, που δεν έχει βρεθεί στην φιστικιά αλλά έχει βρεθεί σε άλλους ξενιστές, είναι το είδος *Botryosphaeria dothidea* (Phillips, 2010). Ο μύκητας προκαλεί σημαντικές ζημιές καθώς προσβάλλει ταξιανθίες, ταξικαρπίες, καρπούς, φύλλα και κλάδους. Όταν οι οφθαλμοί προσβληθούν από το μύκητα κατά κανόνα δεν θα αναπτυχθούν (πλήρης μάρανση) είτε θα εκπτυχθούν αλλά το προερχόμενο άνθος ή βλαστός τελικά θα μααραθεί. Τα συμπτώματα εμφανίζονται με την μορφή μαύρων αλλοιώσεων στη βάση των βλαστών, στις ράχες και στο κύριο νεύρο των φύλλων. Οι βλαστοί που προέρχονται από προσβεβλημένους οφθαλμούς αναπτύσσονται σε μικρό βαθμό, γίνονται μαύροι και ξεραίνονται. Κατά τα μέσα με τέλη Μαΐου τα φύλλα σε προσβεβλημένους βλαστούς μαραίνονται σε 3 – 5 ημέρες. Από τα προσβεβλημένα άνθη εκπτύσσονται ταξιανθίες που μαραίνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Οι προσβολές στις ράχες συμβαίνουν στην βάση τους, τα προσβεβλημένα τμήματα μαυρίζουν και οι ράχες καταρρέουν (Εικόνα 9). Ανάλογα της θέσης της βλάβης, αυτές οι προσβολές μπορούν να οδηγήσουν στην κατάρρευση ολόκληρων ταξικαρπιών.

Οι αρχικές προσβολές σε φύλλα προκαλούν επιμήκεις αλλοιώσεις στο κύριο νεύρο φύλλων οι οποίες συχνά επεκτείνονται σε όλο το φύλλο, με αποτέλεσμα να έχουμε πτώση φύλλων κατά τον Ιούλιο. Στα τέλη του θέρους ωστόσο, σε έντονες προσβολές, συχνά έχουμε μεγάλου βαθμού αποφύλλωση. Όταν υπάρχει μόλυνση μίσχων και πτώση φύλλων, το παθογόνο μπορεί να προσβάλλει και τα παλαιότερα φύλλα και να παράγει πυκνίδια, συνήθως στην βάση του κύριου νεύρου. Οι προσβολές στα φύλλα και στο μίσχο τους είναι πολύ συχνές και συχνά είναι τα πρώτα συμπτώματα όταν έχουμε επιδημία της ασθένειας στον σπρωώνα.



Εικόνα 10 Προσβολές σε ταξικαρπίες (αριστερά) και φύλλα (δεξιά)
(Michailides & Morgan, 2004)

Οι προσβολές στους καρπούς παραμένουν λανθάνουσες κάτω από μη κατάλληλες συνθήκες αλλά το καλοκαίρι εμφανίζονται ως μικρές, στρογγυλές, μαύρες κηλίδες. Κάποιες από τις βλάβες αυτές μεγαλώνουν σε εμβασμό, συνήθως στην άκρη του καρπού ή στη βάση και μπορεί να καταλήξουν σε ξήρανση – καταστροφή των καρπών. Συχνά, σε ένα ή περισσότερους καρπούς αυτές οι βλάβες μεγαλώνουν σε μέγεθος, ο καρπός μαυρίζει τελείως και ο μύκητας μετακινείται μέσω του ποδίσκου στην ράχη και τελικά στον κλαδίσκο όπου προκαλούν ελλειπτικά έλκη. Οι περισσότεροι των παραμένων καρπών σε προσβεβλημένες ταξικαρπίες το φθινόπωρο αποκτούν γκρι χρώμα καθώς ο μύκητας παράγει μεγάλο αριθμό πυκνιδίων κάτω από την επιδερμίδα. Καθώς τα πυκνίδια μεγαλώνουν σε μέγεθος, σπρώχνουν την επιδερμίδα η να μεν οποία αποκολλάται από τον από κάτω ιστό αλλά δεν σχίζεται ή παρουσιάζει μικρά σχισίματα δίνοντας έτσι στο επικάρπιο την όψη κόκκων πιπεριού (Εικόνα 11). Πυκνίδια του παθογόνου είναι δυνατόν να βρεθούν επίσης κάτω από την επιδερμίδα στη βάση της προσβεβλημένης ράχης. Αυτή η χαρακτηριστική μορφή παραμένου ιστού χρώματος γκρι έως αργυρό με μικρά μαύρα εξογκώματα θα πρέπει να εξετάζεται όταν γίνεται

έλεγχος για εύρεση του παθογόνου, ιδιαίτερα όταν η περίοδος είναι τέτοια που δεν υπάρχουν άλλα συμπτώματα, όπως κατά την διάρκεια του χειμώνα.

Έπειτα εμφανίζονται πρωτογενείς και δευτερογενείς προσβολές στο έλασμα φύλλων ως μικρές, γωνιώδεις ή στρογγυλές μαύρες βλάβες, ορισμένες από τις οποίες κατά την διάρκεια του θέρους αυξάνουν μέχρι 25mm ή και παραπάνω και γίνονται καστανές. Στα τέλη του θέρους – αρχές φθινοπώρου ενώνονται πολλές μαζί, στεγνώνουν αποκτώντας υπόφαιη απόχρωση και συχνά αναπτύσσονται μαύρα πυκνίδια στο κέντρο τους.



Εικόνα 11 Αριστερά: Είσοδος του μύκητα από τα φακίδια των καρπών. Δεξιά: Πυκνίδια στον καρπό φιστικιάς (Michailides & Morgan, 2004)

Οι πρωτογενείς και δευτερογενείς προσβολές στους καρπούς ξεκινάν επίσης ως μικρές μαύρες βλάβες οι οποίες μεγαλώνουν καλύπτοντας ολόκληρο τον καρπό. Τελικά οι καρποί αποκτούν χαρακτηριστικό κιτρινόγκριζο χρώμα με μικρές μαύρες κουκίδες. Γενικά μόνο ένας με δυο καρποί σε μια ταξικαρπία προσβάλλονται και αναπτύσσουν το χαρακτηριστικό σύμπτωμα και χρώμα ενώ οι υπόλοιποι γίνονται καστανωποί καθώς η ταξικαρπία καταρρέει. Προσβολές στους καρπούς είναι δυνατόν να εμφανιστούν και από νύγματα ημιπτέρων εντόμων ή πουλιών (Michailides & Morgan, 2004).

Οι προσβολές σε κλαδίσκο τρέχοντος έτους αναπτύσσονται σε έλκη. Αυτά τα έλκη είναι ελαφρώς βυθισμένα, αναπτύσσονται γύρω από το σημείο εισόδου του παθογόνου και το μήκος τους ποικίλει από 1 – 10 cm. Σε κάποιες περιπτώσεις τα έλκη είναι δυνατόν να φτάσουν 30 cm μήκος ή και να προσβάλλουν κύριο βραχίονα, ωστόσο αυτό συμβαίνει πολύ σπάνια. Γενικά ο μύκητας δεν προσβάλλει μεγάλους κλάδους ωστόσο έχει παρατηρηθεί και προσβολή κλάδων σε μορφή «βεντάλιας» (προσβολή μόνο ενός τομέα) (Michailides & Morgan, 2004).

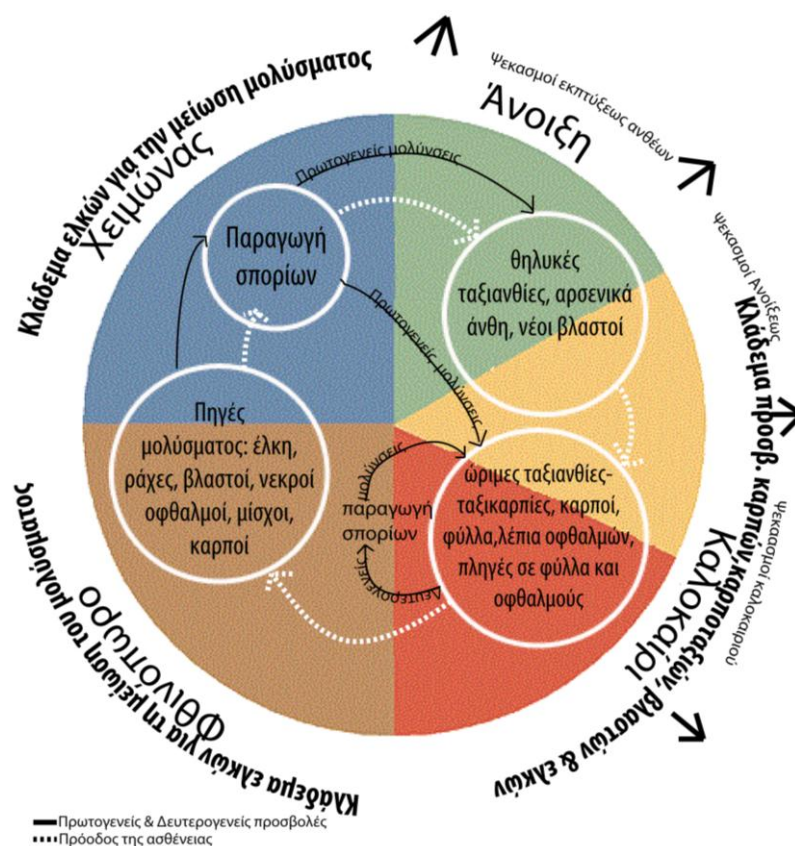
1.1.6 Κύκλος της ασθένειας και επιδημιολογία

1.1.6.1 Διαχειμάζουσες πηγές του παθογόνου

Τα κονίδια που ελευθερώνονται από πυκνίδια τα οποία είναι σε προηγούμενης χρονιάς μαραμένους κλαδίσκους, ράχες, έλκη, οφθαλμοί και μίσχους φύλλων προκαλούν τις πρωτογενείς

μολύνσεις την άνοιξη και αρχές καλοκαιριού (Εικόνα 12). Τα έλκη και οι ράχες παλαιότερης βλάστησης είναι η κύρια πηγή μολύσματος κατά την διάρκεια του χειμώνα και της άνοιξης, ειδικά όταν βρέχει και τα κονίδια διασπείρονται. Κονίδια προερχόμενα από πυκνίδια που είναι σε άλλον ξενιστή μπορούν να είναι πηγή μολύσματος επίσης όταν δεν υπάρχει άλλη προσβολή από το μύκητα στον οπωρώνα. Κατά την διάρκεια του θέρους νέα πυκνίδια παράγονται, πέφτουν στο έδαφος και συμβάλλουν στο προϋπάρχον μόλυσμα για δευτερογενείς προσβολές στο τέλος της περιόδου ανάπτυξης. Εκτός αυτών, έλκη σε βραχίονες παράγουν πυκνίδια μέχρι και για 6 χρόνια (Michailides et al., 1998). Το παθογόνο μπορεί να αναπτυχθεί σε νεκρό ξύλο συμπεριλαμβανόμενων ελκών προερχόμενων από τον μύκητα *Botrytis cinerea*.

1.1.6.2 Διασπορά



Εικόνα 12 Κύκλος της ασθένειας προκαλούμενης από τον μύκητα *Botryosphaeria dothidea* και συνιστώμενες επεμβάσεις αναλόγως της εποχής.

Φθινόπωρο – Χειμώνας: Το παθογόνο διατηρείται σε λανθάνουσα κατάσταση και αναπτύσσεται όταν οι θερμοκρασίες αυξηθούν. Η περίοδος ευαισθησίας είναι από τα μέσα Μαρτίου (πριν την άνθηση) μέχρι τέλη Μαΐου. Οι εφαρμογές γίνονται κατά την περίοδο που οι ιστοί είναι ευαίσθητοι (τμήματα μεταξύ των βελών στο σχήμα) (Michailides & Morgan, 2004)

Τα κονίδια διασπείρονται κυρίως με το νερό της βροχής αλλά και από έντομα, πουλιά και σταγόνες νερού από συστήματα ποτίσματος. Οι βροχές του φθινοπώρου και του χειμώνα διασπείρουν κονίδια σε αμυχές φύλλων και οφθαλμών. Μερικοί οφθαλμοί νεκρώνονται, άλλοι μπορεί να μολυνθούν μερικώς κατά την διάρκεια του καλοκαιριού και του φθινοπώρου και άλλοι παραμένουν υγιείς αλλά γεμάτοι από μόλυσμα το οποίο εξέρχεται από τα υγρά πυκνίδια με τις βροχές το χειμώνα και την άνοιξη. Σε ατμόσφαιρα υψηλής υγρασίας, τα σπόρια εξέρχονται εκ της οστίολης υπό μορφή συνεστραμμένων νημάτων κηρώδους υφής και χρώματος υπόλευκου (Εικόνα

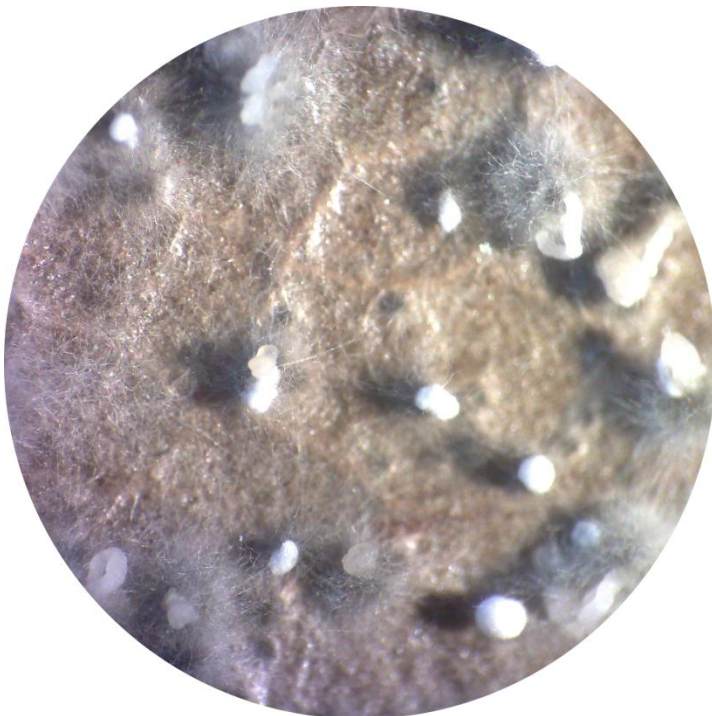
14). Γενικά η βροχή οποιοδήποτε διάστημα του έτους μεταφέρει μόλυσμα στους αναπτυσσόμενους ιστούς (Michailides & Morgan, 2004).



Εικόνα 13 Αριστερά: Προσβολή σε καρπό φιστικιάς από τον μύκητα *Botryosphaeria dothidea* μέσω οπής που έγινε από το ετερόπτερο *Leptoglossus clypealis*
Η προσβολή συνήθως επεκτείνεται μερικά cm πέρα από τον ποδίσκο του καρπού
Δεξιά: έλκος σε κλαδίσκο φιστικιάς από *B. dothidea* (Michailides, 2011)

1.1.6.3 Μόλυνση

Η βροχή παίζει σημαντικό ρόλο στην διασπορά κονιδίων του μύκητα, και οι μολύνσεις γενικά συμβαίνουν τις ημέρες με βροχή και θερμοκρασία πάνω από 10°C. Οι οφθαλμοί μολύνονται μόλις εκπτυχθούν αρχές ανοίξεως ακόμα και αν δεν έχει βρέξει μετά την έκπτυξή τους. Αυτές οι αρχικές μολύνσεις είναι από κονίδια που έχουν πέσει σε μίσχους φύλλων και εξελίσσονται σε ενεργές «πληγές».



Εικόνα 14 Έξοδος κονιδίων σε μορφή σπειραμάτων από πυκνίδια που έχουν αναπτυχθεί πάνω σε φύλλα.
Για την ανάπτυξη των πυκνιδίων σε ευνοϊκές συνθήκες (12h/12h φωτοπερίοδος, θερμοκρασία 28°C και υγρασία κοντά στο 100%) απαιτούνται 7 – 10 ημέρες.

Σε μη ώριμους καρπούς, νεαρά φύλλα και βλαστούς οι μολύνσεις παραμένουν λανθάνουσες και εξελίσσονται αργότερα όταν οι θερμοκρασίες ανέλθουν σε κατάλληλο επίπεδο. Το παθογόνο αναπτύσσεται καλύτερα σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες και έτσι η ασθένεια φτάνει στην μέγιστη ένταση της τέλη άνοιξη προς καλοκαίρι όταν η θερμοκρασία και η υγρασία είναι υψηλές. Οι συχνότητες των λανθανουσών προσβολών και φύλλα και καρπούς έχουν βρεθεί ότι συνδέονται θετικά με την ένταση των συμπτωμάτων σε φύλλα και καρπούς (Ahimera et al., 2003). Οι παράγοντες που προκαλούν την ανάπτυξη δευτερογενών μολύνσεων είναι άγνωστοι, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις θετικής συσχέτισης της αύξησης των υδατανθράκων στους καρπούς με την συχνότητα της ασθένειας (Ntahimpera et al., 2002).

Η περίοδος από την έκπτυξη των ανθέων μέχρι το δέσιμο των καρπών οι οφθαλμοί είναι πολύ επιδεκτικοί στην μόλυνση από τον μύκητα. Οι υφές εισέρχονται μέσω στομάτων σε φύλλα και νεαρούς βλαστούς ή φακιδίων σε καρπούς. Αναλόγως της περιοχής, η περίοδος που οι φιστικιές είναι ευαίσθητες για προσβολή από τον μύκητα ποικίλει από αρχές Μαρτίου (πριν την άνθηση) μέχρι τέλη Μαΐου (αρχή ξυλοποίησης). Η βροχή σε περίοδο που η φιστικιά είναι πολύ ευαίσθητη για προσβολή μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικού βαθμού προσβολές σε καρπούς και ταξικαρπίες. Αυτό μπορεί να αποτελέσει εξήγηση για το γεγονός ότι ψεκασμοί με κατάλληλα μυκητοκτόνα από την αρχή της ανθοφορίας είναι αποτελεσματικότεροι απ' ότι ψεκασμοί νωρίτερα ή αργότερα.

Η άριστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του μύκητα είναι μεταξύ 27 – 30°C σε PDA και για βλάστηση πυκνιδιοσπορίων μεταξύ 24 – 36°C. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες για τη μέγιστη ένταση ασθένειας είναι παρόμοιες με την αυτές της βλάστησης πυκνιδιοσπορίων – 27 – 33°C. Τα πυκνίδια παράγονται περισσότερο σε υψηλές θερμοκρασίες της τάξης των 30°C ενώ σε θερμοκρασίες κάτω των 6°C η παραγωγή τους σταματάει. Η φωτοπερίοδος είναι πολύ σημαντική για την παραγωγή πυκνιδίων, καθώς σε πλήρες σκότος δεν αναπτύσσονται καθόλου (Michailides & Morgan, 2004).

Όσον αφορά την υγρασία, απαιτούνται 9 έως 12 ώρες υψηλής σχετικής υγρασίας για την μόλυνση, την ανάπτυξη συμπτωμάτων και υψηλά επίπεδα ασθένειας. Περίοδοι υψηλής υγρασίας που εναλλάσσονται με περιόδους ξηρασίας οδηγούν σε μεγαλύτερη συχνότητα και ένταση της ασθένειας. Τα πυκνιδιοσπόρια απελευθερώνονται μέσα σε 2 έως 3 ώρες ποτίσματος και ανάλογα του τμήματος του φυτού του έχει το μόλυσμα, είναι δυνατόν τα πυκνίδια να αδειάσουν μέσα σε 10 έως 12 ώρες άρδευσης (Michailides & Morgan, 1993). Εναλλακτικά, απαιτούνται μόλις 6mm βροχόπτωσης για την απελευθέρωση σπορίων του μύκητα από τα πυκνίδια.

Γενικά απαιτείται χρόνος 2 – 3 εβδομάδων για την ξήρανση μιας καρποταξίας από τον μύκητα, ωστόσο όταν η προσβολή είναι στην βάση της ταξικαρπίας είναι δυνατόν πολλές ταξικαρπίες να νεκρωθούν εντός μια εβδομάδας. Οι πληγές είναι δυνατόν να αυξήσουν τις μολύνσεις παρόλο που ο μύκητας μπορεί να εισέλθει από τα στομάτια των φύλλων και τα φακίδια των καρπών. Έχει

παρατηρηθεί σε μικρή συχνότητα είσοδος του μύκητα από φακίδια σε ενός έτους κλαδίσκους ωστόσο αυτές οι μολύνσεις αναπτύσσονται ως βλάβες διαμέτρου 0.5 – 1 cm, δεν επεκτείνονται περαιτέρω και έτσι ο κλαδίσκος δεν βλάπτεται περαιτέρω.

Συνήθως οι τομές κλαδέματος, όταν γίνονται υπό σωστές καιρικές συνθήκες, δεν είναι πηγές μολύσματος, ωστόσο αποτελούν δυνητική θέση εισόδου του παθογόνου άμα βρέξει μετά την πραγματοποίηση του κλαδέματος (Michailides & Morgan, 2004).

1.1.7 Έλεγχος της ασθένειας

Ο έλεγχος της ασθένειας είναι γενικά δύσκολος και γίνεται με συνδυασμό καλλιεργητικών πρακτικών και εφαρμογής μυκητοκτόνων. Στην χώρα μας πολλά μυκητοκτόνα δεν έχουν εγκριθεί ακόμα για τον συγκεκριμένο μύκητα και γίνεται έρευνα για την εύρεση και άλλων κατάλληλων μυκητοκτόνων.

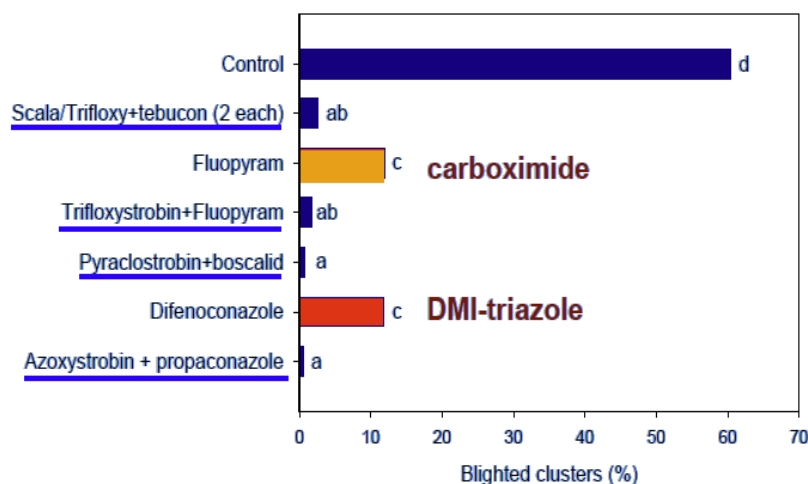
1.1.7.1 Καλλιεργητικές πρακτικές

Δεδομένου ότι ο ασθένειας είναι δύσκολος, μεγάλη σημασία έχουν τα προληπτικά μέτρα, δηλαδή η αποφυγή συσσώρευσης μολύσματος. Επειδή ο μύκητας παράγει πληθώρα πυκνιδίων σε νεκρές ταξιανθίες / ταξικαρπίες και κλαδίσκους αφημένους στα δέντρα ή στο έδαφος, το κλάδεμα και η αφαίρεση των προσβεβλημένων τμημάτων είναι υψηλής σημασίας. Τα κύρια μέτρα προληπτικού ελέγχου είναι τα εξής:

- Χρήση στάγδην ποτίσματος και αποφυγή κατάκλυσης ή τεχνητής βροχής για την αποφυγή υγρασίας πέριξ του λαιμού και σταγόνων που μπορεί να μεταφέρουν κονίδια. Με αυτό τον τρόπο επίσης αποφεύγουμε σε σημαντικό βαθμό την μεταφορά μολύσματος σε άλλα σημεία του οπωρώνα.
- Αν είναι απαραίτητη η χρήση ψεκαστήρων υψηλής πίεσης, η μείωση της γωνίας ή και της πίεσης εκτοξεύσεως του νερού μπορεί να βοηθήσει στην μικρότερη διαβροχή των δέντρων και έτσι μείωση της ποσότητας και της μεταφοράς του μολύσματος. Οι (Michailides & Morgan, 1993) βρήκαν ότι με μείωση της γωνίας των ψεκαστήρων από 23° σε 12° το ποσοστό των προσβεβλημένων ταξιανθιών και ταξικαρπιών μειώθηκε από 90% σε 20%
- Η διατήρηση του οπωρώνα χωρίς ζιζάνια είναι απαραίτητη για μείωση της υγρασίας και ελαχιστοποίηση ημιπτέρων καθώς αυτά με τα νύγματα που προκαλούν στους καρπούς τους μολύνουν και μεταφέρουν το μόλυσμα σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ό τι μόνο με την βροχή και την άρδευση
- Για την αποφυγή συσσώρευσης μολύσματος απαιτείται συνεχής επιτήρηση του οπωρώνα και κλάδεμα των πρώτων μολυσμένων βλαστών, ταξιανθιών και ταξικαρπιών. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό το καλοκαίρι που είναι πιο εύκολη η αναγνώριση των

προσβεβλημένων τμημάτων των δέντρων. Οι κλαδίσκοι που έχουν έλκη θα πρέπει να κόβονται σε βάθος τουλάχιστον 10 cm κάτω από το όριο.

- Επειδή τα πυκνιδιοσπόρια του μύκητα διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα θα πρέπει τα αφαιρούνται όλα τα προσβεβλημένα τμήματα, τα υπολείμματα στο έδαφος και να ακολουθεί κάψιμο
- Μια ελαφρά μείωση της έντασης της ασθένειας μπορεί να προέλθει από την λίπανση των φυσιτικών με διπλάσια ποσότητα Κ ή/ και ο ψεκασμός με 0.1-0.4% Ca(NO₃)₂. Με αυτές τις επεμβάσεις οι διαφορές μπορούν να φτάσουν και 20-30% μικρότερη προσβολή σε σχέση με τον μάρτυρα (Michailides & Brown, 2002).
- Τα δέντρα δεν θα πρέπει να αφήνονται σε κατάσταση έλλειψης νερού διότι αυτό προδιαθέτει τις φυσιτικές για ασθένεια. Σε πειράματα που έχουν έγιναν έχει βρεθεί ότι η μολυσματική ικανότητα του παθογόνου αυξανόταν σε Ψ=0 – 2 MPa (όπου Ψ οσμωτικό δυναμικό) ενώ ξαναμειωνόταν σε Ψ< -2 MPa (Ma et al., 2001)



Εικόνα 15 Απόδοση (ως % προσβεβλημένων ομάδων ταξιανθιών/ ταξικαρπιών) διάφορων μυκητοκτόνων ως προς τη δραστική ουσία. (Morgan et al., 2009)

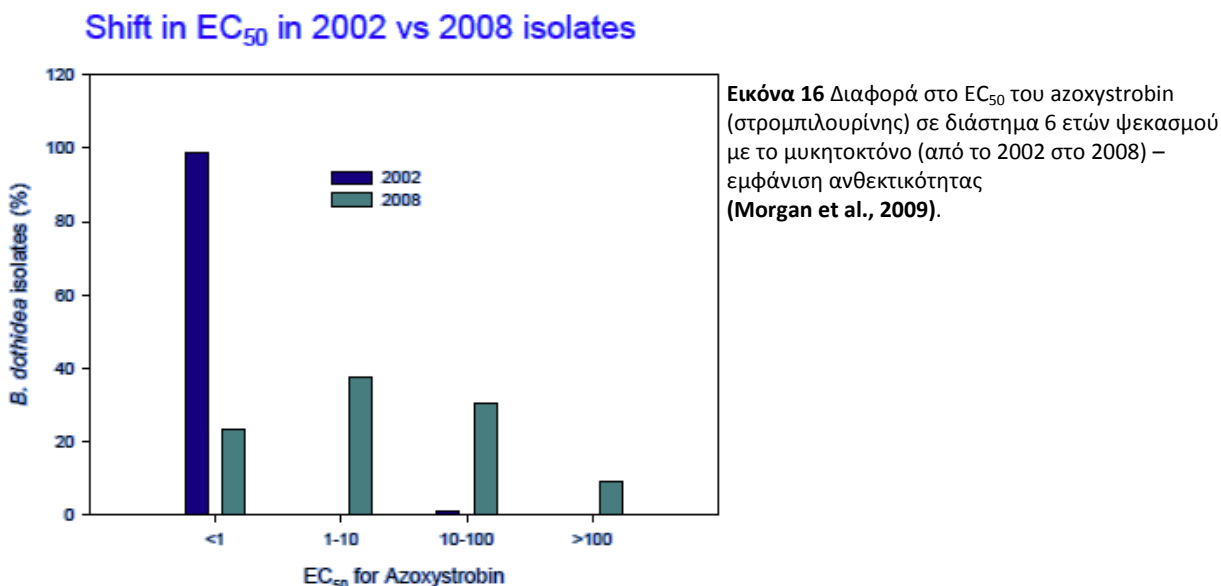
Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι έχει επιχειρηθεί η χρήση βιολογικών σκευασμάτων για τον έλεγχο του μύκητα. Το σημαντικότερο από αυτά είναι το βακτήριο *Paenibacillus lentimorbus*, με το οποίο έχει δείξει αρκετά καλή απόδοση στον έλεγχο διαφόρων μυκήτων, συμπεριλαμβανόμενου του μύκητα *Botryosphaeria* sp. (Chen et al., 2003). Το βακτήριο παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μύκητα και την βλάστηση των σπορίων μέσω μεταβολιτών που παράγει. Από διάφορα μυκητοκτόνα που δοκιμάστηκαν (benomyl, tebuconazole, propiconazole, trifloxystrobin, iprodione και azoxystrobin) μόνο το iprodione είχε μια ανασταλτική επίδραση στο *P. lentimorbus*, η οποία ήταν και προσωρινή.

1.1.7.2 Χρήση μυκητοκτόνων

Η χρήση μυκητοκτόνων είναι πολύ σημαντική για τον έλεγχο του μύκητα, πάντα με συνδυασμό με καλλιεργητικές πρακτικές. Λόγω της φύσεως του παθογόνου οι ψεκασμοί θα πρέπει να γίνονται αρχές ανοίξεως (μέσα ανθήσεως) και το καλοκαίρι. Τα κυριότερα μυκητοκτόνα που έχουν βρεθεί

να έχουν την καλύτερη απόδοση ανήκουν στις εξής ομάδες: παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών – SBIs (tebuconazole, propriconazole), ενώσεις που προκαλούν βλάβες στην δομή των κυτταρικών μεμβρανών (iprodione), στρομπιλουρίνες (azoxystrobin, trifloxystrobin, pyraclostrobin, kresoxim – methyl) οι οποίες δρουν στο σύμπλοκο III της αναπνευστικής αλυσίδας, πυριδινο-καρβοξαμικά (boscalid) τα οποία δρουν στο σύμπλοκο II της αναπνευστικής αλυσίδας και βενζιμιδαζολικά (thiophanate methyl), τα οποία παρεμποδίζουν τον σχηματισμό πυρηνικών μικροσωληνίσκων (Εικόνα 15).

Για την αποφυγή εμφάνισης ανθεκτικότητας και την καλύτερη αποτελεσματικότητα παρασκευάζονται μίγματα μυκητοκτόνων με διαφορετικό τρόπο δράσης. όπως τα: *signum* (boscalid + pyraclostrobin), και *switch* (cyprodinil + fludioxonil) .



Γενικά την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έχουν δείξει σκευάσματα που περιέχουν στρομπιλουρίνες, ωστόσο ένα σημαντικό μειονέκτημα αυτών είναι η σχετικά γρήγορη ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Εικόνα 16). Πειράματα που έγιναν στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ για την αποδοτικότητα του azoxystrobin στον μύκητα *B. dothidea* στη φυσικά έδειξαν ότι μέσα σε 6 χρόνια – από το 2002 μέχρι το 2008 – υπήρξε μεγάλη αλλαγή στο EC₅₀. Πιο συγκεκριμένα, ενώ το 2002 σχεδόν το 100% του πληθυσμού του μύκητα είχε EC₅₀<1μg/ml, το 2008 το 38% του πληθυσμού του μύκητα είχε EC₅₀=1-10μg/ml και το 35% 10-100μg/ml (Morgan et al., 2009). Αυτό μας δείχνει ότι παρόλη την αποτελεσματικότητα των στρομπιλουρινών και των μιγμάτων τους με άλλα μυκητοκτόνα, πρέπει να γίνεται συνεχής καταγραφή του EC₅₀ , της μείωσης της απόδοσης ώστε να μην βρεθούμε σε σημείο να είναι ανθεκτικό μεγάλο ποσοστό των πληθυσμών – φυλών του μύκητα.

1.1.7.3 Ολοκληρωμένη διαχείριση

Η ολοκληρωμένη διαχείριση χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό χρήσης μυκητοκτόνων, κλαδέματος, άρδευσης και ελέγχου ημιπτέρων εντόμων. Οι πολλαπλοί ψεκασμοί με μυκητοκτόνα θεωρείται ως ο συμβατικός τρόπος για τον έλεγχο της ασθένειας. Ωστόσο, κάποιες χρονιές μπορεί να απαιτηθούν μειωμένοι ψεκασμοί, ανάλογα της ποσότητας του μολύσματος και τις συνθήκες περιβάλλοντος.

Σε οπωρώνες που δεν έχει εμφανιστεί ποτέ η συγκεκριμένη ασθένεια, ως προληπτικό μέτρο μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος BUDMON (Παρακολούθηση οφθαλμών -Bud Monitoring) με την οποία ελέγχονται δειγματοληπτικά οφθαλμοί και κάνει μια πρόβλεψη για την ασθένεια, το οποίο είναι σημαντικό ειδικά αν αναμένεται έντονη υγρασία την ερχόμενη άνοιξη. Αργότερα, οι παραγωγοί θα πρέπει να εξετάζουν τα δέντρα για πιθανή προσβολή από το παθογόνο έτσι ώστε να επέμβουν πριν πολλαπλασιαστεί το μόλυσμα (Michailides & Morgan, 2004). Η παρακολούθηση και καταγραφή της υγρασίας των φύλλων (LWM) βοηθά επίσης σε σημαντικό βαθμό για την επιλογή του χρόνου και του πλήθους των ψεκασμών (Michailides, 2011).

Όταν εμφανιστούν συμπτώματα της ασθένειας στον οπωρώνα θα πρέπει οι προσβεβλημένοι κλαδίσκοι και ταξικαρπίες/ ταξιανθίες να κλαδεύονται κατά την διάρκεια του καλοκαιριού για δυο τουλάχιστον χρονιές, κόβοντας και τουλάχιστον 5 – 10 cm υγιούς ιστού. Ο λόγος είναι ότι επειδή οι ξηραμένοι κλαδίσκοι κατά κανόνα θα έχουν και ξηρά φύλλα είναι πιο εύκολη η εύρεσή τους πριν την συγκομιδή. Τα κομμένα υπολείμματα θα πρέπει να απομακρύνονται ή να καίγονται καθώς διάφορα έντομα (κυρίως ημίπτερα) (Michailides et al., 1998) μπορούν να είναι φορείς κονιδίων, γεγονός το οποίο σημαντικό επειδή τα κονίδια παραμένουν βιώσιμα για τουλάχιστον 1.5 χρόνια (Holtz et al., 2001).

Σε περίπτωση βροχόπτωσης δεν θα πρέπει να γίνονται κλαδεύματα καθώς είναι δυνατόν οι τομές να μολυνθούν από σπόρια. Την άνοιξη, στο στάδιο της άνθησης θα πρέπει να γίνει ένας ψεκασμός με βενζιμιδαζολικό μυκητοκτόνο (thiophanate – methyl / *Neotopsin*). Συνήθως απαιτούνται επιπλέον ψεκασμοί το καλοκαίρι, οι οποίοι συνήθως γίνονται με διαφορετικά μυκητοκτόνα.

Σε οπωρώνες που το επίπεδο του μολύσματος είναι υψηλό, εκτός των ανωτέρω εφαρμογών θα πρέπει εκτός από το καλοκαιρινό κλάδεμα να ακολουθεί κλάδεμα την συνήθη περίοδο κλαδέματος που τα δέντρα είναι σε λήθαργο (Ιανουάριο / Φεβρουάριο). Έπειτα, ανεξαρτήτως καιρού, θα πρέπει να γίνεται ένας ψεκασμός με *thiophanate methyl* στην άνθιση. Προσοχή θα πρέπει να δοθεί στους επόμενους ψεκασμούς ώστε να χρησιμοποιηθούν τα μυκητοκτόνα που έχουν την μεγαλύτερη απόδοση στην συνιστώμενη δόση καθώς και στην σωστή εναλλαγή μυκητοκτόνων με διαφορετικής ομάδας. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στις στρομπιλουρίνες, που το σημείο δράσης είναι στο Qo στο μιτοχονδριακό σύμπλοκο III, καθώς με επανειλημμένους ψεκασμούς είναι δυνατόν να εμφανιστεί ανθεκτικότητα. Οι ψεκασμοί στην φιστικιά μετά από τον πρώτο ψεκασμό με

thiophanate methyl θα πρέπει να γίνονται μεταξύ Απριλίου και Ιουλίου, καθώς τότε έχουν την μέγιστη αποτελεσματικότητα (Adaskaveg et al., 2009).

Σε περιπτώσεις που ο οπωρώνας είναι δίπλα σε λιβάδι βοσκής ή δίπλα σε ποτάμι είναι σημαντικό να δοθεί προσοχή για προσβολές από τον μύκητα. Επίσης, δεδομένου των πολλών ξενιστών του μύκητα *B. dothidea*, θα πρέπει όσο είναι δυνατόν στον οπωρώνα να μην υπάρχουν κατάλληλοι ξενιστές του ή φυτά στα οποία να τρέφονται ημίπτερα (όπως βίκος και άλλα ψυχανθή). Ωστόσο, σε περιπτώσεις που υπάρχουν ημίπτερα στον οπωρώνα η χρήση παγίδων περιφερειακά του οπωρώνα και ο ψεκασμός με κατάλληλα εντομοκτόνα είναι μέτρα που μπορούν να παρθούν. Είναι δυνατόν να χρειαστούν ψεκασμοί με εντομοκτόνα τέλη άνοιξης – αρχές καλοκαιριού για την αποφυγή εξάπλωσης της ασθένειας και για ελαχιστοποίηση προδιάθεσης των καρπών προς την ασθένεια (Michailides & Morgan, 2004).

Εκτός των εντόμων, προσοχή θα πρέπει να δοθεί και στην μετάδοση του παθογόνου μέσω των πουλιών. Σε αυτή την περίπτωση μολύνονται κυρίως οι καρποί στους οποίους προκαλούν νύγματα τα πουλιά. Για την αποφυγή των νυγμάτων από τα πουλιά μπορούν να χρησιμοποιηθούν κανονάκια προπανίου για τον εκφοβισμό και την απομάκρυνση των από τον οπωρώνα (Michailides & Morgan, 2004).

Όσον αφορά την χρήση ανθεκτικών ποικιλιών, μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί κάποιες με καλό επίπεδο ανθεκτικότητας στον μύκητα *Botryosphaeria dothidea* αλλά και άλλους μύκητες, με τις κυριότερες να είναι οι *Sfax, Lassen* (Michailides et al., 2000) και *pete 1* (Petersen, 2007).. Σύμφωνα με δοκιμές που έγιναν (Petersen, 2007), η ποικιλία *Pete 1*, συγκριτικά με την ποικιλία *Kerman*, έχει χαρακτηριστεί ως «υψηλής ανθεκτικότητας» στον μύκητα *Botryosphaeria dothidea*, η περίοδος ανθοφορίας της είναι πιο νωρίς την άνοιξη και έχει υψηλό ποσοστό καρπών (90%+).

1.2 Σκοποί της παρούσας μελέτης

Οι σκοποί της εργασίας ήταν:

- i. Η μοριακή διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων του καμαροσπορίου της φιστικιάς. Για τη μελέτη που διεξήχθη χρησιμοποιήθηκαν μοριακοί δείκτες από 10 απομονώσεις του μύκητα *Botryosphaeria* sp., οι οποίες προήλθαν από 5 διαφορετικούς ξενιστές: φιστικιά, σοφόρα, ελιά, αμπέλι και δαμασκηλιά από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.
Η πειραματική προσέγγιση περιελάμβανε τον πολλαπλασιασμό αλληλουχιών με την μέθοδο αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR), τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τους, και τη φυλογενετική ανάλυσή τους.
- ii. Τη διερεύνηση της παθογένειας απομονώσεων του μύκητα σε τεχνητές μολύνσεις φύλλων. Για την διερεύνηση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 9 απομονώσεις του μύκητα *Botryosphaeria* sp. από 4 διαφορετικούς ξενιστές: φιστικιά, σοφόρα, ελιά και αμπέλι από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.
Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν αποκομμένα φύλλα φιστικιάς σε 3 επαναλήψεις και υπολογίστηκε το % εμβαδό και τέλος το σχετικό AUDPC για κάθε απομόνωση
- iii. Την διερεύνηση της χρήσης μυκητοκτόνων για την αντιμετώπιση του καμαροσπορίου της φιστικιάς. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερεις απομονώσεις από φύλλα φιστικιάς κάθε μια από δέντρο που είχε ψεκαστεί με το αντίστοιχο μυκητοκτόνο συν μια που από δέντρο που δεν είχε ψεκαστεί και μετρήθηκαν οι διάμετροι ανάπτυξης για την κάθε απομόνωση ως προς τον μάρτυρα.

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βιολογικό υλικό

2.1.1 Απομονώσεις

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 64 απομονώσεις: 48 από φιστικά, 6 από ελιά, 4 από σοφόρα, 3 από αμπέλι, 1 από δαμασκηλιά, 1 από ροδιά και 1 από σεκόια.

Πίνακας 2-1

ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	ΞΕΝΙΣΤΗΣ	ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΟΥ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΗΜ/ΝΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ
1	Σοφόρα	Ταξικαρπία	ΓΠΑ, Αττική	11/22/2009
2	Σοφόρα	Καρποί	ΓΠΑ, Αττική	10/13/2009
5	Σοφόρα	Ταξικαρπία	ΓΠΑ, Αττική	12/26/2009
6	Σοφόρα	Καρποί	ΓΠΑ, Αττική	12/17/2009
23	Φιστικά	Καρποί	ΓΠΑ, Αττική	12/26/2009
26	Φιστικά	Ταξικαρπία	ΓΠΑ, Αττική	11/22/2009
27	Φιστικά	Καρποί	ΓΠΑ, Αττική	10/14/2009
28	Φιστικά	Φύλλα	ΓΠΑ, Αττική	10/14/2009
29	Φιστικά	Ταξικαρπία	Μώλος Φθιώτιδας	10/15/2009
30	Φιστικά	Καρποί	Μώλος Φθιώτιδας	10/15/2009
32	Φιστικά	Ταξικαρπία	Μάκρη Φθιώτιδας	10/15/2009
33	Φιστικά	Καρποί	Μάκρη Φθιώτιδας	10/15/2009
35	Ελιά	Καρποί	Κηφισιά - ΙΓΕ (Άλσος Συγγρού)	10/20/2009
36-1	Φιστικά	Βλαστός	Μάκρη Φθιώτιδας	10/15/2009
36-2	Φιστικά	Βλαστός	Μάκρη Φθιώτιδας	10/15/2009
36-3	Φιστικά	Βλαστός	Μάκρη Φθιώτιδας	10/15/2009
36-4	Φιστικά	Βλαστός	Μάκρη Φθιώτιδας	10/15/2009
37	Φιστικά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	10/15/2009
40	Ελιά	Καρποί	Πεντέλη, Αττική	11/1/2009
41-A	Δαμασκηλιά	Κορμός	Πεντέλη, Αττική	11/1/2009
45	Ελιά	Καρποί	Πεντέλη, Αττική	10/20/2009

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

46	Ελιά	Καρποί	Πεντέλη, Αττική	10/20/2009
47	Φιστικιά	Φύλλα	Μώλος Φθιώτιδας	8/20/2006
48	Φιστικιά	Φύλλα	Μακρακώμη Φθιώτιδας	8/20/2006
49p	Αμπέλι	Κληματίδα	Πύργος Ηλείας	8/20/2006
50	Αμπέλι	Κληματίδα	Αλίαρτος Βοιωτίας	8/20/2006
51	Φιστικιά	Βλαστός	Βόλος	8/20/2006
52	Αμπέλι	Κληματίδα	Αλίαρτος Βοιωτίας	8/20/2006
54I	Φιστικιά	Ταξιανθία	Μακρακώμη Φθιώτιδας	8/20/2006
55	Φιστικιά	Φύλλα	Θήβα	8/20/2006
57	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	8/20/2006
58	Φιστικιά	Φύλλα	Αυλώνα, Εύβοια	8/20/2006
59I	Φιστικιά	Καρποί	Μακρακώμη Φθιώτιδας	8/20/2006
62p	Ελιά	Καρποί	Αγρίνιο	8/20/2006
66	Ελιά	Καρποί	Αγρίνιο	8/20/2006
68	Φιστικιά	Φύλλα	Λαμία Φθιώτιδας	8/20/2006
69	Φιστικιά	Φύλλα	Αυλώνα, Εύβοια	8/20/2006
70	Φιστικιά	Φύλλα	Μώλος Φθιώτιδας	8/20/2006
71	Σεκόϊα	Κορμός		8/20/2006
73	Ροδιά	Κορμός	Θράκη - Δράμα	5/26/2010
74	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/3/2010
75	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
76	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
77	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
78	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
79	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
80	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
81	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
82	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
83	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
84	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010

85	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
86	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
87	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
88	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
89	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
90	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
91	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
92	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
93	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
94	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
95	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
96	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010
97	Φιστικιά	Φύλλα	Μάκρη Φθιώτιδας	6/18/2010

2.1.2 Θρεπτικά υλικά και διαδικασίες απομόνωσης και ανάπτυξης του μύκητα

Χρησιμοποιήθηκαν τρία θρεπτικά υλικά : το Potato Dextrose Agar (PDA) για την ανάπτυξη του μύκητα και τα Littman Oxgall Agar , M-Green yeast & mold broth για την παραγωγή μονόσπορων αποικιών.

2.1.2.1 Υλικό Potato Dextrose Agar

Το θρεπτικό υλικό PDA χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του μύκητα, την παραγωγή μυκηλίου για εξαγωγή DNA και την διερεύνηση της χρήσης των πιο κατάλληλων μυκητοκτόνων για την αντιμετώπιση της ασθένειας.

Για την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή μυκηλίου για εξαγωγή DNA παρασκευάστηκε PDA με χρήση εκχυλίσματος πατάτας, D-γλυκόζης και Agar στις εξής αναλογίες:

Πίνακας 2-2

Ανά L υλικού:	ποσότητα
1)εκχύλισμα πατάτας	200g πατάτας
2)D-γλυκόζη	20g
3)Άγαρ	20g
4)απεσταγμένο νερό	Μέχρι όγκου 1 L

Για την διερεύνηση της χρήσης των πιο κατάλληλων μυκητοκτόνων χρησιμοποιήθηκε έτοιμο PDA της εταιρίας Merck. Η αναλογία ήταν 39g PDA/ 1 L νερό. Στην δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε έτοιμο PDA για να μην υπάρχουν διακυμάνσεις στην ανάπτυξη του μύκητα από τρυβλίο σε τρυβλίο που οφείλονται στη μη σταθερή σύσταση του PDA.

