

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ



Διερεύνηση του κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικότητας στους
παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών (SBI's) και της
επίδρασης στην παραγωγή μυκοτοξινών στο μύκητα *Fusarium
graminearum* Schwabe.

Καλαμπόκης Ιωάννης
Μεταπτυχιακή μελέτη

Αθήνα 2012

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διερεύνηση του κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικότητας στους
παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών (SBI's) και της
επίδρασης στην παραγωγή μυκοτοξινών στο μύκητα *Fusarium*
graminearum Schwabe.

Καλαμπόκης Ιωάννης
Μεταπτυχιακή μελέτη υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Μαρκόγλου
Αναστάσιου.

Αθήνα 2012

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπων: Α. Μαρκόγλου Καθηγητής εργαστηρίου Γεωργικής
φαρμακολογίας Γ.Π.Α.

Μέλος: Μαρία Χρυσάγη Καθηγήτρια και Διευθύντρια εργαστηρίου
Γεωργικής φαρμακολογίας Γ.Π.Α.

Μέλος: Δημήτριος Ι. Τσιτσιγιάννης Λέκτορας εργαστηρίου
Φυτοπαθολογίας Γ.Π.Α.

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Α. Μαρκόγλου τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την δυνατότητα που μου προσέφερε, να εκπονήσω την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, καθώς και για την πολύτιμη αρωγή και καθοδήγηση που μου προσέφερε, δίχως την οποία θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωσή της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τα μέλη της τριμελούς εξετατικής επιτροπής και συγκεκριμένα την Καθηγήτρια και διευθύντρια του εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας κ Μ. Χρυσάγη και τον Λέκτορα του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας κ. Δ. Τσιτσιγιάννη, για τις συμβουλές και παρατηρήσεις που μου παρείχαν τόσο κατά τα στάδια της εκπόνησης, όσο και της απόδοσης του τελικού κειμένου της παρούσης μεταπτυχιακής μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Διδάκτορα κ. Ε. Δούκα για τις πολύτιμες συμβουλές του στο θέμα των μυκοτοξινών καθώς και στην αμέριστη και πολύτιμη προσωπική βοήθειά του κατά τα στάδια της ανάλυσής τους, βοήθεια η οποία τελικά ήταν καθοριστική.

Σημαντική παράλειψη θα ήταν να μην μνημονεύσω και τον Διδάκτορα και μέλος ΕΤΕΠ του εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας κ. Α. Μαλανδράκη για την πολύτιμη προσωπική βοήθεια που μου παρείχε τόσο στο πειραματικό κομμάτι της παρούσας μελέτης, όσο και κατά τη συγγραφή της.

Φυσικά ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας, προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές για την κατανόηση και ανοχή που επέδειξαν, αποδίδοντας τελικώς άριστη συνεργασία και κυρίως φιλική συμπαράσταση, δίχως την οποία η παρούσα μελέτη δε θα μπορούσε να είχε ολοκληρωθεί.

Σας ευχαριστώ όλους θερμά για τη συμπαράσταση και κυρίως την υπομονή που επιδείξατε σε αυτά τα δύο σχεδόν χρόνια

Περίληψη

Οι τριχοθηκίνες και η ζεαραλενόνη αποτελούν δύο σημαντικές ομάδες τοξικών δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται κυρίως από είδη του γένους *Fusarium* στα σιτηρά. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ιδιαίτερη ανησυχία σε παγκόσμιο επίπεδο για αρκετές από τις τοξίνες αυτές (T-2, HT-2, διακετοξυσκιρπενόλη-DAS, δεοξυνιβαλενόλη-DON, νιβαλενόλη-NIV, ζεαραλενόνη-ZEA), γεγονός που έχει οδηγήσει την ΕΕ στη θέσπιση σειράς κανονισμών για τον καθορισμό μέτρων ελέγχου και μέγιστων επιτρεπτών ορίων στα σιτηρά και τα υποπροϊόντα τους.

Η αντιμετώπιση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων στον αγρό (προσυλλεκτικά) με την εφαρμογή κατάλληλων προγραμμάτων φυτοπροστασίας φαίνεται να είναι η πιο αξιόπιστη και αποτελεσματική στρατηγική διαχείρισης των μυκοτοξινών. Εντούτοις, ελάχιστα είναι μέχρι σήμερα γνωστά για την αποτελεσματικότητα μυκητοκτόνων στην αντιμετώπιση μυκοτοξικογόνων ειδών του γένους *Fusarium*, ενώ δεν υπάρχουν επαρκή ερευνητικά δεδομένα για τον κίνδυνο εμφάνισης και επικράτησης στελεχών των μυκοτοξικογόνων μυκήτων ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα μυκητοκτόνων από διάφορες χημικές ομάδες στην αντιμετώπιση του μύκητα *F. graminearum*, καθώς και ο κίνδυνος ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα της ομάδας των παρεμποδιστών της απομεθυλίωσης του C-14 (DMIs), που χρησιμοποιούνται ευρέως στη φυτοπροστασία για την αντιμετώπιση σημαντικών ασθενειών των σιτηρών.