2.1.2.2 Υλικό M-Green Yeast & Mold broth

Το υλικό M-Green Yeast & Mold broth της εταιρίας Difco χρησιμοποιήθηκε στην διαδικασία απομόνωσης του μύκητα. Συστατικά υλικού:

Πίνακας 2-3

Ανά L υλικού:	Ποσότητα
1)εκχύλισμα ζύμης	9g
2)D - γλυκόζη	50g
3)πεπτόνη C	5g
4)πεπτόνη A	5g
5)θειικό μαγνήσιο	2.1g
6)φωσφορικό κάλιο	2g
7)διαστάση	0.05g
8)θειαμίνη	0.05g
9)δείκτης: πράσινο της βρομοκρεζόλης	26mg
10)απεσταγμένο νερό	Μέχρι όγκου 1 L

Το υλικό αυτό χρησιμοποιήθηκε στην λειοτρίβιση πυκνιδίων και μυκηλίου σε βαθμό που τα σπόρια να απελευθερωθούν από τα πυκνίδια και το μυκήλιο να κοπεί σε μικρά τμήματα. Ένας άλλος λόγος για την χρήση του συγκεκριμένου υλικού είναι η ικανότητά του να διατηρεί ζωντανό το μύκητα – ειδικά στην περίπτωση που παραμένει το μυκήλιο στο υλικό για κάποιο χρονικό διάστημα. Το τελικό pH του υλικού είναι 4.6 ± 0.2 και σε περίπτωση που ο μύκητας παράγει οξύ παρατηρείται αλλαγή χρώματος από πράσινο σε κίτρινο. Στις περισσότερες απομονώσεις παρατηρήθηκε η αλλαγή χρώματος, γεγονός που σημαίνει ότι παρήχθηκε οξύ.

2.1.2.3 Υλικό Littman Oxgall Agar

Το υλικό Littman Oxgall Agar της εταιρίας Difco χρησιμοποιήθηκε στην παραγωγή μονόσπορων αποικιών με γραμμική διασπορά με την χρήση γυάλινου στείλεου. Συστατικά υλικού:

Πίνακας 2-4

Ανά L υλικού:	ποσότητα
1)πεπτόνη	10g
2)D - γλυκόζη	10g
3)χολή βοός	15g
4)crystal-violet	0.01g
5)βακτηριολογικό άγαρ	20g
6)στρεπτομυκίνη	30mg
7)απεσταγμένο νερό	Μέχρι όγκου 1L

Το υλικό αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των καλλιέργειών από άλλους μύκητες και βακτήρια. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό του υλικού και ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκε είναι η ιδιότητά του να επιβραδύνει και να περιορίζει την ανάπτυξη των διαφόρων αποικιών. Αυτό το χαρακτηριστικό του υλικού επέτρεψε τον διαχωρισμό των αποικιών και έτσι την επιλογή μονόσπορων αποικιών του μύκητα.

- Η πεπτόνη προσφέρει άζωτο, αμινοξέα και άνθρακα. Η D - γλυκόζη ως κύριο θρεπτικό στοιχείο για τους μύκητες και τα βακτήρια είναι επίσης μια πηγή άνθρακα.
- Το oxgall (χολή βοός) επιβραδύνει και περιορίζει σε μέγεθος την ανάπτυξη των μυκήτων, και είναι ένα από τα σημαντικότερα συστατικά του θρεπτικού υλικού.
- Το crystal violet και η στρεπτομυκίνη έχουν επιλεκτική βακτηριοστατική δράση, πράγμα το οποίο βοήθησε αρκετά στον καθαρισμό της καλλιέργειας.

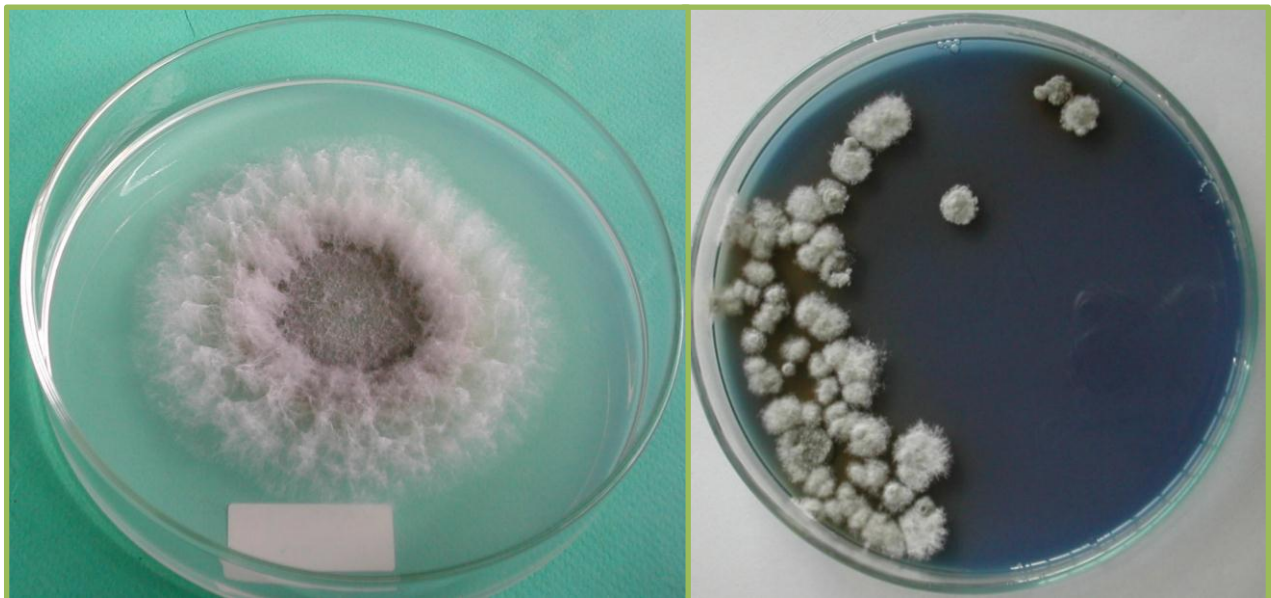
Η ανάπτυξη του μύκητα σε αυτό το υλικό έγινε σε τρυβλία petri διαμέτρου 15cm σε συνθήκες θερμοκρασίας 25°C και φωτοπερίοδου 12h φως/12h σκοτάδι. Η μεταφορά των μονόσπορων αποικιών σε τρυβλία με PDA έγινε στις 10 ημέρες μετά την απομόνωση. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε μακροσκοπικός και μικροσκοπικός έλεγχος ώστε να εξεταστεί αν οι μονόσπορες αποικίες ανήκουν στο γένος *Botryosphaeria* ή όχι.

Η ανάπτυξη του μύκητα σε αυτό το υλικό δεν διάστημα δυο εβδομάδων δεν υπερέβη τα 2cm την στιγμή που σε υλικό PDA το μυκήλιο είχε φτάσει τα τοιχώματα του τρυβλίου. Η ανάπτυξη των αποικιών – μυκήτων και βακτηρίων – στο υλικό Littman Oxgall Agar ήταν αρκετά συνεπτυγμένη, ωστόσο τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά ήταν ίδια με αυτά στο PDA. Χαρακτηριστικό είναι επίσης το

γεγονός ότι υπήρχαν απομονώσεις που στο PDA εμφανιζόταν ως μόνο του συγκεκριμένου μύκητα, στο υλικό Littman Oxgall Agar εμφανιζόταν και αποικίες άλλων μυκήτων.

Για την απομόνωση του μύκητα από τα φυτικά δείγματα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. επιφανειακή απολύμανση με αιθανόλη
2. αποκοπή προσβεβλημένης περιοχής φυτικού ιστού
3. λειοτρίβιση σε ιγδίο που περιέχει M-Green yeast & mold broth
4. Μεταφορά σταγόνας και γραμμική διασπορά με γυάλινο στείλειό σε τρυβλίο Littman Oxgall Agar
5. Μεταφορά μονόσπορης αποικίας σε τρυβλίο με Potato Dextrose Agar



Εικόνα 17 Ανάπτυξη μυκηλίου *Botryosphaeria dothidea* σε υλικό PDA (αριστερά) και Littman Oxgall Agar (δεξιά)

2.1.3 Καλλιέργεια, διατήρηση και ανανέωση των απομονώσεων

Η καλλιέργεια των απομονώσεων πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία Petri διαμέτρου 8cm με υλικό σε συνθήκες θερμοκρασίας 26°C και φωτοπερίοδου 12h φως/12h σκοτάδι. Η διατήρηση των απομονώσεων γινόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με κεκλιμένο PDA σε θερμοκρασία 4°C.

2.1.4 Παραγωγή βιομάζας για εξαγωγή DNA

Η παραγωγή βιομάζας (μυκηλίου και πυκνιδίων) του μύκητα για εξαγωγή DNA έγινε σε τρυβλία με υλικό PDA. Μετά από διάστημα 20 ημερών σε 26°C έγινε απόξεση του μυκηλίου, τοποθέτηση σε erperdorf tubes των 1.5ml και ακολούθησε λυοφιλίωση στους -50°C για 24h. Ακολούθησε η εξαγωγή DNA με τη μέθοδο Lee & Taylor ή την εξαγωγή DNA με μικροκύματα.

Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο είναι κυρίως ότι η εξαγωγή με μικροκύματα είναι πολύ πιο εύκολη από την εξαγωγή με την μέθοδο *Lee & Taylor*.

2.1.4.1 Εξαγωγή DNA με την μέθοδο *Lee & Taylor*

Αρχικά γίνεται κονιορτοποίηση 30-60mg λυοφιλιωμένου μυκηλίου με χρήση υγρού αζώτου και υγδίου. Έπειτα προστίθεται στους σωληνίσκους erpendorf 700μl ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (50mM Tris-HCl pH 7.2, 50mM EDTA, 3% απορρυπαντικό SDS, 1% β-μερκαπτοαιθανόλη) και αναδεύονται καλά σε vortex. Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο 65°C για 1h με περιοδική ανάδευση κάθε 15min. Έπειτα προστίθενται ίσοι όγκοι (700μl) φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1, ακολουθεί καλή ομογενοποίηση σε vortex και φυγοκέντριση στις 12000rpm για 15min. Αμέσως μετά μεταφέρεται η υπερκείμενη (υδατική) φάση σε νέους σωληνίσκους μετρώντας τον όγκο που μεταφέρθηκε και επαναλαμβάνεται η διαδικασία από την προσθήκη φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης. Στο επόμενο στάδιο προστίθεται 10μl NaOAc 3M pH=5.2 και 0.54x όγκου ισοπροπανόλη και αναδεύεται ελαφρά μέχρι να φανεί το νήμα του DNA.

Μετά από 12-24 ώρες παραμονή στους 4°C για την κατακρήμνιση του DNA οι σωληνίσκοι φυγοκεντρούνται στις 12000rpm για 10min και αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό. Έπειτα προστίθενται 500μl παγωμένης 70% αιθανόλης, φυγοκέντριση στις 12000rpm για 3min και αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό. Η πλύση με αιθανόλη επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά και ακολουθεί μια τελική φυγοκέντριση στις 12000rpm για μερικά sec. Έπειτα οι σωληνίσκοι τοποθετούνται ανοικτοί σε θάλαμο 37°C για 10min περίπου ώστε να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη. Τέλος προστίθενται 50μl TE (10mM Tris-HCl, 0.1M EDTA + RNAση 100ng/ml). Ακολουθεί ελαφρά ανακίνηση μέχρι να γίνει πλήρης αναδιάλυση του DNA και παραμονή για λίγη ώρα (10-30min) στον πάγκο για να δράσει η RNAση (Lee & Taylor, 1990).

2.1.4.2 Εξαγωγή DNA με μικροκύματα

Η εξαγωγή του DNA με μικροκύματα είναι μια εναλλακτική και πολύ πιο σύντομη μέθοδος σε σχέση με την μέθοδο των *Lee & Taylor*. Η διαδικασία έχει ως εξής:

Σε σωληνίσκους erpendorf 1.5ml προστίθενται 5-10mg μυκηλίου και 50μl TE που έχει αποστειρωθεί μέσω φίλτρου. Τα δείγματα ομογενοποιούνται όσο το δυνατόν με το tip της πιπέτας και ακολουθεί ανακίνηση σε vortex και φυγοκέντριση για λίγα sec. Έπειτα οι σωληνίσκοι τοποθετούνται κλειστοί στο φούρνο μικροκυμάτων για 40sec στην μέγιστη ένταση. Μετά τοποθετούνται για 5min στους 28°C και φυγοκεντρούνται για 10min στις 13000rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέους σωληνίσκους και προστίθενται Rnase (5mg/ml). Τέλος τοποθετούνται για 10min σε 68°C και είναι έτοιμοι για άμεση χρήση σε PCR ή αποθήκευση σε κατάψυξη -20°C (Tendulkar et al., 2003).

2.1.5 Μέτρηση νουκλεϊκών οξέων –DNA

Η μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA (σε ng/μl) πραγματοποιήθηκε σε Nanodrop nd-1000 spectrophotometer της εταιρίας Thermo Scientific. Το κυριότερο προτέρημα της μεθόδου αυτής είναι ότι δεν χρειάζεται καθόλου αραιώση του δείγματος και δίνει ακριβείς μετρήσεις.

2.1.6 Παραγωγή εναιωρήματος μυκηλίου για τεχνητές μολύνσεις φύλλων και δοκιμών ευαισθησίας σε μυκητοκτόνα

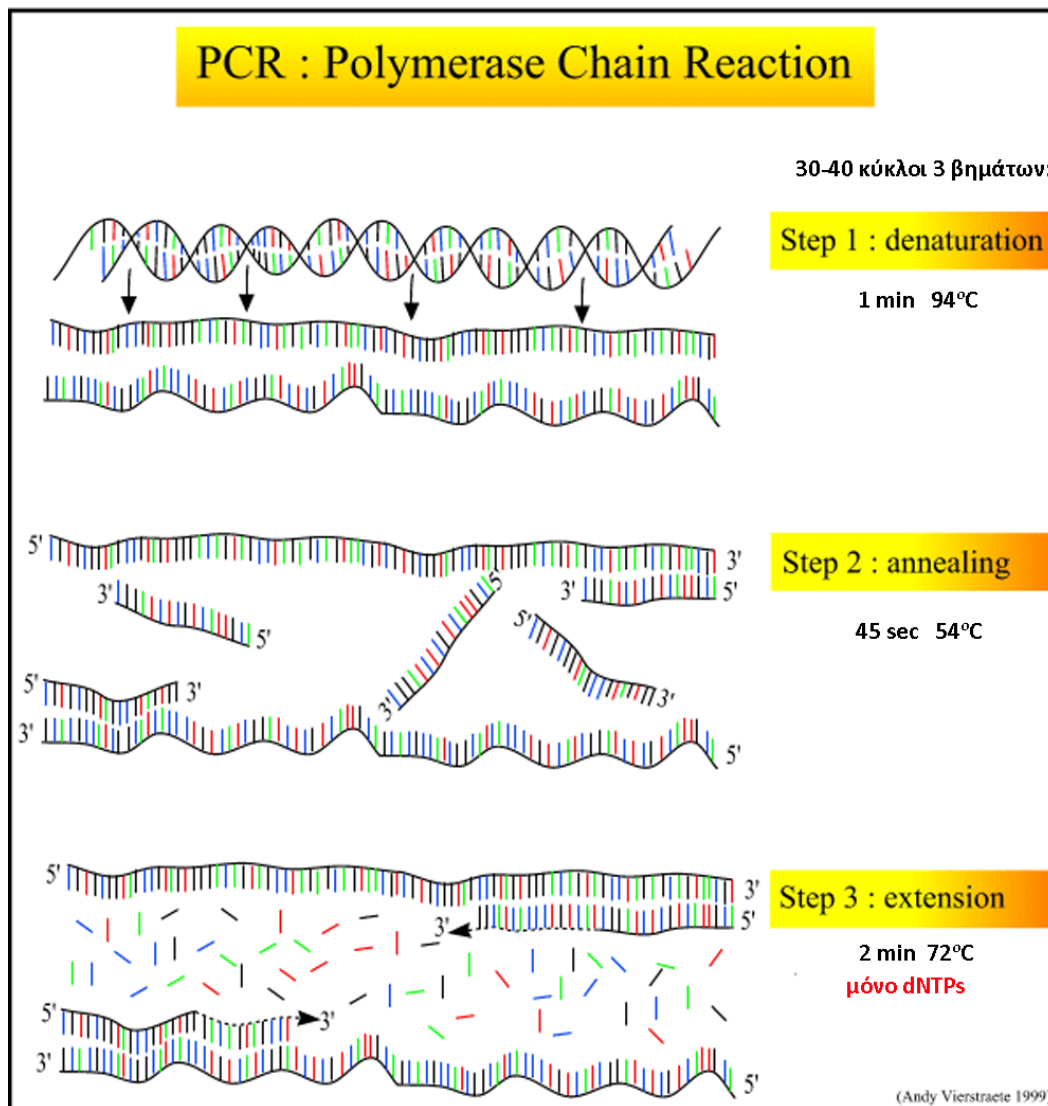
Για καλύτερη αποτελεσματικότητα των τεχνητών μολύνσεων φύλλων και δοκιμών ευαισθησίας σε μυκητοκτόνα αντί για δίσκο μυκηλίου επιχειρήθηκε η παρασκευή εναιωρήματος μυκηλίου. Από τρυβλίο PDA με αποικία καμαροσπορίου γίνεται απόξεση επιφανειακού μυκηλίου, έπειτα τοποθέτηση σε erpendorf σωληνίσκο όγκου 1.5ml, προσθήκη 600μl 20% γλυκερόλη και 100μl αποστειρωμένης άμμου κοκκομετρίας 100-300μm. Ακολούθως γινόταν τρίψιμο του μυκηλίου με πλαστικό γουδοχέρι (pestle) μέγιστου πλάτους 3mm. Τέλος, ακολούθησε μετάγγιση του εναιωρήματος μυκηλίου σε άλλο σωληνίσκο erpendorf προσέχοντας να μην μεταφερθεί η άμμος. Λόγω του μεγέθους της άμμου το μυκήλιο να μην κοβόταν σε τμήματα πολύ μικρού μήκους αλλά δεν καταστρεφόταν λόγω του μικρού πλάτους του (<5μm). Πραγματοποιήθηκε μικροσκοπικός έλεγχος του τριμμένου μυκηλίου και βρέθηκε ότι τα τμήματα ήταν μήκους 10-50μm. Σε έλεγχο που έγινε σε υλικό *Littman Oxgall Agar* αναπτύχθηκαν πάνω από 50 αποικίες από κάθε σταγόνα εναιωρήματος. Η διατήρηση του υλικού έγινε σε θερμοκρασία 4°C και ακόμα και μετά την πάροδο μηνών δεν μειώθηκε η ικανότητα ανάπτυξης των τμημάτων μυκηλίου. Η μεταφορά σταγόνας εναιωρήματος μυκηλίου σε τρυβλίο ή για τεχνητή μόλυνση γίνεται με γυάλινο στυλεό με σφαιροειδή άκρη πλάτους 2mm. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η τοποθέτηση μικροσκοπικής σταγόνας εναιωρήματος μυκηλίου σε σχέση με την αποκοπή και μεταφορά δίσκου μυκηλίου. Σε δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν το μέγεθος του αναπτυσσόμενου μυκηλίου ήταν ακριβώς το ίδιο κάθε φορά.

2.2 Μοριακός χαρακτηρισμός

2.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για να συνθέσει και να ενισχύσει ένα τμήμα DNA (DNA στόχος) με στόχο να παράγει αρκετή ποσότητα DNA που να είναι επαρκώς ανιχνεύσιμη. Η μέθοδος πολλαπλασιάζει εκθετικά το επιθυμητό κομμάτι του DNA, in vitro, χωρίς να απαιτείται ζωντανός οργανισμός (όπως το *E. coli*), αλλά με πολυμεράση. Για να χρησιμοποιηθεί η PCR, πρέπει να είναι γνωστή η ακριβής αλληλουχία που βρίσκεται εκατέρωθεν του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί (μπορεί να είναι ένα γονίδιο ή απλά μια αλληλουχία). Η μέθοδος εφευρέθηκε από τον Kary Mullis το 1983.

Ο DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο (“εκμαγείο”, template) DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια – συνήθως 15-30 ζεύγη βάσεων (base pairs), οι λεγόμενοι εκκινητές (primers), που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις αλληλουχίες των άκρων του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς την μονόκλωνη αλυσίδα του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.



Εικόνα 18 Τα τρία στάδια της αντίδρασης PCR (Vierstraete, 1999)

Το πρώτο βήμα της PCR είναι η μετουσίωση (denaturation) του DNA στόχου κατά την οποία οι δεσμοί υδρογόνου DNA-DNA διασπώνται και έτσι από δίκλωνο (double - stranded) DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο (single – stranded) που είναι επιδεκτικό στους εκκινητές. Στη συνέχεια (δεύτερο βήμα), τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία καλούνται εκκινητικά μόρια, (primers) «υβριδίζονται» (annealing), με σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, στις δύο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA. Στο τρίτο βήμα, με την δράση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων (πολυμερισμός) στο

3' άκρο κάθε εκκινητικού μορίου (primer) και η αλυσίδα επεκτείνεται (extension) (Εικόνα 18). Και για τους δύο εκκινητές η επιμήκυνση γίνεται με κατεύθυνση 5' → 3' απλώς ο ένας από τους δυο εκκινητές ενώνεται στο συμπληρωματικό νήμα του DNA. Έτσι σχηματίζονται δύο καινούριες αλυσίδες ή κλώνοι DNA, συμπληρωματικές προς αυτές των δύο κλώνων του προτύπου DNA, με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου. Η σειρά των τριών βημάτων: μετουσίωσης (denaturation), υβριδισμού (annealing) και επέκτασης των εκκινητών με την σύνθεση καινούριου κλώνου (extension), αποτελούν ένα κύκλο της αντίδρασης PCR (Εικόνα 18) (Μαρκουλάτος & Β, 1996).

Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μίγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται:

- DNA στόχος (template)
- Εκκινητές (primers) (οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί στα άκρα 3' και 5' του DNA που είναι να πολλαπλασιαστεί)

- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) (τα οποία θα αποτελέσουν δομικά συστατικά των νέων αλυσίδων DNA). Τα dNTPs αποτελούνται από τα dATP, dCTP, dGTP και dTTP, καθένα από τα οποία είναι σε ίση συγκέντρωση.

- Ένζυμο Taq ή άλλη θερμοάντοχη πολυμεράση
- Ιόντα Mg^{2+} απαραίτητα για την ενζυμική δράση
- Κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) pH 8.2 για την δράση του ενζύμου (σε αρκετές περιπτώσεις συμπεριλαμβάνει τα ιόντα Mg^{2+})

(Μαρκουλάτος & Β, 1996)

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA στόχου είναι πλέον 4 και αποτελούν τα πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA στο 2ο κύκλο (Εικόνα 19). Έτσι στο τέλος του 2ου κύκλου οι κλώνοι θα είναι 8 και επομένως αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων, αυξάνει εκθετικά και ο αριθμός των ανατύπων του στόχου DNA, διότι οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ενίσχυση του DNA στόχου 2^n , όπου n ο αριθμός των κύκλων (Μαρκουλάτος & Β, 1996).

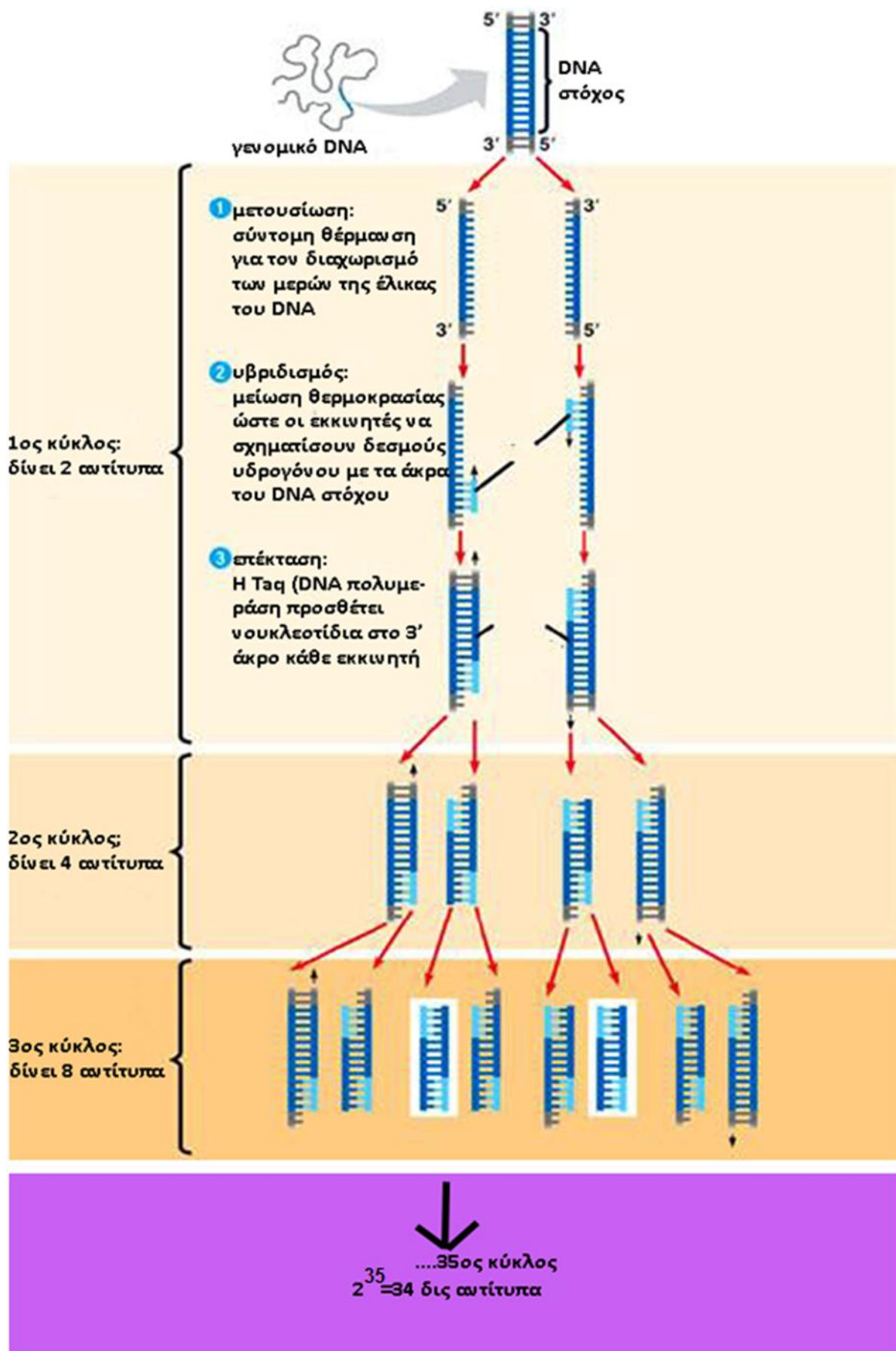
Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα τρία βήματα, μετουσίωσης, υβριδισμού και επέκτασης. Η μετουσίωση του DNA επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασία 92-96°C για 30 sec (ο χρόνος που μένουν τα δείγματα σε αυτή την θερμοκρασία είναι περίπου 1 min), ο υβριδισμός ανάλογα με την αναλογία των βάσεων A/T, G/C σε θερμοκρασία 50-65 °C επί 1-2 min και τέλος η επέκταση των εκκινητικών μορίων (primers) σε θερμοκρασία 70-78 °C επί 1-2 min. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές (thermal cyclers), οι οποίοι έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την θερμοκρασία μεταξύ των τριών προαναφερθέντων θερμοκρασιών με

ρυθμό μέχρι και 40°C/min. Οι συσκευές αυτές βασίζονται στο φαινόμενο Peltier, βάση του οποίου διαφορά δυναμικού (τάσης) σε Volt μεταξύ συγκεκριμένων υλικών προκαλεί θέρμανση του ενός υλικού και ψύξη του άλλου (Μαρκουλάτος & Β, 1996).

Η επιλογή των εκκινητών (*primers*) είναι μεγάλης σημασίας. Οι εκκινητές θα επιλεγθούν πάνω σε μη μεταβλητές περιοχές του DNA στόχου, το οποίο θα μεγεθυνθεί μεταξύ των 2 εκκινητών. Το προϊόν της αντίδρασης PCR θα είναι το μεγεθυμένο τμήμα DNA, το οποίο θα καθορίζεται από τα δύο εκκινητικά μόρια, τα οποία θα αποτελούν τα άκρα του. Τα εκκινητικά μόρια θα πρέπει να έχουν παραπλήσιο αριθμό βάσεων G/C, να μην παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή 5' άκρο τους ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών και η απόστασή τους να είναι μεγαλύτερη των 100 βάσεων ώστε να επιτρέπεται ο σχηματισμός του νέου κλώνου DNA.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης συνήθως πραγματοποιείται επί 25-40 κύκλους οπότε το τμήμα του DNA στόχου ενισχύεται 2^n ($2^{25} \approx 33$ εκατομμύρια, $2^{40} \approx 1$ τετράκις εκατομμύριο φορές). Ωστόσο επειδή η πολυμεράση αναλόγως του είδους έχει διαφορετική ακρίβεια, ο τελικός αριθμός των σωστών αντιγράφων είναι κατά ένα ποσό μικρότερος (Eckert & A.Kunkel, 1990).

Για την επιτυχή ενίσχυση ο αριθμός των κύκλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο ενίσχυσης. Υπερβολικός αριθμός κύκλων οδηγεί σε αύξηση μη εξειδικευμένων προϊόντων της αλυσίδας DNA, ενώ μικρότερος από τον απαιτούμενο στην μη ανίχνευση του DNA στόχου. Το κύριο προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι δίκλωνο DNA το οποίο περιβάλλεται από τους εκκινητές, των οποίων τα 5' άκρα είναι τα άκρα του προϊόντος της PCR. Το μέγεθος του σε ζεύγη βάσεων (base pairs) είναι ίσο με το άθροισμα των βάσεων των εκκινητικών μορίων και της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας του DNA στόχου (Μαρκουλάτος & Β, 1996).



Εικόνα 19 Η εκθετική ενίσχυση του DNA στόχου στην PCR (Mallery, 2008)



Εικόνα 20 Φωτογραφία Φθορίζουσας πηκτή αναρόζης με χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας – ενισχυμένα ITS τμήματα

× αριθμός βάσεων A + T)].

Η εξειδίκευση εξαρτάται επίσης από τη συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} , τον αριθμό των κύκλων, την συγκέντρωση του ενζύμου *Taq* πολυμεράση καθώς και από τη συγκέντρωση των εκκινητικών μορίων και του DNA στόχου. Το προϊόν της PCR συνήθως προσδιορίζεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αναρόζης,. Με την εφαρμογή συνεχούς τάσης (20-120 Volt) τα διάφορα τμήματα του DNA ανάλογα με τον λόγο *μάζα/φορτίο* προχωράν λιγότερο ή περισσότερο στην πηκτή αναρόζης. Αυτά με το λιγότερο πλήθος ζεύγους βάσεων προχωράν περισσότερο στον ίδιο χρόνο, ενώ αυτά αποτελούνται από περισσότερα ζεύγη βάσεων προχωράν λιγότερο. Έπειτα ακολουθεί εμβάπτιση σε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) συγκέντρωσης 1μg/mL. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων των νουκλεοτιδίων, και φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας αποκαλύπτοντας το προϊόν της PCR (Μαρκουλάτος & Β, 1996).

Στην συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε ανάλυση 10 απομονώσεων του μύκητα *Botryosphaeria* spp βάση των τμημάτων πυρηνικού rDNA ITS1, 5.8S και ITS2. Επιλέχθηκαν 10 αντιπροσωπευτικές απομονώσεις από 5 ξενιστές:

Η εξειδίκευση της PCR εξαρτάται από την ειδική σύνδεση των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο η οποία εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία υβριδισμού (T_a). Όσο πιο κοντά είναι η θερμοκρασία υβριδισμού προς την θερμοκρασία τήξεως (T_m) των εκκινητών τόσο πιο πολύ αυξάνει η εξειδίκευση. Η T_m υπολογίζεται από τον τύπο των Thein και Wallace: [$T_m=(4 \times \text{αριθμός βάσεων G + C}) + (2$

Πίνακας 2-5

Απομόνωση	Ξενιστής	Περιοχή
1	Σοφόρα	Αττική
26	Φιστικιά	Αττική
29	Φιστικιά	Φθιώτιδα, Μώλος
32	Φιστικιά	Φθιώτιδα, Μάκρη
33	Φιστικιά	Φθιώτιδα, Μάκρη
35	Ελιά	Αττική
36_3	Φιστικιά	Φθιώτιδα, Μάκρη
41	Δαμασκηλιά	Αττική
50	Αμπέλι	Βοιωτία, Αλίαρτος
52	Αμπέλι	Βοιωτία, Αλίαρτος

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ITS4 και ITS5.

Πίνακας 2-6

Εκκινητής	Ακολουθία	Κατεύθυνση
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Reverse primer (3'→5')
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	Forward primer (5'→3')

Η συσκευή PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν η “MiniCycler PTC-150” (MJ Research Inc. Waltham, MA 02451 U.S.A.)

Οι συνθήκες και τα αντιδραστήρια της ITS-PCR έχουν ως εξής:

Πίνακας 2-7

Συστατικό	όγκος	Τελική συγκέντρωση	Συνθήκες ITS-PCR	Θ°C	χρόνος
Buffer 10x w/ 15mM	5μl	1x buffer,	① αποδιάταξη	94°C	1 min
dNTPs 10mM	1μl	200μM	② υβριδοποίηση	55°C	1 min
Forward primer 25μM	1μl	500μM	③ επέκταση	72°C	2 min
Reverse primer 25μM	1μl	500μM	Αριθμός κύκλων	35	
Taq 1:10 polymerase	1μl	-	Θερμοκρασία	8°C	
DNA sample 50ng/μl	2μl	2ng/μl			
ddH ₂ O	39μl	-			
Total	50μl	-			

2.2.2 Καθαρισμός της πολλαπλασιασμένης αλληλουχίας

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητος για την περίπτωση που ακολουθεί αλληλούχηση τμήματος του πολλαπλασιασθέντος DNA αλλά και για να απενεργοποιηθεί η πολυμεράση. Αυτό οφείλεται στο ότι οι αναλυτές αλληλουχίας είναι πολύ ευαίσθητοι σε προσμίξεις που μειώνουν την καθαρότητα του DNA. Στα προϊόντα της PCR τέτοιες προσμίξεις αφορούν σε κατάλοιπα ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν είτε στη PCR είτε στην απομόνωση του DNA π.χ. άλατα, ένζυμα, απορρυπαντικά και ολιγονουκλεοτίδια.

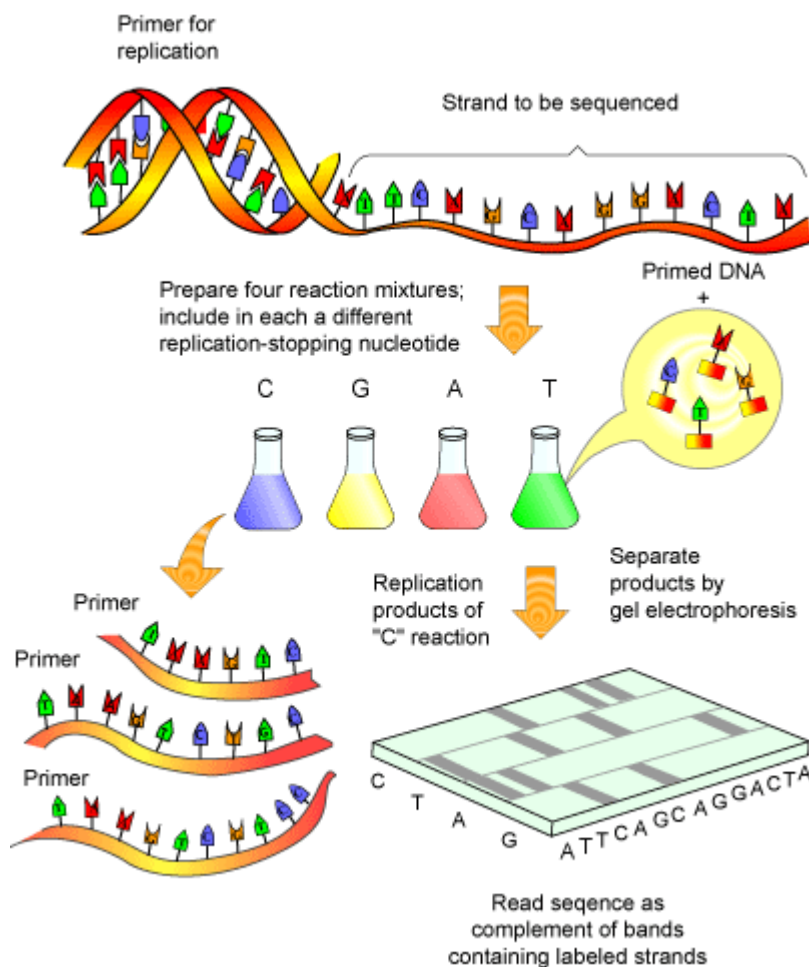
Η μέθοδος έχει ως εξής:

Αρχικά γίνεται απογέμιση με ddH₂O (διπλά αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό) των erpendorf σωληνίσκων μέχρι 100μl όγκο. Ακολουθεί μεταφορά σε σωληνίσκο 1.5ml και προσθήκη ίσου όγκου φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1. Έπειτα, ανάμιξη σε vortex για 2 min και φυγοκέντριση για 3 min στις 12000rpm. Μεταφέρεται η υπερκείμενη φάση σε νέο σωληνίσκο, σημειώνεται ο όγκος και προστίθεται 0.1 όγκοι NaOAc 3M pH 5.2. Για την κατακρήμνιση του DNA προστίθεται 2.5 όγκοι απόλυτη αιθανόλη και αναμιγνύεται έντονα. Μετά από ½h στην κατάψυξη -20°C ακολουθεί φυγοκέντριση για 10min στις 10000rpm και άμεση αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού χωρίς να διαλυθεί το ίζημα. Στην επόμενη φάση προστίθεται 500μl παγωμένη αιθανόλη, φυγοκέντριση για 5min στις 12000rpm και ξανά αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού. Οι σωληνίσκοι τοποθετούνται ανοικτοί σε θάλαμο θερμοκρασίας 37°C για 20min, έπειτα το ίζημα αναδιαλύεται σε 30μl ddH₂O και αποθηκεύεται στην κατάψυξη.

Πριν το δείγμα σταλθεί για αλληλούχηση είναι σημαντικό να γίνει μια ηλεκτροφόρηση (2μl δείγματος) ώστε να επαληθευθεί η σωστή εξαγωγή του DNA.

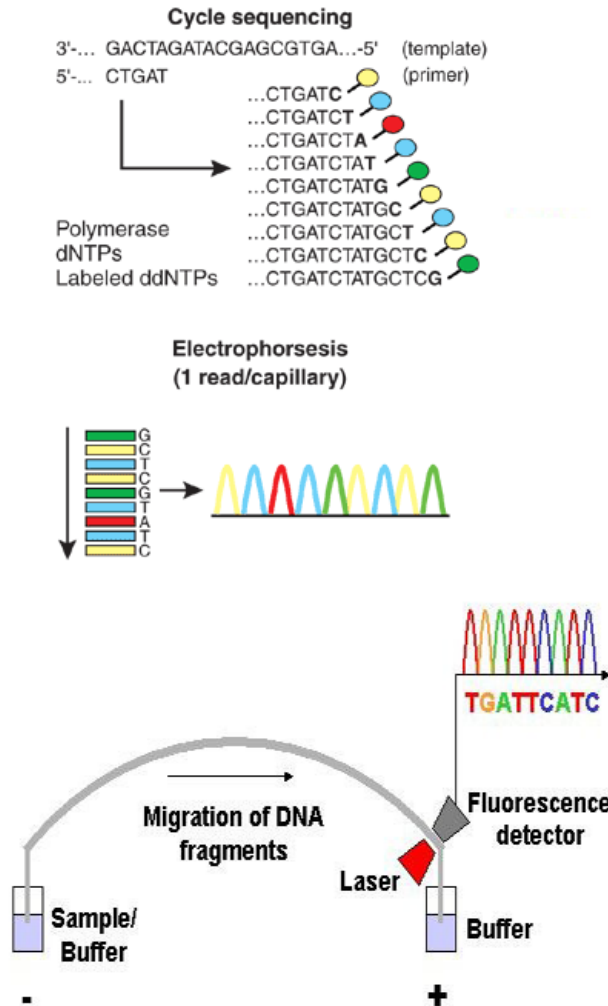
2.2.3 Αλληλούχηση του ενισχυμένου τμήματος DNA – sequencing

Η αλληλούχηση του DNA πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο “dye terminator sequencing” που είναι παραλλαγή της μεθόδου “chain termination” που είχε αναπτυχθεί από τον Sanger και τους συνεργάτες του το 1977 (Sanger et al., 1977). Με την μέθοδο αυτή στην ουσία ένα τμήμα DNA ενισχύεται πολλές φορές. Στην απλή PCR όταν ένα τμήμα DNA ενισχύεται τμήματα δεοξυ-νουκλεοτιδίων (dNTPs) προστίθενται στην αλυσίδα. Η μέθοδος του Sanger ωστόσο χρησιμοποιεί εκτός από τα dNTPs και ειδικές βάσεις που λέγονται διδεοξυ-νουκλεοτίδια (ddNTPs). Η αναλογία των ddNTPs είναι 5% των dNTPs. Τα ddNTPs είναι σχεδόν πανομοιότυπα με τα dNTPs ωστόσο έχουν δυο σημαντικές διαφορές: 1^ο, είναι σημασμένα με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική για κάθε ddNTP (4 συνολικά) και 2^ο, τους λείπει το άτομο οξυγόνου στο 3’ άκρο της δεοξυριβόζης, εμποδίζοντας την περαιτέρω επέκταση του DNA. Έτσι, μόλις ένα ddNTP συνδεθεί στην αλυσίδα του DNA η συγκεκριμένη αλυσίδα δεν επεκτείνεται άλλο. Συνολικά το μείγμα της αντίδρασης περιέχει το πρότυπο DNA, dNTPs, ddNTPs, DNA πολυμεράση και έναν από τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αρχική PCR.



Εικόνα 21 Απεικόνιση της μεθόδου Sanger: Μονόκλωνο DNA πολλαπλασιάζεται παρουσία φθορίζοντα σημασμένων ddNTPs που χρησιμεύουν στον τερματισμό της επιμήκυνσης του DNA καθώς και στην σήμανση των μορίων που προκύπτουν. Τα τμήματα του DNA διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμίδιου και διαβάζονται μέσω ακτίνων λέιζερ από υπολογιστές. (Kae, 2003)

Η αντίδραση ξεκινάει με θέρμανση μέχρι οι αλυσίδες του DNA να ξεχωρίσουν, έπειτα ο εκκινητής συγκολλείται στην συμπληρωματική θέση και αρχίζει η επιμήκυνση. Η επιμήκυνση - αντιγραφή κάθε αντιγράφου DNA συνεχίζεται μέχρι να ενωθεί ένα ddNTP. Μετά από πολλούς



Εικόνα 22 Το σύστημα σάρωσης και ανίχνευσης του μηχανήματος αλληλούχησης τύπου ABI 3730xl DNA sequencer. Καθώς προχωρεί η ηλεκτροφόρηση τα φθορίζοντα ddNTPs διαβάζονται ανά ένα από το μικρότερο έως το μεγαλύτερο (Kae, 2003)

λαμβάνονταν η άγνωστη αλληλουχία.

Η ανάλυση των δειγμάτων της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Macrogen (Κορέα) με το μοντέλο ABI 3730xl DNA Analyzer. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης απεστάλησαν μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου.

κύκλους ενίσχυσης θα υπάρχουν όλων των δυνατών μηκών τμήματα DNA και θα έχουν στο τέλος τους το φθορίζον ddNTP.

Έπειτα το ενισχυμένο DNA διαχωρίζεται βάση μεγέθους με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή πηκτή. Καθώς το φθορίζον DNA – που είναι πλέον διαχωρισμένο από το μικρότερο τμήμα έως το μεγαλύτερο – φτάνει το τέλος της πηκτής ένα laser «διαβάζει» τον φθορισμό κάθε τμήματος. Έτσι, καθώς τα ddATPs, ddCTPs, ddGTPs και ddTTPs φθορίζουν σε διαφορετικό μήκος κύματος η αλληλουχία γράφεται σε ειδικό αρχείο μέσω προγράμματος του συνδεδεμένου υπολογιστή.

Οι κυριότερες διαφορές σε σχέση με την παλαιότερη μέθοδο (chain termination) είναι οι εξής:

- απαιτούσε 4 διαφορετικές αντιδράσεις όπου σε κάθε μια υπήρχε διαφορετικό ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP και ddTTP) που ήταν φθορίζοντα ή ραδιοσημασμένα.
- Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι μπάντες διαβαζόταν μηχανικά και έτσι

2.2.4 Επεξεργασία αλληλουχιών

2.2.4.1 Στατιστική σύγκριση αλληλουχιών –BLAST

Η σύγκριση και η αναζήτηση ομοιότητας της αλληλουχίας που έχει προσδιοριστεί είναι μείζονος σημασίας. Για παράδειγμα αν κάποιος ερευνητής που έχουν ανακαλύψει μια δυνητικά ενδιαφέρουσα αλληλουχία ενδιαφέρονται να μάθουν αν η συγκεκριμένη αλληλουχία έχει ήδη ταυτοποιηθεί από άλλους ερευνητές. Αν αυτό δεν έχει συμβεί τότε το επόμενο βήμα είναι να μάθουν αν η συγκεκριμένη αλληλουχία μοιάζει με γνωστές αλληλουχίες άλλων οργανισμών, αποκτώντας έτσι στοιχεία για το ρόλο της αλληλουχίας αυτής στον αρχικό οργανισμό.

Το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) είναι ένα από τα πιο δημοφιλή εργαλεία στην βιολογική έρευνα. Συγκρίνει μια άγνωστη αλληλουχία με βάση δεδομένων γνωστών αλληλουχιών με σκοπό να βρει ομοιότητες (Altschul et al., 1990). Οι διαφορετικοί τύποι αλληλουχιών που μπορεί κανείς να συγκρίνει είναι: αλληλουχίες νουκλειοτιδίων, αλληλουχίες πρωτεϊνών, αλληλουχίες κωδικοποιούσας περιοχής με πρωτεϊνών, αλληλουχίες πρωτεϊνών με κωδικοποιούσες περιοχές, αλληλουχίες κωδικοποιούσας περιοχής με κωδικοποιούσες περιοχές, εύρεση πολυμορφισμών (SNPs) και άλλες. Επίσης χωρίζονται σε υποκατηγορίες BLAST ανάλογα του τύπου της αλληλουχίας: ανθρωπίνου γονιδιώματος, γονιδιώματος μυός, και υπολοίπων.

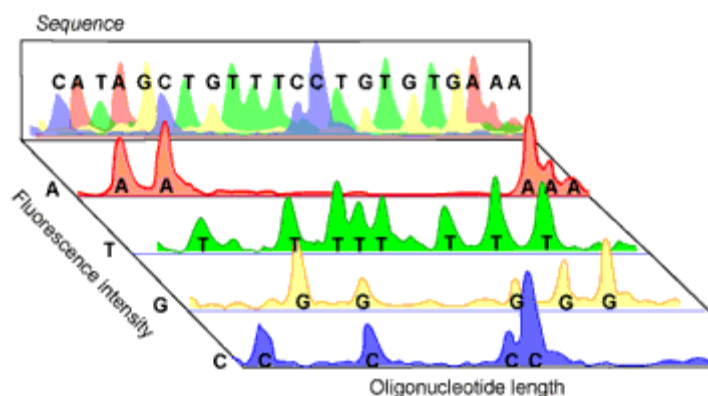
Χρησιμοποιώντας μια ευρετική μέθοδο το πρόγραμμα BLAST βρίσκει ομόλογες αλληλουχίες, όχι συγκρίνοντας τις εξ ολοκλήρου, αλλά συγκρίνοντας μικρά τμήματα μεταξύ των αλληλουχιών. Η διαδικασία της εύρεσης των αρχικών υποθέσεων ονομάζεται «διαδικασία σποράς» (seeding).

Μετά αυτήν τη πρώτη σύγκριση το πρόγραμμα BLAST αρχίζει να κάνει τις τοπικές συγκρίσεις αλληλουχιών. Η επιλογή των τμημάτων αλληλουχιών βασίζεται στον έλεγχο της πολυπλοκότητας των και την επιλογή των σχετικώς πιο πολύπλοκων αλληλουχιών. Αυτό γίνεται επειδή τα μη πολύπλοκα τμήματα βρίσκονται σε πολύ περισσότερα αντίγραφα και αν επιλεχθούν είναι δυνατόν να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα των συγκρίσεων (Mount, 2007). Επιλέγονται μικρά τμήματα αλληλουχιών (3-4 γράμματα) και συγκρίνονται με όλο και περισσότερα γράμματα λαμβάνοντας υπόψη το συνολικό βαθμό επιτυχίας στην σύγκριση. Η ομολογία μεταξύ των αλληλουχιών σημαίνει ότι οι αλληλουχίες αυτές σχετίζονται εξελικτικά. Ο τρόπος λειτουργίας του BLAST εξασφαλίζει ότι δυο αλληλουχίες είτε έχουν πολύ μεγάλο βαθμό ομολογίας είτε δεν κατατάσσονται ως ομόλογες.

Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κάθε αλληλουχίας με τις ήδη κατατεθειμένες στη διαδικτυακή βάση δεδομένων αλληλουχιών GenBank του NCBI (Benson et al., 2008). Οι συγκρίσεις έγιναν με το διαδικτυακό πρόγραμμα nucleotide BLAST για να διαπιστωθεί ότι η αλληλουχία προέρχεται από το σωστό είδος ή από συγγενικό του και την αποφυγή χρήσης αλληλουχιών που προέρχονται από άλλο παθογόνο ή λανθασμένων αλληλουχιών κατά την ανάλυση.

2.2.4.2 Ποιοτικός έλεγχος ηλεκτροφερογραφημάτων

Πριν να γίνει φυλογενετική ανάλυση τα ηλεκτροφερογραφήματα θα πρέπει να ελεγχθούν ως προς την ποιότητά τους. Συχνά μετά την αλληλούχηση δεν είναι καλή στις πρώτες 20-40 βάσεις, μετά ακολουθούν 500-900 βάσεις καλής ποιότητας και μετά το σήμα φθίνει απότομα. Αυτά τα φαινόμενα μπορεί να οφείλονται σε διάφορους παράγοντες όπως κακής ποιότητας DNA, επιλογή λάθος εκκινητών, λάθη στην PCR. Η πολυμεράση μπορεί να «σκοντάψει» τοποθετώντας με επαναλαμβανόμενο τρόπο ίδια τμήματα του DNA, δημιουργώντας έτσι ένα ψευδές μέρος της αλληλουχίας. Όταν οι εκκινητές δεν είναι σωστά σχεδιασμένοι είναι δυνατόν από ένα σημείο και μετά να σχηματίζουν διμερή και έτσι να έχουμε τελειώς λάθος ηλεκτροφερογράφημα. Εκτός αυτού, είναι δυνατόν κατά την PCR έχουμε υβριδοποίηση μη σχετικών ή μερικών σχετικών αλληλουχιών,



Εικόνα 23 Ηλεκτροφερογράφημα μιας ολοκληρωμένης αντίδρασης αλληλούχησης. Καθώς τα τμήματα από την αντίδραση αλληλούχησης αναλύονται μέσω της ηλεκτροφόρησης, μια ακτίνα λέιζερ διαβάζει τον φθορισμό του κάθε τμήματος (μπλέ, πράσινο, κίτρινο, κόκκινο) και συγκεντρώνει τα δεδομένα σε μια εικόνα. Κάθε χρώμα αντιπροσωπεύει ένα διαφορετικό νουκλεοτίδιο και δείχνει την θέση του στην αλληλουχία.

καταλήγοντας σε χιμαιρικές αλληλουχίες που περιέχουν τμήματα από δυο διαφορετικά DNA. Τα χρωματογραφήματα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση πρέπει να έχουν το αναμενόμενο μήκος βάσεων και μοναδική, ευδιάκριτη κορυφή για κάθε σημείο της αλληλουχίας. Αυτού του τύπου ο έλεγχος είναι καθαρά εμπειρικός και γίνεται με το μάτι.

Σε αρκετά χρωματογραφήματα παρατηρούνται λάθη σε ορισμένα σημεία, π.χ. τοποθετείται ο χαρακτηρισμός N (άγνωστη βάση) πάνω από μη ευδιάκριτες κορυφές ή δεν τοποθετείται βάση πάνω από διακριτές κορυφές. Τα λάθη αυτά, αν δεν διορθωθούν, μειώνουν την ακρίβεια του συνολικού φυλογενετικού συστήματος των αλληλουχιών. Για την διόρθωση αυτών των σημείων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα *Sequencher 4.1.4* (Gene Codes) και *FinchTV 1.4* (Geospiza). Με το πρόγραμμα *Sequencher* γίνεται πρόχειρη στοιχισή κάθε αλληλουχίας βάση αντίστοιχης αλληλουχίας που βρέθηκε με την τεχνική BLAST. Σε οποιοδήποτε σημείο της αλληλουχίας παρατηρηθεί λάθος διορθώνεται με την χρήση του προγράμματος *FinchTV*. Επίσης αφού γίνει αντιστοιχισή των τμημάτων των αλληλουχιών που ανήκουν στις περιοχές 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 και 28S αποκρίνονται τα ακατάλληλα τμήματα των αλληλουχιών, τα οποία είναι οι αρχικές και οι τελικές βάσεις.

2.2.5 Διαδικασία κατασκευής φυλογενετικών δέντρων

Τα βασικότερα βήματα για την κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου είναι τα εξής:

1. Η πολλαπλή στοίχιση (alignment) των αλληλουχιών
2. Έλεγχος για ομοπλασία - κορεσμό
3. Η επιλογή κατάλληλου μοντέλου εξέλιξης
4. Ο καθορισμός της ή των μεθόδων κατασκευής δέντρου
5. Η αξιολόγηση της αξιοπιστίας του δέντρου που κατασκευάστηκε

2.2.5.1 Στοίχιση αλληλουχιών

Το πρώτο βήμα και ταυτόχρονα το πιο σημαντικό για την διαδικασία της φυλογενετικής ανάλυσης είναι η στοίχιση των αλληλουχιών. Οι αλληλουχίες των υπό μελέτη δειγμάτων δεν αναμένεται να είναι πανομοιότυπες αλλά να παρουσιάζουν διαφορές ως προς τις βάσεις ορισμένων νουκλεοτιδικών θέσεων. Για την αποκάλυψη αυτών των πολυμορφισμών, οι αλληλουχίες στοιχίζονται. Η στοίχιση αποσκοπεί στον προσδιορισμό των ομόλογων βάσεων των αλληλουχιών, αφού βάση των διαφορών σ' αυτές τις θέσεις υπολογίζονται οι εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη αλληλουχιών. Συνεπώς, η στοίχιση των αλληλουχιών είναι ζωτικής σημασίας για την εύρεση σωστών φυλογενετικών σχέσεων των υπό εξέταση ομάδων ή απομονώσεων. Γενικά θεωρείται ότι μόνο η σωστή στοίχιση μπορεί να παράγει φυλογενετικώς ορθά συμπεράσματα, ενώ η λάθος στοίχιση οδηγεί σε λάθη στο δέντρο ή και τελείως λανθασμένα δέντρα. Σε αρκετές περιπτώσεις τα φυλογενετικά συμπεράσματα που θα προκύψουν βασίζονται περισσότερο στην μέθοδο της στοίχισης των αλληλουχιών παρά στην μέθοδο κατασκευής των δέντρων (Ogden & Rosenberg, 2006). Αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχουν μέθοδοι κατασκευής φυλογενετικών δέντρων που δεν περιλαμβάνουν στοίχιση των αλληλουχιών με τη κύρια διαφορά βασίζεται στον τρόπο των ανά ζεύγη συγκρίσεων. Γενικά όμως αυτές οι μέθοδοι δεν έχουν αποδειχθεί πιο αξιόπιστες από αυτές που απαιτούν στοίχιση αλληλουχιών (Hohl & Ragan, 2007).

Προέχουσας σημασίας είναι οι αμφισβητούμενες ή καθώς στοιχισμένες ακολουθίες να αφαιρεθούν από την φυλογενετική ανάλυση. Η επιλογή του ή των τμημάτων που θα αφαιρεθούν είναι συχνά υποκειμενική και επαφίεται στην κρίση του εκάστοτε ερευνητή. Σε ακραίες περιπτώσεις κάποιοι ερευνητές αφαιρούν όλες τις ενθέσεις και τα ελλείμματα (indels, από **inserts & deletions**) και χρησιμοποιούν μόνο θέσεις που είναι κοινές σε όλες τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων. Το μειονέκτημα αυτής της τακτικής είναι ότι πολύτιμα φυλογενετικά σήματα χάνονται. Τα κενά αυτά (indels) είναι απαραίτητα για τον διαχωρισμό μεταξύ των αλληλουχιών και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη (Väli et al., 2008).

Εάν μια αλληλουχία έχει δευτεροταγή δομή η οποία είναι γνωστή ή μπορεί να προβλεφθεί, τότε αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθοδηγήσει την στοίχιση. Ένα από τα λίγα

προγράμματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην πρόβλεψη της δευτεροταγής δομής μιας ακολουθίας είναι το Praline (Simossis & Heringa, 2005).

Στην παρούσα μελέτη για την στοίχιση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *ClustalW 2.1* (Larkin et al., 2007), το πιο διαδεδομένο μέλος της οικογένειας μεθόδων ευρετικής πολλαπλής στοίχισης *Clustal*, το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο. Οι μέθοδοι *Clustal* χρησιμοποιούν προοδευτικούς αλγορίθμους (progressive algorithms) όπου οι δυο συνολικά πιο ομόλογες αλληλουχίες στοιχίζονται πρώτες και ακολουθεί μια σειρά από νέες στοιχίσεις, προσθέτοντας σε κάθε βήμα την αμέσως συγγενέστερη αλληλουχία στις ήδη στοιχισμένες. Η διαδικασία έχει ως εξής: πρώτα υπολογίζεται ο πίνακας αποστάσεων με ανά ζεύγη συγκρίσεις, έπειτα αρχικό “neighbor- joining” φυλογενετικό δέντρο χωρίς ρίζα το οποίο οδηγεί σε αρχικό “neighbor- joining” φυλογενετικό δέντρο με ρίζα και «μερικά βάρη» αλληλουχιών και στο τέλος γίνεται η προοδευτική στοίχιση (Thompson et al., 1994). Το *ClustalW* έχει αποδειχθεί κατάλληλο εργαλείο για πολλούς τύπους αλληλουχιών (ριβοσωμικών, αμινοξικών).

Πριν την στοίχιση οι αλληλουχίες τοποθετήθηκαν όλες σε ένα αρχείο με τη χρήση του προγράμματος *Notepad* και αποθηκεύτηκαν ως μορφή “fasta”. Στο πρόγραμμα *ClustalW* χρησιμοποιήθηκαν παράμετροι για ανά ζεύγη (pairwise) στοίχιση οι: μέγεθος κενού (gap opening)=15, επέκταση κενού (gap extension)=6.66, πίνακας βάρους DNA (DNA weight matrix): IUB και για πολλαπλή στοίχιση οι: μέγεθος κενού (gap opening)=15, επέκταση κενού (gap extension)=6.66, καθυστέρηση αποκλινόντων αλληλουχιών (Delay divergent sequences)=30%, μεταβατικό βάρος DNA (DNA transition weight)=0.5, πίνακας βάρους DNA (DNA weight matrix): IUB. Η στοίχιση των αλληλουχιών ελέγχθηκε ως προς την επαναληψιμότητα με την ρύθμιση του πλήθους των επαναλήψεων. Το αρχείο με τις στοιχισμένες αλληλουχίες (τύπου aln) έτυχε επεξεργασίας με τα προγράμματα *MEGA 5* (Tamura et al., 2011) και *DAMBE 5.2* (Xia & Xie, 2001) ώστε να εκτιμηθούν οι συνολικές νουκλεοτιδικές αποκλίσεις, οι ανά ζεύγη αποστάσεις μεταξύ των αλληλουχιών και να γίνει έλεγχος για ομοπλασία.

2.2.5.2 Έλεγχος ομοπλασίας – τεστ κορεσμού

Δεδομένου ότι ο αριθμός των νουκλεοτιδικών θέσεων που μπορούν να μεταλλαχτούν είναι πεπερασμένος, όσο μεγαλύτερη είναι η γενετική απόσταση μεταξύ δύο ειδών (δηλαδή όσο πιο απομακρυσμένα εξελικτικά είναι τα είδη) τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα να έχουμε αλλαγή σε βάση που ήδη έχει υποστεί αλλαγή. Κάθε μια από τις πολλαπλές υποκαταστάσεις που συμβαίνει στο ίδιο νουκλεοτίδιο αποτελεί στο πλαίσιο της κλαδιστικής ξεχωριστό ομοπλασικό γεγονός. Όταν συμβεί αυτό αναφέρεται ως κατάσταση κορεσμού νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων (substitution saturation) και ουσιαστικά σταματάει να ισχύει η γραμμική σχέση του χρόνου και της απόστασης δυο αλληλουχιών, με αποτέλεσμα να αλλοιώνεται η ποιότητα της πληροφορίας που κρύβουν οι

αλληλουχίες. Η ένταση του κορεσμού υποκαταστάσεως ποικίλει ανάλογα του εξεταζόμενου γενετικού τύπου και του τύπου των αλλαγών νουκλεοτιδίων: ο βαθμός κορεσμού των μεταπτώσεων (transitions) είναι αρκετά μεγαλύτερος αυτού των μεταστροφών (transversions). Αν το πλήθος των μεταπτώσεων ή/και των μεταστροφών δεν αυξάνει γραμμικά με τον χρόνο τότε υπάρχει ισχυρή ένδειξη για ομοπλασία στα εξεταζόμενα είδη (Page & Holmes, 1998). Στην παρούσα μελέτη πριν την επιλογή μοντέλων για φυλογενετικά δέντρα πραγματοποιήθηκε έλεγχος για κορεσμό υποκαταστάσεων σύμφωνα με την δοκιμασία των (Xia et al., 2003) μέσα από το πρόγραμμα DAMBE 5.2 (Xia & Xie, 2001). Με το ίδιο πρόγραμμα κατασκευάστηκαν γραφήματα κορεσμού (saturation plots), δηλαδή γραφήματα του συνόλου των γενετικών μεταπτώσεων και μεταστροφών συνάρτηση της γενετικής απόστασης (ρ), όπου όσο περισσότερο «κορεσμένες» είναι οι αλληλουχίες τόσο περισσότερο τα διαγράμματα θα αποκλίνουν από την ευθεία γραμμική μορφή.

2.2.5.3 Επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου εξέλιξης

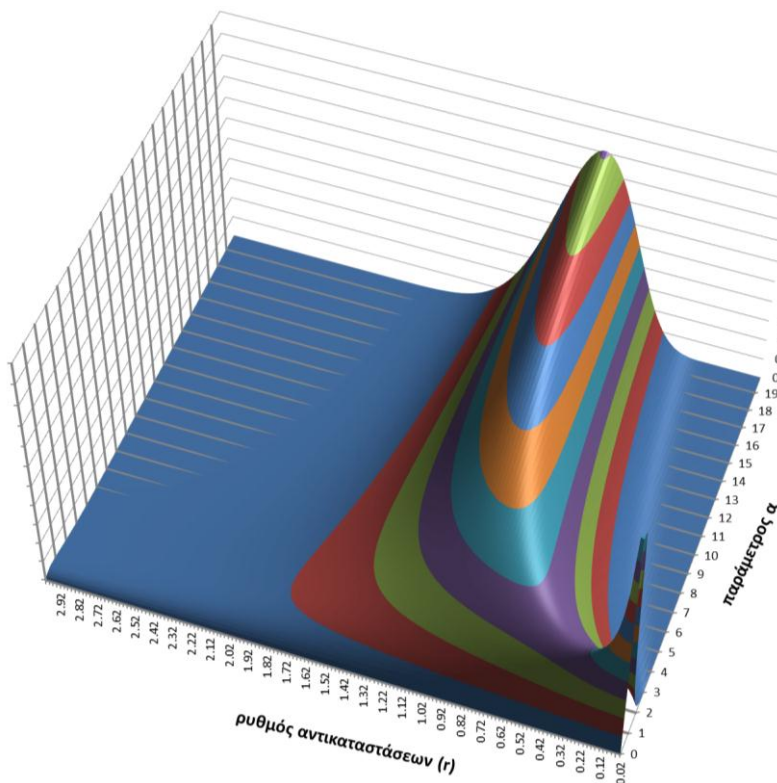
Το αποτέλεσμα των διάφορων φυλογενετικών μεθόδων εξαρτάται άμεσα από το μοντέλο που χρησιμοποιούν στην εκτίμηση των εξελικτικών αποστάσεων, αφού αυτές οι μέθοδοι κάνουν παραδοχές όσον αφορά τις νουκλεοτιδικές αποστάσεις των αλληλουχιών. Για να υπάρχει αξιοπιστία στα συμπεράσματα των φυλογενετικών αναλύσεων είναι απαραίτητη η αξιοπιστία του μοντέλου εξέλιξης (Goldman, 1993). Ο Penny (1982) έχει αναφέρει πως το πιο σημαντικό κριτήριο για μια επιστημονική μέθοδο φυλογενετικής ανάλυσης είναι τα δεδομένα να είναι ασύμβατα με το μοντέλο, και σχεδόν καμία φυλογενετική μέθοδος δεν πληρεί αυτό το κριτήριο. Έτσι, θα πρέπει να εξεταστούν όλες οι μέθοδοι που βασίζονται σε σαφή μοντέλα εξέλιξης για να βρεθεί πιο απ' όλα ταιριάζει καλύτερα στο συγκεκριμένο σύνολο δεδομένων που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση, ώστε να δικαιολογείται και η χρήση του (Posada & Crandall, 2001).

2.2.5.3.1 Οι βασικές παράμετροι των μοντέλων

Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί πλήθος μοντέλων, τα οποία ποικίλουν σε πολυπλοκότητα ανάλογα με τον αριθμό των παραμέτρων (1-60+) που χρησιμοποιούν για να εξηγήσουν το σύνολο των εξελικτικών αλλαγών. Υπάρχουν τρεις τύποι μέτρων που χρησιμοποιούνται απ' όλα τα μοντέλα: 1) οι παράμετροι συχνότητας βάσεων, 2) οι παράμετροι υποκατάστασης βάσεων, και 3) οι παράμετροι ρυθμού ετερογένειας.

- 1) Οι παράμετροι συχνότητας βάσεων (*nucleotide/ base frequencies*) περιγράφουν τις συχνότητες των βάσεων A, T, C και G κατά μέσο όρο στο σύνολο των νουκλεοτιδικών θέσεων των αλληλουχιών. Αυτοί οι παράμετροι θεωρείται ότι αναπαριστούν σημαντικές διαφορές σε πολλά θέματα, όπως το συνολικό *G+C* ποσοστό και δρουν ως σταθμισμένοι παράγοντες στο μοντέλο, κάνοντας την εμφάνιση συγκεκριμένων βάσεων πιο συχνή όταν συμβαίνει υποκατάσταση αυτών (Bos & Posada, 2005)

- 2) Οι παράμετροι υποκατάστασης βάσεων (*substitution rate*) περιγράφουν τις σχετικές τάσης υποκατάστασης μιας βάσης από μια άλλη. Αναπαριστούν γενικά ένα μέτρο βιοχημικής ομοιότητας των βάσεων. Στην ουσία είναι οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν με την πάροδο του χρόνου στις βάσεις και διαχωρίζονται σε υποκαταστάσεις μεταπτώσεων (*transitions*) οι οποίες είναι αλλαγή σε ίδιο τύπο βάσης (πουρίνη ↔ πουρίνη: A↔G και πυριμιδίνη↔ πυριμιδίνη: C↔T) και υποκαταστάσεις μεταστροφών (*transversions*) που είναι αλλαγή σε διαφορετικό τύπο βάσης (πυριμιδίνη ↔ πουρίνη). Γενικά οι υποκαταστάσεις μεταπτώσεων είναι περισσότερες από τις υποκαταστάσεις μεταστροφών, παρόλο που οι δυνατές αλλαγές βάσεων είναι περισσότερες στις υποκαταστάσεις μεταστροφών
- 3) Η προσέγγιση του μοντέλου του ρυθμού ετερογένειας μπορεί να γίνει αρκετά ικανοποιητικά μέσω γ-κατανομής καθώς σε αυτή την κατανομή η πιθανότητα αλλαγής νουκλεοτιδίων ποικίλει από χαμηλή έως υψηλή. Οι (Bos & Posada, 2005) έδειξαν ότι η γ-κατανομή, συγκρινόμενη με την κανονική κατανομή, περιγράφει πολύ καλά το βαθμό ετερογένειας και ταιριάζει σε πλήθος φυλογενετικών σχέσεων. Σε όλα τα μοντέλα στα οποία εφαρμόζεται η γ-κατανομή χρησιμοποιείται μια μεταβλητή – *σχηματική παράμετρος «α»* (*shape parameter alpha*) που αλλάζει το σχήμα της κατανομής. Επίσης, επειδή πολλά από τα νουκλεοτίδια κατά κανόνα δεν αλλάζουν, χρησιμοποιείται συχνά και η παράμετρος “I”: *ποσοστό αμετάβλητων θέσεων* (*proportion of invariable sites*).



Εικόνα 24 Γράφημα γ-κατανομής συναρτήσει της παραμέτρου α και του ρυθμού αντικαταστάσεων r . Ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που εξελίσσονται με ένα συγκεκριμένο ρυθμό καθορίζει το σχήμα της καμπύλης. Όταν μια αλληλουχία περιέχει κυρίως σταθερές νουκλεοτιδικές θέσεις και έχουμε μόνο μερικές γρήγορα εξελισσόμενες ν. θέσεις, η παράμετρος (α) του σχήματος είναι μικρή (<1). Καθώς το ποσοστό των μεταβλητών νουκλεοτιδικών θέσεων αυξάνει, η παράμετρος (α) του σχήματος αυξάνει και αυτή, αποτελώντας ένδειξη του γεγονότος ότι περισσότερες ν. θέσεις αλλάζουν με μέτριο ρυθμό και λιγότερες με υψηλό ή χαμηλό ρυθμό. (Bos & Posada, 2005)

2.2.5.3.2 Συνοπτική περιγραφή των μοντέλων

Τα πιο απλά μοντέλα δεν λαμβάνουν υπόψη όλες τις πληροφορίες που προκύπτουν από τις αλληλουχίες και όταν χρησιμοποιούνται στην φυλογένεση μπορούν να οδηγήσουν σε λάθος συμπεράσματα και δέντρα. Τα πιο εξελιγμένα και χρησιμοποιούμενα μοντέλα προσμετρούν τουλάχιστον τις παραμέτρους συχνότητας βάσεων, τις παραμέτρους μετάθεσης/μεταστροφής και τη γ -κατανομή. Τα κυριότερα χρησιμοποιούμενα είναι:

I. *Jukes και Cantor (JC69)*

Το μοντέλο JC69 είναι από τα πρώτα και ίσως το πιο απλό καθώς έχει μόνο μια παράμετρο εκτός από τον χρόνο. Υποθέτει ότι οι 4 βάσεις (A, C, G, T) έχουν ίδια συχνότητα καθώς και ίδια συχνότητα υποκαταστάσεων (Jukes & Cantor, 1990)

II. *Kimura 2 παραμέτρων (K80 ή K2P)*

Το διπαραμετρικό μοντέλο K80 υποθέτει ότι οι συχνότητες των τεσσάρων βάσεων είναι ίδιες αλλά επιτρέπει τον διαχωρισμό των ρυθμών μεταπτώσεων και μεταστροφών (Kimura, 1980).

III. *Kimura 3 παραμέτρων (T92 ή K3P)*

Το τριπαραμετρικό μοντέλο K92 είναι εξέλιξη του K80 και διαφέρει στο ότι επιτρέπει διαφορετικές συχνότητες βάσεων, ίσες συχνότητες μεταπτώσεων αλλά διαφορετικές συχνότητες μεταστροφών. Αυτό το μοντέλο είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σε περιπτώσεις ειδών που έχουν συγκεκριμένη ροπή προς κάποια συγκεκριμένη μορφή μεταστροφών - μεταπτώσεων ή/και ποσοστού G+C (Tamura, 1992)

IV. *Felsenstein (F81)*

Το μοντέλο του *Felsenstein* επιτρέπει στις συχνότητες των τεσσάρων νουκλεοτιδίων να είναι διαφορετικές, ωστόσο υποθέτει ότι πιθανότητα αλλαγής από ένα νουκλεοτίδιο σε άλλο είναι ίση με την συχνότητα του δεύτερου. Μια άλλη παραδοχή αυτού του μοντέλου είναι ότι σε όλες οι εξεταζόμενες αλληλουχίες η συχνότητα του κάθε νουκλεοτιδίου είναι κατά προσέγγιση ίδια, γεγονός που όταν δεν ισχύει παραβιάζεται η αρχή του μοντέλου (Felsenstein, 1981).

V. *Γενικευμένο χρόνο – αντιστρέψιμο (GTR - Generalized time reversible)*

Το GTR μοντέλο είναι από τα πιο ουδέτερα, ανεξάρτητα χρόνο – αντιστρέψιμα μοντέλα που υπάρχουν. Συνολικά έχει 6 παραμέτρους υποκατάστασης βάσεων, υποθέτει ότι ο πίνακας υποκαταστάσεων είναι συμμετρικός και επιτρέπει διαφορετικές συχνότητες των 4 βάσεων (Tavare, 1986), (Rodriguez et al., 1990), (Lanave et al., 1984).

VI. *Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85)*

Το διπαραμετρικό μοντέλο HKY85 επιτρέπει στις μεταπτώσεις και μεταστροφές να εμφανίζονται με διαφορετικό ρυθμό και παράλληλα επιτρέπει διαφορετική συχνότητα στις 4 νουκλεοτιδικές θέσεις, η οποία όμως συχνότητα δεν διαφέρει από αλληλουχία σε αλληλουχία.

Στην πραγματικότητα είναι συνδυασμός των μοντέλων K80 και F81 – γι' αυτό το λόγο μερικές φορές αναφέρεται ως F84 μοντέλο (Hasegawa et al., 1985).

VII. *Tamura & Nei (T93 ή TrN)*

Το μοντέλο T93 επιτρέπει διαφορετικό ρυθμό εμφάνισης μεταπτώσεων και ίδιο ρυθμό εμφάνισης μεταστροφών ο οποίος όμως διαφέρει αυτών των μεταπτώσεων. Επίσης το συγκεκριμένο μοντέλο επιτρέπει διαφορετική συχνότητα των 4 νουκλεοτιδίων στις νουκλεοτιδικές θέσεις (Tamura & Nei, 1993).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν παραλλαγές αυτών των μοντέλων, όπως +G, το οποίο εμπεριέχει Γ-κατανομή, +I που υποθέτει ότι ορισμένες νουκλεοτιδικές θέσεις παραμένουν σταθερές ή και τα δύο μαζί (+I+G).

2.2.5.3.3 Κοινές υποθέσεις μεταξύ των μοντέλων

Κοινές παραδοχές των περισσότερων μοντέλων είναι οι ακόλουθες: α) όλες οι νουκλεοτιδικές θέσεις αλλάζουν ανεξάρτητα η μια από την άλλη, β) ο ρυθμός υποκατάστασης είναι σταθερός στον χρόνο και σε όλες τις γενεαλογικές γραμμές, γ) η συχνότητα των νουκλεοτιδίων είναι σε ισορροπία και δ) ο ρυθμός υποκατάστασης για μια θέση είναι ο ίδιος για όλες τις νουκλεοτιδικές θέσεις και δεν αλλάζει με τον χρόνο.

Μολονότι αυτές οι παραδοχές κάνουν πιο εύκολο το έργο της παρακολούθησης των αλλαγών νουκλεοτιδίων, σε πολλές περιπτώσεις είναι μη ρεαλιστικές.

Για παράδειγμα, η παραδοχή της ανεξαρτησίας των αλλαγών που πραγματοποιούνται στις διάφορες νουκλεοτιδικές θέσεις παραβιάζεται στην περίπτωση των ριβοσωμικών γονιδίων. Το μεταγραφόμενο DNA παίρνει μια πολύπλοκη δευτεροταγής δομή καθώς αναδιπλώνεται στον χώρο, στην οποία μετέχουν «στελέχη» και «θηλιές» όπου τα στελέχη να διατηρούν την σταθερότητά τους με ζεύγη βάσεων κατά Watson-Crick. Η αλλαγή μιας βάσης σε ένα στέλεχος μπορεί να οδηγήσει σε αναίρεση ενός ζεύγους βάσεων, μειώνοντας την σταθερότητα του μορίου. Σε αυτήν την κατάσταση, είναι αρκετά πιθανόν να έχουμε ακόμη μια αλλαγή βάσης που ως στόχο θα έχει την αποκατάσταση του ζεύγους βάσεων και την σταθερότητα του μορίου. Κατ' αυτόν τον τρόπο, αλλαγές σε νουκλεοτίδια που φαίνονται να απέχουν πολύ μεταξύ τους και φαίνονται ανεξάρτητες, στην πραγματικότητα σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό (Page & Holmes, 1998). Ένας τρόπος για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα και να μην υποεκτιμηθούν οι γενετικές αποστάσεις που χωρίζουν δυο αλληλουχίες, είναι να δοθεί διαφορετικό βάρος στις αλλαγές που συμβαίνουν στα στελέχη σε σχέση με τις αλλαγές που συμβαίνουν στις θηλιές. Αυτό προϋποθέτει την αναγνώριση των αλλαγών στα στελέχη και τις θηλιές και το στατιστικό έλεγχο για την επιβεβαίωση του αριθμού των αλλαγών, διαδικασία χρονοβόρο και πολύπλοκη, η οποία δεν αποδίδει πάντα τα αναμενόμενα. Όσον αφορά την εύρεση των περιοχών «στελεχών» και «θηλιών» υπάρχουν μέθοδοι που

χρησιμοποιούν πολλές παραμέτρους ώστε να είναι δυνατή με μέτρια προς καλή ακρίβεια. Μια μέθοδος για την εύρεση των περιοχών εμπεριέχει τις παραμέτρους:

- ποσοστό ζευγών A-T και G-C (όσο περισσότερα είναι τα G-C ζεύγη, τόσο μεγαλύτερη η σταθερότητα),
- ποσοστό κάθε βάσης A, T, C, G
- ελάχιστο ποσοστό των A,T= AT_{\min} και των G,C= GC_{\min}
- η διαφορά ποσοστού μεταξύ A & T (w=weak bases) και C & G (s=strong bases) “Chargaff difference” (Forsdyke & Mortimer, 2000)
- το γινόμενο των ποσοστών AxT, CxG (base products)

Βάση πολύπλοκων αλγορίθμων, υπολογίζονται οι «τιμές των ενεργειών διπλώματος του DNA» (FONS. FORS-M) (Fold energy values) και οι διαφορές τους (FORS-D) και βάση αυτών οι περιοχές στελεχών και θηλιών (Forsdyke, 1998)

Η υπόθεση ότι τα ζεύγη βάσεων βρίσκονται σε ισορροπία σημαίνει ότι μεταξύ των αλληλουχιών που εξετάζονται τα ποσοστά των βάσεων είναι περίπου τα ίδια. Φυσικά αυτό δεν ισχύει πάντα και μπορεί να οδηγήσει σε λάθη στο δέντρο, για παράδειγμα δυο είδη που έχουν τοποθετηθεί σε διαφορετικούς κλάδους λόγω διαφορετικού ποσοστού %G+C, ενώ στην πραγματικότητα είναι γενετικά πιο κοντά. Η αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος μπορεί να γίνει με την μετατροπή LogDet (Lockhart et al., 1994) η οποία επιτρέπει τον διαφορετικό ρυθμό εξέλιξης ανά γενεαλογική σειρά.

Οι μέθοδοι του υπολογισμού της εξελικτικής απόστασης μεταξύ αλληλουχιών κάνουν ποικίλες υποθέσεις όσον αφορά τις πιθανότητες αλλαγών μεταξύ νουκλεοτιδίων, ωστόσο μια υπόθεση που είναι κοινή για όλες τις μεθόδους είναι ότι η κάθε νουκλεοτιδική θέση σε μια αλληλουχία έχει την ίδια πιθανότητα με τις υπόλοιπες να υποκατασταθεί. Διαφορετικές περιοχές αλληλουχιών DNA μπορεί να έχουν διαφορετικές πιθανότητες αλλαγής. Για παράδειγμα, ψευδογονίδια που έχουν χάσει την λειτουργικότητά τους εξελίσσονται πολύ πιο γρήγορα από γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες.

Οι μεταβλητοί ρυθμοί υποκαταστάσεων παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην απόσταση των αλληλουχιών. Σε πολλές περιπτώσεις ορισμένα τμήμα DNA είναι «δεσμευμένα» ενώ άλλα αλλάζουν με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό. Στην πάροδο του χρόνου (της τάξης των εκατομμυρίων ετών) οι αλληλουχίες θα φαίνονται ότι απέχουν παραπάνω και ότι η μια αλληλουχία εξελίσσεται πιο γρήγορα, σε αντίθεση με τι θα ισχύει στην πραγματικότητα (Page & Holmes, 1998)

Καταλήγοντας, διαπιστώνεται ότι η επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης δεν είναι απλή υπόθεση. Προϋποθέτει πολύ μεγάλη εμπειρία και κριτική στάση απέναντι στα δεδομένα που κανείς έχει, διαδικασία η οποία είναι αρκετά χρονοβόρα. Ο καλύτερος

τρόπος για να αντιμετωπίσει κανείς τα δεδομένα του είναι να χρησιμοποιήσει περισσότερα του ενός μοντέλα, τουλάχιστον στις μεθόδους εκείνες που ο υπολογιστικός χρόνος δεν είναι απαγορευτικός, στα οποία θα περιλαμβάνονται εξελικτικά μοντέλα με αρκετές παραμέτρους, αλλά και απλούστερα.

Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί αρκετές στατιστικές δοκιμασίες για την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου, με τα AIC (Akaike, 1974) & BIC (Schwarz, 1978) να θεωρούνται τα πιο αξιόπιστα.

Το κριτήριο του AIC υλοποιεί την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου υπολογίζοντας τις πιθανότητες των πιθανότερων μοντέλων και χρησιμοποιώντας αρνητική βαθμολογία που βασίζεται στον αριθμό των παραμέτρων των δοκιμασθέντων μοντέλων. Στην ουσία παίρνει υπόψη όχι μόνο την καμπύλη που ταιριάζει καλύτερα στα δεδομένα, αλλά και τις αποκλίσεις των εκτιμώμενων παραμέτρων.

Το κριτήριο του BIC δίνει μια κατά προσέγγιση στον φυσικό λογάριθμο του Μπεϊσιανού παράγοντα (Bayesian parameter), ειδικά όταν τα μεγέθη των αλληλουχιών είναι μεγάλα και υπάρχουν «ανταγωνιστικές υποθέσεις». Ο Μπεϊσιανός παράγοντας υπολογίζει τον βαθμό «ταιριάσματος» των δεδομένων στο κάθε μοντέλο αλλά αυτή η διαδικασία συχνά συμπεριλαμβάνει δύσκολα ολοκληρώματα τα οποία υπολογίζονται κατά προσέγγιση. Όπως και ο AIC, ο BIC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συγκρίνει ένθετα και μη μοντέλα (Posada & Crandall, 2001). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα μοντέλα AIC και BIC με χρήση των προγραμμάτων *MEGA 5* (Tamura et al., 2011) και *Modeltest* (Posada, 2008).

2.2.5.4 Ανεξάρτητη ή συνδυασμένη ανάλυση

Όταν έχουμε διαφορετικά υποσύνολα δεδομένων τίθεται το ερώτημα αν αυτά τα δεδομένα μπορούν να συνδυαστούν ή αν πρέπει να εφαρμοστούν φυλογενετικές αναλύσεις ανεξάρτητα για κάθε σύνολο δεδομένων.

Υπάρχουν ερευνητές που υποστηρίζουν την ανεξάρτητη ανάλυση των δεδομένων (Bull et al., 1993), σύμφωνα με την οποία τα σύνολα των δεδομένων πρέπει να αναλύονται ξεχωριστά και τα παραγόμενα δέντρα να συνδυάζονται σε συναινετικά δέντρα (consensus trees). Αυτοί βασίζονται σε υποθέσεις όπως στη διαφορά του μεγέθους από υποσύνολο και υποσύνολο, της δυνατότητας να ανευρίσκονται εύκολα ετερογένειες και της αδυναμίας να συμπεριληφθούν σε μια ομάδα διαφορετικοί τύποι δεδομένων.

Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν το συνδυασμό των δεδομένων ανεξάρτητα από την φύση τους (Kluge & Wolf, 1993) καθώς υπερτερεί της ανεξάρτητης σε ορισμένες περιπτώσεις. Τα κύρια προτερήματα αυτής της μεθόδου είναι: η δυσκολία του καθορισμού των ομάδων στην ανεξάρτητη

ανάλυση, η μεγαλύτερη επεξηγητική ικανότητα και η μεγαλύτερη ικανότητά της να αποκαλύψει πραγματικές φυλογενετικές ομάδες.

Τέλος, μια τρίτη προσέγγιση είναι η αυτή του συνδυασμού των δεδομένων υπό προϋποθέσεις (conditional combination), στην οποία τα δεδομένα συνδυάζονται εκτός και αν υπάρχει ένδειξη για σημαντικές διαφορές –διενέξεις μεταξύ τους (Page & Holmes, 1998). Για τον σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες στατιστικές μέθοδοι που ελέγχουν αν μπορούν να συνδυαστούν οι ανεξάρτητες ομάδες των δεδομένων μιας μελέτης, όπως το τεστ πιθανότητας ετερογένειας (likelihood heterogeneity test) των (Huelsenbeck & Bull, 1996).

2.2.5.5 Αξιολόγηση της κατάλληλης μεθόδου

Για την εύρεση της πιο κατάλληλης μεθόδου κατασκευής φυλογενετικού δέντρου υπάρχουν κάποιες απαιτούμενες ιδιότητες. Έχουν προταθεί πέντε προτιμητέες ιδιότητες που θα πρέπει να έχει μια μέθοδος κατασκευής φυλογενετικού δέντρου (Penny et al., 1992). Αυτές οι ιδιότητες είναι:

- i. Η *αποδοτικότητα (efficiency)*, πόση γρήγορη είναι δηλαδή η μέθοδος αναφορικά με τον χρόνο που απαιτείται ώστε το υπολογιστικό πρόγραμμα να βρει το δέντρο χρησιμοποιώντας την.
- ii. Η *ισχύς (power)*, δηλαδή ποιο είναι το ελάχιστο ποσό δεδομένων που απαιτεί η μέθοδος ώστε να δώσει ένα σωστό αποτέλεσμα – το οποίο με όλο και περισσότερα δεδομένα από ένα σημείο και πέρα να δίνει το ίδιο δέντρο. Αυτό είναι σημαντικό δεδομένου ότι μια μέθοδος μπορεί θεωρητικά να είναι καλή αλλά στην πράξη να απαιτεί μεγάλο πλήθος δεδομένων (ζεύγη βάσεων) για να δώσει ικανοποιητικό αποτέλεσμα.
- iii. Η *συνέπεια (consistency)*, εννοώντας την ικανότητα της μεθόδου να καταλήγει πάντα στο ίδιο φυλογενετικό δέντρο. Μια μη συνεπής μέθοδος πιθανώς να αποτύγχανε ανεξαρτήτως του αριθμού των δεδομένων.
- iv. Η *ρώμη (robust)*, δηλαδή η ικανότητα της μεθόδου να είναι συνεπής όχι μόνο αν τα δεδομένα ταιριάζουν στο μοντέλο αλλά και αν αποκλίνουν αρκετά. Σε περίπτωση που μια μέθοδος «ακολουθεί» πιστά μόνο για το συγκεκριμένο μοντέλο (για παράδειγμα σταθερό ποσοστό GC μεταξύ των ταξινομικών ομάδων) σε αλλαγή μιας σημαντικής παραμέτρου του μοντέλου θα δίνει λάθος αποτελέσματα. Με άλλα λόγια είναι η «ευαισθησία» της μεθόδου σε παραβίαση του μοντέλου.
- v. Η *διαψευσιμότητα (falsifiability)*, δηλαδή η ικανότητα της μεθόδου να «αρνηθεί» το συγκεκριμένο μοντέλο εξέλιξης, καθώς δεν είναι συμβατό με τα δεδομένα που είναι προς ανάλυση. Αυτή η ιδιότητα είναι ταυτόχρονα η πιο σημαντική αλλά και πιο σπάνια

ανάμεσα στις μεθόδους καθώς δεν υπάρχει πρακτικώς καμία που να πληρεί αυτό το κριτήριο.

Η ιδανική λοιπόν μέθοδος θα ήταν αυτή που πληρούσε και τα πέντε κριτήρια, δυστυχώς όμως τέτοια μέθοδος δεν υπάρχει ούτε είναι πιθανόν να υπάρξει. Οι υπάρχουσες δίνουν έμφαση σε ένα ή περισσότερα κριτήρια σε βάρος των υπολοίπων. Για παράδειγμα, η μέθοδος UPGMA είναι πολύ γρήγορη (αποδοτική) αλλά όχι τόσο εύρωστη γιατί βασίζεται στην αυθαίρετη υπόθεση του μοριακού ρολογιού (molecular clock), ενώ η μέθοδος «μεγίστων πιθανοτήτων» (maximum likelihood) είναι συνεπής (ως προς το επιλεγμένο μοντέλο εξέλιξης) αλλά υπολογιστικά όχι τόσο εύχρηστη (Page & Holmes, 1998).

2.2.5.6 Μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης

Γενικά, η εξαγωγή φυλογενετικών σχέσεων είναι μια εκτιμητική διαδικασία. Πρακτικά αυτό που γίνεται είναι η διατύπωση μιας υπόθεσης για μια εξελικτική διαδικασία που έγινε στο παρελθόν, χρησιμοποιώντας ένα σχετικά μικρό ποσοστό πληροφορίας, αυτό που εμπεριέχεται στο σύνολο των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν (Swofford et al., 1996).

Οι διάφορες μέθοδοι για εύρεση φυλογενετικού δέντρου διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες με δυο τρόπους - 1^{ος}, βάση του τρόπου με τον οποίο χειρίζονται τα δεδομένα και 2^{ος}, βάση της προσέγγισης που ακολουθούν για την κατασκευή του ορθότερου φυλογενετικού δέντρου. Έτσι, προς τον χειρισμό των δεδομένων υπάρχουν δυο υποκατηγορίες: α) οι μέθοδοι αποστάσεων (distance methods), οι οποίες χρησιμοποιούν μια μήτρα αποστάσεων (pairwise distance matrix) για να κατασκευάσουν το δέντρο και β) οι διακριτές μέθοδοι (discrete methods) που ξεετάζουν ξεχωριστά την κάθε νουκλεοτιδική θέση. Ως προς τον τρόπο κατασκευής του φυλογενετικού δέντρου οι μέθοδοι χωρίζονται στις: α) μεθόδους ομαδοποίησης (clustering methods), οι οποίες χρησιμοποιούν έναν αλγόριθμο για να κατασκευάσουν ένα φυλογενετικό δέντρο μέσα από μια σειρά δεδομένων βημάτων και β) μεθόδους διερεύνησης κριτηρίων (search methods), οι οποίες με βάση κριτήρια «δοκιμάζουν» πολλά διαφορετικά δέντρα και επιλέγεται το (ή τα) δέντρο/ δέντρα με τη μεγαλύτερη βαθμολογία (Page & Holmes, 1998)

Πίνακας 2-8

		Ταξινόμηση ως προς τύπο δεδομένων	
		Μέθοδοι αποστάσεων	Διακριτές μέθοδοι
Ταξινόμηση ως προς κατασκευή μέθοδοι κατασκευής φυλογενετικού δέντρου	ομαδοποίησης	UPGMA Neighbor- joining	
	Μέθοδοι κριτηρίων	Minimum Evolution	Maximum Parsimony Maximum Likelihood Bayesian Inference

Τόσο στις μεθόδους αποστάσεων, ή αλλιώς αλγοριθμικές, όσο και στις διακριτές, ή αλλιώς διερεύνησης κριτηρίων, χρησιμοποιούνται αλγόριθμοι και είναι σημαντικό να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους. Θα πρέπει να σημειώσουμε ότι υπάρχει μέθοδος που ανήκει ταυτόχρονα στις μεθόδους αποστάσεων και στις μεθόδους διερεύνησης κριτηρίων αλλά αποτελεί εξαίρεση. Στις αλγοριθμικές μεθόδους, ο αλγόριθμος καθορίζει το κριτήριο της επιλογής του δέντρου και έχει πρωταρχικό ρόλο.

Στις μεθόδους που βασίζονται σε κριτήρια, οι αλγόριθμοι είναι απλά εργαλεία πάνω στα οποία θα στηριχθεί η αξιολόγηση των δέντρων που προκύπτουν με βάση τα δεδομένα και βελτιστοποιούν το κριτήριο που έχει τεθεί. Με δεδομένο ότι κάθε δέντρο προκύπτει από μια μέθοδο που στηρίζεται σε τέτοια κριτήρια «βαθμολογείται», τα αντίστοιχα φυλογενετικά σενάρια μπορούν να ιεραρχηθούν με βάση την τιμή αυτού του κριτηρίου. Αυτό είναι το πλεονέκτημα των μεθόδων της κατηγορίας αυτής έναντι των αλγοριθμικών (Swofford et al., 1996), (Page & Holmes, 1998).

2.2.5.6.1 Μέθοδοι αποστάσεων

Οι μέθοδοι αποστάσεων είναι πολύ ταχύτερες διότι προχωρούν άμεσα στην τελική λύση, χωρίς να καθυστερούν συγκρίνοντας εναλλακτικά ανταγωνιστικά σενάρια. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι μέθοδοι UPGMA (Sneath & Sokal, 1973), η Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), η Minimum-Evolution (Kidd & Sgaramella-Zonta, 1971) κ.α.

2.2.5.6.1.1 Μέθοδος “Minimum Evolution”

Η μέθοδος Ελάχιστης Εξέλιξης (Minimum evolution ,ME) βασίζεται στην υπόθεση ότι το δέντρο με το μικρότερο συνολικό άθροισμα μήκους κλάδων είναι το πιθανότερο. Η μέθοδος είναι παρόμοια με την «μέγιστης φειδωλότητας» με την διαφορά ότι βασίζεται σε μήτρα γενετικών αποστάσεων. Πρώτα κατασκευάζεται ένα δέντρο τύπου Neighbor-Joining με την μέθοδο των Saitou & Nei (1987) και υπολογίζεται το συνολικό μήκος (S) των κλάδων του δέντρου. Έπειτα, όλες οι

τοπολογίες που είναι κοντά στο NJ δέντρο εξετάζονται με ορισμένα κριτήρια και υπολογίζεται το μήκος S για κάθε δέντρο. Αυτές οι τιμές έπειτα συγκρίνονται η μια με την άλλη και το δέντρο με την μικρότερη τιμή S θα επιλεγεί ως τελικό. Αυτό συχνά είναι το NJ δέντρο, ωστόσο μερικές φορές η NJ μέθοδος αποτυγχάνει να βρει το “ME” δέντρο. Για την εύρεση των πιο σωστών μηκών των κλάδων χρησιμοποιείται η μέθοδος των ελάχιστων τετραγώνων. Συγκρίσεις με κατάλληλο λογισμικό έδειξαν ότι η μέθοδος ME είναι πιο αποδοτική σε σχέση με άλλες μεθόδους φυλογενετικής ανάλυσης και ότι η προτεινόμενη στατιστική δοκιμασία είναι συντηρητική (Rzhetsky & Nei, 1993).