Στελέχη του μύκητα *Fusarium graminearum* (τ.μ. *Giberella zae*) ανθεκτικά στους DMIs απομονώθηκαν σε υψηλή συχνότητα (3×10^{-5}), μετά από μεταλλαξιγένεση με UV ακτινοβολία και επιλογή σε υλικό που περιείχε prochloraz. Πειράματα διασταυρωτής ανθεκτικότητας με άλλα μυκητοκτόνα έδειξαν ότι οι μεταλλαγές για ανθεκτικότητα στο prochloraz μειώνουν την ευαισθησία των μεταλλαγμένων στελεχών και σε άλλους παρεμποδιστές της απομεθυλίωσης του C-14 (DMIs), όπως το τριαζολικό flusilazole, όχι όμως σε μυκητοκτόνα που δρουν σε άλλες βαθμίδες της βιοσυνθετικής οδού των στερολών (μορφολινικά και υδροξυανιλίδια) ή σε άλλες λειτουργίες του κυτταρικού μεταβολισμού, εξαιρουμένου ενός στελεχούς, ανθεκτικού και στα υδροξυανιλίδια (fenhexamid).

Μελέτη της φυτοπαθογόνου προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών στο prochloraz στελεχών του μύκητα *F. graminearum* έδειξε ότι οι μεταλλαγές για ανθεκτικότητα στους DMIs είναι κατά κανόνα πλειοτροπικές και επηρεάζουν την ικανότητα παραγωγής και βλάστησης των κονιδίων, ενώ φαίνεται να μην επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τη μυκηλιακή αύξηση στα περισσότερα μεταλλαγμένα στελέχη που μελετήθηκαν. Μελέτη της μυκοτοξικογόνου ικανότητας των στελεχών σε σπόρους καλαμποκιού με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) έδειξε κατά κανόνα αρνητική συσχέτιση της παραγωγής ζεαραλενόνης, ενώ στην παρούσα μελέτη δεν κατέστη δυνατή η ανάλυση της δεοξυνιβαλενόλης. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φανερώνουν σημαντικό κίνδυνο εμφάνισης και επικράτησης μυκοτοξικογόνων στελεχών του μύκητα *F. graminearum* στα σιτηρά με σημαντικά μειωμένη ευαισθησία στα τριαζολικά και ιμιδαζολικά μυκητοκτόνα.

Abstract

Fusarium graminearum (teleomorph *Giberella zeae*), the causal agent of fusarium head blight (also known as wheat scab), can cause substantial losses in yield and grain quality, particularly through mycotoxin contamination. The most frequent mycotoxins produced by *F. graminearum* in cereals are the trichothecenes deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxyscirpenol (DAS), T-2 and HT-2 toxins, and the mycotoxin zearalenone (ZEA), which can cause severe toxicities in humans and livestock.

The prevention of mycotoxin contamination of cereals is one of the top priorities in human and animal safety. While several pre- or post-harvest techniques have been evaluated for the control of mycotoxigenic fungal species, chemical control seems to be the main measure to reduce the incidence of mycotoxin contamination in most crops.

The main objectives of the present study were to evaluate the effectiveness of sterol biosynthesis inhibiting fungicides on growth and mycotoxins production of *F. graminearum*, and further to assess the impact of resistance to sterol biosynthesis inhibitors on the fungal mycotoxigenic ability and ecological fitness characteristics.

Laboratory mutant strains of *Fusarium graminearum* resistant to prochloraz were isolated at a high mutation frequency (3×10^{-5}) after UV-mutagenesis and selection on fungicide-amended medium. Cross resistance studies with other fungicides showed that the mutation(s) for resistance to prochloraz also reduced the sensitivity of mutant strains to other C-14 demethylase inhibiting fungicides (DMIs), such as the triazole flusilazole but not to fungicides affecting other steps of the sterol biosynthesis (e.g. morpholines and hydroxyanilidines) or other cellular pathways, with the exception of one mutant strain resistant to hydroxyanilidines (fenhexamid).

Study of fitness determining parameters showed that the mutation(s) for resistance to prochloraz affects sporulation, conidial germination and may or may not affect the mycelial growth rate.

Analysis of mycotoxins production by the wild-type and mutant strains of *F. graminearum* showed that the resistance to DMIs may or may not affect the mycotoxigenic ability of resistant strains.

The data of the present study indicate, for the first time, the potential risk of increased mycotoxins contamination of cereals after intensive use of DMI fungicides.