2.2.5.6.1.2 Μέθοδος “Neighbor-Joining”

Η μέθοδος Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbor-Joining, NJ), είναι μια αρκετά δημοφιλής μέθοδος κατασκευής φυλογενετικών δέντρων που συνδυάζει υπολογιστική δύναμη με την μοναδικότητα της λύσης, καθώς δίνει μόνο ένα τελικό δέντρο. Αυτές οι δύο παραμέτρους (γρήγορη, μόνο ένα δέντρο) την έχουν κάνει μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Ο αλγόριθμος της μεθόδου NJ είναι παρόμοιος της των (Sattath & Tversky, 1977)-(ST μέθοδος), ωστόσο αντίθετα με αυτήν υπολογίζει και την τοπολογία και τα μήκη των κλάδων του τελικού δέντρου. «Γειτονικές αλληλουχίες» ονομάζονται αυτές που ενώνονται με ένα εσωτερικό κόμβο σε «άρριζο» (unrooted) διακλαδιζόμενο δέντρο. Το πλήθος των ζευγών «γειτόνων» σε ένα δέντρο εξαρτάται από την τοπολογία του δέντρου. Όταν έχουμε ένα δέντρο με N αλληλουχίες, όπου $N \geq 4$, τα ελάχιστα ζεύγη είναι δυο, και τα μέγιστα είναι $N/2$ όταν το N είναι άρτιος ή $(N-1)/2$ όταν το N είναι περιττός αριθμός. Για να αρχίσει η κατασκευή, υποθέτει αρχικά ότι υπάρχει μόνο ένας εσωτερικός κόμβος από τον οποίο ξεκινούν οι αλληλουχίες, σχηματίζοντας ένα αστεροειδές σχήμα. Αυτό είναι κατ’ ουσία αδύνατο όσον αφορά τις εξελικτικές διαδικασίες, αλλά αυτό το σχήμα αποτελεί μόνο το αρχικό σημείο. Στην συνέχεια, επιλέγεται τυχαία ένα ζεύγος αλληλουχιών, μετατοπίζεται από τον κόμβο και συνδέεται σε ένα δεύτερο εσωτερικό κόμβο, ο οποίος συνδέεται με κλάδο με τον αρχικό. Έπειτα χρησιμοποιείται η μήτρα αποστάσεων για να υπολογιστεί το ολικό μήκος των κλάδων σε αυτό το «καινούριο» δέντρο. Οι αλληλουχίες επανέρχονται έπειτα στην αρχική τους θέση και ένα άλλο ζεύγος αλληλουχιών συνδέεται σε ένα δεύτερο κλάδο και υπολογίζεται το μήκος αυτού του κλάδου. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να ελεγχθούν όλα τα πιθανά ζεύγη, και έχει βρεθεί ο συνδυασμός που θα δώσει το μικρότερο συνολικό μήκος κλάδων. Αυτό το ζεύγος αλληλουχιών θα είναι γείτονες (neighbors) στο τελικό δέντρο. Αυτές οι δύο αλληλουχίες συνδυάζονται προσωρινά σε μια ενότητα με αποτέλεσμα το πλήθος των συνολικών [ενοτήτων + αλληλουχιών] μειώνεται κατά ένα. Έπειτα, για την νέα μήτρα αποστάσεων, η ανωτέρω διαδικασία επαναλαμβάνεται για την εύρεση του νέου ζεύγους γειτόνων. Από εδώ και στο εξής η διαδικασία επιλογής των αλληλουχιών και του υπολογισμού του μήκους των κλάδων επαναλαμβάνεται μέχρι

να υπολογιστεί το τελικό ολοκληρωμένο δέντρο. Η μέθοδος αυτή, όπως και της Ελάχιστης Φειδωλότητας βασίζεται στην ελάχιστη αλλαγή, ωστόσο δεν εγγυάται ότι θα βρει το δέντρο με την συνολικά μικρότερη απόσταση (Saitou & Nei, 1987)

Η απόδοση της μεθόδου Neighbor-Joining (NJ) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μοντέλο που επιλέγεται για την μετατροπή των καταστάσεων των χαρακτήρων προς γενετικές αποστάσεις. Αν το μοντέλο που χρησιμοποιείται δεν αφήνει περιθώρια για πολλαπλές υποκαταστάσεις σε μια νουκλεοτιδική θέση, τότε η αξιοπιστία των δέντρων που προκύπτουν τίθεται σε αμφισβήτηση. Όταν οι γενετικές αποστάσεις που χρησιμοποιούνται είναι μικρές και το μήκος των αλληλουχιών μεγάλο, τότε προκύπτουν ακριβείς εκτιμήσεις των γενετικών αποστάσεων και η μέθοδος αποδίδει αρκετά καλά ακόμα και αν παραβιάζεται η αρχή του σταθερού ρυθμού εξέλιξης. Στην περίπτωση όμως που οι αλληλουχίες είναι μικρού μήκους, αναγκαστικά οι εκτιμώμενες αποστάσεις θα έχουν υψηλές τυπικές αποκλίσεις, γεγονός που οδηγεί σε δέντρα με τοπολογίες στατιστικά ανίσχυρες. Επιπλέον, αν μερικές από τις εκτιμώμενες γενετικές αποστάσεις είναι υψηλές ή αν διαφέρει ο ρυθμός εξέλιξης μεταξύ των νουκλεοτιδικών θέσεων, τότε η ακριβής εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων δυσχεραίνεται σε μεγάλο βαθμό. Υπό τέτοιες συνθήκες λοιπόν, όπως και όλες μέθοδοι που στηρίζονται σε μήτρες γενετικών αποστάσεων, δίνουν αμφίβολα αποτελέσματα (Graur & Li, 2000).

2.2.5.6.1.3 Μέθοδος "UPGMA"

Η μέθοδος «Αστάθμιστων ζευγών με αριθμητικό μέσο» (UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means) είναι και αυτή μια μέθοδος αποστάσεων που χρησιμοποιεί αλγόριθμο για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου. Θεωρείται ως η απλούστερη των μεθόδων κατασκευής φυλογενετικών δέντρων. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή ταξινομικών φαινογραφημάτων, δηλαδή δέντρων που αναδεικνύουν τις φαινοτυπικές ομοιότητες μεταξύ ταξινομικών μονάδων, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για κατασκευή φυλογενετικών δέντρων εάν ο ρυθμός εξελίξεως είναι περίπου ο ίδιος μεταξύ των διαφορετικών γενεαλογικών γραμμών. Η μέθοδος χρησιμοποιεί έναν «διαδοχικής ομαδοποίησης» αλγόριθμο, όπου κοντινές τοπολογικές σχέσεις εξετάζονται και στοιχίζονται βάση ομοιότητας. Το φυλογενετικό δέντρο κατασκευάζεται και αυτό με την ίδια λογική, δηλαδή με συγκρίσεις ανά δυο αλληλουχιών. Αρχικά, βάσει μήτρας αποστάσεων, ενώνονται οι «κοντινότερες» (από πλευράς ομοιότητας) αλληλουχίες και η διακλάδωση τοποθετείται στο $\frac{1}{2}$ της απόστασης. Στο επόμενο βήμα, κατασκευάζεται η νέα μήτρα αποστάσεων που έχει πλέον μικρότερη κατά μια διάσταση και ξαναγίνεται η συνένωση των δύο πιο κοντινών αλληλουχιών. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι το τελικό δέντρο (Sneath & Sokal, 1973)

Η μέθοδος UPGMA διαφέρει από άλλες στο ότι βασίζεται σε «μοριακό ρολόι» που σημαίνει ότι υποθέτει πως όλα τα γονίδια εξελίσσονται στον χρόνο με τον ίδιο ρυθμό. Παρόλη την ταχύτητα της

μεθόδου UPGMA έχει και σημαντικά μειονεκτήματα. Το σημαντικότερο από αυτά είναι ότι η μέθοδος είναι πολύ ευαίσθητη σε διαφορετικούς ρυθμούς εξέλιξης. Αυτό σημαίνει πως όταν μια ταξινομική ομάδα έχει υποστεί περισσότερες υποκαταστάσεις σε ένα χρονικό διάστημα σε σχέση με μια άλλη, μπορεί να καταλήξουμε σε δέντρο που έχει λάθος τοπολογία (Page & Holmes, 1998).

Τα κυριότερα γενικά προβλήματα των μεθόδων αποστάσεων είναι δυο: το πρώτο είναι ότι με τις μεθόδους αυτές χάνουμε αρκετή από την αρχική πληροφορία και το δεύτερο είναι τα μη ερμηνεύσιμα μήκη κλάδων. Εάν τα αρχικά δεδομένα είναι ήδη σε μορφή αποστάσεων, όπως αυτά που λαμβάνονται από αποτελέσματα υβριδισμού DNA τότε αναγκαστικά θα χρησιμοποιήσουμε αυτές τις αποστάσεις. Αν όμως έχουμε ακολουθίες, μπορούμε είτε να τις αναλύσουμε απευθείας είτε να τις μετατρέψουμε πρώτα σε αποστάσεις. Εάν κάνουμε το δεύτερο θα απολέσουμε πολύτιμη πληροφορία. Για παράδειγμα, όταν τα δεδομένα μετατραπούν σε αποστάσεις δεν μπορούμε να «ιχνηλατήσουμε» την εξέλιξη ξεχωριστών «στελεχών» ή κατηγοριών «στελεχών», καθώς έχουμε μόνο έναν μέσο όρο σχέσης μεταξύ του φυλογενετικού δέντρου και των δεδομένων.

Όσον αφορά το δεύτερο μειονέκτημα, είναι δυνατόν να αναπαραχθούν κλάδοι του δέντρου με μήκη που να μην είναι μαθηματικά είναι σωστά αλλά είναι δύσκολα στην ερμηνεία. Όταν ένας κλάδος βρεθεί να έχει μήκος μη ακέραιο (π.χ. 331.5 υποκαταστάσεις), έχουμε δυο προβλήματα. Το πρώτο είναι ότι το πώς θα ερμηνεύσουμε τις 0.5 υποκαταστάσεις ανά νουκλεοτίδιο καθώς θα πρέπει να στρογγυλοποιηθεί προς ένα ακέραιο. Αυτό λύνεται εν μέρει λόγω του ότι τα μήκη των κλάδων μπορούν να αντιπροσωπεύουν 2 διαφορετικές έννοιες: η μία είναι το *αναμενόμενο* ποσό εξελικτικών αλλαγών και η άλλη το *πραγματικό* ποσό. Έτσι, όταν υπολογίζουμε σε βάθος χρόνου, μπορούμε να θεωρήσουμε αποδεκτό μη ακέραιο νούμερο υποκαταστάσεων. Το δεύτερο πρόβλημα είναι ότι ένας μη ακέραιος αριθμός υποκαταστάσεων δεν είναι δυνατός στην πραγματικότητα. Έτσι πάντα θα πρέπει το μήκος του κλάδου μεταξύ δυο αλληλουχιών (που υπολογίζεται μέσω ελάχιστων τετραγώνων) να μην είναι μικρότερο από την από την παρατηρούμενη απόσταση μεταξύ των (Page & Holmes, 1998).

2.2.5.6.2 Διακριτές μέθοδοι

2.2.5.6.2.1 Μέθοδος Μέγιστης Φειδωλότητας (*Maximum Parsimony*)

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο σκεπτικό ότι πιο απλές υποθέσεις είναι προτιμητέες σε σχέση με πιο πολύπλοκες. Ο αλγόριθμος της μεθόδου βασίζεται στην κατασκευή φυλογενετικού δέντρου με τις ελάχιστες δυνατές εξελικτικές αλλαγές (παραδοχές) που απαιτούνται. Σε αυτή την μέθοδο εξετάζονται όλες οι πιθανές τοπολογίες που μπορούν να συνδέουν τις αλληλουχίες και για κάθε τοπολογία υπολογίζεται ο αριθμός των εξελικτικών αλλαγών που πρέπει να έχουν γίνει στις αλληλουχίες ώστε να προκύψει η συγκεκριμένη τοπολογία. Η τοπολογία που θα έχει το μικρότερο (φειδωλότερο) αριθμό βημάτων αποτελεί και το δέντρο της μέγιστης φειδωλότητας. Είναι αρκετά

πιθανό να μην προκύψει μόνο ένα δέντρο, αλλά πολλά περισσότερα, τα οποία θεωρούνται εξίσου φειδωλά (equally parsimony trees). Μια ιδιαιτερότητα αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν χρησιμοποιούνται όλες οι νουκλεοτιδικές θέσεις, αλλά μόνο αυτές οι οποίες διαφοροποιούνται μεταξύ των αλληλουχιών, ενώ οι σταθερές νουκλεοτιδικές θέσεις εξαιρούνται από την ανάλυση. Για να είναι μια θέση πληροφοριακή στην κατασκευή δέντρων μέγιστης φειδωλότητας θα πρέπει να φέρει τουλάχιστον δυο διαφορετικά νουκλεοτίδια και το καθένα εκπροσωπείται σε δυο τουλάχιστον αλληλουχίες. Αυτές οι θέσεις χαρακτηρίζονται πληροφοριακές θέσεις (parsimony-informative sites). Όσο περισσότερες είναι αυτές οι θέσεις τόσο πιο αξιόπιστο αναμένεται να είναι το αντίστοιχο δέντρο που θα προκύψει. Ωστόσο, η τοπολογία του φειδωλού δέντρου ενδέχεται να είναι λανθασμένη όταν ο ρυθμός εξέλιξης διαφέρει από κλάδο σε κλάδο. Κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις, ιδίως όταν οι εξεταζόμενες αλληλουχίες είναι περισσότερες των τεσσάρων, η λανθασμένη τοπολογία μπορεί να προκύψει ακόμα και αν ο εξελικτικός ρυθμός είναι κοινός ανάμεσα στους κλάδους (Hendy & Penny, 1989).

Η μέθοδος της μέγιστης φειδωλότητας κάνει μόνο μια παραδοχή και αυτή είναι ότι το δέντρο που απαιτεί τις λιγότερες αλλαγές είναι το καλύτερο. Όταν ο βαθμός της διαφοροποίησης μεταξύ των αλληλουχιών είναι μικρός, τότε οι ομοπλασίες (η κατάσταση κατά την οποία ένας χαρακτήρας εξελίσσεται ανεξάρτητα σε δυο γενεαλογικές γραμμές) είναι σπάνιες και το κριτήριο φειδωλότητας λειτουργεί ικανοποιητικά. Ωστόσο, όταν ο βαθμός της διαφοροποίησης είναι υψηλός, τότε οι ομοπλασίες αναμένεται να είναι κοινές και το κριτήριο της φειδωλότητας να δώσει εσφαλμένες τοπολογίες. Συγκεκριμένα, αν κάποιες αλληλουχίες διαφοροποιούνται με διαφορετικό ρυθμό από κάποιες άλλες, τότε είναι πιθανόν οι ομοπλασίες να είναι περισσότερο κοινές στους κλάδους που οδηγούν στις ταχύτερα εξελισσόμενες αλληλουχίες. Αποτέλεσμα αυτού είναι να προκύπτουν παραπλανητικές σχέσεις μεταξύ των αλληλουχιών. Με άλλα λόγια, η μέθοδος της μέγιστης φειδωλότητας δεν αποδίδει ικανοποιητικά όταν υπάρχουν κλάδοι μεγάλου μήκους σε σχέση με τους υπόλοιπους (στελέχη που έχουν υποστεί πολλές υποκαταστάσεις σε σχέση με άλλα), γιατί βάση του κριτηρίου φειδωλότητας αυτοί οι κλάδοι θα ενωθούν μεταξύ τους (long branch attraction, (Felsenstein, 1978). Σε περίπτωση που υπάρχει υποψία αυτού του φαινομένου, είναι δυνατόν να αφαιρεθεί προσωρινά μία αλληλουχία από το ζεύγος που έχει το πρόβλημα και να ξαναγίνει έλεγχος του δέντρου. Αν παρουσιαστεί διαφορετικό δέντρο, σημαίνει ότι πράγματι υπήρχε «έλξη μακρών κλάδων» (O'Connor et al., 2010).

Γενικά, σε μια ανάλυση μέγιστης φειδωλότητας, πρέπει να ελεγχθούν όλα τα πιθανά δέντρα που προκύπτουν. Αυτή η σύγκριση είναι δυνατή μόνο όταν χρησιμοποιείται μικρός αριθμός αλληλουχιών και το μήκος των αλληλουχιών δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλο (Graur & Li, 2000). Αυτό είναι ένα σημαντικό πρόβλημα καθώς όσο αυξάνει ο αριθμός των αλληλουχιών το πλήθος των

δυνατών δέντρων αυξάνει υπέρμετρα. Για παράδειγμα, με 5 αλληλουχίες θα πρέπει να ελεγχθούν 5 άρριζα δέντρα ενώ για 15 αλληλουχίες 2.13×10^{15} άρριζα δέντρα. Μια παράκαμψη αυτού του προβλήματος είναι η χρήση ενός ταχύτερου αλγόριθμου αναζήτησης του βέλτιστου δέντρου, κάτι που όμως μειώνει σε μεγάλο βαθμό την δυνατότητα να βρεθεί το πραγματικά φειδωλότερο δέντρο. Οι κύριοι δυο αλγόριθμοι που χρησιμοποιούνται εκτός από τον πλήρη (exhaustive), είναι ο “Branch-and-Bound” που ξεκινά από το δέντρο που έχει το μεγαλύτερο συνολικό μήκος, ελέγχει ορισμένα δέντρα και επιλέγει το καλύτερο δέντρο και ο ευρετικός «Heuristic» που ελέγχει ορισμένα δέντρα και επιλέγει ένα δέντρο που μπορεί να είναι ή να μην είναι το καλύτερο (Lin et al., 2007). Γενικά η μέθοδος έχει αρκετά θετικά στοιχεία, ωστόσο δύο κύρια μειονεκτήματα εκτός της ταχύτητας είναι ότι δεν χρησιμοποιεί όλα τα δεδομένα των αλληλουχιών και ότι δεν δίνει πληροφορίες για το μήκος των κλάδων. Οι αναλύσεις μέγιστης φειδωλότητας έγιναν με το πρόγραμμα MEGA 5 με την χρήση αλγορίθμων α) “max-mini branch & bound” που είναι παραλλαγή της μεθόδου branch & bound και επιτρέπει τον έλεγχο περισσότερων τάξεων, και β) [Close neighbor interchange], που είναι ευρετική μέθοδος καθώς ξεκινά με ένα προσωρινό δέντρο και υπολογίζει άλλα με εναλλαγή κοντινών «γειτόνων» υπολογίζει άλλα ώσπου να βρει το καλύτερο. Η διαδικασία αυτή μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές για καλύτερη προσέγγιση του σωστού δέντρου.

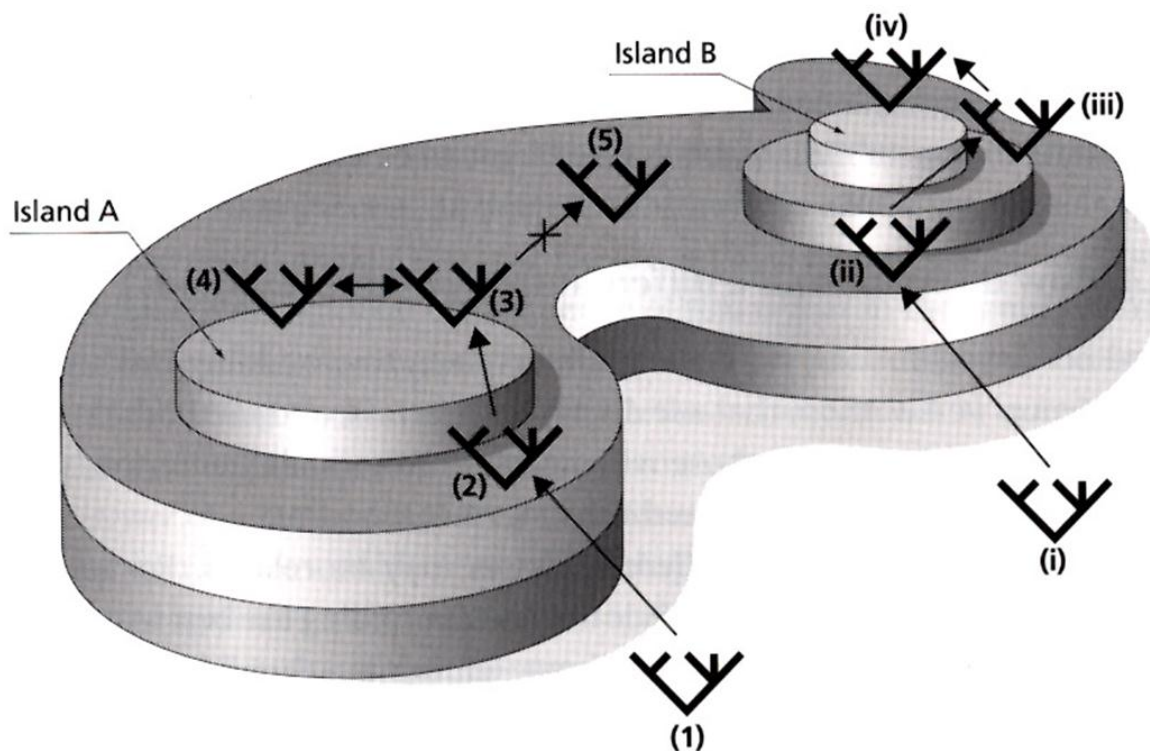
2.2.5.6.2.2 Μέθοδος Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood)

Η ιδέα της εφαρμογής αυτής της μεθόδου για την διερεύνηση φυλογενετικών σχέσεων παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τους Cavalli-Sforza & Edwards (1967), οι οποίοι χρησιμοποίησαν συχνότητες αλληλόμορφων. Στη συνέχεια, ο Felsenstein (1981) εφάρμοσε αυτή την μέθοδο σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και ανέπτυξε έναν αλγόριθμο για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου με βάση αυτή τη μέθοδο. Κατά την μέθοδο αυτή υπολογίζεται το φυλογενετικό δέντρο που έχει την μεγαλύτερη πιθανότητα να ταιριάζει με την εξελικτική πορεία των στελεχών, όταν οι αλληλουχίες εξελίσσονται με ένα εξαρχής ορισμένο μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης. Ποιο συγκεκριμένα, η πιθανοφάνεια ορίζεται ως:

$L_D = \Pr(D|H_0)$, δηλαδή η πιθανότητα να παρατηρήσουμε τα δεδομένα (D) κάνοντας μια αρχική υπόθεση (H_0) σχετικά με τον τρόπο που αυτά προέκυψαν. Με αντίστοιχο τρόπο, στο πλαίσιο της φυλογενετικής μεθόδου της μέγιστης πιθανοφάνειας, αναζητείται το δέντρο (H_0) εκείνο που εξηγεί με την μεγαλύτερη πιθανότητα (Pr) τις στοιχισμένες μας αλληλουχίες (D) έχοντας ως δεδομένο ένα μοντέλο εξέλιξης των αλληλουχιών. Το δέντρο με την μεγαλύτερη τιμή πιθανοφάνειας είναι αυτό που προτείνεται τελικά ως το πιο κοντινό προς το πραγματικό.

Ένα βασικό πρόβλημα της μεθόδου αυτής είναι ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί, καθώς εξετάζει όλα τα πιθανά δένδρα για να καταλήξει στο καλύτερο. Για μεγάλο αριθμό αλληλουχιών εφαρμόζονται διάφοροι αλγόριθμοι αναζήτησης, οι οποίοι όμως δεν διασφαλίζουν

τελικά την εύρεση του δέντρου με την μέγιστη τιμή πιθανοφάνειας, ιδιαίτερα όταν το σύνολο των αλληλουχιών περιλαμβάνει αλληλουχίες μικρές σε μέγεθος. Το συγκεκριμένο πρόβλημα αρκετών αλγορίθμων είναι ότι υπάρχουν πολλές «καλές» νησίδες πιθανοφάνειας όπου αν ο αλγόριθμος τύπου «αναρρίχησης λόφου» (hill climbing) καταλήγει στο τοπικό μέγιστο και όχι στο ολικό. Αυτό συμβαίνει επειδή η φύση των συγκεκριμένων αλγορίθμων είναι να προσπαθούν να βρουν ένα μέγιστο χωρίς όμως να «ξεναδοκιμάζουν» περιοχές με μικρότερη πιθανότητα.



Εικόνα 25 Το πρόβλημα των νησίδων φυλογενετικών δέντρων. Ένας αλγόριθμος αναρρίχησης που θα ξεκινούσε από το δέντρο 1 θα επιτύχαινε να βρει τα δέντρα 3 & 4 (που αποτελούν την νησίδα A), αλλά δεν θα μπορούσε να βρει ότι το δέντρο iv στην νησίδα B είναι ακόμα καλύτερο γιατί θα έπρεπε να διασχίσει ένα πλατό δέντρων (π.χ. 5) που είναι χειρότερα των 3 & 4. Ωστόσο, αν η αναζήτηση ξεκινούσε από το δέντρο i θα επιτύχαινε να βρει το καλύτερο δέντρο. (Maddison, 1991)

Στην μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας ελέγχονται όλες οι δυνατές τοπολογίες και ιδιαίτερα όλες οι νουκλεοτιδικές θέσεις, όχι μόνο οι πληροφοριακές. Αντίθετα με την μέθοδο της μέγιστης φειδωλότητας, που και αυτή επιτρέπει διαφοροποίηση στους λόγους μεταπτώσεων/ μεταστροφών, η μέθοδος μέγιστης πιθανοφάνειας βασίζεται σε κριτήρια για την εύρεση των καλύτερων τιμών. Συνεπώς, η πληροφορία που βρίσκεται κατατεθειμένη στις αλληλουχίες χρησιμοποιείται στον μέγιστο βαθμό (Page & Holmes, 1998). Παρόλα αυτά, στην πράξη είναι μια μέθοδος που κάνει πολύ συγκεκριμένες υποθέσεις όσον αφορά το ρυθμό και τον τύπο των αντικαταστάσεων στις νουκλεοτιδικές θέσεις (Tateno et al., 1994). Η μέθοδος απαιτεί ένα ακριβές μοντέλο εξέλιξης, γεγονός το οποίο είναι και θετικό αλλά και αρνητικό. Αν χρησιμοποιηθεί μοντέλο το οποίο δεν

ανταποκρίνεται στα πραγματικά δεδομένα ή αν καταλήγουμε σε περισσότερα του ενός δέντρα , τότε και με αυτή την μέθοδο τα αποτελέσματα ενδέχεται να είναι παραπλανητικά.

2.2.5.6.2.3 Μπεϊσειανή Συμπερασματολογία (Bayesian Inference)

Η Μπεϊσειανή Συμπερασματολογία (Bayesian Inference) είναι μια σχετικά πρόσφατη φυλογενετική μέθοδος, η οποία μοιάζει αρκετά με την μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας ως προς τις βασικές παραδοχές τις και είναι πολύ πιο γρήγορη (Huelsenbeck et al., 2001). Στην πραγματικότητα ο στόχος της είναι να γίνει αναφορά σε κάτι που δεν έχει παρατηρηθεί βασιζόμενη σε ήδη υπάρχουσες παρατηρήσεις. Χρησιμοποιεί μια σημαντική αρχή που ονομάζεται *επανασταθμισμένη πιθανότητα ή πιθανότητα προκύπτουσα εκ των υστέρων (posterior probability)*.

Το θεώρημα του Bayes:

$$\Pr[Tree|Data] = \frac{\Pr[Data|Tree] \times \Pr[Tree]}{\Pr[Data]}$$

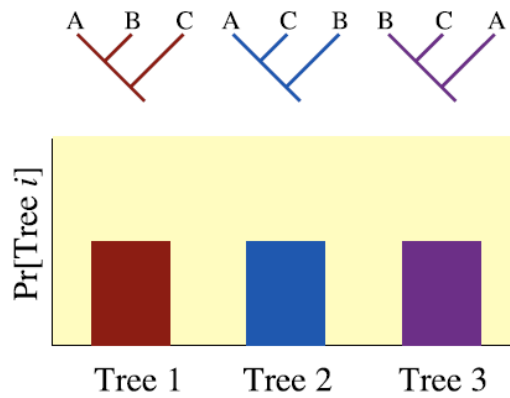
(όπου η κάθετος | σημαίνει «δοσμένου ότι») χρησιμοποιείται για να συνδυάσει την πιθανότητα μιας υπόθεσης να είναι σωστή πριν κάνουμε κάποια παρατήρηση (*prior probability*) της φυλογένεσης, δηλαδή το $\Pr[Tree]$,με την πιθανοφάνεια (*likelihood*) των δεδομένων που συμβολίζεται με $\Pr[Data|Tree]$ ώστε να παραχθεί η κατανομή της επανασταθμισμένης πιθανότητας $\Pr[Tree|Data]$ της αρχικής υπόθεσης υπό το πρίσμα των δεδομένων που παρατηρήθηκαν. Στην ουσία, η επανασταθμισμένη πιθανότητα ενός δέντρου είναι συνώνυμη με την πιθανότητα το επιλεγμένο δέντρο να είναι το σωστό. Έπειτα, τα συμπεράσματα της φυλογενετικής «ιστορίας» της ομάδας είναι βασισμένα στην επανασταθμισμένη πιθανότητα.

Η επανασταθμισμένη πιθανότητα παρόλο που είναι εύκολο να διατυπωθεί, στην πράξη εμπεριέχει άθροισμα για κάθε δέντρο, καθώς και ολοκλήρωση για όλους τους δυνατούς συνδυασμούς μήκους κλάδων και παραμέτρων υποκατάστασης. Ευτυχώς, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που επιτρέπουν την κατ' εκτίμηση υπολογισμό της επανασταθμισμένης πιθανότητας ενός δέντρου, με την σημαντικότερη να είναι η "Markov chain Monte Carlo" (MCMC).

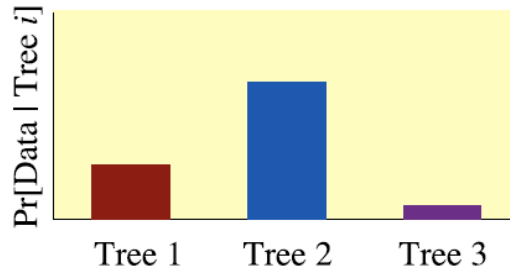
Για τον υπολογισμό της οριακής πιθανότητας αποδοχής ή μη ενός δέντρου χρησιμοποιείται συνδυαστικά ο αλγόριθμος των *Metropolis & Hastings* (Metropolis et al., 1953) & (Hastings, 1970). Ο αλγόριθμος MCMC έχει σχεδιαστεί ως μέθοδος «αναρρίχησης λόφων» που αναζητά τις ψηλότερες «κορυφές» αλλά και κάθε τόσο κινείται προς τα κάτω λόγω της τυχαίας φύσης της αναζήτησης. Έτσι, σε αντίθεση με την μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας, δεν κινδυνεύει να «εγκλωβιστεί» σε τοπικό μέγιστο. Με την πάροδο του χρόνου, δέντρα με μεγαλύτερη βαθμολογία υφίστανται δειγματοληψία περισσότερο από δέντρα με χαμηλή βαθμολογία. Όταν η MCMC φτάσει τις περιοχές με υψηλή βαθμολογία συλλέγονται αρκετά δέντρα που βρίσκονται κοντά στο βέλτιστο για την κατασκευή ενός συναινετικού δέντρου (*consensus tree*).

Εικόνα 26 Στην εικόνα φαίνονται τα τρία χαρακτηριστικά μέρη από τα οποία αποτελείται η Μπείσειανή συμπερασματολογία.

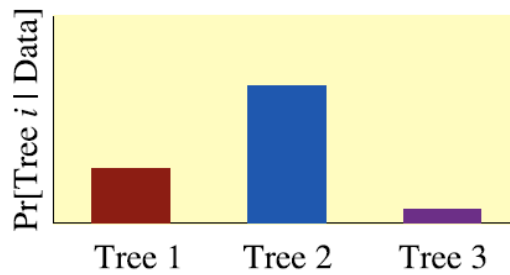
Στο 1^ο διάγραμμα απεικονίζεται η πιθανότητα μιας υπόθεσης να είναι σωστή προτού κάνουμε κάποια παρατήρηση (prior probability) που συμβολίζεται με $\Pr[\text{Tree } i]$ και αντιπροσωπεύει την πιθανότητα κάθε δέντρου πριν γίνουν οι παρατηρήσεις. Τυπικά, όλα τα δέντρα θεωρούνται εξίσου πιθανά εκ των προτέρων.



Στο 2^ο διάγραμμα φαίνεται η πιθανοφάνεια (likelihood) που απεικονίζεται με $\Pr[\text{Data} | \text{Tree } i]$ η οποία είναι ανάλογη των παρατηρήσεων (συχνά είναι μια στοίχιση αλληλουχιών DNA) και προϋποθέτει την θέση συγκεκριμένων υποθέσεων σχετικά με τις διαδικασίες παραγωγής των συμπερασμάτων.



Στο 3^ο διάγραμμα φαίνεται η εκ των υστέρων πιθανότητα (posterior probability) - $\Pr[\text{Tree } i | \text{Data}]$ που ουσιαστικά είναι η πιθανότητα παρατήρησης του κάθε δέντρου με βάση τις παρατηρήσεις. Προκύπτει με τον συνδυασμό της εκ των προτέρων πιθανότητας και της πιθανοφάνειας με την χρήση του τύπου του Bayes. (Huelsenbeck et al., 2001)



Όπως και η Μέγιστη Πιθανοφάνεια, η Μπείσειανή Ανάλυση επανασταθμίζει τις πιθανοφάνειες σε πραγματικές πιθανότητες έτσι ώστε το άθροισμα των πιθανοτήτων σε όλα τα δέντρα να είναι ίσο με την μονάδα, και με αυτόν τον τρόπο μας επιτρέπει να χρησιμοποιήσουμε τη κλασική θεωρία των πιθανοτήτων για να αναλύσουμε τα δεδομένα. Η Μπείσειανή Ανάλυση διαφέρει από την Μέγιστη Πιθανοφάνεια στο ότι η πρώτη αναζητά το δέντρο που έχει την μεγαλύτερη πιθανότητα έχοντας ως βάση τα δεδομένα και το εξελικτικό μοντέλο $\Pr[\text{Tree} | \text{Data}]$ ενώ η δεύτερη αναζητά το δέντρο που μεγιστοποιεί την πιθανότητα να παρατηρηθούν τα εκάστοτε δεδομένα έχοντας ως βάση το δέντρο (την υπόθεση) $\Pr[\text{Data} | \text{Tree}]$. Η Μπείσειανή Ανάλυση μπορεί να έχει καλύτερη απόδοση από την Μέγιστη Πιθανοφάνεια (ML), αλλά ειδικά είναι πολύ πιο γρήγορη από την ML και κατάλληλη για τον έλεγχο μεγάλου όγκου δεδομένων. Ο λόγος που η Μπείσειανή Ανάλυση έχει μεγαλύτερη απόδοση της ML είναι ότι η ML αναζητά και μπορεί να βρει ένα δέντρο με έστω 90% πιθανότητα να είναι αληθινό, ενώ η Μπείσειανή Ανάλυση αναζητά και βρίσκει εκατοντάδες ή χιλιάδες δέντρα με 85-90% πιθανότητα να είναι αληθινά (Xiong, 2006).

2.2.5.7 Αξιοπιστία των δέντρων

Το δέντρο που προκύπτει από την ανάλυση κάποιων δεδομένων σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να είναι λανθασμένο. Για παράδειγμα, τυχαία γεγονότα όμως η συγκλίνουσα εξέλιξη μπορούν να οδηγήσουν στο λανθασμένο συμπέρασμα ότι δυο τάξα είναι πολύ συγγενικά, παρότι αυτό δεν ισχύει πραγματικά. Ο καλύτερος τρόπος για την αποφυγή των τυχαίων λαθών είναι η χρησιμοποίηση μεγάλου αριθμού δεδομένων που θα εγγυηθούν το σωστό αποτέλεσμα των χρησιμοποιούμενων μεθόδων. Χρησιμοποιούνται δυο κυρίως μέθοδοι εκτίμησης της αξιοπιστίας των δέντρων της φυλογενετικής ανάλυσης: η μέθοδος *Bootstrap* και η μέθοδος *Jackknife*. Και οι δυο μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της ποικιλότητας που σχετίζεται με κάποια στατιστική παράμετρο, για την οποία η δειγματοληπτική κατανομή είναι άγνωστη ή δύσκολο να βρεθεί. Οι μέθοδοι αυτές ονομάζονται και *αναδειγματοληπτικές* (*resampling*) επειδή λειτουργούν εκτιμώντας την μορφή της δειγματοληπτικής κατανομής μέσω της επανειλημμένης δειγματοληψίας από τα αρχικά δεδομένα.

Στην μέθοδο *Bootstrap* γίνεται τυχαία δειγματοληψία των στοιχείων δεδομένων μέσω αντικατάστασης ορισμένων από τα αρχικά δεδομένα, μέχρι την δημιουργία μιας νέας σειράς με τον ίδιο αριθμό δεδομένων με την αρχική σειρά. Κατά συνέπεια, σε μια αναδειγματοληψία, ορισμένα από τα αρχικά στοιχεία δεδομένων δεν περιλαμβάνονται καθόλου, άλλα περιλαμβάνονται μια φορά και άλλα δυο φορές ή περισσότερες. Σε κάθε αναδειγματοληψία υπολογίζεται εκ νέου η στατιστική παράμετρος που μας ενδιαφέρει. Αν, μετά από τον επιλεγμένο αριθμό επαναδειγματοληψιών (κατά κανόνα ≥ 100), τα στοιχεία δεδομένων είναι αντιπροσωπευτικά των εξεταζόμενων τάξεων τότε οι τιμές της παραμέτρου υπολογίζονται μέσα στα όρια εμπιστοσύνης (συνήθως 95%) που θέτουμε γι' αυτήν. Όταν τα δεδομένα είναι «καλής ποιότητας» τότε θα έχουμε σταθερό τελικό δέντρο ενώ σε αντίθετη περίπτωση θα έχουμε τυχαία δέντρα (Felsenstein, 1985).

Στην μέθοδο *Jackknife* γίνεται αναδειγματοληψία απορρίπτοντας η στοιχεία από τα αρχικά στοιχεία δεδομένων οπότε ο υπολογισμός της στατιστικής παραμέτρου που μας ενδιαφέρει γίνεται από $m-n$ στοιχεία. Συνήθως $n=1$ οπότε σε κάθε αναδειγματοληψία απορρίπτεται ένα στοιχείο δεδομένων και γίνεται «ψευδοεκτίμηση» της παραμέτρου από $m-1$ στοιχεία. Η αλλαγή της παραμέτρου είναι το $1/n$ που θα υπήρχε αν γινόταν μια δειγματοληψία από μεγαλύτερο πληθυσμό. Με τον τρόπο αυτό υπολογίζεται η απόκλιση της παραμέτρου προεκτείνοντας από τις «ψευδοεκτιμήσεις» των αναδειγματοληψιών στον υπό εξέταση πληθυσμό. Η χρήση της μεθόδου αυτής προϋποθέτει τα εξής: η υπό εξέταση ομάδα τάξεων να είναι μονοφυλετική, τα στοιχεία δεδομένων αντιπροσωπευτικά της κατανομής και τα αρχικά στοιχεία δεδομένων πολυπληθή ώστε να όρια εμπιστοσύνης της μεθόδου να είναι μεγάλα. Μια κύρια διαφορά των *bootstrap* και *jackknife* είναι ότι η πρώτη μέθοδος δίνει διαφορετικά αποτελέσματα κάθε φορά ενώ η δεύτερη τα

ίδια. Επίσης, η μέθοδος jackknife υπολογίζει μόνο την διακύμανση της στατιστικής παραμέτρου, ενώ η μέθοδος bootstrap όλη την κατανομή βάση της στατιστικής παραμέτρου.

Η αξιολόγηση της αξιοπιστίας των φυλογενετικών δέντρων που κατασκευάζονται με τις διάφορες φυλογενετικές μεθόδους αποσκοπεί στην εκτίμηση της σταθερότητας, η οποία μπορεί να αποδοθεί στην τοπολογία των κλάδων τους. Οι τιμές των μεθόδων αυτών μας δίνουν την πιθανότητα που έχει κάθε κλάδος να εμφανίζεται σε όλα τα δέντρα που προκύπτουν μετά πολλαπλές τυχαίες αναδιατάξεις των ίδιων δεδομένων. Όσο μεγαλύτερες είναι οι τιμές των παραμέτρων αυτών τόσο σταθερότερη θεωρείται η τοπολογία των κλάδων του. Ωστόσο, αν η μέθοδος εξαγωγής φυλογενετικών συμπερασμάτων έχει μη επιθυμητές ιδιότητες – όπως αστάθεια – οι μέθοδοι επαναδειγματοληψίας δεν μπορούν να βοηθήσουν (Felsenstein, 1985).

Την αξιοπιστία των φυλογενετικών δέντρων βελτιώνει επιπλέον η χρήση μιας λειτουργικής ταξινομικής μονάδας που λειτουργεί ως μέτρο φυλογενετικής συγγένειας. Η *ομάδα αναφοράς* ή *εξωτερική ομάδα* (outgroup) επιλέγεται ώστε να είναι γνωστή σε γενικές γραμμές η φυλογενετική της σχέση με τα εξεταζόμενα τάξα. Η ομάδα αναφοράς επίσης θα πρέπει να είναι πιο μακριά σε γενετική απόσταση σε σχέση τα υπόλοιπα τάξα ώστε να έχουμε σωστή αναπαράσταση των φυλογενετικών σχέσεων. Συχνά, η δοκιμαστική χρήση περισσότερων της μιας τέτοιας ομάδων ώστε κάποια να είναι περισσότερο απομακρυσμένη από τα εξεταζόμενα τάξα, επιτρέπει την επιλογή του καλύτερου μέτρου σύγκρισης. Με την επιλογή της κατάλληλης ομάδας αναφοράς, την φυλογενετική ανάλυση των δεδομένων και τον έλεγχο αναδειγματοληψίας των δέντρων που προκύπτουν, καταλήγουμε σε ένα συναινετικό (consensus) δέντρο στο οποίο κάθε κλάδος έχει μεγαλύτερη αξιοπιστία (Jermiin et al., 1997).

2.3 Παθογένεια απομονώσεων καμαροσπορίου φιστικιάς

Ένας από τους σημαντικότερους ελέγχους που γίνονται σε ένα παθογόνο είναι ο έλεγχος της παθογένειάς του. Αυτός μπορεί να γίνει σε διαφορετικά μέρη του φυτού αναλόγως του παθογόνου. Δεδομένου ότι το καμαροσπόριο της φιστικιάς προσβάλλει διάφορα μέρη του δέντρου –κλάδους, φύλλα και ταξικαρπίες αποφασίστηκε ο έλεγχος της παθογένειας να γίνει σε αποκομμένα φύλλα φιστικιάς (detached leaf assay) και σε κλάδους στο δέντρο. Στα φύλλα πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις με εναιώρημα μυκηλίου ενώ στους κλάδους οι μολύνσεις έγιναν με δίσκους μυκηλίου (mycelial disks). Και στις δυο περιπτώσεις έγιναν 3 επαναλήψεις για κάθε απομόνωση. Επιλέχθηκαν συνολικά 9 απομονώσεις που περιελάμβαναν ευρύ κύκλο ξενιστών καθώς και απομονώσεις φιστικιάς από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας.

Πίνακας 2-9

α/α	Ξενιστής	περιοχή
1	Σοφόρα	ΓΠΑ, Αττική
26	Φιστικιά	ΓΠΑ, Αττική
29	Φιστικιά	Μώλος Φθιώτιδας
33	Φιστικιά	Μάκρη Φθιώτιδας
35	Ελιά	Κηφισιά - ΙΓΕ (Άλσος Συγγρού)
51	Φιστικιά	Βόλος
52	Αμπέλι	Αλιάρτος Βοιωτίας
55	Φιστικιά	Θήβα
57	Φιστικιά	Μάκρη Φθιώτιδας

2.3.1 Τεχνητές μολύνσεις φύλλων

Στις τεχνητές μολύνσεις φύλλων γενικά χρησιμοποιείται εναιώρημα σπορίων ή δίσκοι μυκηλίων αλλά και εναιώρημα μυκηλίου (Caró et al., 2003) Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα κατακερματισμένου μυκηλίου μήκους 10-50μm. Η χρήση αυτού του τύπου του μυκηλίου «πλησιάζει» την χρήση εναιωρήματος σπορίων λόγω του πολύ μικρού μεγέθους των τμημάτων μυκηλίου.

Χρησιμοποιήθηκαν φύλλα μετρίου μεγέθους τα οποία τοποθετήθηκαν μέσα σε διαφανή πλαστικά κουτιά. Σε κάθε κουτί είχαν τοποθετηθεί 3 φύλλα αποστειρωμένου διηθητικό χαρτί το οποίο είχε εμποτιστεί με νερό μέχρι κορεσμού ώστε τα φύλλα να είναι σε συνθήκες 100% υγρασίας. Σε κάθε φύλλο έγινε επιφανειακή τομή με χρήση ξυραφιού στο κύριο νεύρο 2 cm από την βάση του φύλλου και τοποθετήθηκε σταγόνα εναιωρήματος μυκηλίου το οποίο ήταν αποθηκευμένο σε

4°C . Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε ξυράφι και όχι μαχαιρίδιο ήταν η τομή να είναι όσο το δυνατόν πιο λεπτή. Τα κουτιά τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο με συνθήκες 28°C και με φωτοπερίοδο 12h φως/ 12h σκοτάδι καθώς αυτές είναι οι βέλτιστες για την ανάπτυξη του μύκητα *Botryosphaeria* sp. (Michailides & Morgan, 2004). Οι μετρήσεις του εμβαδού προσβολής πραγματοποιήθηκαν τις πρώτες 10 ημέρες μετά την τεχνητή μόλυνση. Ακολούθησε επεξεργασία των εικόνων με το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων Photoshop CS4 της εταιρίας Adobe και ακολούθως μέτρηση ποσοστών προσβεβλημένων φύλλων με το πρόγραμμα Image Pro 6 της εταιρίας Media Cybernetics. Η πρόοδος της ασθένειας καταγράφηκε για κάθε στελέχος κάθε ημέρα για 10 ημέρες και υπολογίστηκε ο δείκτης AUDPC (Area Under the Disease Progress Curve, εμβαδό κάτω από την καμπύλη πρόοδου της ασθένειας) (Campbell & Madden, 1990). Ακολούθησε γραφική παράσταση των ποσοστών ασθένειας κάθε στελέχους σε σχέση με τον χρόνο. Προκειμένου να συσχετιστεί ο δείκτης AUDPC με την ένταση της ασθένειας, ο δείκτης αυτός εκφράστηκε ως ποσοστό της μέγιστης τιμής AUDPC για όλη την διάρκεια του πειράματος (που αντιστοιχεί σε 100% προσβολή) και αναφέρθηκε ως ποσοστό ασθένειας βάση AUDPC. Έπειτα στα δεδομένα του σχετικού AUDPC έγινε στατιστική ανάλυση με το πρόγραμμα SPSS της εταιρίας IBM. Στο πρόγραμμα SPSS επιλέχθηκε η ανάλυση μιας μεταβλητής με την μέθοδο ANOVA και πρότυπο πολλαπλών δοκιμών Tukey.

2.3.2 Τεχνητές μολύνσεις κλάδων

Οι τεχνητές μολύνσεις κλάδων πραγματοποιήθηκαν in situ σε φυστικές τον μήνα Αύγουστο με τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν να είναι ίδια με αυτά των τεχνητών μολύνσεων φύλλων. Σε κάθε κλάδο έγινε οπή διαμέτρου 5mm με φελλοτρυπητή και τοποθετήθηκε δίσκος μυκηλίου από αποικίες σε τρυβλίο 4^{ωv} ημερών με το μυκήλιο να εφάπτεται στο ξύλο. Ακολούθησε κάλυψη με βαζελίνη για διατήρηση υγρασίας και τέλος με parafilm και αλουμινόχαρτο. Τέλη Οκτώβριου οι κλάδοι στους οποίους είχαν γίνει οι μολύνσεις αποκόπηκαν, αφαιρέθηκε ο φλοιός μέχρι να φανεί το ξύλο και μετρήθηκε το μήκος του μεταχρωματισμού σε κάθε κλάδο. Έγινε φωτογράφιση των κλάδων και απομόνωση σε τρυβλία με υλικό PDA. Από την ανάπτυξη των αποικιών επαληθεύθηκε η παρουσία μόνο του μύκητα *Botryosphaeria* spp.. στις προσβολές. Ακολούθως έγινε στατιστική επεξεργασία των μηκών των μεταχρωματισμών με το πρόγραμμα SPSS της εταιρίας IBM. Στο πρόγραμμα SPSS επιλέχθηκε η ανάλυση μιας μεταβλητής με την μέθοδο ANOVA και πρότυπο πολλαπλών δοκιμών Tukey.

2.4 Αντιμετώπιση Καμαροσπορίου Φιστικιάς

Ο έλεγχος του μύκητα *Botryosphaeria* sp. είναι γενικά δύσκολος όταν η ασθένεια έχει ήδη εδραιωθεί στον οπωρώνα. Ένας από τους κύριους λόγους είναι ότι ο μύκητας παράγει πυκνίδια σε προσβεβλημένους κλάδους, ράχες, άνθη, μίσχους και έλκη τα οποία παραμένουν στα δέντρα και αποτελούν πηγή μόλυσματος για διάστημα μέχρι και 6 χρόνια (Michailides et al., 1998). Μέχρι τώρα έχουν βρεθεί κάποιες ποικιλίες φιστικιάς σχετικά ανθεκτικές στον μύκητα, οι σπουδαιότερες των οποίων είναι οι *Sfax* και η *Lassen* (Michailides et al., 2000). Για πολλά χρόνια δεν είχε βρεθεί αποτελεσματικό σκεύασμα για τον έλεγχο του μύκητα, ωστόσο τελευταία έχουν γίνει δοκιμές με μυκητοκτόνα διαφόρων ομάδων με αυτά που ανήκουν στις στρομπιλουρίνες να έχουν αρκετά καλή απόδοση (Morgan et al., 2009).

Σε αυτή την εργασία πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ανάπτυξης του μύκητα σε τρυβλία με PDA στα οποία είχε ενσωματωθεί μυκητοκτόνο. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 5 μυκητοκτόνα τα οποία είχαν επίσης δοκιμαστεί για την αποτελεσματικότητά τους στον αγρό. Τα 3 από τα μυκητοκτόνα περιείχαν μια δραστική ουσία ενώ τα υπόλοιπα μίγμα δυο δραστικών ουσιών.

Πίνακας 2-10

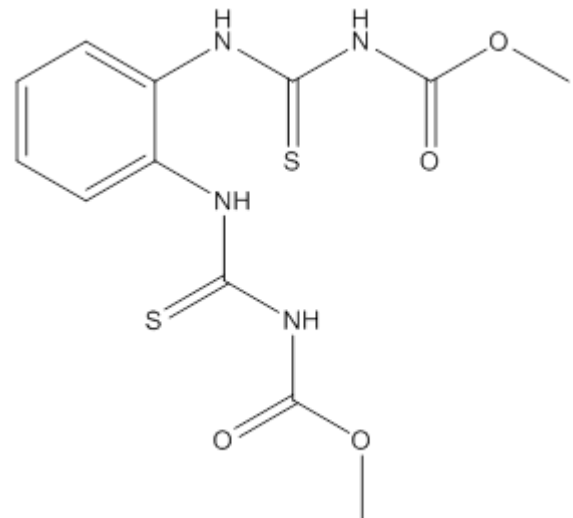
Εμπορικό όνομα	Δραστική ουσία και ομάδα
neotopsin	<i>Thiophanate methyl</i> (βενζιμιδαζολικά)
stroby	<i>Kresoxim methyl</i> (στρομπιλουρίνες)
quadris	<i>Azoxystrobin</i> (στρομπιλουρίνες)
signum	<i>Boscalid</i> (πυριδινο- καρβοξαμιδικά) + <i>Pyraclostrobin</i> (στρομπιλουρίνες)
switch	<i>Cyprodinil</i> (ανιλινοπυριμιδινικά) + <i>Fludioxonil</i> (φαινυλοπυρρολικά)

Στους πειραματικούς αγρούς το σκεύασμα *neotopsin* ψεκάζονταν μια φορά μέσα Απριλίου και τα υπόλοιπα 4 σκευάσματα ψεκάζονταν συνολικά τρεις φορές κατά την διάρκεια του θέρους – αρχές Μαΐου, αρχές Ιουνίου και αρχές Ιουλίου. Το σκεύασμα *neotopsin* ψεκαζόταν 1^{ov} για τον έλεγχο των αρχικών μολύνσεων και 2^{ov} για την αποφυγή ανάπτυξης ανθεκτικότητας του μύκητα *Botryosphaeria* sp. στα υπόλοιπα μυκητοκτόνα. Αυτό είναι σημαντικό γιατί όπως έχει φανεί σε πειράματα με τον μύκητα *Botryosphaeria* sp. ειδικά στις στρομπιλουρίνες έχουμε σχετικά εύκολη ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Morgan et al., 2009).

2.4.1 Περιγραφή μυκητοκτόνων

2.4.1.1 Neotopsin

Το σκεύασμα *neotopsin* χρησιμοποιήθηκε στον αγρό ως πρόσθετο μέτρο για την αποφυγή συσσωρεύσεως υψηλής ποσότητας μολύσματος και τον έλεγχο της ασθένειας στα πρώτα στάδια μετά τον χειμώνα. Έχει προστατευτική και θεραπευτική δράση καθώς ως διασυστηματικό απορροφάται από τις ρίζες και τα φύλλα. Η δραστική του ουσία είναι το *thiophanate-methyl* και ανήκει στα βενζιμιδαζολικά τα οποία παρεμποδίζουν την μιτωτική διαίρεση. Μέσα στο φυτό μετατρέπεται σε *carbendazim* και παρεμποδίζει το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων



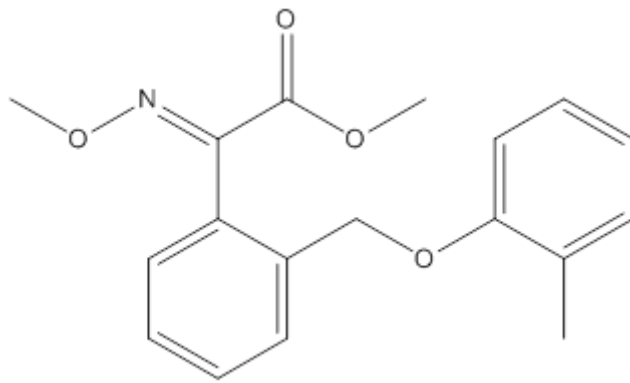
Εικόνα 27 thiophanate methyl

της μιτωτικής ατράκτου με προσκόλληση στην *β-τουμπουλίνη* αποκλείοντας έτσι τον κανονικό αποχωρισμό των θυγατρικών χρωματοσωμάτων (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2007). Σημαντικό ρόλο στην μυκητοτοξικότητα παίζει επίσης η παρεμπόδιση του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων του κυτοπλάσματος από τους οποίους εξαρτάται ο προσανατολισμός της αύξησης των μυκηλιακών υφών. Αρχικές έρευνες την δεκαετία του 1970, όπου και άρχισε η χρήση μυκητοκτόνων της ομάδας αυτής, θεωρούσαν ότι δεν υπήρχε πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας ωστόσο λίγα χρόνια αργότερα εμφανίστηκαν αρκετά προβλήματα ανθεκτικότητας σε πολλούς μύκητες. Τελευταία, ανθεκτικότητα στο *thiophanate methyl* έχει εμφανιστεί σε αρκετούς μύκητες όπως *Diplocarpon mali* (*diplocarpon_thiophanate methyl* resistance), *Fusarium sambucinum* και *Helminthosporium solani* (Kawchuk et al., 1994), *Colletotrichum cereale* (Young et al., 2010), *Cercospora kikuchii* (Iori et al., 2006) και άλλους. Η εμφάνιση ανθεκτικότητας συνδέεται συνήθως με μεταλλαγές σε γονίδια της *β-τουμπουλίνης*, όπως στην περίπτωση του *Colletotrichum cereale* (Young et al., 2010) που είχαν συμβεί 2 μεταλλαγές στο γονίδιο 2 της *β-τουμπουλίνης*.

2.4.1.2 Strobby

Το σκεύασμα *Strobby* είναι ένα από τα 4 μυκητοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν στον αγρό καθώς και σε μετρήσεις ανάπτυξης σε τρυβλία για την αξιολόγηση απόδοσης του. Χαρακτηρίζεται από διασυστηματική κίνηση, προληπτική και θεραπευτική δράση και μεγάλη υπολειμματική διάρκεια. Η δραστική του ουσία είναι το *kresoxim methyl* το οποίο ανήκει στους παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας και ειδικότερα στους Qo παρεμποδιστές. Είναι από τα πρώτα της

ομάδας Qo που εισήχθηκε σε χρήση και στην Ελλάδα χρησιμοποιείται από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2007). Ανθεκτικότητα έχει εμφανιστεί σε κάποιους μύκητες όπως ο *Venturia inequalis* (Turechek & Köller, 2004), *Saccharomyces cerevisiae* (Köller et al., 2001) και άλλους. Το σημείο – στόχος των μυκητοκτόνων της ομάδας αυτής

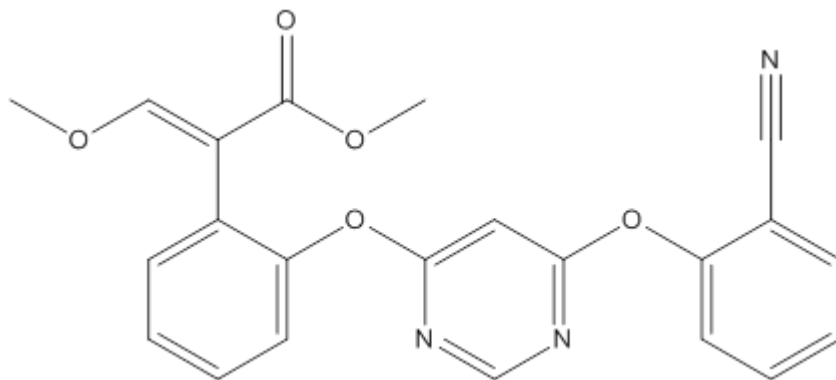


Εικόνα 28 kresoxim methyl

μπορεί να παρακαμφθεί σε σημαντικό βαθμό από την εναλλακτική αναπνοή, ωστόσο *in vivo* δεν έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς δεν επαρκεί. Ένας δυναμικά πιο σημαντικός τρόπος απόκτησης ανθεκτικότητας είναι μια μεταλλαγή στην περιοχή δράσης στο κυτόχρωμα *b*, ο οποίος έχει παρατηρηθεί στον *Saccharomyces cerevisiae* και άλλους μύκητες (Köller et al., 2001).

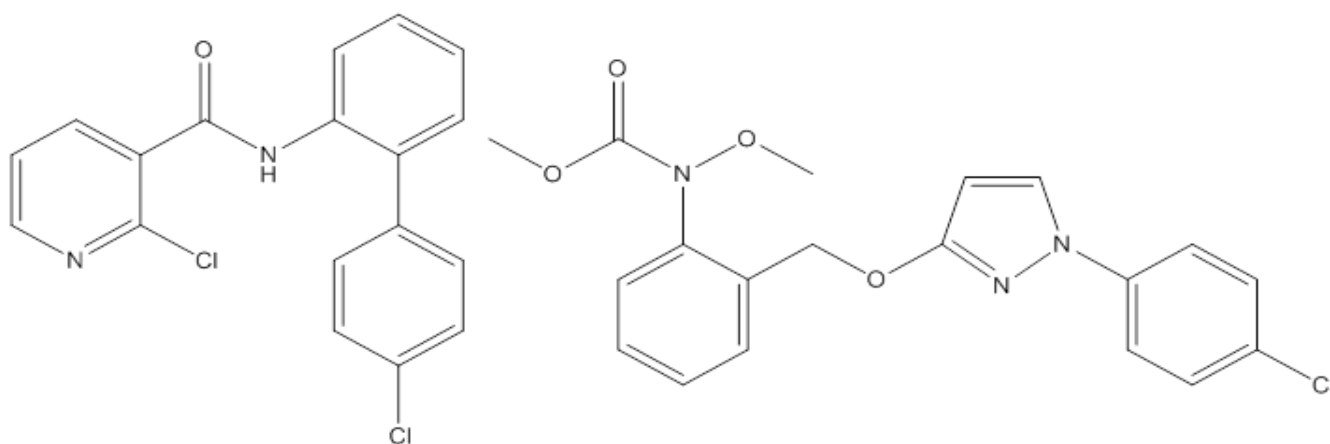
2.4.1.3 Quadris

Το σκεύασμα *Quadris*, όπως το *Stroby*, ανήκει και αυτό στις στρομπιλουρίνες και χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα *in vivo* στον αγρό καθώς και *in vitro* σε μετρήσεις ανάπτυξης σε τρυβλία. Χαρακτηρίζεται από διασυστηματική κίνηση και



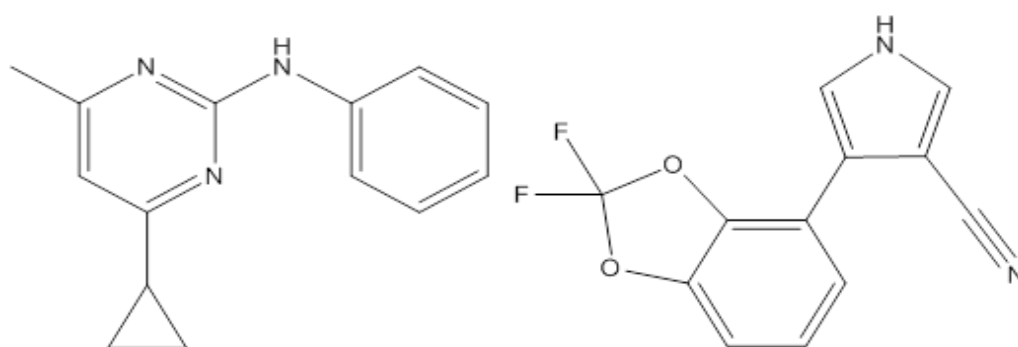
Εικόνα 29 azoxystrobin

χρησιμοποιείται προληπτικά και θεραπευτικά για την καταπολέμηση σημαντικών φυτοπαθογόνων μυκήτων και των τεσσάρων κλάσεων. Η δραστική του ουσία είναι το *azoxystrobin* το οποίο ανήκει και αυτό ανήκει στους παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας και ειδικότερα στους Qo παρεμποδιστές (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2007). Ανθεκτικότητα έχει εμφανιστεί εδώ και δεκαετίες σε μύκητες όπως ο *Alternaria* σε φιστικιά, (Ma et al., 2003), *Colletotrichum cereale* (Young et al., 2010), *Pseudoperonospora cubensis* (Zhang et al., 2007), *Penicillium digitatum* (Zhang et al., 2009), *Magnaporthe oryzae* (Ma & Uddin, 2009) (Ma & Uddin, 2009) καθώς και σε *Botryosphaeria dothidea* (Morgan et al., 2009). Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στις περισσότερες περιπτώσεις οφείλεται, όπως και στο *stroby*, σε μεταλλαγή στο κυτόχρωμα *b* (Zhang et al., 2009), (Zhang et al., 2007).

2.4.1.4 *Signum*

Εικόνα 30 boscalid και pyraclostrobin

Το σκεύασμα *Signum*, που χρησιμοποιήθηκε στον αγρό καθώς και *in vitro*, περιέχει δυο δραστικές ουσίες: το *boscalid* και το *pyraclostrobin*. Και οι δυο δραστικές ουσίες δρουν στο μονοπάτι της αναπνοής αλλά το καθένα σε διαφορετικό σημείο. Το *boscalid* ανήκει στα καρβοξαμικά μυκητοκτόνα τα οποία είναι εξειδικευμένοι παρεμποδιστές του ενζυμικού συμπλόκου της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDC) που ανήκει στο σύμπλοκο II της αναπνευστικής αλυσίδας. Το *pyraclostrobin* ανήκει στις στρομπιλουρίνες οι οποίες όπως αναφέρθηκε πιο πάνω είναι παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας και ειδικότερα Qo παρεμποδιστές. Στον μύκητα του γένους *Botryosphaeria* δεν έχει αναφερθεί μέχρι τώρα ανθεκτικότητα, ωστόσο έχει εμφανιστεί σε άλλους μύκητες, όπως ο *Botrytis cinerea* (Kim & Χiao, 2010), (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2007)

2.4.1.5 *Switch*

Εικόνα 31 cyprodinil και fludioxonil

Το σκεύασμα *Switch*, που και αυτό χρησιμοποιήθηκε και για πειράματα στον αγρό αλλά και *in vitro* σε τρυβλία, περιέχει δυο δραστικές ουσίες: το *cyprodinil* και το *fludioxonil*. Το *cyprodinil*, που είναι διασυστηματικό, ανήκει στα ανιλνοπυριμιδικά μυκητοκτόνα τα οποία παρεμποδίζουν

την βιοσύνθεση της μεθειονίνης, με πιθανή δράση στο ένζυμο *β-λυάση* της κυσταθειονίνης, παρεμποδίζοντας έτσι την έκκριση λυτικών ενζύμων. Το *fludioxonil* ανήκει στα φαιλυνοπυρρολικά μυκητοκτόνα των οποίων ο τρόπος δράσης βασίζεται σε παρεμπόδιση πρωτεϊνικών κινασών, όπως η PK-III και η c-AMP-PKA που συμμετέχουν στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης της γλυκερόλης και του ωσμωτικού δυναμικού γενικότερα με αποτέλεσμα βλάβες στην δομή του κυτταροπλασματικής μεμβράνης ή/ και του κυτταρικού τοιχώματος. Το *fludioxonil* δεν είναι διασυστηματικό, και έτσι προστατεύει μόνο τις επιφάνειες στις οποίες ψεκάζεται το μυκητοκτόνο. Στο μύκητα *Botryosphaeria* sp. δεν έχει εμφανιστεί μέχρι σήμερα ανθεκτικότητα. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχει εμφανιστεί ανθεκτικότητα στο *cypronidil* σε στελέχη του μύκητα *Botrytis cinerea*. Στο *fludioxonil* έχουν εμφανιστεί ανθεκτικά στελέχη μόνο in vitro καθώς στον αγρό έχουν μειωμένη βιωσιμότητα (Leroch et al., 2011).

2.4.2 Δοκιμές ευαισθησίας στελεχών

Πίνακας 2-11

Προέλευση στελέχους	κωδικός
Stroby	77/ Stroby
Signum	81/ Signum
Quadris	86/ Quadris
Switch	93/ Switch
Control – 36-3	36_3

Για τις δοκιμές ευαισθησίας in vitro χρησιμοποιήθηκαν τα τέσσερα μυκητοκτόνα που ελέγχθηκαν στον αγρό για απόδοση, δηλαδή τα *Stroby*, *Quadris*, *Signum* & *Switch* συν το *Neotopsisin* που ψεκάστηκε την Άνοιξη πριν από κάθε επέμβαση με τα 4 διαφορετικά μυκητοκτόνα. Και τα 5 μυκητοκτόνα είναι σταθερά στις συνθήκες του πειράματος καθώς δεν υδρολύονται στο pH του PDA που είναι περίπου 5.2 . Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 5 στελέχη από απομονώσεις που είχαν γίνει από τους πειραματικούς αγρούς. Τα 4 στελέχη είχαν προέλθει το καθένα από ομάδες δέντρων που είχαν ψεκαστεί η κάθε μια με διαφορετικό μυκητοκτόνο και ένα στέλεχος από δέντρα που δεν είχαν ψεκαστεί καθόλου. Αυτό το στέλεχος χρησιμοποιήθηκε ως «μάρτυρας» για τον έλεγχο εμφάνισης ανθεκτικότητας. Και οι 5 απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν από φύλλα των δέντρων που είχαν ψεκαστεί με τα αντίστοιχα μυκητοκτόνα. Και για τα πέντε στελέχη χρησιμοποιήθηκε το *Littman Oxgall Agar* για την παρασκευή μονόσπορων αποικιών. Έπειτα παρασκευάστηκε εναιώρημα μυκηλίου για χρήση ως μόλυσμα. Για τις δοκιμές ανάπτυξης των στελεχών στα τρυβλία χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα μυκηλίου (παράγραφος 2.1.6) Για την επιλογή της μεθόδου

δοκιμάστηκε και η μέθοδος με δίσκο μυκηλίου (mycelial plug). Και στις δυο μεθόδους η ανάπτυξη του μυκηλίου ήταν ικανοποιητική, ωστόσο στην περίπτωση του δίσκου μυκηλίου, ακόμα και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου υπήρχε μικρή ανάπτυξη ενώ με εναιώρημα μυκηλίου η ανάπτυξη ήταν μηδενική. Αυτό οφείλεται πιθανώς στο ότι ο δίσκος μυκηλίου περιέχει και τμήμα PDA από το οποίο μπορεί να αναπτύσσεται σε μικρό βαθμό ενώ στην περίπτωση του εναιωρήματος μυκηλίου το υπάρχει μόνο το PDA στο οποίο είναι ενσωματωμένο το μυκητοκτόνο. Δοκιμές που έγιναν με την μέθοδο του εναιωρήματος μυκηλίου έδειξαν ίδια διάμετρο ανάπτυξης για όλες τις επαναλήψεις. Παρατηρήθηκε επίσης ότι όταν το μυκήλιο που εναποτίθεται είναι μικρή ποσότητα (μερικά μl εναιωρήματος), η ανάπτυξη σε διάμετρο είναι η ίδια αν τοποθετηθεί πολλαπλάσια ποσότητα και το μόνο που αλλάζει είναι το ύψος της αποικίας. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το μικρό μέγεθος των τεμαχίων μυκηλίου, που βοηθά στην σωστή και ομοιόμορφη ανάπτυξη.

2.4.2.1 Μεθοδολογία

Τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ανάπτυξης ήταν σε μορφή σκευασμάτων και όχι καθαρής ουσίας, και ως μέγιστη συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη συνιστώμενη από τον παρασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 11 συγκεντρώσεις για κάθε μυκητοκτόνο με διαδοχική αραιώση λόγου 1:3 (Taylor et al., 2006) & (Kretschmer et al., 2009). Έτσι, η μέγιστη συγκέντρωση ήταν 1 x συνιστώμενη και η ελάχιστη 3^{-10} x συνιστώμενη $\approx 1.694 \times 10^{-5}$ της συνιστώμενης. Το εύρος των συγκεντρώσεων επιλέχθηκε ώστε να υπάρχει από σχεδόν παρεμπόδιση από ελάχιστη έως μεγάλη, καθώς, δεδομένου ότι δυο από τα σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν δυο δραστικές ουσίες δεν ήταν γνωστές εκ των προτέρων οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις τους.

Πίνακας 2-12

Όνομα σκευάσματος	Δραστικές ουσίες	συγκέντρωση
Neotopsin 70wg	Thiophanate methyl 70% w/w	1gr/lt
Stroby 50wg	Kresoxim methyl 50% w/w	0.2gr/lt
Quadris 25sc	Azoxystrobin 25% w/v	1ml/ lt
Signum 26.7/6.7wg	Boscalid 26.7%w/w + pyraclostrobin 6.7% w/w	1.5gr/lt
Switch 25/37.5wg	Fludioxonil 25% w/w + cyprodinil 37.5% w/w	1gr/lt

Η ενσωμάτωση των μυκητοκτόνων ,τα οποία ήταν διαλυμένα σε αποστειρωμένο νερό, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υδατόλουτρου θερμοκρασίας 48°C. Σε κάθε τρυβλίο PDA, το οποίο περιείχε 23ml PDA, τοποθετήθηκε μια σταγόνα εναιωρήματος μυκηλίου με γυάλινο σπειροειδή. Για την

ανάπτυξη του μύκητα τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας 28°C, υγρασίας 100% σε σκοτάδι (Ma et al., 2002). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν για τις πρώτες 8 ημέρες καθώς μετά από αυτό το χρονικό διάστημα το μυκήλιο ακόμα και σε μέτριες συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου είχε σε πολλές περιπτώσεις καλύψει όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Η μέτρηση για το EC₅₀ του εκάστοτε μυκητοκτόνου γινόταν την 4^η ημέρα καθώς τότε ο μάρτυρας (τρυβλίο χωρίς μυκητοκτόνο) ήταν στη μέγιστη διάμετρο πριν καλύψει πλήρως το τρυβλίο. Για κάθε τρυβλίο, μετρήθηκε η διάμετρος του μυκηλίου σε δυο κάθετους άξονες και διαιρέθηκε δια την διάμετρο του εκάστοτε μάρτυρα. Για κάθε στέλεχος υπολογίστηκε γραμμική συνάρτηση παλινδρόμησης της % παρεμπόδισης σε σχέση με τον μάρτυρα έναντι του λογαρίθμου της συγκέντρωσης του μυκητοκτόνου. Έπειτα, υπολογίστηκε το EC₅₀ για κάθε στέλεχος με γραμμική συνάρτηση. Τέλος, έγινε σύγκριση των τεσσάρων στελεχών με το στέλεχος 36_3 που δεν είχε ψεκαστεί με κανένα μυκητοκτόνο.

3 Αποτελέσματα

3.1 Ανάλυση γενετικών τόπων ITS1, 5.8S, ITS2

Το τμήμα του πυρηνικού DNA που πολλαπλασιάστηκε σε αυτή τη μελέτη με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από διάφορα είδη του μύκητα *Botryosphaeria* sp. και μιας αλληλουχίας του μύκητα υπέστη κατάλληλη επεξεργασία καθώς αφαιρέθηκαν τόσο από την αρχή όσο και από το τέλος των αλληλουχιών κάποια τμήματα. Το τελικό σύνολο των στοιχισμένων αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκε στις φυλογενετικές αναλύσεις, μετά την αφαίρεση των τμημάτων από την αρχή και το τέλος των αλληλουχιών, είχε μήκος 566 βάσεων. Το σύνολο αυτό περιελάμβανε βάσεις από το 3' άκρο του 18S, τη συνολική ακολουθία των ITS1, 5.8S & ITS2 και βάσεις από το άκρο του 28S. Στο σύνολο των αλληλουχιών, από τις 566 στοιχισμένες βάσεις, οι 73 (13%) διαφοροποιούνται (variable sites), οι 492 (87%) ήταν συντηρημένες (conserved sites), και οι 71 (13%) ήταν πληροφοριακές θέσεις φειδωλότητας (parsimony – informative sites).

Πίνακας 3-1 Μήκος περιοχών ITS1, 5.8S, ITS2 σε βάσεις ανά στέλεχος

στέλεχος	Ξενιστής	Είδος βάση ανάλυσης blast	Περιοχή	ITS1 bp	5.8S bp	ITS2 bp
1	Σοφόρα	<i>B. dothidea</i>	Αττική	188	148	158
26	Φιστικιά	<i>N. vitifusiforme</i>	Αττική	177	158	155
29	Φιστικιά	<i>N. vitifusiforme</i>	Φθιώτιδα, Μώλος	177	158	155
32	Φιστικιά	<i>N. vitifusiforme</i>	Φθιώτιδα, Μάκρη	177	158	155
33	Φιστικιά	<i>N. vitifusiforme</i>	Φθιώτιδα, Μάκρη	177	158	155
35	Ελιά	<i>B. dothidea</i>	Αττική	188	148	158
36-3	Φιστικιά	<i>N. vitifusiforme</i>	Φθιώτιδα, Μάκρη	177	158	155
41	Δαμασκηλιά	<i>B. dothidea</i>	Αττική	188	148	158
50	Άμπελος	<i>B. obtusa</i>	Βοιωτία, Αλίαρτος	177	155	161
52	Άμπελος	<i>B. obtusa</i>	Βοιωτία, Αλίαρτος	177	155	161

Το ποσοστά των νουκλεοτιδίων στις 10 αλληλουχίες ήταν κατά μέσον όρο 22.3% T, 25.4% C, 23.5% A & 28.8% G. Αναλυτικά τα ποσοστά των νουκλεοτιδίων από το κάθε στέλεχος, καθώς και το μήκος που τελικά έχουν οι αλληλουχίες των απομονώσεων μετά στην στοίχιση φαίνονται στον Πίνακα 3-2, έτσι όπως αυτά προέκυψαν από το πρόγραμμα MEGA 5.

Στους παρακάτω πίνακες (3-2, 3-3, 3-4 και 3-5) φαίνονται οι νουκλεοτιδικές αποστάσεις μεταξύ των στελεχών, οι διαπλυθησιακές νουκλεοτιδικές αποκλίσεις και οι καθαρές νουκλεοτιδικές αποκλίσεις μεταξύ των πληθυσμών. Ως πληθυσμοί συντάχθηκαν οι απομονώσεις που είχαν γίνει

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

από ίδιο ξενιστή. Η μέση νουκλεοτιδική απόκλιση ανάμεσα στις αλληλουχίες των πληθυσμών (overall mean) ανέρχεται στο 3.7%. Οι πίνακες υπολογίστηκαν με το μοντέλο Μέγιστης σύνθετης Πιθανοφάνειας (Maximum composite likelihood) και έδειξαν μικρές σχετικά αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών.

Πίνακας 3-2 Ποσοστό βάσεων των αλληλουχιών και συνολικός αριθμός βάσεων

Απομόνωση	Ξενιστής	T	C	A	G	%(G+C)	Σύνολο
1	Σοφόρα	22.0	25.8	23.4	28.8	54.59	555.0
26	Φιστικιά	22.6	25.3	23.3	28.8	54.10	549.0
29	Φιστικιά	22.5	25.3	23.3	28.9	54.18	550.0
32	Φιστικιά	22.7	25.3	23.1	28.9	54.18	550.0
33	Φιστικιά	22.6	25.2	23.2	29.0	54.23	544.0
35	Ελιά	22.0	25.6	23.5	28.9	54.51	554.0
36-3	Φιστικιά	22.7	25.1	23.1	29.1	54.21	546.0
41	Δαμασκηλιά	21.9	25.7	23.4	29.0	54.71	552.0
50	Άμπελος	21.8	25.4	24.3	28.5	53.93	547.0
52	Άμπελος	21.8	25.4	24.5	28.3	53.72	551.0
Μέσος όρος		22.3	25.4	23.5	28.8	54.24	549.8

Πίνακας 3-3 Νουκλεοτιδικές αποστάσεις μεταξύ των 10 στελεχών με γ-κατανομή

Αποστάσεις μεταξύ ζευγών									
	1	26	29	32	33	35	36-3	41	50
1_{σοφόρα}									
26_{φιστικιά}	0.036								
29_{φιστικιά}	0.042	0.009							
32_{φιστικιά}	0.036	0.003	0.005						
33_{φιστικιά}	0.035	0.000	0.006	0.001					
35_{ελιά}	0.000	0.036	0.042	0.036	0.035				
36-3_{φιστικιά}	0.039	0.006	0.002	0.006	0.005	0.039			
41_{δαμασκηλιά}	0.000	0.036	0.041	0.035	0.035	0.000	0.039		
50_{αμπέλι}	0.067	0.066	0.072	0.065	0.065	0.067	0.069	0.067	
52_{αμπέλι}	0.067	0.066	0.073	0.066	0.065	0.067	0.069	0.067	0.000

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 3-4 Διαπλυθησιακές νουκλεοτιδικές αποκλίσεις (*between group average*) μεταξύ των 5 πληθυσμών (ως ξενιστές) με γ -κατανομή

	ελιά	δαμασκηλιά	σοφόρα	φιστικιά
ελιά				
δαμασκηλιά	0.000			
σοφόρα	0.000	0.000		
φιστικιά	0.038	0.037	0.038	
αμπέλι	0.067	0.067	0.067	0.068

Πίνακας 3-5 Καθαρές νουκλεοτιδικές αποκλίσεις (*net between group*) αποκλίσεις μεταξύ των 5 πληθυσμών (ως ξενιστές) με γ -κατανομή

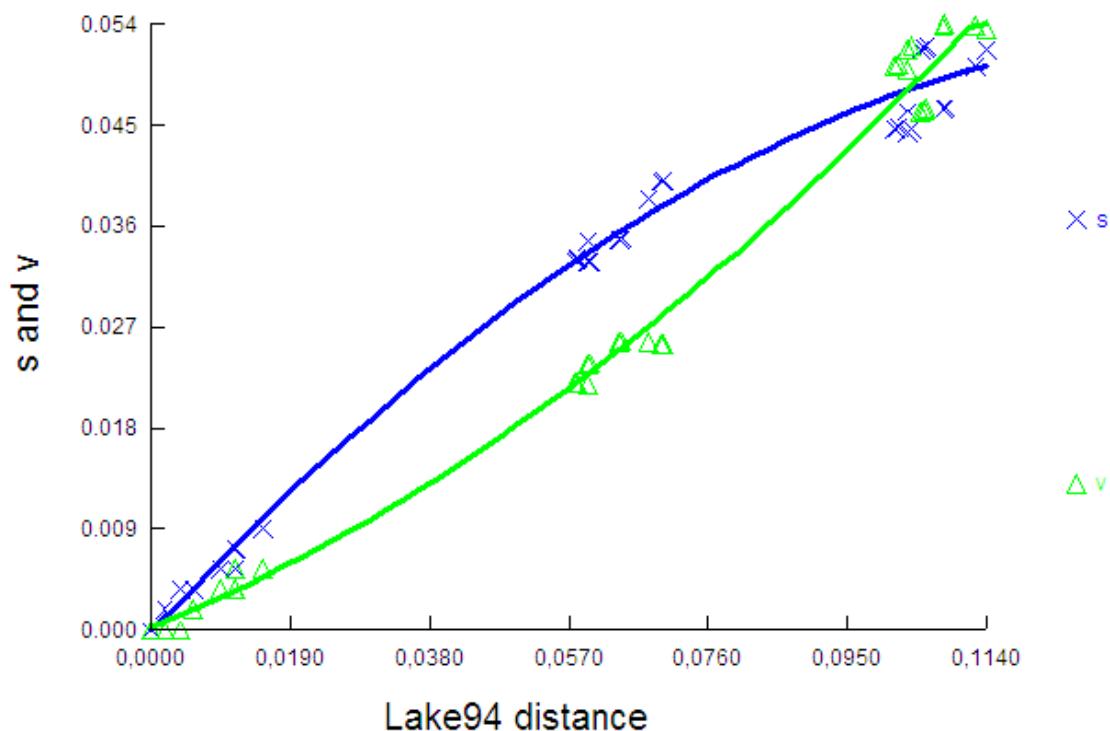
	ελιά	δαμασκηλιά	σοφόρα	φιστικιά
ελιά				
δαμασκηλιά	0.000			
σοφόρα	0.000	0.000		
φιστικιά	0.035	0.035	0.035	
αμπέλι	0.067	0.067	0.067	0.065

Το καλύτερο μοντέλο εξέλιξης των αλληλουχιών που προέκυψε, σύμφωνα με το AIC, είναι το μοντέλο HKY με ενσωμάτωση παραμέτρου G όπως υπολογίστηκε από το πρόγραμμα MEGA5 (HKY+G με $-\ln L = 1194,55$), σχήμα παραμέτρου γ -κατανομής με $\alpha=0,6022$, αριθμό παραμέτρων που λήφθηκαν υπόψη $k=22$ και 8 διαφορετικούς ρυθμούς υποκαταστάσεων. Ο πίνακας του ρυθμού υποκαταστάσεων μεταξύ των νουκλεοτιδίων έχει ως εξής:

Πίνακας 3-6 Ρυθμός υποκαταστάσεων μεταξύ των νουκλεοτιδίων

Οι μεταπτώσεις που διαφέρουν είναι σημειωμένες με έντονα γράμματα είναι και οι μεταστροφές με πλάγια. Το σύνολο των r ισούται με 100 (Tamura et al., 2007)

Από\ Προς	A	T	C	G
A	-	4.7558	5.4280	16.5118
T	5.0200	-	14.5533	6.1584
C	5.0200	12.7511	-	6.1584
G	13.4595	4.7558	5.4280	-



Εικόνα 32 Γράφημα κορεσμού για τις αλληλουχίες των γενετικών τόπων ITS1, 5.8S, ITS2, υπολογίζοντας τη γενετική απόσταση με το μοντέλο *Lake94* (Xia & Xie, 2001) $\times s$ =μεταπτώσεις, Δv =μεταστροφές

Η τιμή Iss (Index of Substitution Saturation) που προκύπτει από τον έλεγχο των αλληλουχιών για κορεσμό υποκαταστάσεων με την δοκιμασία των (Xia & Xie, 2001) είναι $Iss=0,1068$, μικρότερη από την $Iss.c=0,7366$ (Index of Substitution Saturation, Critical value), με την διαφορά των δύο τιμών να είναι στατιστικά σημαντική εντός των ορίων εμπιστοσύνης του 95%. Επίσης, από το γράφημα κορεσμού (Εικόνα 32), επιβεβαιώνεται πως οι αλληλουχίες δεν εμφανίζουν κορεσμό υποκαταστάσεων συνεπώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω αναλύσεις.

Τα δέντρα που προέκυψαν από τις διάφορες φυλογενετικές αναλύσεις παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 33 έως και Εικόνα 40). Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μεθόδων Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbor-Joining - NJ), UPGMA και Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood-ML), έπειτα αυτά της Μέγιστης Φειδωλότητας (Maximum Parsimony – MP) και εν συνεχεία αυτά της Μπεϊσιανής Συμπερασματολογίας (Bayesian Inference - BI). Σε κάθε δέντρο τα στελέχη εμφανίζονται μαζί με το είδος του μήκητα που βρέθηκε να ταιριάζει περισσότερο με την δοκιμασία BLAST.

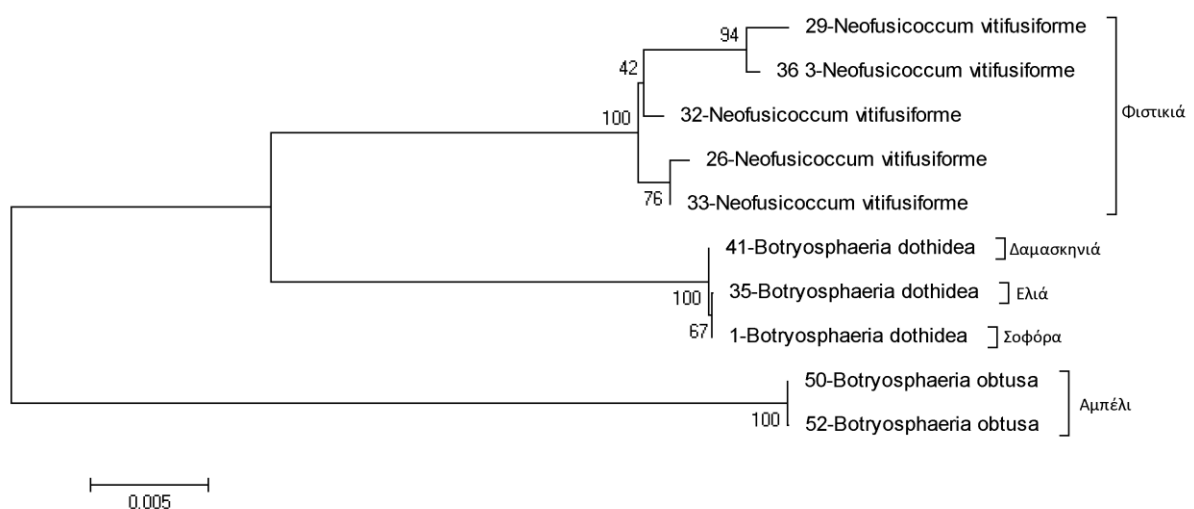
Στην Εικόνα 33, Εικόνα 34 και Εικόνα 35 φαίνονται τα δέντρα που προέκυψαν με τις μέθοδο *Neighbor Joining* (γραμμικά με μη) & *UPGMA* αντίστοιχα μέσω του προγράμματος MEGA5. Τα δέντρα αυτά προέκυψαν χρησιμοποιώντας το μοντέλο της Μέγιστης Σύνθετης Πιθανοφάνειας

(Maximum Composite Likelihood) (που βασίζεται στην μέθοδο των Tamura & Nei, 1993) με γ κατανομή και 1000 bootstrap επαναλήψεις.

Παρακάτω (Εικόνα 36 & Εικόνα 37) φαίνονται τα δέντρα που προέκυψαν με την μέθοδο *Maximum Likelihood* μέσω του προγράμματος MEGA5. Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο HKY (Hasegawa-Kishino-Yano, 1985) με γ κατανομή και 1000 bootstrap επαναλήψεις.

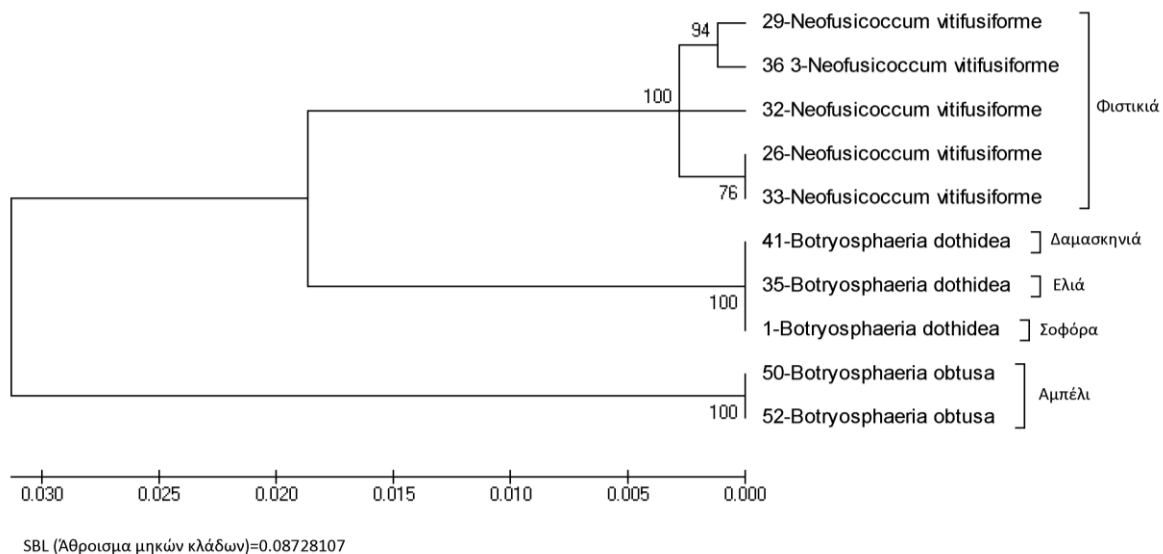
Στην Εικόνα 38 που ακολουθεί, φαίνεται το δέντρο που προέκυψε από την ανάλυση Μέγιστης Φειδωλότητας (MP). Χρησιμοποιήθηκαν ακριβώς οι ίδιες αλληλουχίες με τις υπόλοιπες μεθόδους. Επιχειρήθηκαν αναλύσεις οι οποίες διέφεραν μεταξύ τους ως προς το χειρισμό των κενών (gaps) των αλληλουχιών. Στην μια τα κενά αντιμετωπιζόνταν ως άγνωστες θέσεις και στην άλλη ως νέος χαρακτήρας. Στην δεύτερη περίπτωση, η στατιστική στήριξη των κλάδων ήταν ελάχιστα μειωμένη σε σχέση με την πρώτη, γι' αυτό και τελικά επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν τα κενά ως άγνωστες θέσεις. Ως εξωμάδα (outgroup) χρησιμοποιήθηκε στέλεχος του μύκητα *Mycosphaerella populorum* (Genbank AF216533) (Denman et al., 2003). Έγιναν 1000 bootstrap επαναλήψεις για να ελεγχθεί η στατιστική υποστήριξη των κλάδων, όμως μόνο οι τιμές που ήταν μεγαλύτερες από 50% παρουσιάζονται στο δέντρο. Στο τέλος, υπολογίστηκε το συναινετικό δέντρο (bootstrap consensus tree) το οποίο και παρουσιάζεται.

Τέλος, (Εικόνα 39, 40) παρουσιάζεται το δέντρο που προέκυψε από την ανάλυση της Μπεϊεσιανής Συμπερασματολογίας (*Bayesian Inference*) μέσω του προγράμματος BAMBE 2.01 (Simon & Larget, 2001) με προεπιλεγμένες ρυθμίσεις χρησιμοποιώντας το μοντέλο HKY με ενσωμάτωση παραμέτρων G, όπως υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα MEGA5. Ο αριθμός των κύκλων ήταν 50000, με διάστημα δείγματος 10 και αρχικό αριθμό κύκλων απόρριψης (burn cycles) 9000.

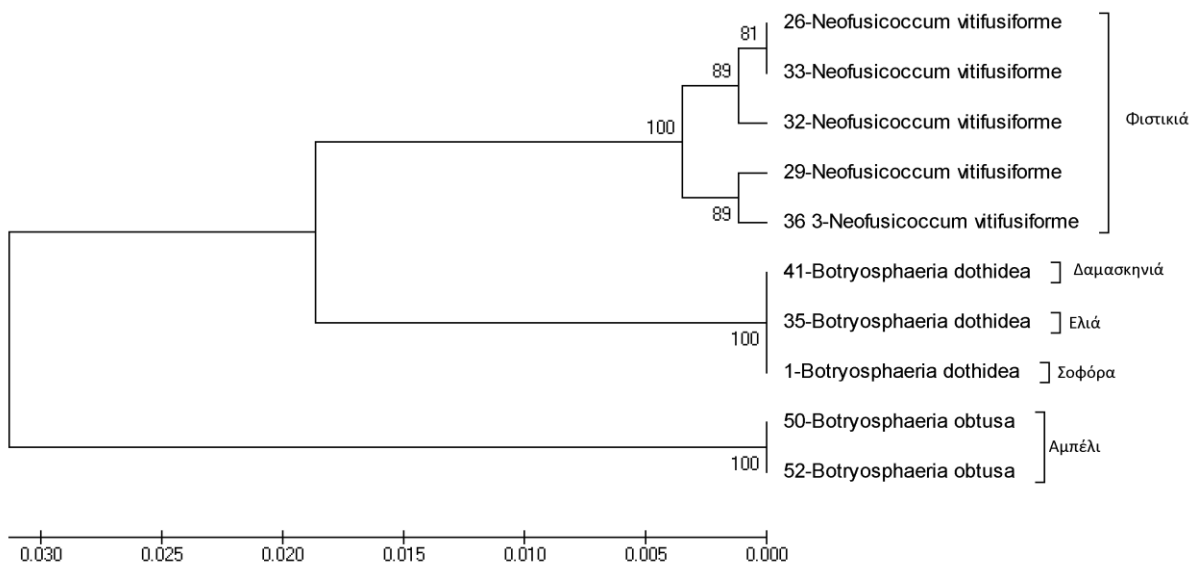


Εικόνα 33 Γενετικοί τόποι ITS1, 5.8S, ITS2, δέντρο *Neighbor-Joining* με βάση το μοντέλο Μέγιστης Σύνθετης Πιθανοφάνειας. Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 επαναλήψεις). Η κλίμακα αναπαριστά τον αριθμό αντικαταστάσεων/θέση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

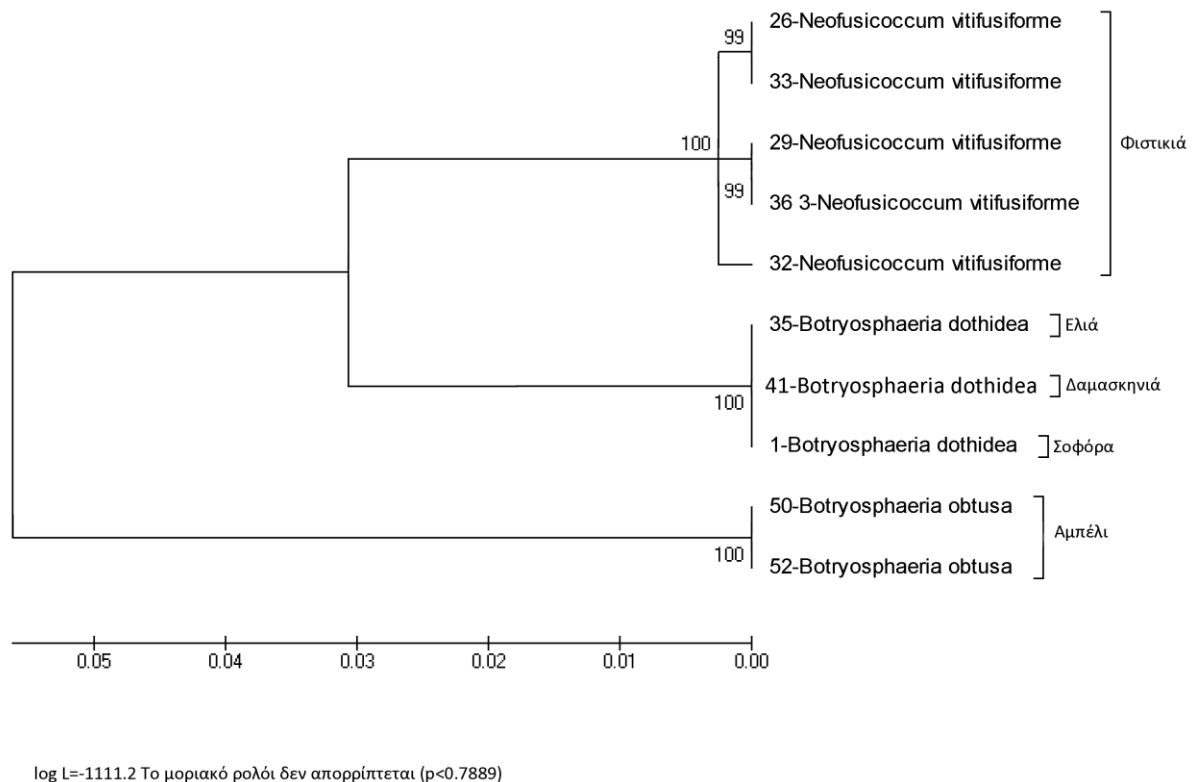


Εικόνα 34 Γενετικοί τόποι ITS1, 5.8S, ITS2, γραμμικό δέντρο *Neighbor-Joining* με βάση το μοντέλο *Μέγιστης Σύνθετης Πιθανοφάνειας*. Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 επαναλήψεις). Η κλίμακα αναπαριστά τον αριθμό αντικαταστάσεων/ θέση

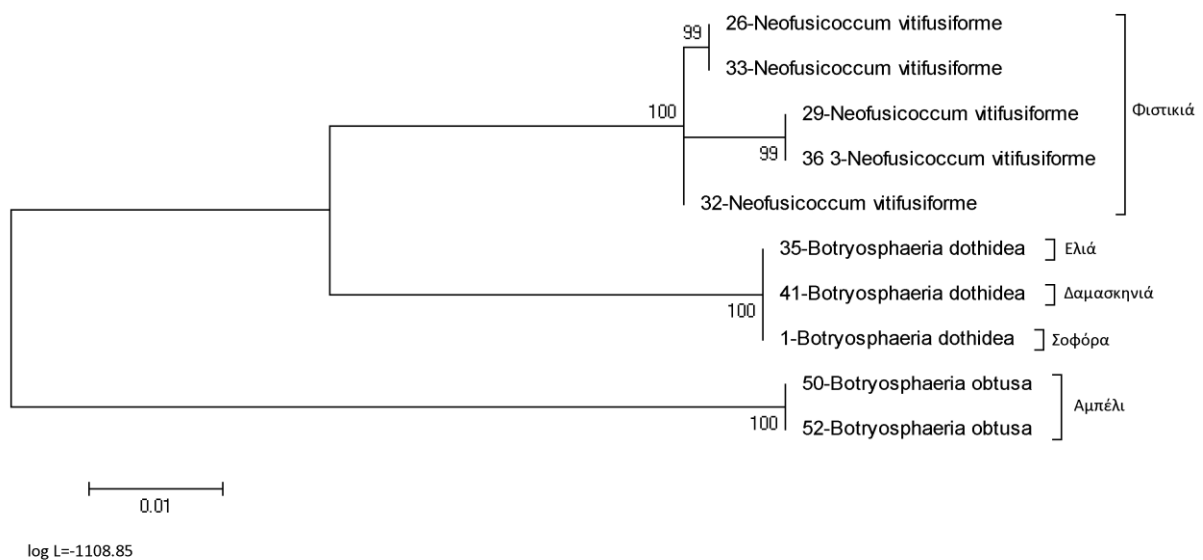


Εικόνα 35 Γενετικοί τόποι ITS1, 5.8S, ITS2, δέντρο *UPGMA* με βάση το μοντέλο *Μέγιστης Σύνθετης Πιθανοφάνειας*. Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 επαναλήψεις). Η κλίμακα αναπαριστά τον αριθμό αντικαταστάσεων/ θέση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

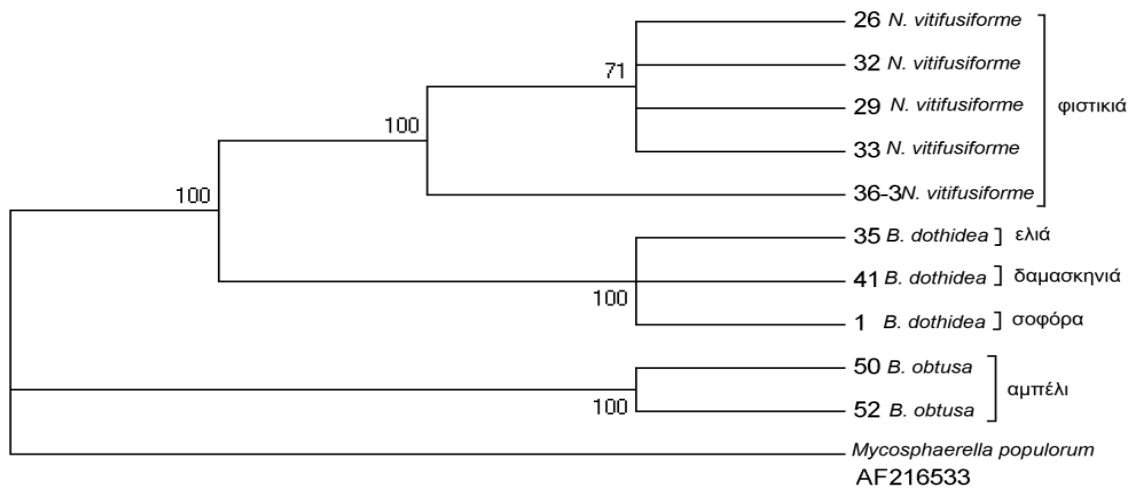


Εικόνα 36 Γενετικοί τόποι ITS1, 5.8S, ITS2, γραμμικό δέντρο *Maximum Composite Likelihood* με βάση το μοντέλο *HKY+G*. Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 επαναλήψεις). Η κλίμακα αναπαριστά τον αριθμό αντικαταστάσεων/ θέση

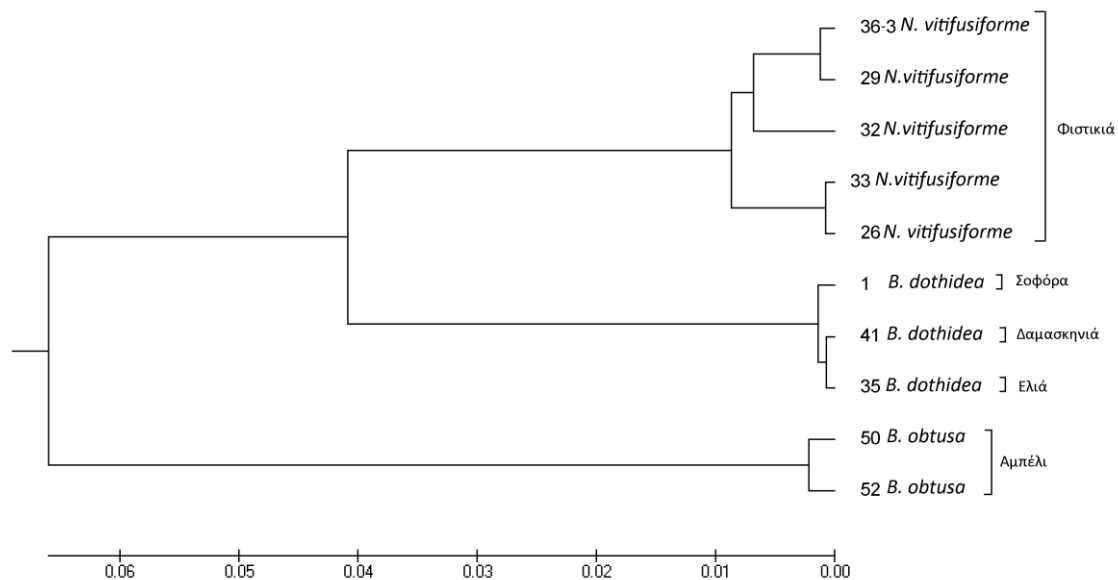


Εικόνα 37 Γενετικοί τόποι ITS1, 5.8S, ITS2, δέντρο *Maximum Composite Likelihood* με βάση το μοντέλο *HKY+G*. Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 επαναλήψεις). Η κλίμακα αναπαριστά τον αριθμό αντικαταστάσεων/ θέση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

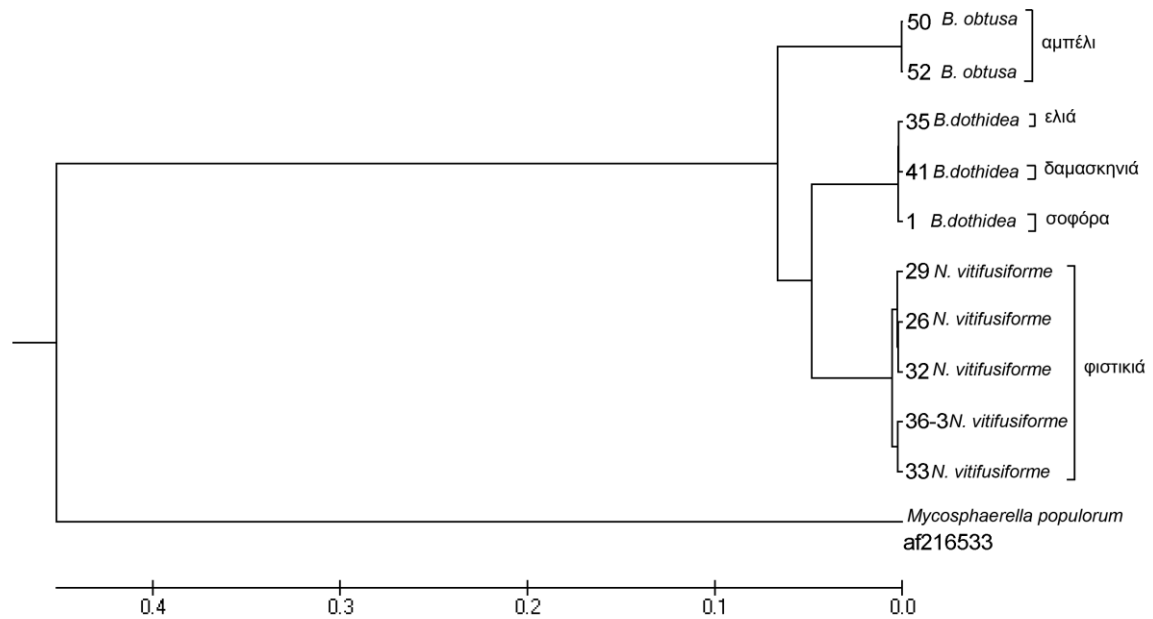


Εικόνα 38 Γενετικοί τόποι ITS1, 5.8S, ITS2, γραμμικό δέντρο *Maximum Parsimony* με τη μέθοδο *Close Neighbor Interchange*. Η εξωτερική ομάδα είναι στέλεχος του μύκητα *Mycosphaerella porulorum*. Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 επαναλήψεις).



SBL (Αθροισμα μηκών κλάδων)=0.1945

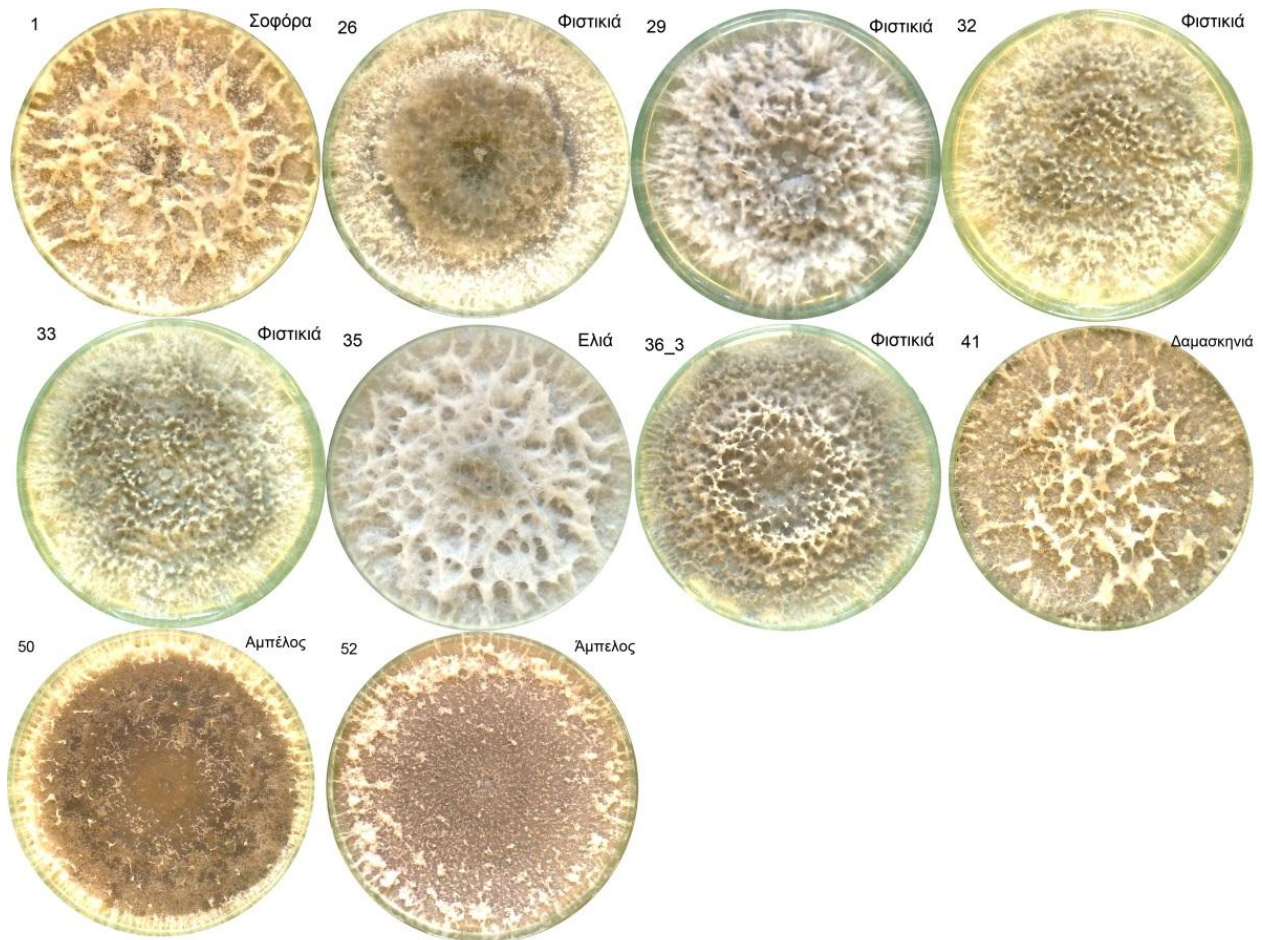
Εικόνα 39 Γενετικοί τόποι ITS1, 5.8S, ITS2, δέντρο *Μπείσειανής Συμπερασματολογίας* με βάση το μοντέλο *HKY+G*. Η κλίμακα αναπαριστά τον αριθμό αντικαταστάσεων/ θέση



Εικόνα 40 Γενετικοί τόποι ITS1, 5.8S, ITS2, δέντρο Μπείσειανής Συμπερασματολογίας με βάση το μοντέλο HKY+G. Συμπεριλαμβάνεται ως εξωτερική ομάδα στέλεχος του μύκητα *Mycosphaerella populorum* af216533. Η κλίμακα αναπαριστά τον αριθμό αντικαταστάσεων/ θέση

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα στελέχη [1, 35 και 41] καθώς και οι απομονώσεις από φιστικιά (26,29,32,33,36-3) είχαν πολύ μικρή γενετική απόσταση ανά μεταξύ τους και έτσι από δέντρο σε δέντρο είναι δυνατόν να διαφέρουν οι αντίστοιχοι κλάδοι σε μικρό βαθμό.

Από όλα τα φυλογενετικά δέντρα, που ήταν σχεδόν πανομοιότυπα, το κοινό συμπέρασμα είναι πως οι απομονώσεις από φιστικιές που χαρακτηρίζονται ως *Neofusicoccum vitifusiforme* ομαδοποιούνται σε έναν κλάδο ανεξάρτητα της περιοχής και διαχωρίζονται από τον κλάδο που περιέχει τις απομονώσεις από ελιά, δαμασκηλιά & σοφόρα. Αυτά τα τρία στελέχη χαρακτηρίζονται ως *Botryosphaeria dothidea* και είναι σχεδόν πανομοιότυπα γενετικά μεταξύ τους. Οι απομονώσεις από αμπέλι που χαρακτηρίζονται ως *Botryosphaeria obtusa* βρίσκονται σε άλλο κλάδο. Σύμφωνα με το μοντέλο δέντρου *Maximum composite likelihood* ο κλάδος των 5 απομονώσεων φιστικιάς χωρίζεται από το κλάδο που συμπεριλαμβάνει τις απομονώσεις ελιάς, σοφόρας & δαμασκηλιάς με διαφοροποίηση 3%. Ο κλάδος που συμπεριλαμβάνει τις απομονώσεις από αμπέλι έχει διαφοροποίηση 6% σε σχέση με τους δύο άλλους κλάδους.



Εικόνα 41 Ανάπτυξη των 10 στελεχών σε PDA. Οι φωτογραφίες αντιστοιχούν σε ανάπτυξη 10 ημερών.

Επίσης, από τις φωτογραφίες των αποικιών σε PDA των απομονώσεων (Εικόνα 41) βλέπουμε ότι μορφολογικά συγκεκριμένες απομονώσεις μοιάζουν μεταξύ τους και ταξινομούνται σε ίδιες ομάδες με τους κλάδους των φυλογενετικών δέντρων. Ειδικότερα, όσον αφορά την μορφολογία, οι απομονώσεις 26, 29, 32, 33, 36-3 (φιστικιά) μοιάζουν μεταξύ τους καθώς το μυκήλιο είναι με «πυκνές κορυφές», οι 1 (σοφόρα), 35 (ελιά) και 41 (δαμασκηλιά) έχουν πιο «αραιές κορυφές» και οι 50, 52 έχουν ανάπτυξη κυρίως προς τα άκρα του τρυβλίου.

3.1.1 Σχολιασμός φυλογενετικών σχέσεων

Τα δέντρα που προέκυψαν από και από τις 5 μεθόδους (NJ, UPGMA, ML, MP & BI) σε γενικές γραμμές μοιάζουν μεταξύ τους παρόλη την μειωμένη στατιστική στήριξη των κλάδων σε ορισμένες περιπτώσεις. Αναλόγως της μεθόδου, η γενετική απόσταση (ως κλίμακα) που υπολογιζόταν διέφερε αρκετά – ιδιαίτερα στις μεθόδους NJ & UPGMA – ωστόσο αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τους αλγορίθμους των NJ & UPGMA μεθόδων που δεν είναι τόσο «ενδεδειγμένοι» όσο των άλλων μεθόδων. Με όλες τις μεθόδους, οι 10 απομονώσεις ομαδοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο ανά είδος του μύκητα και συνολικά ανά ξενιστή. Όσον αφορά την γεωγραφική κατανομή δεν παρατηρείται καμία διαφοροποίηση. Οι απομονώσεις (*Neofusicoccum vitifusiforme*) από φιστικιά διέφεραν ελάχιστα

μεταξύ τους και χωριζόταν σε δύο ομάδες οι οποίες είχαν περίπου 1% διαφοροποίηση. Οι λόγοι για την μικρή διαφοροποίηση μεταξύ των απομονώσεων αυτών πιθανώς είναι: α) ότι οι περιοχές από τις οποίες έγιναν οι απομονώσεις ήταν σχετικά κοντινές, β) ότι η ασθένεια είναι σχετικά πρόσφατη στην φιστικιά και γ) ότι στην φιστικιά έχει βρεθεί μόνο η ατελής μορφή (Záchos et al., 1974-1977). Αυτή η μικρή διαφοροποίηση μεταξύ απομονώσεων από φιστικιές έχει βρεθεί και σε άλλα πειράματα όπως στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ (Ma et al., 2004). Οι τρεις απομονώσεις από ελιά, σοφόρα & δαμασκηνιά (*Botryosphaeria dothidea*) βρέθηκαν να είναι σχεδόν πανομοιότυπες με σχεδόν όλες τις μεθόδους εκτός της μεθόδου BI (*Μπείσειανής Συμπερασματολογίας*) που χωριζόταν σε 2 κλάδους. Ωστόσο, ακόμα και με αυτή την φυλογενετική μέθοδο, τα τρία καλύτερα δέντρα που υπολογίστηκαν είχαν αλλαγές μεταξύ αυτών των 3 απομονώσεων και συνολικό ποσοστό 64%.

Θα πρέπει ωστόσο να ληφθεί ως δεδομένο η αδυναμία της βασισμένης σε ITS φυλογενετικής ανάλυσης να διακρίνει λεπτομέρειες πέρα από το είδος, οπότε ορισμένες απομονώσεις που έμοιαζαν ίδιες, στην πραγματικότητα να διαφέρουν σε μεγαλύτερο ποσοστό. Για να βρεθούν οι πιθανές διαφορές σε αυτήν την περίπτωση θα βοηθούσε η χρήση άλλης μοριακής μεθόδου, όπως η AFLP.

3.2 Μελέτη παθογένειας

Χρησιμοποιήθηκαν 9 απομονώσεις που είχαν γίνει από 4 διαφορετικούς ξενιστές και έγιναν μολύνσεις σε φύλλα και κλάδους.

3.2.1 Μελέτη παθογένειας σε φύλλα φιστικιάς

Όπως έχει αναφερθεί, χρησιμοποιήθηκαν 9 απομονώσεις που είχαν γίνει από 4 διαφορετικούς ξενιστές και έγιναν 3 επαναλήψεις ανά απομόνωση. Το πείραμα διήρκησε 10 ημέρες και ο μεταχρωματισμός λόγω ανάπτυξης του μύκητα από τις 3dpi. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SPSS με την μέθοδο Tukey HSD (πιθανότητα λάθους $\alpha=0.05$) Υπολογίστηκε το σχετικό AUDPC, με τα στελέχη να χωρίζονται σε δυο κύριες ομάδες. Το χρώμα των φύλλων από πράσινο έγινε γκριζο με το εμβαδό να αυξάνει σταθερά από ημέρα σε ημέρα. Στις 10dpi στα περισσότερα στελέχη τα φύλλα είχαν καλυφθεί σχεδόν εξ' ολόκληρου από τον μύκητα. Πάνω στα φύλλα σχηματίστηκαν πυκνίδια στο διάστημα μεταξύ 7dpi και 8dpi. Στις παρακάτω εικόνες (Πίνακας 3-7, Εικόνα 42, Εικόνα 43) φαίνονται η στατιστική ανάλυση, το γράφημα της σχετικής AUDPC και η πρόοδος της ασθένειας στον χρόνο. Στην Εικόνα 44 φαίνεται η πρόοδος της ασθένειας στον χρόνο για την απομόνωση 55 (φιστικιά).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τα δεδομένα φαίνεται πως οι διαφορές μεταξύ των σχετικών AUDPC δεν σχετίζονται ειδικά με τον ξενιστή ούτε με την περιοχή. Ωστόσο, στην περίπτωση της απομόνωσης από αμπέλι ήταν χαρακτηριστική η μειωμένη μολυσματική ικανότητα.

σχετική AUDPC ^d Tukey HSD ^{a,b,c}				
στέλεχος	N	Περιοχή	υποομάδα	
			1	2
M μάρτυρας	6		,000000	
52 αμπέλι	3	Βοιωτία	,022285	
33 φυσικιά	3	Φθιώτιδα	,150308	,150308
51 φυσικιά	6	Βόλος	,241085	,241085
57 φυσικιά	6	Φθιώτιδα	,241915	,241915
26 φυσικιά	6	Αττική	,257568	,257568
55 φυσικιά	6	Θήβα		,363185
35 ελιά	6	Αττική		,367293
1 σοφόρα	6	Αττική		,379404
29 φυσικιά	6	Φθιώτιδα		,381979
Σημαντική διαφορά			,058	,112

Πίνακας 3-7 Εμφανίζονται οι μέσοι όροι για ομάδες σε ομοιογενή υποσύνολα.

Το τυπικό σφάλμα ισούται με 0.013.

a. χρησιμοποιεί αρμονικό μέσο όρων δείγματος = 5.00.

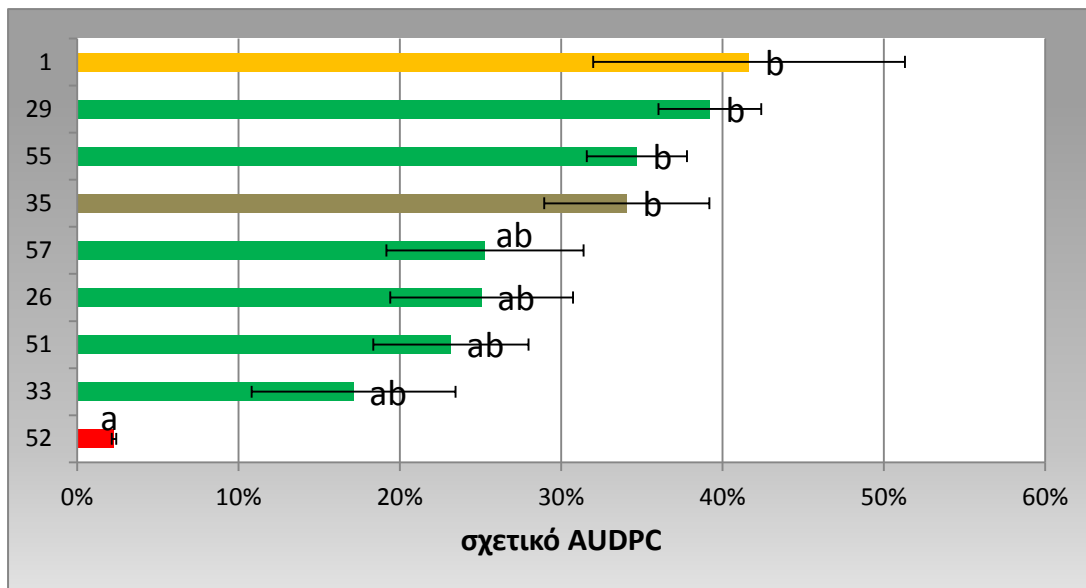
b. τα μεγέθη των δειγμάτων δεν είναι ίσα. Χρησιμοποιείται ο αρμονικός μέσος των μεγεθών των ομάδων.

Τα σφάλματα των δειγμάτων τύπου α δεν είναι εγγυημένα

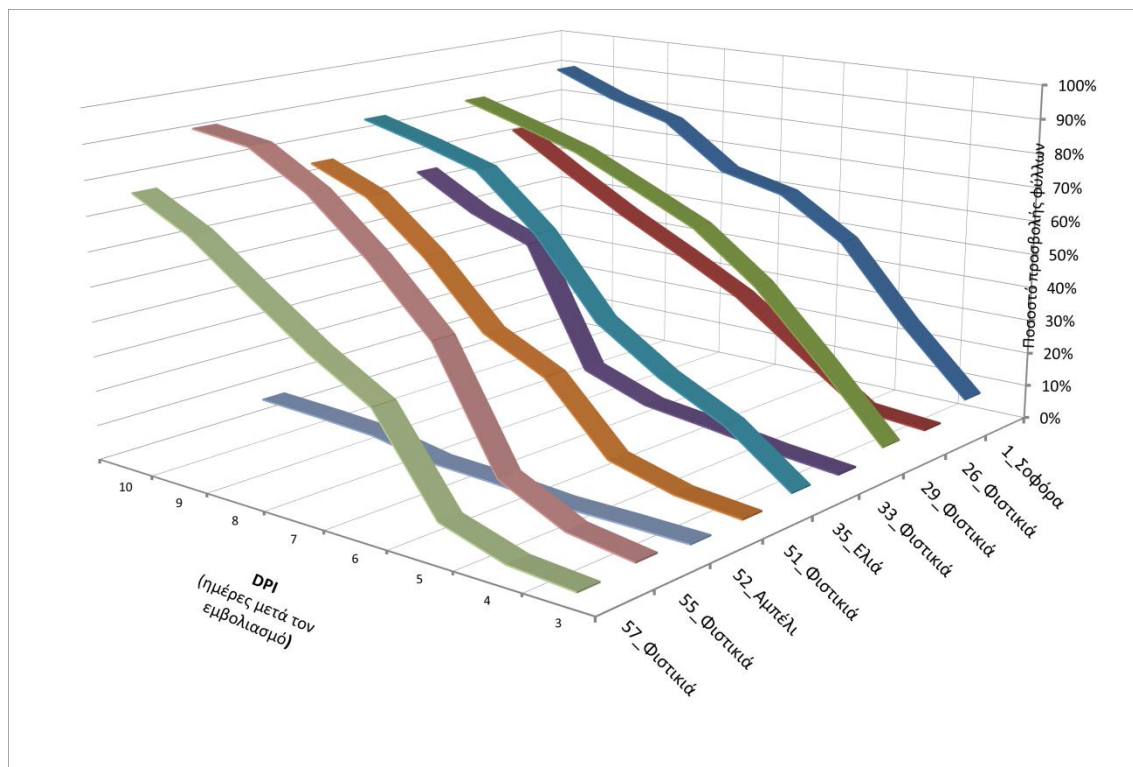
c. $\alpha = 0.05$.

d. σταθμισμένη παλινδρόμηση ελαχίστων τετραγώνων βάση επαναλήψεων

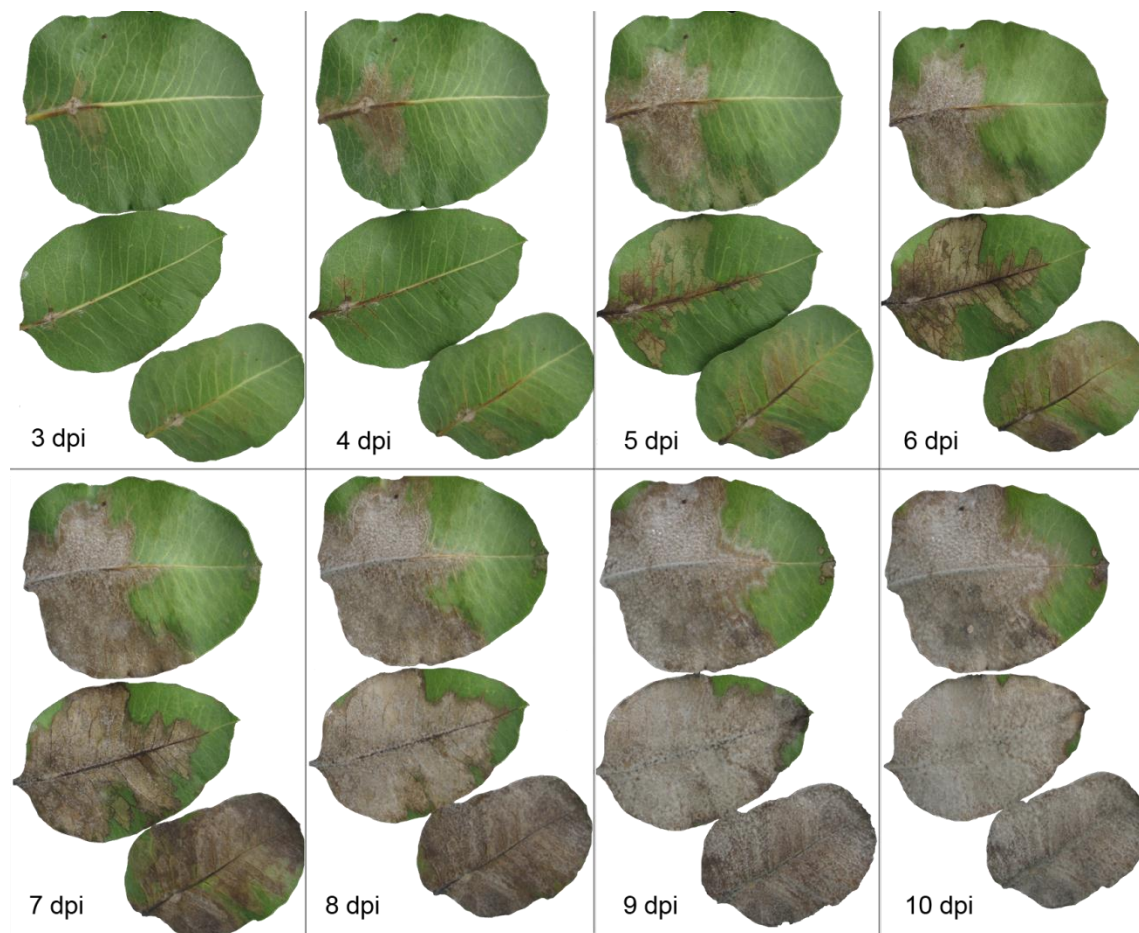
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 42 Διάγραμμα σχετικού AUDPC για τις 9 απομονώσεις σε μολύνσεις σε φύλλα φιστικιάς χρωματικός κώδικας: ΦΙΣΤΙΚΙΑ ΕΛΙΑ ΑΜΠΕΛΙ ΣΟΦΟΡΑ



Εικόνα 43 Διάγραμμα % εμβαδού σε σχέση με το χρόνο για τις 9 απομονώσεις σε μολύνσεις σε φύλλα φιστικιάς



Εικόνα 44 Πρόοδος ασθένειας σε τεχνητή μόλυνση φύλλων από 3dpi έως 10dpi. Εικονίζεται η απομόνωση 55 (φιστικιά)

3.2.2 Μελέτη παθογένειας σε κλάδους φιστικιάς

Οι απομονώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση μολυσματικής ικανότητας σε κλάδους φιστικιάς ήταν οι ίδιες με αυτές σε φύλλα φιστικιάς. Μετά το πέρας των τριών μηνών οι κλαδίσκοι εξετάστηκαν και μετρήθηκε το μήκος μεταχρωματισμού. Από τα παρακάτω δεδομένα (Πίνακας 3-8 & Εικόνα 46) το συμπέρασμα είναι πως δεν υπάρχει σαφής διαφορά μεταξύ των απομονώσεων, ειδικά αφού τα αποτελέσματα δεν συμφωνούν με τις τεχνητές μολύνσεις στα φύλλα. Ωστόσο, γενικά, απομονώσεις από φιστικιές δείχνουν υψηλή μολυσματική ικανότητα και η απομόνωση από αμπέλι σχετικά μικρή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μήκος μεταχρωματισμού mm ^c - Tukey HSD ^{a,b}				
στέλεχος	N	Περιοχή	υποομάδα	
			1	2
M	6		.00	
52 αμπέλι	6	Βοιωτία	24.00	24.00
1 σοφόρα	6	Αττική	31.50	31.50
26 φιστικιά	6	Αττική	37.00	37.00
35 ελιά	6	Αττική	37.17	37.17
57 φιστικιά	6	Φθιώτιδα	51.67	51.67
33 φιστικιά	6	Φθιώτιδα	56.67	56.67
51 φιστικιά	6	Βόλος		77.17
29 φιστικιά	6	Φθιώτιδα		78,00
55 φιστικιά	6	Θήβα		84.33
Σημαντική διαφορά			.177	.127

Πίνακας 3-8 Εμφανίζονται οι μέσοι όροι για ομάδες σε ομοιογενή υποσύνολα.

Το τυπικό σφάλμα ισούται με 1164.658

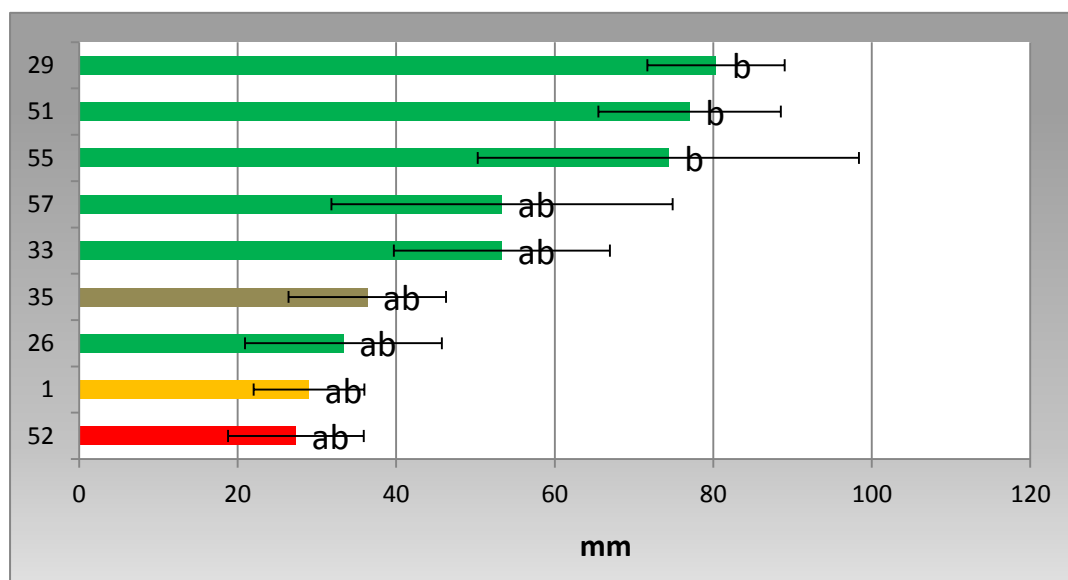
a. χρησιμοποιεί αρμονικό μέσο όρων δείγματος = 6.00.

b. α = 0.05

c. σταθμισμένη παλινδρόμηση ελαχίστων τετραγώνων βάση επαναλήψεων



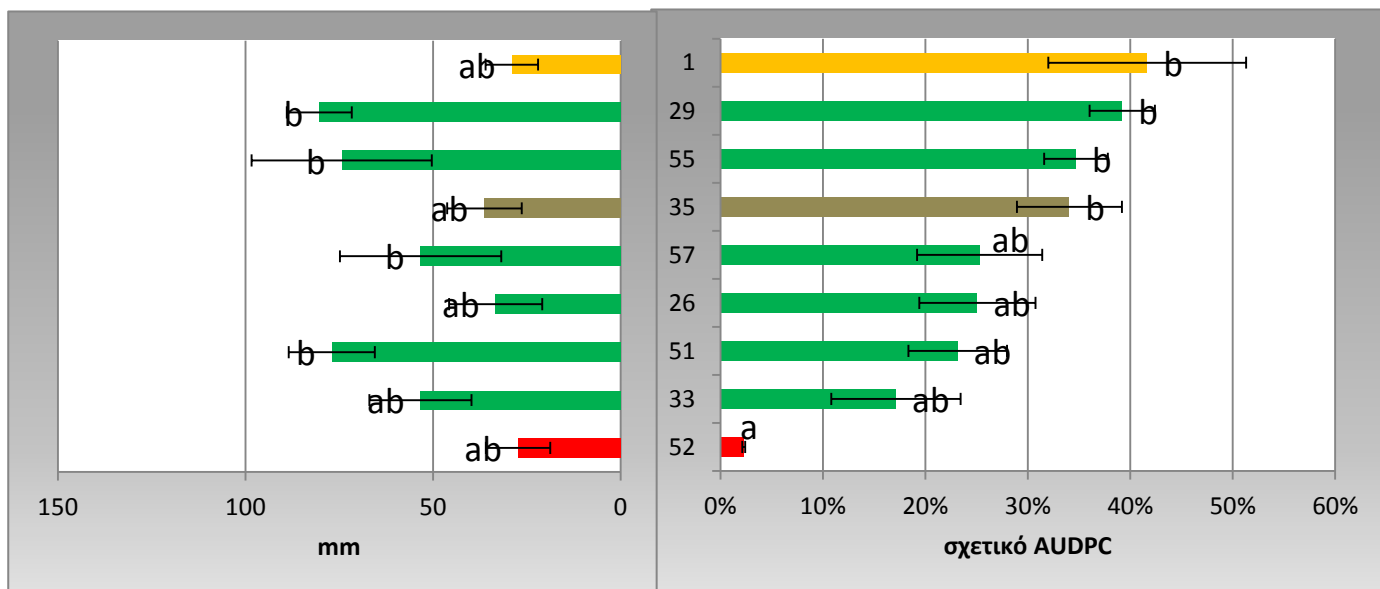
Εικόνα 45 Μεταχρωματισμός ξύλου κλαδίσκου φιστικιάς από μόλυνση με δίσκο μυκηλίου



Εικόνα 46 Διάγραμμα μήκους μεταχρωματισμού (mm) για τις 9 απομονώσεις σε μολύνσεις σε κλάδους φιστικιάς

χρωματικός κώδικας: ΦΙΣΤΙΚΙΑ ΕΛΙΑ ΑΜΠΕΛΙ ΣΟΦΟΡΑ

Από τη μελέτη παθογένειας των απομονώσεων σε αποκομμένα φύλλα φιστικιάς και κλαδίσκους φιστικιάς τα αποτελέσματα δεν δείχνουν ιδιαίτερη διαφοροποίηση μεταξύ απομονώσεων με εξαίρεση την απομόνωση από άμπελο (52) που είχε μικρότερη παθογόνο δύναμη από τις υπόλοιπες. Στην περίπτωση των φύλλων οι διαφοροποιήσεις ήταν μεγαλύτερες και με μικρότερο τυπικό σφάλμα από τους κλαδίσκους. Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι δεν υπήρξε διαφοροποίηση στην παθογόνο δύναμη όσον αφορά την περιοχή από την οποία απομονώθηκαν τα στελέχη. Όσον αφορά τη σχέση μεταξύ παθογόνου δύναμης και φυλογενετικής σχέσης υπήρξε μια συσχέτιση η οποία όμως παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση της τεχνητής μόλυνσης των φύλλων και μπορεί να οφείλεται σε τυχαίους παράγοντες. Πιο αναλυτικά, η απομόνωση φιστικιάς 29 που είναι σε διαφορετικό κλάδο από τις απομονώσεις φιστικιάς 26 & 33 βρέθηκε να έχει σχετικά υψηλή παθογόνο δύναμη. Επίσης, οι απομονώσεις 1 (σοφόρας) & 35 (ελιάς) που βρίσκονται στον ίδιο κλάδο βρέθηκαν να έχουν παρόμοια παθογόνο δύναμη.



Εικόνα 47 Σύγκριση αποτελεσμάτων τεχνητών μόλυνσεων σε κλαδίσκους (αριστερά) και φύλλων (δεξιά).

Στην Εικόνα 47 διακρίνονται οι διαφορές μεταξύ μόλυνσεων κλαδίσκων και φύλλων. Οι φύλλων είναι πιο κοντά στην πραγματική (μη τεχνητή) μόλυνση από τον μύκητα σε σχέση με τους κλαδίσκους όπου ανοίγεται «πληγή» στο ξύλο. Ειδικά, η τεχνική μόλυνσης των φύλλων με εναιώρημα μυκηλίου ομοιάζει πολύ στην μόλυνση με κονίδια λόγω του πολύ μικρού μεγέθους των τμημάτων μυκηλίου.

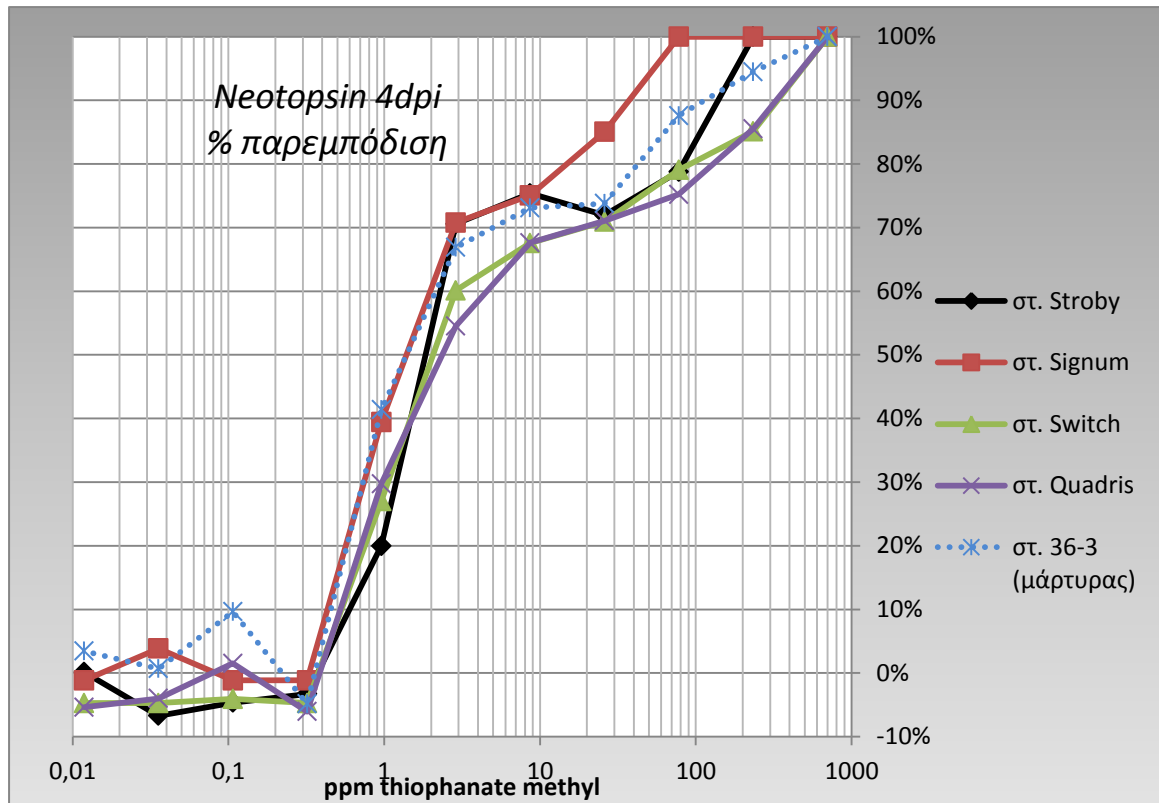
3.3 Αντιμετώπιση & μελέτη ανθεκτικότητας καμαροσπορίου φιστικιάς σε μυκητοκτόνα

Όπως έχει αναφερθεί, χρησιμοποιήθηκαν 4 στελέχη συν ένας μάρτυρας για δοκιμή ανάπτυξης στα 5 μυκητοκτόνα.

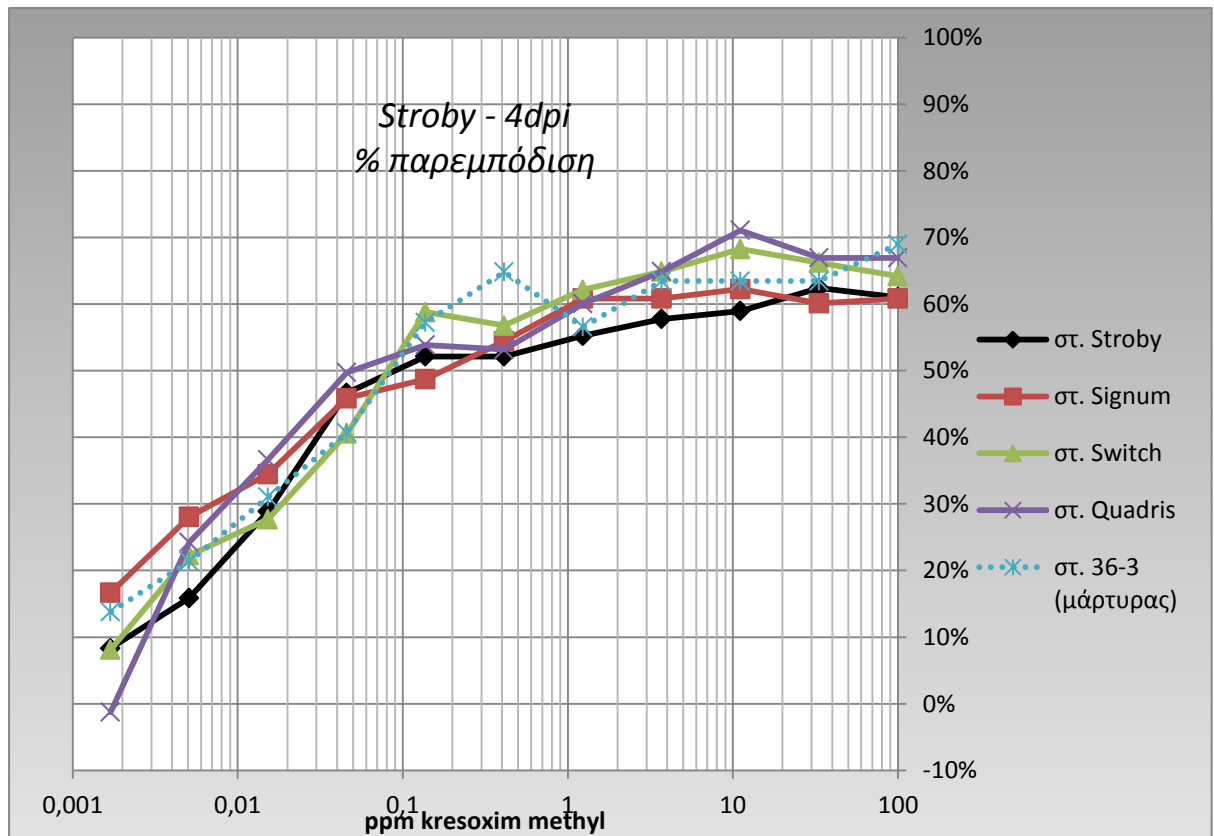
Πίνακας 3-9

Προέλευση στελέχους	κωδικός
Stroby	77
Signum	81
Quadris	86
Switch	93
Control – 36-3	36-3

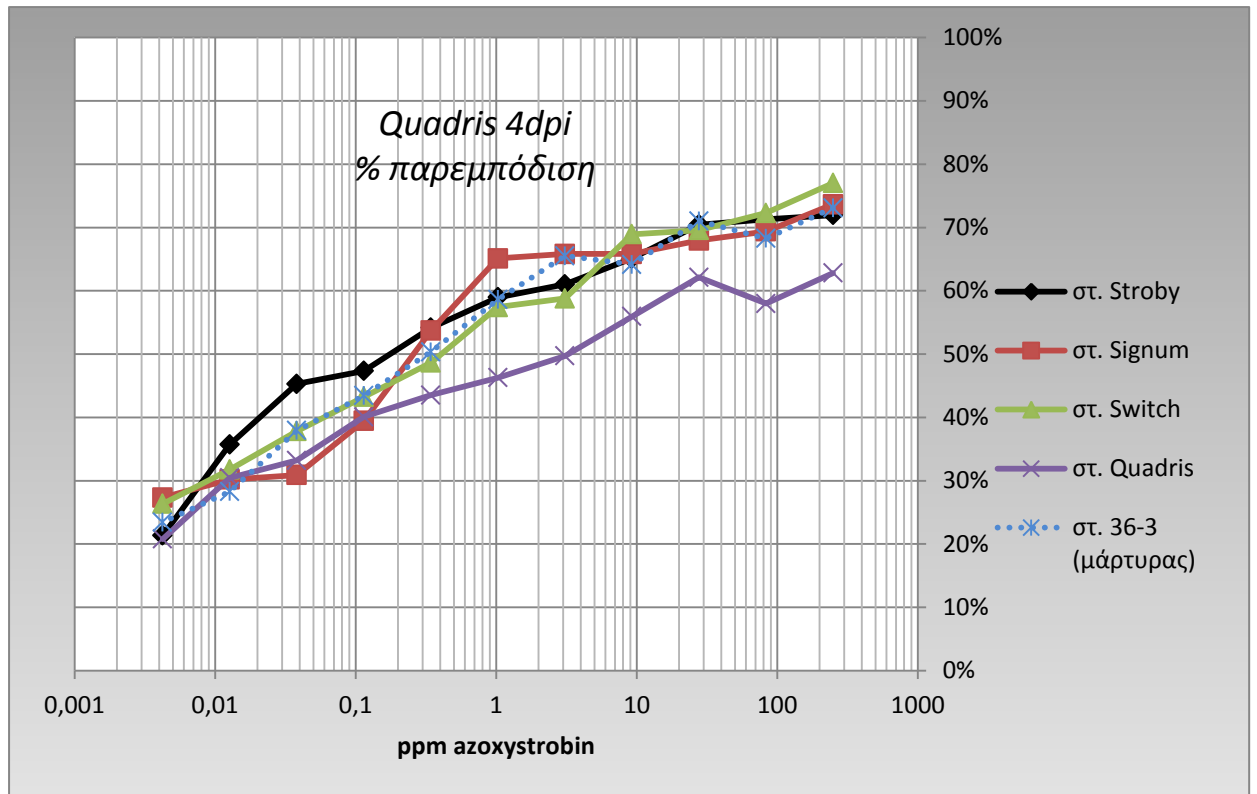
Στις επόμενες εικόνες (48-52) αναλύεται η σχετική παρεμπόδιση της ανάπτυξης στα 4^ηρι της κάθε απομόνωσης σε κάθε ένα από τα πέντε μυκητοκτόνα, το EC₅₀ για κάθε στέλεχος & μυκητοκτόνο (53 & 54) και οι καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών (55-60). Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε η 4^η ημέρα είναι ότι την ημέρα αυτή η ανάπτυξη του τρυβλίου χωρίς μυκητοκτόνο ήταν η μέγιστη και την 5^η ημέρα είχε καλύψει όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Το στέλεχος 36_3 απομονώθηκε από φιστικιές που δεν έχουν ψεκαστεί με μυκητοκτόνα και χρησιμεύει σαν μάρτυρας (control).



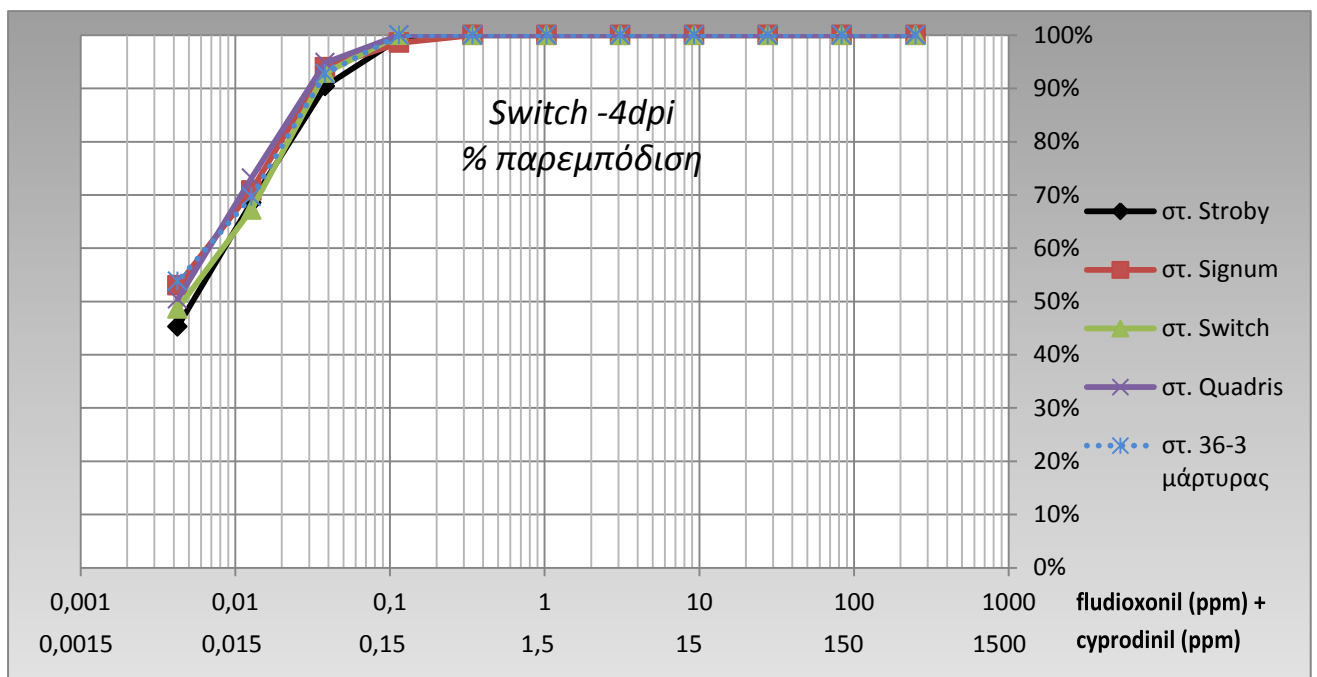
Εικόνα 48 Διάγραμμα % παρεμπόδισης στις 4dri των πέντε στελεχών στο σκεύασμα **neotopsis**. Στη λεζάντα είναι τα στελέχη που είχαν απομονωθεί από δέντρα που είχαν ψεκαστεί με τα αντίστοιχα σκευάσματα.



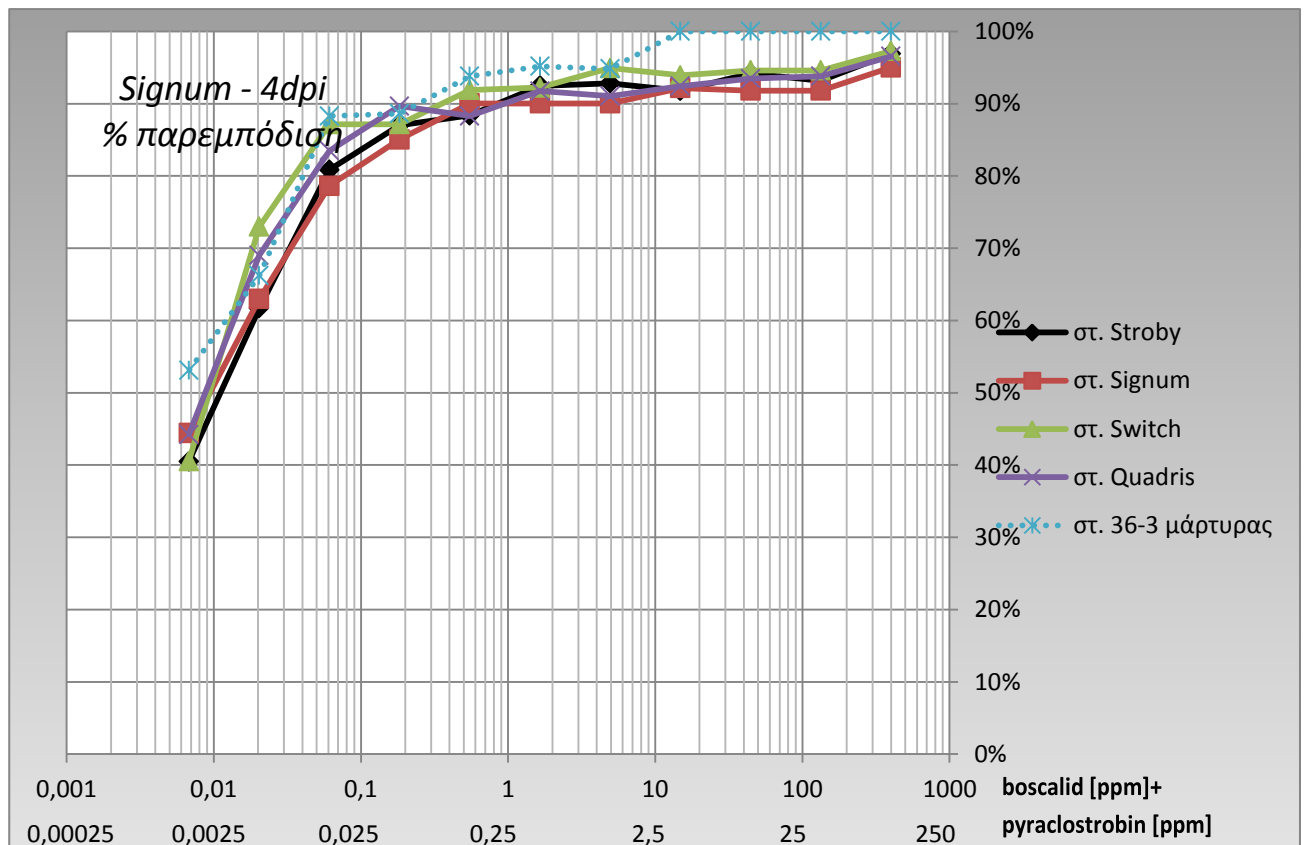
Εικόνα 49 Διάγραμμα % παρεμπόδισης στις 4dri των πέντε στελεχών στο σκεύασμα **Strobry**. Στη λεζάντα είναι τα στελέχη που είχαν απομονωθεί από δέντρα που είχαν ψεκαστεί με τα αντίστοιχα σκευάσματα.



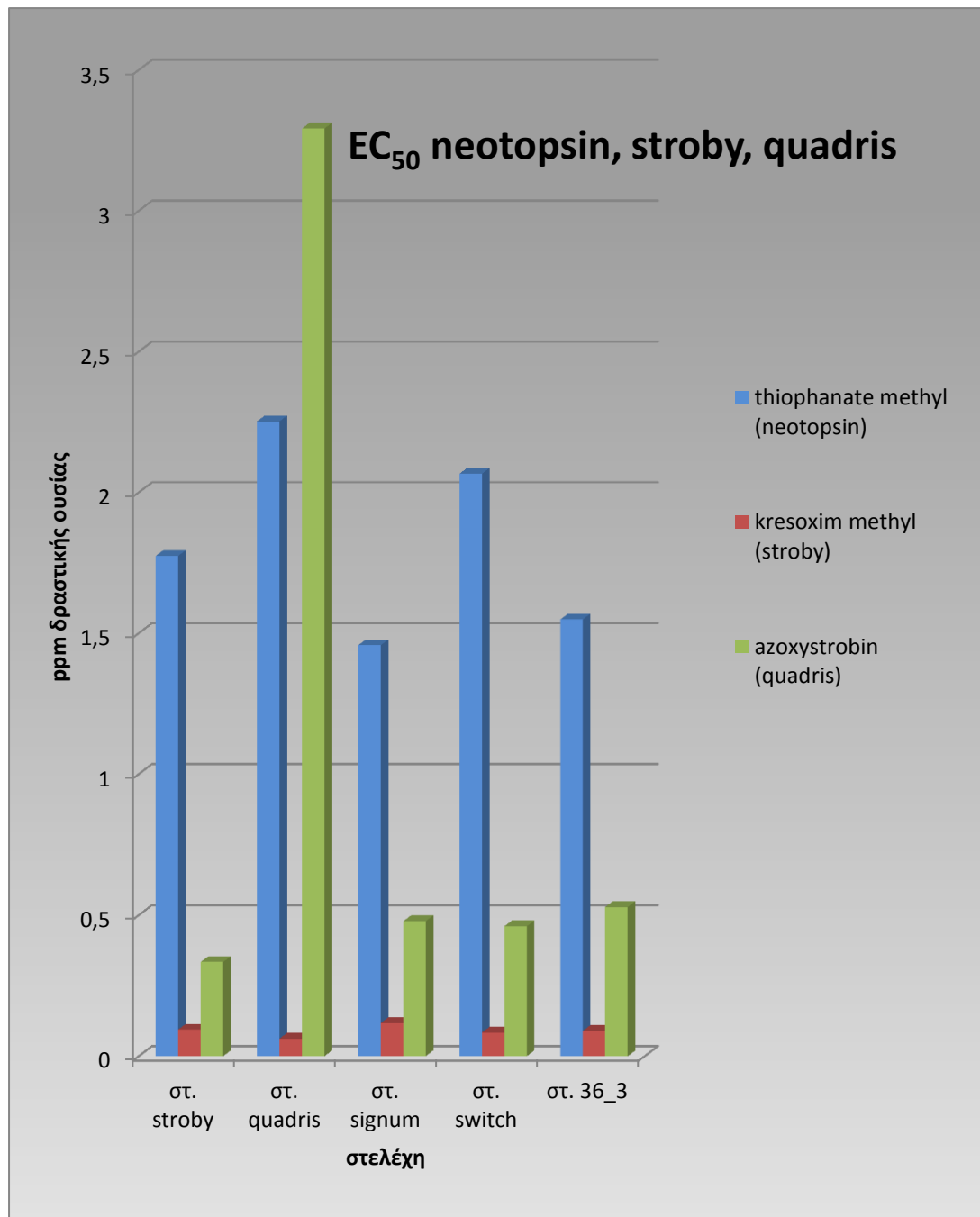
Εικόνα 50 Διάγραμμα % παρεμπόδισης στις 4dri των πέντε στελεχών στο σκεύασμα **Quadris**. Στη λεζάντα είναι τα στελέχη που είχαν απομονωθεί από δέντρα που είχαν ψεκαστεί με τα αντίστοιχα σκευάσματα.



Εικόνα 51 Διάγραμμα % παρεμπόδισης στις 4dri των πέντε στελεχών στο σκεύασμα **Switch**. Στη λεζάντα είναι τα στελέχη που είχαν απομονωθεί από δέντρα που είχαν ψεκαστεί με τα αντίστοιχα σκευάσματα

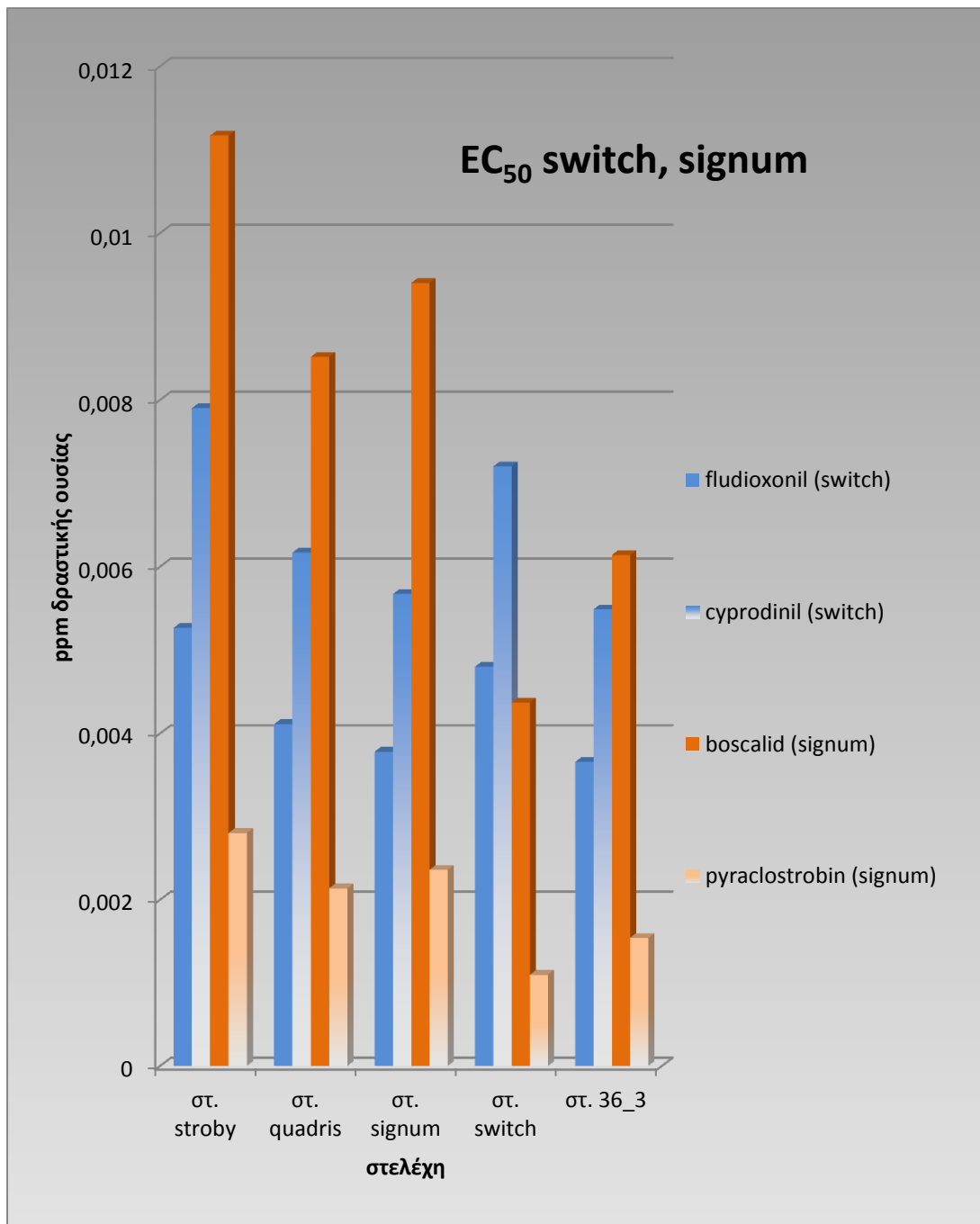


Εικόνα 52 Διάγραμμα % παρεμπόδισης στις 4drri των πέντε στελεχών στο σκεύασμα *Signum*. Στη λεζάντα είναι τα στελέχη που είχαν απομονωθεί από δέντρα που είχαν ψεκαστεί με τα αντίστοιχα σκευάσματα.



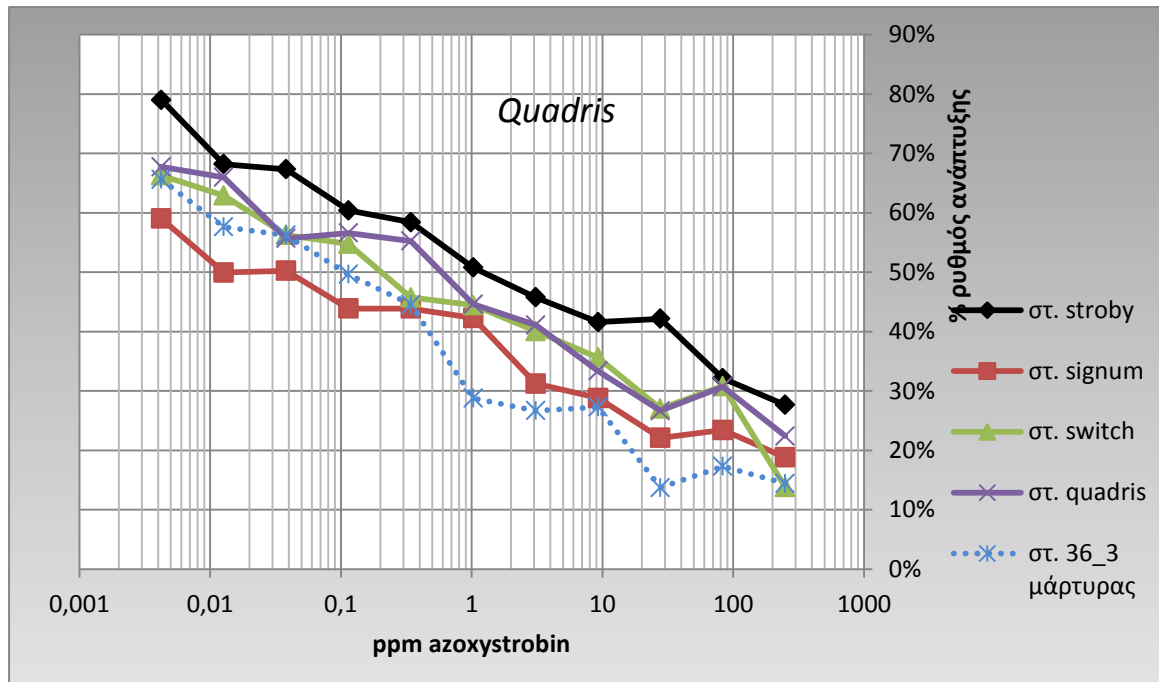
Εικόνα 53 Διάγραμμα EC₅₀ (συγκέντρωσης μυκητοκτόνου με την οποία έχουμε το ½ της ανάπτυξης του στελέχους σε σχέση με το τρυβλίο χωρίς μυκητοκτόνο) για τα σκευάσματα *Neotopsin* (thiophanate methyl), *Stroby* (kresoxim methyl) και *Quadris* (azoxystrobin).

Στον οριζόντιο άξονα εικονίζονται οι απομονώσεις που προήλθαν από φιστικές που είχαν ψεκαστεί με το αντίστοιχο μυκητοκτόνο

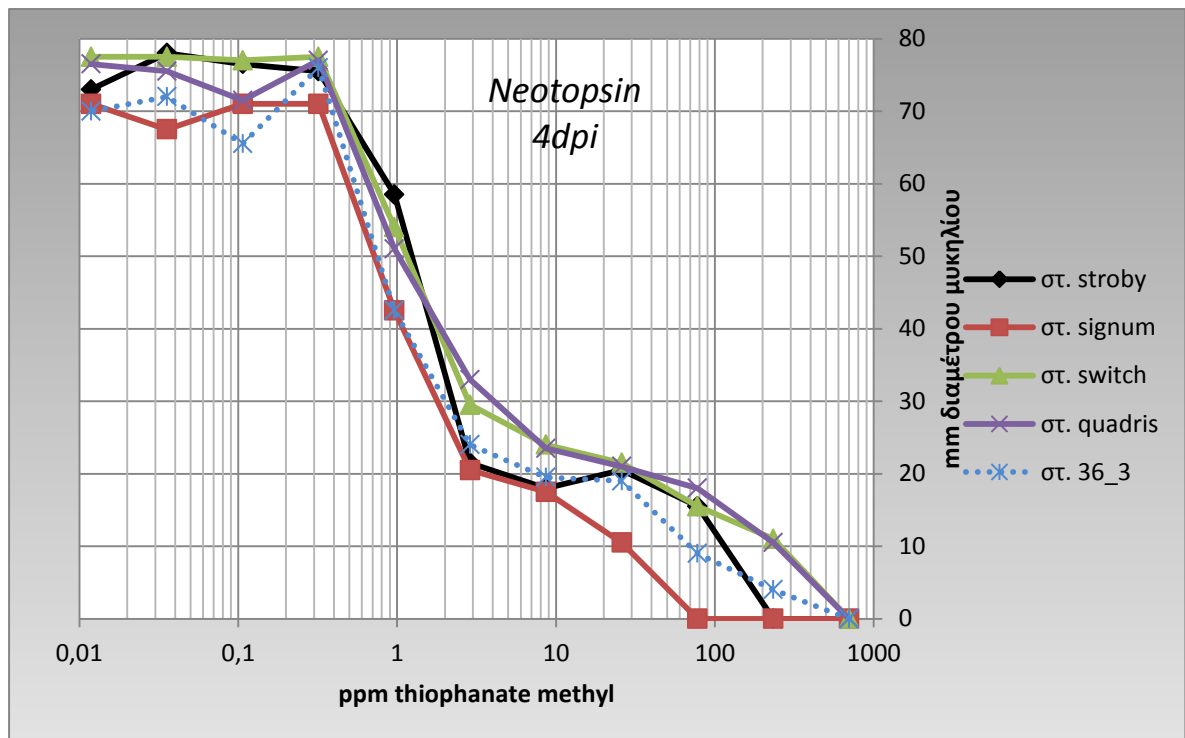


Εικόνα 54 Διάγραμμα EC_{50} (συγκέντρωσης μυκητοκτόνου με την οποία έχουμε το ½ της ανάπτυξης του στελέχους σε σχέση με το τρυβλίο χωρίς μυκητοκτόνο) για τα σκευάσματα *Switch* (fludioxonil + cyprodinil) και *Signum* (boscalid + pyraclostrobin). Το κάθε σκεύασμα καταλαμβάνει 2 στήλες στο γράφημα καθώς εμπεριέχει 2 δραστικές ουσίες.

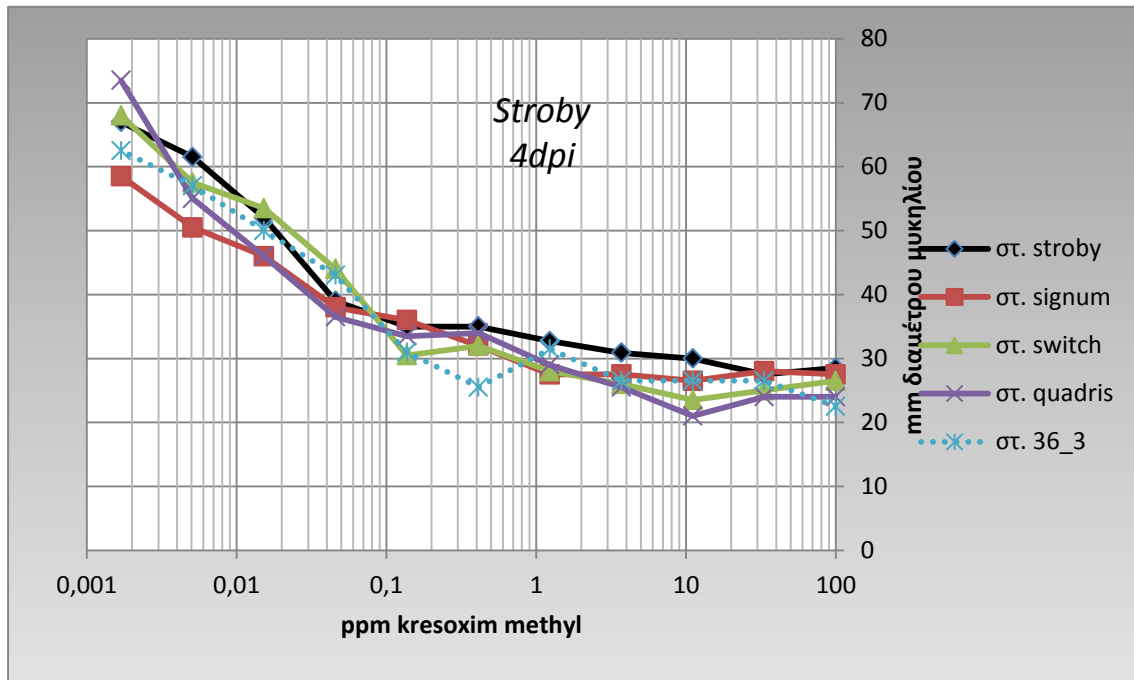
Στον οριζόντιο άξονα εικονίζονται οι απομονώσεις που προήλθαν από φιστικές που είχαν ψεκαστεί με το αντίστοιχο μυκητοκτόνο.



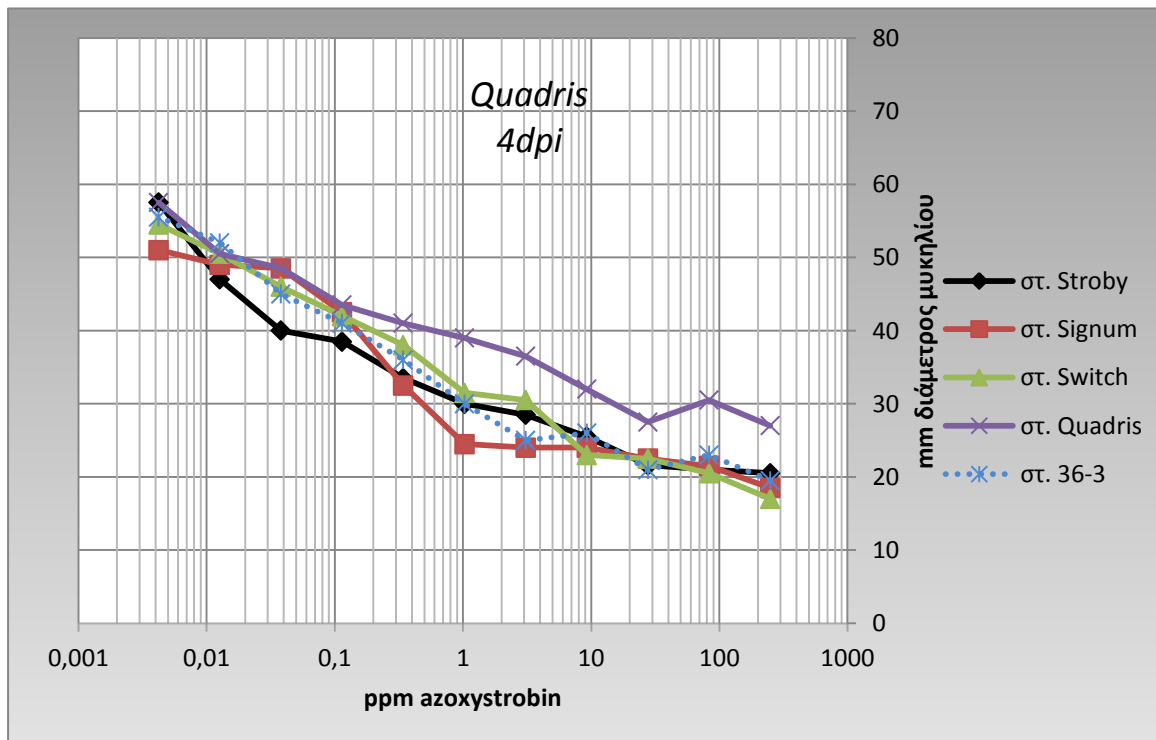
Εικόνα 55 Σχετικός ρυθμός ανάπτυξης κάθε στελέχους (ρυθμός ανάπτυξης σε mm/μέρα δια το ρυθμό ανάπτυξης τρυβλίου χωρίς μυκητοκτόνο) στο σκεύασμα *Quadris*



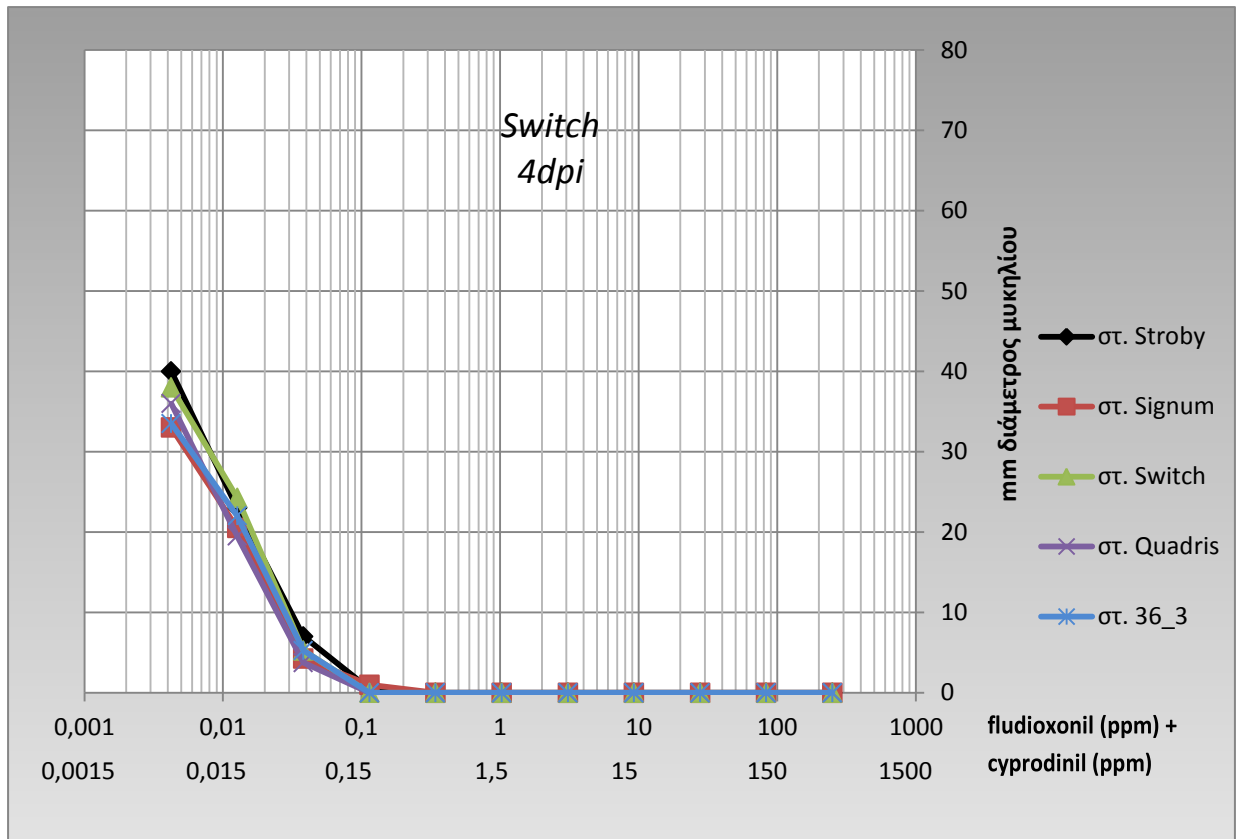
Εικόνα 56 Καμπύλη ανάπτυξης (dose response curve) των 5 στελεχών στο μυκητοκτόνο *neotopsin*



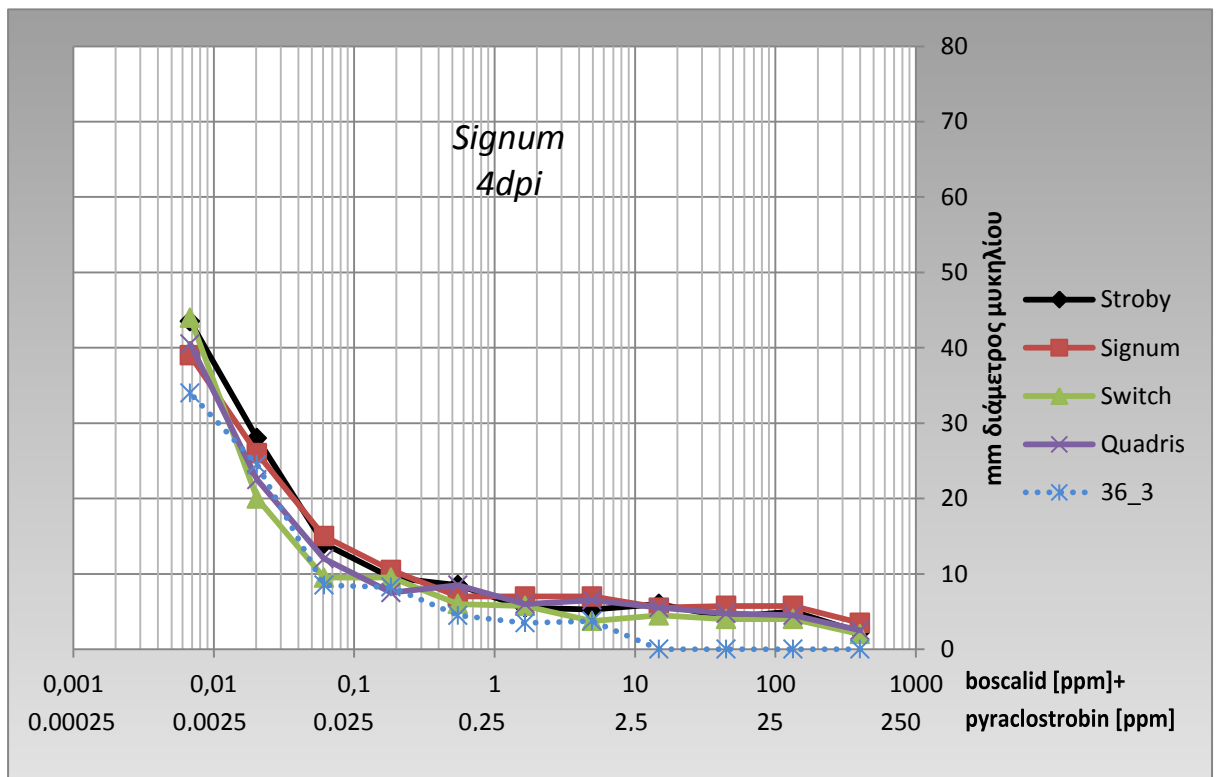
Εικόνα 57 Καμπύλη ανάπτυξης (dose response curve) των 5 στελεχών στο μυκητοκτόνο *Strobly*



Εικόνα 58 Καμπύλη ανάπτυξης (dose response curve) των 5 στελεχών στο μυκητοκτόνο *Quadris*



Εικόνα 59 Καμπύλη ανάπτυξης (dose response curve) των 5 στελεχών στο μυκητοκτόνο *Switch*



Εικόνα 60 Καμπύλη ανάπτυξης (dose response curve) των 5 στελεχών στο μυκητοκτόνο *Signum*

3.3.1 Διαφορές ανάπτυξης βάση μετρήσεων

Από τα διαγράμματα της % παρεμπόδισης των 5 μυκητοκτόνων, των καμπύλων ανάπτυξης και των EC_{50} βλέπουμε πως σαφής διαφορά μεταξύ των στελεχών υπάρχει μόνο στο μυκητοκτόνο *Quadris* (δραστική ουσία *azoxystrobin*) στο οποίο το στέλεχος *Quadris* (86) έδειξε σχετική ανθεκτικότητα. Στα υπόλοιπα μυκητοκτόνα (Εικόνα 48 έως Εικόνα 60) δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στην EC_{50} μεταξύ των στελεχών.

Στο σκεύασμα *Neotopsin* (Εικόνα 48) βλέπουμε πως σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 0.3ppm η παρεμπόδιση είναι μηδενική. Σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0.3 & 4 ppm δραστικής ουσίας (*thiophanate methyl*) έχουμε λογαριθμική σχέση συγκέντρωσης –παρεμπόδισης, και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η κλίση της καμπύλης μειώνεται. Στην μέγιστη συγκέντρωση των 700ppm δραστικής ουσίας έχουμε σχεδόν πλήρη παρεμπόδιση της ανάπτυξης και για τα πέντε στελέχη μέχρι και τα 8dpi.

Στο σκεύασμα *Stroby* (Εικόνα 49) η παρεμπόδιση στην ελάχιστη συγκέντρωση (≈ 0.001 ppm δραστικής ουσίας) η παρεμπόδιση είναι ελάχιστη και κυμαίνεται μεταξύ 0-15%, αναλόγως του στελέχους. Ο ρυθμός ανάπτυξης του μύκητα παρατηρήθηκε να είναι υψηλός ακόμα και στις σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις. Μέχρι την συγκέντρωση των 0.2ppm η σχέση συγκέντρωσης – παρεμπόδισης είναι λογαριθμική και έπειτα η κλίση μειώνεται. Από τα 0.2ppm μέχρι την μέγιστη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (1ppm) η παρεμπόδιση είναι περίπου σταθερή, και φτάνει το μέγιστο το 60%. Αυτό πιθανώς να υποδηλώνει μια «ανθεκτικότητα» του μύκητα στην ανάπτυξη στο PDA και μπορεί να εξηγηθεί μερικώς από τον τρόπο δράσης του *kresoxim methyl* καθώς δεν παρεμποδίζει την εναλλακτική αναπνοή. Στο πείραμα στον αγρό το μυκητοκτόνο έδειξε σχετικά καλή παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα και αυτό πιθανώς οφείλεται στο ότι ενώ *in vitro* επαρκεί η εναλλακτική αναπνοή για την ανάπτυξη του μυκηλίου, *in vivo* που συμπεριλαμβάνεται η βλάστηση των σπορίων και η προσβολή του ξενιστή δεν επαρκεί (Miguez et al., 2004), (Köller et al., 2001). Μεταξύ των 5 στελεχών δεν παρατηρείται ιδιαίτερη διαφοροποίηση οπότε πιθανότατα δεν έχει αναπτυχθεί ανθεκτικότητα.

Στο σκεύασμα *Quadris* (Εικόνα 50), που και αυτό όπως το *Stroby* είναι μια στρομπιλουρίνη, η σχέση συγκέντρωσης –παρεμπόδισης είναι λογαριθμική σχεδόν καθ' ολοκλήρου του εύρους των συγκεντρώσεων. Στην ελάχιστη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε (4×10^{-3} ppm) η παρεμπόδιση ήταν περίπου 25% και με την μέγιστη, που είναι η συνιστώμενη κυμαινόταν από 60-75%. Παρατηρούμε ότι ακόμα και στην μέγιστη συγκέντρωση δεν έχουμε πλήρη παρεμπόδιση της ανάπτυξης και μάλιστα το στέλεχος *Quadris* (86) έδειξε διαφοροποίηση από τα υπόλοιπα στελέχη. Η μερική παρεμπόδιση στην μέγιστη συγκέντρωση μπορεί να εξηγηθεί όπως και στην περίπτωση του *Stroby* καθώς έχουν γενικά τον ίδιο μηχανισμό δράσης (Q_o παρεμποδιστής). Η διαφοροποίηση του στελέχους *Quadris* αυξάνει με την συγκέντρωση του μυκητοκτόνου: στην ελάχιστη συγκέντρωση

πρακτικώς δεν υπάρχει διαφοροποίηση ενώ όσο αυξάνει η συγκέντρωση παρατηρείται μικρότερη παρεμπόδιση της ανάπτυξης. Η διαφορά της τάξης του 10 στο EC_{50} του στελέχους (Εικόνα 50 & Εικόνα 53) είναι πιθανό να είναι μια εμφανιζόμενη ανθεκτικότητα στο *azoxystrobin*. Επίσης από την (Εικόνα 55) φαίνεται η διαφορά στον ρυθμό ανάπτυξης του στελέχους *Quadris* (86). Ο ρυθμός αύξησης του μυκηλίου βρέθηκε να έχει λογαριθμική σχέση με τη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου και στην μέγιστη συγκέντρωση ο ρυθμός κυμαίνεται από 15-25% του τρυβλίου χωρίς μυκητοκτόνο. Τα στελέχη *Stroby* & *Quadris* παρουσιάζουν μεγαλύτερο σχετικό ρυθμό ανάπτυξης από τα υπόλοιπα και το στέλεχος 36_3 (μάρτυρας) έχει τον μικρότερο σχετικό ρυθμό ανάπτυξης. Μεταξύ των στελεχών που προήλθαν από φυστικές που είχαν ψεκαστεί με *Stroby* και *Quadris* (στρομπιλουρίνες) δεν παρατηρείται διασταυρωτή ανθεκτικότητα στις δοκιμές *in vitro* καθώς στα τρυβλία με μυκητοκτόνο *Stroby* όλα τα στελέχη είχαν περίπου την ίδια ανάπτυξη.

Το σκεύασμα *Switch* όπως έχει αναφερθεί, εμπεριέχει δύο δραστικές ουσίες, το *cyprodinil* & το *fludioxonil*. Η παρεμπόδιση στην ανάπτυξη ήταν σχεδόν 100% σε συγκέντρωση μόλις (0.2ppm *fludioxonil* + 0.3ppm *cyprodinil*) για όλα τα στελέχη και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις η σχέση ήταν λογαριθμική. Η αυξημένη παρεμπόδιση του σκευάσματος μπορεί να δικαιολογηθεί από δράση και των δυο δραστικών ουσιών. Σε όλες τα στελέχη, ο ρυθμός αύξησης μέχρι από την συγκέντρωση των 0.3ppm ήταν μηδενικός και δεν είχε αναπτυχθεί καθόλου μυκήλιο ακόμα και στις 8dpi. Μεταξύ των στελεχών δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στην ανάπτυξή τους.

Το σκεύασμα *Signum* εμπεριέχει, όπως και το *Switch*, δυο δραστικές ουσίες, τα *boscalid* & *pyraclostrobin*. Γενικά το μυκητοκτόνο αυτό παρουσιάζει μεγάλη παρεμπόδιση σε συγκεντρώσεις σχετικά μικρές (85% παρεμπόδιση σε [0.1ppm *boscalid* + 0.025ppm *pyraclostrobin*]). Σε συγκεντρώσεις μικρότερες των [0.1ppm *boscalid* + 0.025ppm *pyraclostrobin*] η σχέση συγκέντρωσης – παρεμπόδισης είναι λογαριθμική και σε μεγαλύτερες η κλίση γίνεται σχεδόν οριζόντια, και στην μέγιστη συγκέντρωση η παρεμπόδιση φτάνει το 95%. Ωστόσο, το στέλεχος 36_3 (μάρτυρας) υφίστανται πλήρη παρεμπόδιση ήδη από [10ppm *boscalid* + 2.5ppm *pyraclostrobin*], αλλά και σε μικρότερες συγκεντρώσεις έχει ελαφρά μεγαλύτερη παρεμπόδιση από τα υπόλοιπα στελέχη. Ο ρυθμός ανάπτυξης του μυκηλίου στην μέγιστη συγκέντρωση φτάνει μόλις το 5%.

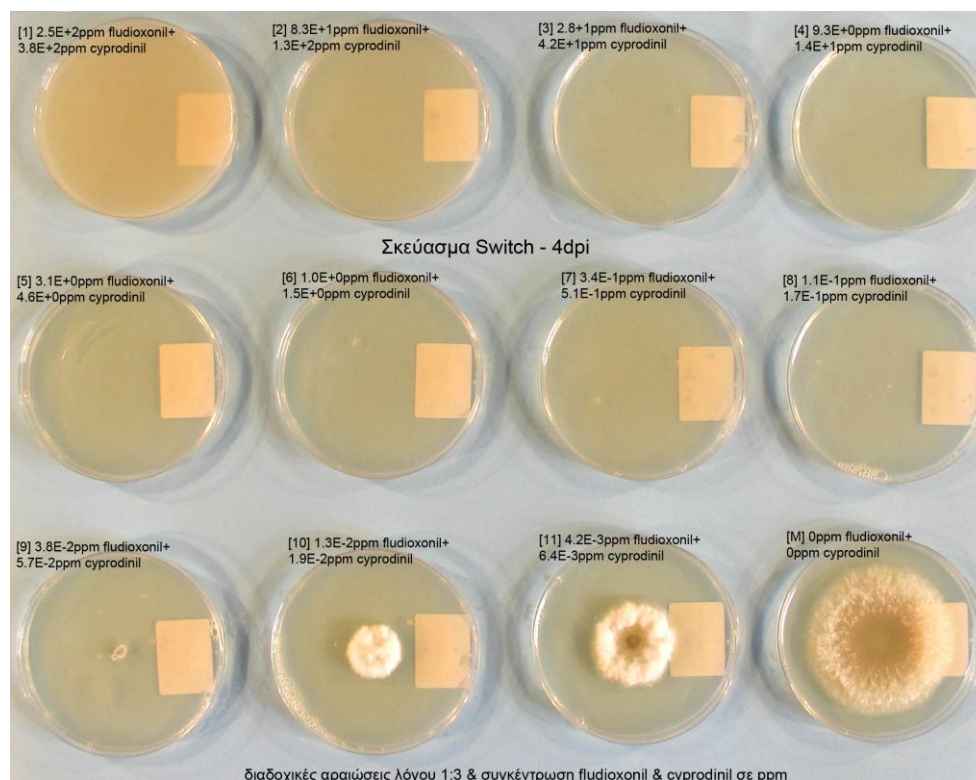
Σε πειράματα απόδοσης των 4 μυκητοκτόνων *Stroby*, *Quadris*, *Signum* & *Switch* που έγιναν σε αγρό (*in planta*) στην Μάκρη Φθιώτιδας το 2010, τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά από τα *in vitro* (ανάπτυξη σε PDA) πειράματα. Πιο συγκεκριμένα, το μυκητοκτόνο *Quadris* έδειξε την μεγαλύτερη απόδοση και ακολουθούσαν τα *Signum*, *Stroby* & *Switch*. Σε χαμηλό επίπεδο μόλυσματος τα *Quadris*, *Signum* & *Stroby* είχαν παρόμοια αποδοτικότητα, ενώ σε μέτριο και υψηλό επίπεδο ήταν όλα διαφορετικά με το *Quadris* να έχει την καλύτερη απόδοση. Ο κυριότερος λόγος της διαφοράς της απόδοσης του *Quadris* *in vitro* και *in planta* πιθανότατα είναι ο μηχανισμός

δράσης. Πιο συγκεκριμένα, το *Quadris* (δραστική ουσία *azoxystrobin*) είναι Qo παρεμπόδισης στο σύμπλοκο III. Στους μύκητες υπάρχει και η εναλλακτική αναπνοή (alternative respiration) η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη του μύκητα. Ωστόσο, η εναλλακτική αναπνοή δεν επαρκεί για την βλάστηση των κονιδίων και την προσβολή του ξενιστή από τον μύκητα και έτσι η παρεμπόδιση είναι πολύ καλύτερη απ' αυτή in vitro. Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι ακόμα και in vitro το μυκητοκτόνο *Quadris* παρεμπόδιζε σε σημαντικό ποσοστό την ανάπτυξη του μύκητα ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις.

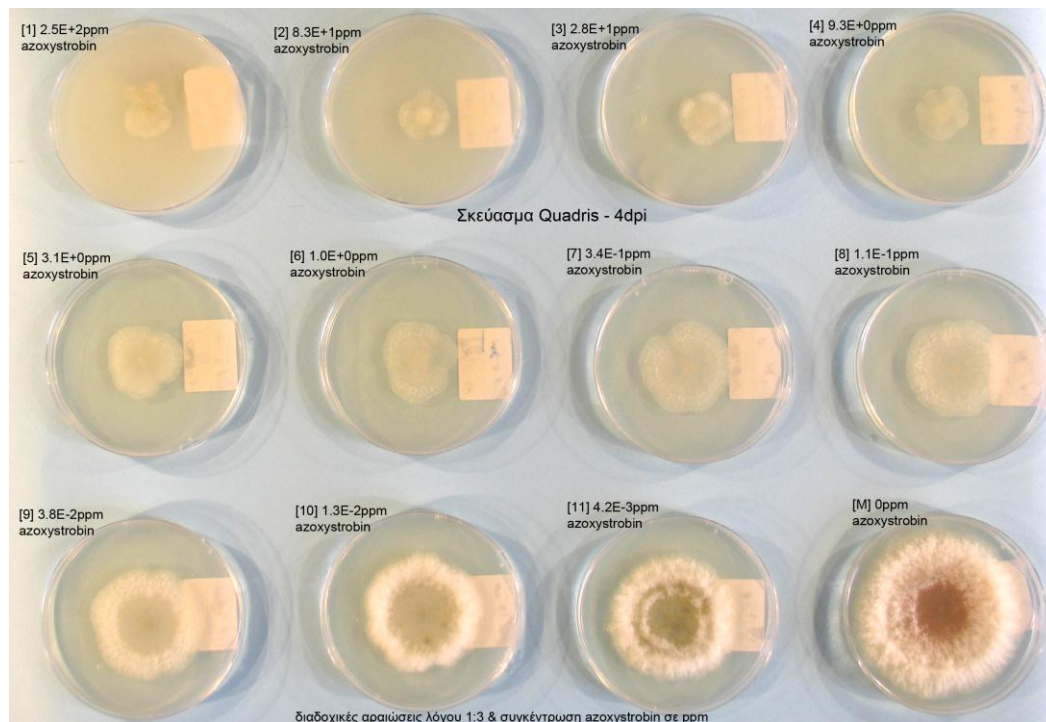
Επίσης υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ δοκιμών in vitro & in vivo όσον αφορά το μυκητοκτόνο *Switch*. Στις δοκιμές in vitro η απόδοσή του ήταν πολύ καλή, ενώ αντίθετα in vivo ήταν αυτό με την μικρότερη απόδοση. Ένας πιθανός λόγος για την μεγάλη αυτή διαφορά είναι ότι και το *cyprodinil* και το *fludioxonil* φωτολύονται σχετικά γρήγορα (χρόνος ημιζωής 10-13 ημέρες) καθώς και το ότι η ουσία *fludioxonil* δεν είναι διασυστηματική (FOOTPRINT Project, 2011). Επίσης, σημαντικής σημασίας παράγοντας για την διαφορά στην απόδοση του *cyprodinil* + *fludioxonil* φαίνεται να είναι το γεγονός ότι στην παρεμπόδιση βλάστησης των σπορίων το *Switch* έχει διαφορετική συμπεριφορά απ' ότι στην ανάπτυξη μυκηλίου (Jaspers, 2001).

3.3.2 Σύγκριση των μυκητοκτόνων βάση μορφολογίας και ανάπτυξης

Η ανάπτυξη του μυκηλίου διέφερε αναλόγως του μυκητοκτόνου, και η μορφολογία του μυκηλίου σε ορισμένες περιπτώσεις ήταν διαφορετική από τα υπόλοιπα μυκητοκτόνα.



Εικόνα 61 Ανάπτυξη μυκηλίου στις 4dpi με ενσωματωμένο το μυκητοκτόνο *Switch*. Το ένα τρυβλίο με το άλλο έχει λόγο συγκέντρωσης 1:3



Εικόνα 62 Ανάπτυξη μυκηλίου στις 4dpi με ενσωματωμένο το μυκητοκτόνο *Quadris*. Το ένα τρυβλίο με το άλλο έχει λόγο συγκέντρωσης 1:3

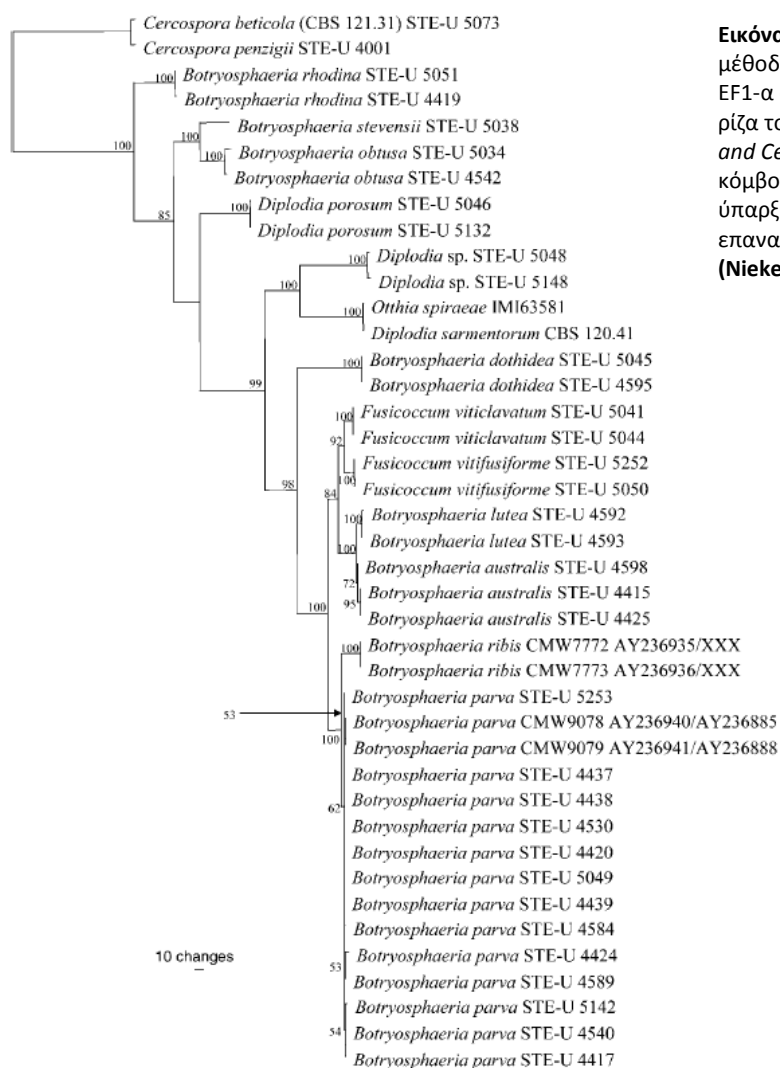
Στην Εικόνα 61 φαίνεται η ανάπτυξη του μύκητα στις 4dpi στο μυκητοκτόνο *Switch*. Παρατηρούμε ότι η ανάπτυξη είναι μηδενική μέχρι και το 3^ο από το τέλος τρυβλίο ενώ αντίθετα σε άλλα μυκητοκτόνα όπως το *Quadris* (Εικόνα 62) υπάρχει ανάπτυξη μυκηλίου σε όλα τα τρυβλία. Η μορφολογία της ανάπτυξης του μυκηλίου στο σκεύασμα *Switch* ήταν διαφορετική από αυτή στα άλλα μυκητοκτόνα: Παρόλο που η ανάπτυξη σε διάμετρο ήταν πολύ μικρή, η αύξηση σε ύψος του μυκηλίου ήταν παρόμοια με αυτή στο τρυβλίο χωρίς μυκητοκτόνο. Αντίθετα, σε άλλα μυκητοκτόνα η ανάπτυξη του μυκηλίου ήταν σχεδόν επίπεδη. Αυτό το γεγονός πιθανότατα έχει να κάνει με τον τρόπο δράσης των δραστικών ουσιών του μυκητοκτόνου *Switch*.

4 Συζήτηση – Συμπεράσματα

4.1 Φυλογενετική ανάλυση απομονώσεων καμαροσπορίου φιστικιάς

4.1.1 Μελέτες του γένους *Botryosphaeria* – σύγκριση

Το γένος *Botryosphaeria* spp (Cesati and De Notaris, 1863). κατανέμεται σε μεγάλο εύρος γεωγραφικών πλατών: από την Αυστραλία μέχρι και Καλιφόρνια αλλά και πιο βόρεια για αρκετά είδη. Γενικά τα είδη έχουν σχετικά μικρή φυλογενετική απόσταση μεταξύ τους, με τα είδη *B. obtusa*, *B. stevensii* και *B. corticola* να διαφέρουν σε μεγαλύτερο βαθμό (Slippers et al., 2004), (Niekerk et al., 2004).



Εικόνα 63 Φυλογενετικό δέντρο με την μέθοδο *parsimony* από δεδομένα ITS & EF1-α ακολουθιών. Το δέντρο έχει ως ρίζα τους μύκητες *Cercospora beticola* and *Cercospora penzigii*. Στους κόμβους φαίνεται η πιθανότητα ύπαρξης των με 1000 επαναδειγματοληψίες τύπου bootstrap (Niekerk et al., 2004)

Τα αποτελέσματα της μελέτης συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με αυτά άλλων μελετών όπως αυτή των (Niekerk et al., 2004) (Εικόνα 63), οι οποίοι χρησιμοποίησαν τους πυρηνικούς τόπους ITS1, 5.8S, ITS2 και την περιοχή του γονιδίου, όπου οι απομονώσεις από τα είδη *Botryosphaeria dothidea* και *Fusicoccum vitifusiforme* (= *Neofusicoccum vitifusiforme*, (Phillips, 2010)) είναι σε δύο

ξεχωριστούς κλάδους οι οποίοι έχουν μικρή απόσταση ενώ ο κλάδος που περιέχει απομονώσεις είδους *Botryosphaeria obtusa* απέχει παραπάνω και συνδέεται «εξωτερικά» με τους κλάδους των ειδών *Botryosphaeria dothidea* και *Fusicoccum vitifusiforme*. Επίσης οι Slippers et al.(2005) που χρησιμοποίησαν τις ITS περιοχές και το γονίδιο της β-τουμπουλίνης βρήκαν ότι το είδος *Botryosphaeria obtusa* διαφέρει σε αρκετό βαθμό και βρίσκεται σε «εξωτερικό» κλάδο σε σχέση με το είδος *Botryosphaeria dothidea*. Ωστόσο θα πρέπει να εξεταστούν περισσότερες απομονώσεις καμαροσπορίου φιστικιάς και μάλιστα με μεθόδους που έχουν μεγαλύτερη ακρίβεια, όπως η AFLP.

4.2 Μελέτη παθογένειας απομονώσεων καμαροσπορίου φιστικιάς

Οι διαφορές στην παθογένεια δεν βρέθηκε να σχετίζονται με την περιοχή απομόνωσης ούτε με τον ξενιστή. Η μη συσχέτιση επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες όπως των Ma & Michailides (2002).

Από τα δεδομένα των μολύνσεων σε φύλλα και κλαδίσκους συμπεραίνουμε πως οι τεχνητές μολύνσεις σε φύλλα είναι πιο κατάλληλη μέθοδος για την μελέτη παθογένειας σε σχέση με τις μολύνσεις σε κλαδίσκους καθώς στην περίπτωση των κλαδίσκων η διακύμανση μεταξύ των επαναλήψεων ήταν μεγαλύτερη αυτή των φύλλων. Ωστόσο αυτή η διαφορά μπορεί εν μέρει να καλυφθεί με περισσότερες επαναλήψεις και χρήση κλαδίσκων παρόμοιας διαμέτρου. Τα φύλλα θα πρέπει να είναι αρκετά τρυφερά και όχι λίγο πριν την απόπτωση, καθώς τότε τα αποτελέσματα συχνά είναι παραπλανητικά και μη επαναλήψιμα. Για τον πιο πληρέστερο έλεγχο της παθογένειας καλό θα είναι να γίνουν πειράματα με περισσότερες απομονώσεις συνολικά και ανά ξενιστή καθώς και ψεκασμοί φύλλων με εναιώρημα κονιδίων ή και εναιώρημα μυκηλίου με την μέθοδο που δοκιμάστηκε στην μελέτη αυτή.

4.3 Μελέτη ανθεκτικότητας καμαροσπορίου φιστικιάς σε μυκητοκτόνα

Το EC₅₀ του σκευάσματος *Neotopsin* (thiophanate methyl) είναι παρόμοιο με αυτό άλλων μελετών, όπου κυμαίνεται μεταξύ 0.5-5ppm (Yourman & Jeffers, 1999). Ωστόσο δεν είναι δυνατόν να αποφανθούμε αν υπάρχει έστω κάποιου βαθμού ανθεκτικότητα καθώς οι διαφορές στο EC₅₀ μπορούν να οφείλονται στην απομόνωση σε βαθμό που η παραλλακτικότητα μεταξύ στελεχών να τις υπερκαλύπτει.

Στην περίπτωση του σκευάσματος *Stroby* (kresoxim methyl), για την ανάπτυξη του μυκηλίου το EC₅₀ (0.06-0.11 ppm) είναι παρόμοιο με αυτό άλλων μελετών (Jaspers, 2001). Μέχρι σήμερα στο μύκητα *Botryosphaeria dothidea* δεν έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα ωστόσο έχει αναφερθεί σε άλλους μύκητες όπως ο *Venturia inequalis* (Turechek & Köller, 2004) και ο *Saccharomyces cerevisiae* (Köller et al., 2001).

Το σκεύασμα *Quadris* περιέχει την δραστική ουσία *azoxystrobin* στην οποία ένα από τα στελέχη στο πείραμα είχε 10πλάσιο EC_{50} των άλλων στελεχών. Στο καμαροσπόριο της φιστικιάς έχει πρόσφατα αναφερθεί ανθεκτικότητα στο *azoxystrobin* σε πειράματα σε αγρό στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ (Morgan et al., 2009) και έτσι είναι πιθανόν να εμφανιστεί ανθεκτικότητα και σε άλλα στελέχη. Ωστόσο δεν έχει γίνει μοριακός έλεγχος για την επιβεβαίωση της ανθεκτικότητας, που συνήθως οφείλεται σε μεταλλαγή στο κυτόχρωμα b, επομένως δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για την ύπαρξη ανθεκτικότητας.

Το σκεύασμα *Signum* (boscalid + pyraclostrobin) έδειξε καλή παρεμπόδιση σε στις δοκιμές in vitro ([0.004 ppm boscalid + 0.001ppm pyraclostrobin]-[0.011ppm boscalid + 0.003ppm pyraclostrobin]) αλλά και στους ψεκασμούς σε αγρό. Σε πειράματα του Michailides (2011) το *Signum* είχε την καλύτερη απόδοση σε σχέση με άλλα μυκητοκτόνα με μόλις 1% προσβολή σε σχέση με 30% του μάρτυρα. Στο καμαροσπόριο της φιστικιάς ακόμη δεν έχει εμφανιστεί ανθεκτικότητα ωστόσο έχει εμφανιστεί σε άλλους μύκητες, όπως ο *Botrytis cinerea* (Kim & Xiao, 2010) όπου δεν υπήρχε διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ boscalid και pyraclostrobin.

Στο μυκητοκτόνο *Switch* (cyprodinil + fludioxonil) μέχρι τελευταία δεν έχουν εμφανιστεί ανθεκτικά στελέχη στο μύκητα *Botryosphaeria* sp. ωστόσο έχει εμφανιστεί σε άλλους μύκητες όπως ο *Botrytis cinerea* (Leroch et al., 2011) με τα ανθεκτικά στελέχη τα αυξάνουν το 2008 και 2009 .

Σε γενικές γραμμές τα αποτελέσματα του πειράματος συμφωνούν με αυτά του αγρού αλλά και άλλων πειραμάτων, όπου τα σκευάσματα *Signum* και *Quadris* είναι τα καλύτερα για τον έλεγχο του καμαροσπορίου της φιστικιάς (Michailides, 2011). Τέλος, για πιο πληρέστερο έλεγχο καταλληλότητας των μυκητοκτόνων θα πρέπει να γίνουν πειράματα με περισσότερες απομονώσεις από κάθε πειραματικό τεμάχιο που έχει γίνει επέμβαση με ένα μυκητοκτόνο καθώς και σε μεγαλύτερο βάθος χρόνου.

Βιβλιογραφία

- Adaskaveg, J., Gubler, D., Michailides, T. & Holtz, B., 2009. *EFFICACY AND TIMING OF FUNGICIDES, BACTERICIDES, AND BIOLOGICALS for DECIDUOUS TREE FRUIT, NUT, STRAWBERRY, AND VINE CROPS*. UC Davis, Dept. of Plant Pathology, UC Kearney Agricultural Center.
- Ahimera, N., Driever, G.F. & Michailides, T.J., 2003. Relationships Among Propagule Numbers of *Botryosphaeria dothidea*, Latent Infections, and Severity of Panicle and Shoot Blight in Pistachio Orchards. *Plant Disease*, 87(7), pp.846-53.
- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *Automatic Control, IEEE Transactions on*, 19(6), pp.716-23.
- Alberts, B. et al., 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Science.
- Altschul, S.F. et al., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal Of Molecular Biology*, 215, pp.403-10.
- Avise, J.C., 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 2nd ed. Sinauer Associates.
- Baldrige, G.D., Dalton, M.W. & Fallon, A.M., 1992. Is higher-order structure conserved in eukaryotic ribosomal DNA intergenic spacers? *Journal of Molecular Evolution*, 35(6), pp.514-23.
- Barr, M.E., 1987. *Prodromus to Class Loculoascomycetes*. Lubrecht & Cramer Ltd.
- Benson, D.A. et al., 2008. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 36, pp.25-30.
- Bos, D.H. & Posada, D., 2005. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. *Developmental & Comparative Immunology*, 29, pp.211-27.
- Bull, J. et al., 1993. Partitioning and Combining Data in Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*, 42(3), pp.384-97.
- Campbell, C.L. & Madden, L.V., 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. New York: Wiley.
- Capó, Y.A. et al., 2003. Early evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of *Mycosphaerella fijiensis*. In Lacombe, L. et al., eds. *Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook*. San Jose, Costa Rica, 2003.
- Caputo, P., 1997. Dna and phylogeny in plants - history and new perspectives. *Lagascalia*, 19(1-2), pp.331-44.
- Cavalli-Sforza, L. & Edwards, A., 1967. Phylogenetic analysis- models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, 19(3), pp.233-56.
- Chen, W.-Q., Morgan, D.P., Felts, D. & Michailides, T.J., 2003. Antagonism of *Paenibacillus lentimorbus* to *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*, 87, pp.359-65.
- Ciardo, D.E. et al., 2006. Internal Transcribed Spacer Sequencing versus Biochemical Profiling for Identification of Medically Important Yeasts. *Journal Of Clinical Microbiology*, 44(1), pp.77-84.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Condeelis, J. & Singer, R.H., 2005. How and why does β -actin mRNA target? *Biology of the Cell*, 97, pp.97-110.
- Crous, P.W. et al., 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *STUDIES IN MYCOLOGY*, 55, pp.235-53.
- Davis, J.I. & Nixon, K.C., 1992. Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology*, 41(4), pp.421-35.
- Denman, S. et al., 2003. Circumscription of Botryosphaeria species associated with Proteaceae based on morphology and DNA sequence data. *Mycologia*, 95(2), p.294–307.
- Denman, S. et al., 2000. An overview of the taxonomic history of Botryosphaeria, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, 45, pp.129-40.
- Eckert, K.A. & A.Kunkel, T., 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus*. *Nucleic Acids Research*, 18(13), pp.3739-44.
- Felsenstein, J., 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology*, 27, pp.401-10.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences- A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17, pp.368-76.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies- An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), pp.783-191.
- FOOTPRINT Project, 2011. *THE PPDB A to Z List of Pesticide Active Ingredients*. [Online] Available at: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/> [Accessed 20 Φεβρουαρίου 2011].
- Forsdyke, D.R., 1998. An Alternative Way of Thinking about Stem loops in DNA. A Case Study of the Human G0S2 Gene. *Journal of Theoretical Biology*, 192, pp.489-504.
- Forsdyke, D.R. & Mortimer, J.R., 2000. Chargaff's legacy. *Gene*, 261, pp.127-37.
- Freeman & Herron, 2003. *Evolutionary Analysis*. 3rd ed. Benjamin Cummings.
- Gogarten, J.P., Hilario, E. & Olendzenski, L., 1996. Gene duplications and horizontal gene transfer during early evolution. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 26(3-5), pp.284-85.
- Goldman, N., 1993. Statistical tests of models of DNA substitution. *Journal of Molecular Evolution*, 36, pp.182-98.
- Goldstein, L.S., Fyrberg, E.A., Wilson, L. & Matsudaira, P.T., 1994. *Drosophila melanogaster*, Practice and Uses in Cell and Molecular Biology. *Methods in Cell Biology*, 44.
- Graur, D. & Li, W.-H., 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc.
- Guarro, J., Gene, J. & Stchigel, A.M., 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 12(3), pp.454-500.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Guindon, S. & Gascuel, O., 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), pp.696-704.
- Hasegawa, M. & Kishino, H., 1994. Accuracies of the simple method for estimating the bootstrap probability of a maximum-likelihood tree. *Molecular Biology and Evolution*, 11, p.142-145.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T.-a., 1985. Dating of the Human-Ape Splitting by a Molecular Clock of Mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22, pp.160-74.
- Hashimoto, T. & Hasegawa, M., 1996. Origin and early evolution of eukaryotes inferred from the amino acid sequences of translation elongation factors 1 α -Tu and 2-. *Advances in Biophysics*, 32, pp.73-120.
- Hastings, W.K., 1970. Monte Carlo samplings methods using Markov chains and their applications. *Biometrika*, 57(1), pp.97-109.
- Hendy, M.D. & Penny, D., 1989. A framework for the quantitative study of evolutionary trees. *Systematic Zoology*, 38(4), pp.297-309.
- Hillis, D.M., 1987. Molecular Versus Morphological Approaches to Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, pp.23-42.
- Hillis, D.M. & Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA- Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66(4), pp.411-53.
- Hohl, M. & Ragan, M.A., 2007. Is multiple-sequence alignment required for accurate inference of phylogeny? *Systematic Biology*, 56(2), pp.206-21.
- Holtz, B., Michailides, T. & Hoffman, E., 2001. *Survivability of Botryosphaeria dothidea pycnidia and pycnidiospores in prunings and nuts*. Annual Report 2000-01. Fresno, CA: California Pistachio Industry.
- Huelsenbeck, J.P. & Bull, J., 1996. A LIKELIHOOD RATIO TEST TO DETECT CONFLICTING PHYLOGENETIC SIGNAL. *Systematic Biology*, 45(1), pp.92-98.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., Nielsen, R. & Bollback, J.P., 2001. Bayesian Inference of Phylogeny and its impact in Evolutionary Biology. *Science*, 294, pp.2310-14.
- Hwang, U.-W. & Kim, W., 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology*, 37(4), pp.215-28.
- Iori, I. et al., 2006. Incidence of thiophanate-methyl resistance in *Cercospora kikuchii* within a single lineage based on amplified fragment length polymorphisms in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 72(2), pp.77-84.
- Jacobs, K. & Rehner, S., 1998. Comparison of Cultural and Morphological Characters and ITS Sequences in Anamorphs of *Botryosphaeria* and Related Taxa. *Mycologia*, 90(4), pp.601-610.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Jaspers, M.V., 2001. Effect of fungicides, in vitro, on germination and growth of *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, (40), pp.453-58.
- Jermiin, L.S., Olsen, G.J., Mengersen, K.L. & Easteal, S., 1997. Majority-Rule Consensus of Phylogenetic Trees Obtained by Maximum-Likelihood Analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 14(12), pp.1296-302.
- Jukes, T. & Cantor, C., 1990. Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*, pp.21-132.
- Kae, H., 2003. *Genome Projects: Uncovering the Blueprints of Biology*. [Online] Available at: <http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/08/sequencing2.gif> [Accessed 10 Ιανουαρίου 2011].
- Kawchuk, L., Holley, J., Lynch, D. & Clear, R., 1994. Resistance to thiabendazole and thiophanate-methyl in canadian isolates of *Fusarium sambucinum* and *Helminthosporium solani*. *American Journal of Potato Research*, 71(3), pp.185-92.
- Keeling, P.J. & Doolittle, W.F., 1996. Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Molecular Biology and Evolution*, 13(10), pp.1297-305.
- Kidd, K.K. & Sgaramella-Zonta, L.A., 1971. Phylogenetic Analysis- Concepts and Methods. *American Journal of Human Genetics*, 23(3), pp.235-52.
- Kimura, M., 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, pp.111-20.
- Kim, Y.K. & Xiao, C.L., 2010. Resistance to Pyraclostrobin and Boscalid in Populations of *Botrytis cinerea* from Stored Apples in Washington State. *Plant Disease*, 94(5), pp.604-12.
- Klenk, H.-P. et al., 1995. Location of protist lineages in a phylogenetic tree inferred from sequences of DNA-dependant RNA polymerases. *International Society for Evolutionary Protistology*, 145, pp.221-30.
- Kluge, A.G. & Wolf, A.J., 1993. Cladistics- What's in a word. *Cladistics*, 9, pp.183-99.
- Köller, W., Avila-Adame, C., Olaya, G. & Zheng, D., 2001. Resistance to Strobilurin Fungicides. In *Agrochemical Resistance*. ACS Symposium Series. pp.215-29.
- Kretschmer, M. et al., 2009. Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. *PLOS pathogens*, 5(12), pp.1-13.
- Lanave, C., Preparata, G., Sacone, C. & Serio, G., 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of Molecular Evolution*, 20(1), pp.86-93.
- Larkin, M. et al., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE*, 23(21), pp.2947-48.
- Lee, S. & Taylor, J., 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, pp.282-87.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Leroch, M., Kretschmer, M. & Hain, M., 2011. Fungicide Resistance Phenotypes of *Botrytis cinerea* Isolates from Commercial Vineyards in South West Germany. *Journal of Phytopathology*, 159, pp.63-65.
- Lin, Y.-M., Fang, S.-C. & Thorne, J.L., 2007. A tabu search algorithm for maximum parsimony phylogeny inference. *European Journal of Operational Research*, 176, pp.1908-17.
- Lockhart, P.J., Steel, M.A., Hendy, M.D. & Penny, D., 1994. Recovering Evolutionary Trees under a More Realistic Model of Sequence Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 11(4), pp.605-12.
- Maddison, D.R., 1991. The Discovery and Importance of Multiple Islands of Most-Parsimonious Trees. *Systematic Zoology*, 40(3), pp.315-28.
- Ma, Z., Felts, D. & Michailides, T.J., 2003. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77(2), pp.66-74.
- Mallery, C., 2008. *Pcr cycles*. [Online] Available at: <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg> [Accessed 15 Δεκεμβρίου 2010].
- Ma, Z., Luo, Y. & Michailides, T.J., 2004. Spatiotemporal changes in the population structure of *Botryosphaeria dothidea* from California pistachio orchards. *Phytopathology*, 94, pp.326-32.
- Ma, Z. & Michailides, T.J., 2002. Characterization of *Botryosphaeria dothidea* Isolates Collected from Pistachio and Other Plant Hosts in California. *Phytopathology*, 92(5), pp.519-26.
- Ma, Z., Morgan, D.P., Felts, D. & Michailides, T.J., 2002. Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* from California pistachio to tebuconazole. *Crop Protection*, 21, pp.829-35.
- Ma, Z., Morgan, D.P. & Michailides, T.J., 2001. Effects of Water Stress on *Botryosphaeria* Blight of Pistachio Caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*, 85, pp.745-49.
- Martin, W., Brinkmann, H., Savonna, C. & Cerff, R., 1993. Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes- eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Evolution*, 90, pp.8692-96.
- Ma, B. & Uddin, W., 2009. Fitness and competitive ability of an azoxystrobin-resistant G143A mutant of *Magnaporthe oryzae* from perennial ryegrass. *Plant Disease*, 93(10), pp.1044-49.
- Metropolis, N. et al., 1953. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *The Journal of Chemical Physics*, 21(6), pp.1087-92.
- Michailides, D.T., 2011. Challenges in Management of *Alternaria* and *Botryosphaeria*. In 2011 ANNUAL PISTACHIO DAY. Visalia, 2011.
- Michailides, T.J. & Brown, P., 2002. *Relationship between Fertilization and Pistachio Diseases*. [Online] Available at: www.cdfa.ca.gov/is/docs/Michailides99-fr.pdf [Accessed 5 Δεκεμβρίου 2010].
- Michailides, T.J., Ma, Z., Boehm, E.W. & Luo, Y., 2000. *Detection of population structure of Botryosphaeria dothidea and selection of resistant pistachio cultivars against Botryosphaeria blight*. Annual Report. Fresno, CA: California Pistachio Industry.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Michailides, T.J. & Morgan, D.P., 1993. Spore release by *Botryosphaeria Dothidea* in pistachio orchards and disease control by altering the trajectory angle of sprinklers. *Phytopathology*, 83(2), pp.145-52.
- Michailides, T.J. & Morgan, D.P., 2004. *Panicle and Shoot Blight of Pistachio: A Major Threat to the California Pistachio Industry*. [Online] The American Phytopathological Society Available at: <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Pistachio.aspx> [Accessed 10 Ιανουαρίου 2011].
- Michailides, T.J., Morgan, D.P. & Felts, D., 1998. SPREAD OF BOTRYOSPHAERIA DOTHIDEA IN CENTRAL CALIFORNIA PISTACHIO ORCHARDS. In *II International Symposium on Pistachios and Almonds*, 1998. ISHS Acta Horticulturae 470.
- Michailides, T.J., Morgan, D.P., Felts, D. & Chitzanidis, A., 1998. *Disease monitoring and prediction of Botryosphaeria blight in California pistachio orchards*. Annual Report, Crop Year 1997-98. Fresno, CA: California Pistachio Industry.
- Miguez, M., Reeve, C., Wood, P.M. & Hollomon, D.W., 2004. Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QOI fungicides. *Pest Management Science*, 60(1), pp.3-7.
- Morgan, D., Reyes, H., Puckett, R. & Michailides, T., 2009. *Susceptibility of Pistachio Cultivars to Botryosphaeria & Botrytis Blights, Disease Control, and Studies on the Lower Limb Dieback of Pistachio*. [Online] Available at: fruitsandnuts.ucdavis.edu/files/75351.pdf [Accessed 16 Μαρτίου 2010].
- Moritz, C. & Hillis, D.M., 1996. Molecular Systematics -Context and Controversies. In *Molecular Systematics*. Sinauer Associates.
- Morris, S.C., 2003. *Life's Solution- Inevitable Humans in a Lonely Universe Share*. Cambridge University Press.
- Mount, D.W., 2007. Using the Basic Local Alignment Search Tool. *Cold Spring Harbor Protocols*.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S. & Saiki, R., 1992. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *BIOTECHNOLOGY SERIES*, (24), p.17.
- Mycobank.org, 2006. *Camarosporium mamananes Crous 2006*. [Online] Available at: <http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=501006> [Accessed 12 Δεκεμβρίου 2010].
- Niekerk, J.M.v., Crous, P.W., Fourie, P.H. & Halleen, F., 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*, 96(4), p.781-798.
- NIGMS, 2011. *National Institute of General Medical Sciences*. [Online] Available at: <http://www.nigms.nih.gov/Initiatives/Models/> [Accessed 10 Μαρτίου 2011].
- Ntahimpera, N. et al., 2002. *Biology, epidemiology, monitoring, and control of Botryosphaeria panicle and shoot blight on pistachio*. Annual Pistachio Research Report. California Pistachio Commission.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- O'Connor, T. et al., 2010. Analysis of Long Branch Extraction. *BMC Genomics*, 11(2), pp.2-14.
- Ogden, T.H. & Rosenberg, M.S., 2006. Multiple Sequence Alignment Accuracy and Phylogenetic Inference. *Systematic Biology*, 55(2), pp.314-28.
- Page, R.D.M. & Holmes, E.C., 1998. *Molecular Evolution A Phylogenetic Approach*. Blackwell Publishing Ltd.
- Penny, D., 1982. Towards a basis for classification- the incompleteness of distance measures, incompatibility analysis and phenetic classification. *Journal of Theoretical Biology*, 96, pp.129-42.
- Penny, D., Hendy, M.D. & Steel, M.A., 1992. Progress with methods for constructing evolutionary trees. *Tree*, 7(3), pp.73-78.
- Petersen, D., 2007. *United States Plant Patent - PISTACHIO PLANT CALLED 'PETE I'*. [United States Plant Patent] Available at: <http://www.freepatentsonline.com/PP17836.pdf> [Accessed 2 Ιανουαρίου 2011].
- Phillips, A.J.L., 2010. *The Botryosphaeria Site*. [Online] Available at: http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/index.htm [Accessed 20 Δεκεμβρίου 2010].
- Posada, D., 2008. jModelTest- Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), pp.1253-56.
- Posada, D. & Crandall, K.A., 2001. Selecting the Best-Fit Model of Nucleotide Substitution. *Systematic Biology*, 50(4), pp.580-601.
- Reed, D.H. & Frankham, R., 2001. How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution*, 55(6), pp.1095-103.
- Rodriguez, F., Oliver, J., Marin, A. & Medina, J., 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*, 142, pp.485-501.
- Roger, A.J., Sandblom, O., Doolittle, W.F. & Philippe, H., 1999. An Evaluation of Elongation Factor 1a as a Phylogenetic Marker for eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 16(2), p.218-233.
- Rzhetsky, A. & Nei, M., 1993. Theoretical Foundation of the Minimum-Evolution Method of Phylogenetic Inference. *Molecular and Biology Evolution*, 10(5), pp.1073-95.
- Saitou, N. & Nei, M., 1987. The Neighbor-Joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), pp.406-25.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry*, 74(12), pp.5463-67.
- Sattath, S. & Tversky, A., 1977. Additive similarity trees. *Psychometrika*, 42(3), pp.319-45.
- Schwarz, G., 1978. Estimating the Dimension of a Model. *The Annals of Statistics*, 6(2), pp.461-64.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Shah, M., Verma, K., Singh, K. & Kaur, R., 2010. Morphological, pathological and molecular variability in *Botryodiplodia theobromae* (Botryosphaeriaceae) isolates associated with die-back and bark canker of pear trees in Punjab, India. *Genetics and Molecular Research*, 9(2), pp.1217-28.
- Shoemaker, R., 1964. Conidial states of some Botryosphaeria species on Vitis and Quercus. *Canadian Journal of Botany*, 42, p.1297–1301.
- Simon, D. & Larget, B., 2001. *Bayesian analysis in molecular biology and evolution (BAMBE)*, version 2.03 beta. Department of Mathematics and Computer Science, Duquesne University.
- Simossis, V.A. & Heringa, J., 2005. PRALINE- a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucleic Acids Research*, 33, pp.289-94.
- Slippers, B. et al., 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as Botryosphaeria dothidea. *Mycologia*, 96(1), p.83–101.
- Slippers, B. et al., 2004. Multiple gene sequences delimit Botryosphaeria australis sp. nov. *Mycologia*, 96(5), pp.1030-41.
- Slippers, B. et al., 2005. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the Botryosphaeria species causing diseases of Magnifera indica. *Mycologia*, 97(1), pp.99-110.
- Smith, D.R., J.Michailides, T. & Stanosz, G.R., 2001. Differentiation of a Fusicoccum sp. Causing Panicle and Shoot Blight on California Pistachio Trees from Botryosphaeria dothidea. *Plant Disease*, 85(12), pp.1235-40.
- Sneath & Sokal, 1973. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean. In *Numerical Taxonomy*. San Francisco: W.H. Freeman and Company. p.W.H. Freeman and Company.
- Swofford, D., Olsen, G., Waddell, P. & Hillis, D., 1996. Phylogenetic inference. In *Molecular systematics*. 2nd ed. Sinauer and Associates. pp.407-514.
- Tamura, K., 1992. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions When There Are Strong Transition-Transversion and G+C-Content Biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4), pp.678-87.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, pp.1596-99.
- Tamura, K. & Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), pp.512-26.
- Tamura, K. et al., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Likelihood, Distance, and Parsimony methods *Molecular Biology and Evolution*. *Molecular Biology and Evolution (to be submitted)*.
- Tamura, K. et al., 2011. Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. *Molecular Biology and Evolution (submitted)*.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Tateno, Y., Takezaki, N. & Nei, M., 1994. Relative efficiencies of the maximum-likelihood, neighbor-joining, and maximum parsimony methods when substitution rate varies with site. *Molecular Biology and Evolution*, 11(2), pp.261-77.
- Tavare, S., 1986. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. *Lectures of Mathematics in the Life Sciences*, 17, pp.57-83.
- Taylor, R.J., Pasche, J.S. & Gudmestad, N.C., 2006. Biological Significance of Mefenoxam Resistance in *Phytophthora erythroseptica* and Its Implications for the Management of Pink Rot of Potato. *Plant Disease*, 90, pp.927-34.
- Tendulkar, S.R., Gupta, A. & Chattoo, B.B., 2003. A simple protocol for isolation of fungal DNA. *Biotechnology Letters*, 25(22), pp.1941-44.
- Thompson, D.J., Desmond, G.H. & Toby, J.G., 1994. CLUSTAL W- improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), pp.4673-80.
- Turechek, W.W. & Köller, W., 2004. *Managing Resistance of Venturia inaequalis to the Strobilurin Fungicides*. [Online] Available at: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2004/strobilurin/> [Accessed 16 Ιανουαρίου 2011].
- Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Voegel, T.M. & Gubler, W.D., 2006. Identification and Distribution of *Botryosphaeria* spp Associated with Grapevine Cankers in California. *Plant Disease*, 90(12), pp.1490-503.
- Väli, Ü., Brandström, M., Johansson, M. & Ellegren, H., 2008. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genetics*, 9(8).
- Vierstraete, A., 1999. *Principle of the PCR*. [Online] Available at: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> [Accessed 23 Ιανουαρίου 2010].
- Xia, X. & Xie, Z., 2001. DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Journal of Heredity*, 92(4), pp.371-74.
- Xia, X. et al., 2003. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26, pp.1-7.
- Xiong, J., 2006. *Essential Bioinformatics*. 1st ed. Cambridge University Press.
- Yang, Z., 1996. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Tree*, 9, pp.367-71.
- Young, J.R., Tomaso-Peterson, M., Cerda, K.d.I. & Wong, F.P., 2010. Two Mutations in β -Tubulin 2 Gene Associated with Thiophanate-Methyl Resistance in *Colletotrichum cereale* Isolates from Creeping Bentgrass in Mississippi and Alabama. *Plant Disease*, 94(207-212).
- Young, J.R., Tomaso-Peterson, M., Tredway, L.P. & Cerda, K.d.I., 2010. Occurrence and Molecular Identification of Azoxystrobin-Resistant *Colletotrichum cereale*. *Plant Disease*, 94(6), pp.751-57.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Yourman, L. & Jeffers, S., 1999. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 83(6), pp.569-75.
- Zhang, X., Chen, Y., Zhang, Y.-j. & Zhou, M.-g., 2007. Occurrence and molecular characterization of azoxystrobin resistance in cucumber downy mildew. *Phytoparasitica*, 36(2), pp.136-42.
- Zhang, Z., Zhu, Z., Ma, Z. & Li, H., 2009. A molecular mechanism of azoxystrobin resistance in *Penicillium digitatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2-3), pp.157-61.
- Zhu, H. et al., 1999. Molecular breeding for grain yield in barley an evaluation of QTL effects in a spring barley cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(5), pp.772-79.
- Ζάχος, Δ., Τζαβέλλα-Κλωνάρη, Κ. & Ρούμπος, Ι., 1974-1977. Μια ασθένεια της πιστακίας (*Pistacia vera* L.) οφειλόμενη εις τον μύκητα *Camarosporium pistaciae* N. sp. *Χρονικά Μπεννακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου(Ν.Σ.)*, 11, pp.57-63.
- Ζιώγας, Β.Ν. & Μάρκογλου, Α.Ν., 2007. *Γεωργική Φαρμακολογία*. 1st ed. Αθήνα.
- Μαρκουλάτος, Π. & Β, Σ., 1996. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) στην διάγνωση των ιώσεων. *Ελληνική Ιολογία*, 1(1), pp.83-88.