Ευχαριστίες	4
Περίληψη.....	5
Abstract	7
A. Εισαγωγή.....	11
A.1. Η ανθεκτικότητα	11
A.1.1 Γενικά	11
A.1.2. Εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών	14
A.1.3. Γενετικός έλεγχος της ανθεκτικότητας.....	21
A.1.4 Διασταυρωτή ανθεκτικότητα (cross-resistance).....	22
A.1.5. Βιοχημικοί μηχανισμοί ανάπτυξης ανθεκτικότητας	23
A.1.6 Εμφάνιση ανθεκτικότητας στον αγρό.....	25
A.1.7 Κατάταξη των μυκητοκτόνων, αναλόγως του κινδύνου απώλειας της αποτελεσματικότητά τους.	27
A.1.8. Αντιμετώπιση του προβλήματος της ανθεκτικότητας	30
A.2 Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών.....	32
A.2.1 Η εργοστερόλη.....	32
A.2.1.1 Σημασία της εργοστερόλης	32
A.2.1.2 Βιοσύνθεση της εργοστερόλης.....	33
A.2.2. Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών	36
A.2.2.1. Γενικά.....	36
A.2.2.2. Δράση των SBI's	37
A.2.3. Παρεμποδιστές απομεθυλίωσης C-14 (DMI's).....	39
A.2.4. Η Ανθεκτικότητα στους DMI's.....	40
A.3. Οι μυκοτοξίνες	45
A.3.1. Οι τριχοθικίνες	48
A.3.1.1 Τοξικότητα των τριχοθικινών	50
A.3.1.2 Βιοσύνθεση των τριχοθικινών	52
A.3.1.3 Σημασία των τριχοθικινών.....	54

A.3.1.4 Η δεοξυβαλενόλη (DON)	58
A.3.1.4.1 Γενικές πληροφορίες	58
A.3.1.4.2. Τοξικότητα Δεοξυνιβαλενόνης	59
A.3.2. Η ζεαραλενόνη (ZEA).....	61
A.3.2.1. Γενικές πληροφορίες - χημική δομή	61
A.3.2.2. Τοξικότητα της ζεαραλενόνης	62
A.3.2.3 Βιοσύνθεση της Ζεαραλενόνης	64
A.3.3 Μέθοδοι προσδιορισμού Δεοξυνιβαλενόνης και Ζεαραλενόνης	65
A.3.3.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας	65
A.3.3.2 Ενόργανες μέθοδοι.....	66
B. Σκοπός της μελέτης	68
Γ. Υλικά και μέθοδοι.....	69
Γ.1 Βιολογικό υλικό	69
Γ.1.1. Ταξινόμηση	69
Γ.1.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	70
Γ.1.3. Η ασθένεια Φουζαρίωση των κεφαλών των σιτηρών	72
Γ.1.3.1 Παθογόνο αίτιο	72
Γ.1.3.2 Επιδημιολογία	73
Γ.1.3.3. Συμπτωματολογία	74
Γ.1.3.4. Αντιμετώπιση.....	75
Γ.2. Υλικά ανάπτυξης	78
Γ.3. In vitro ευαισθησία του <i>Fusarium graminearum</i> σε διάφορες δραστικές ουσίες.....	79
Γ.4 Δραστική ουσία.....	81
Γ.5. Επιλογή ανθεκτικών στο prochloraz στελεχών	82
Γ.6 Προσδιορισμός επιπέδου ανθεκτικότητας της στο prochloraz στο άγριο και τα ανθεκτικά στελέχη.....	83
Δ.7 Αξιολόγηση του κινδύνου ανάπτυξης διασταυρωτής ανθεκτικότητας	83

Γ.8 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στην προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών	84
Γ.8.1 Μέτρηση του ρυθμού αύξησης (growth rate)	84
Γ.8.2. Μέτρηση της παραγωγής και βλάστησης των κονιδίων	84
Γ.9 Προσδιορισμός μυκοτοξινών.....	85
Δ. Αποτελέσματα	86
Δ.1 In vitro ευαισθησία του <i>Fusarium graminearum</i> σε διάφορες δραστικές ουσίες.	86
Δ.2 Επιλογή ανθεκτικών στο prochloraz στελεχών	88
Δ.3 Επίπεδο ανθεκτικότητας στο prochloraz των ανθεκτικών στελεχών.	89
Δ.4 Αξιολόγηση του κινδύνου ανάπτυξης διασταυρωτής ανθεκτικότητας	91
Δ.4.1 Flusilazole	91
Δ.4.2 Fenhexamid	93
Δ.4.3 Carbendazim	95
Δ.4.4 Fludioxonil	97
Δ.4.5 Σύνοψη αποτελεσμάτων διασταυρωτής ανθεκτικότητας.....	99
Δ.5 Μελέτη της επίδρασης της ανθεκτικότητας σε διάφορες παραμέτρους φυτοπαθογόνου προσαρμοστικότητας του παθογόνου	100
Δ.5.1. Επίδραση της ανθεκτικότητας στο ρυθμό αύξησης των ανθεκτικών στο prochloraz στελεχών.....	100
Δ.7. Αποτελέσματα ανάλυσης δεοξυνιβαλενόνης	105
Ε. Συμπεράσματα - συζήτηση.....	106
Ζ. Βιβλιογραφία	115

A. Εισαγωγή

A.1. Η ανθεκτικότητα

A.1.1 Γενικά

Από τη στιγμή που ο άνθρωπος πέρασε από το στάδιο του θηρευτή στο στάδιο του συλλέκτη, βρίσκεται διαρκώς αντιμέτωπος με προκλήσεις, τις οποίες και προσπαθεί να ξεπεράσει, ώστε να είναι σε θέση να διασφαλίσει την ικανοποιητική παραγωγή και διάθεση τροφίμων, τα οποία με τη σειρά τους, είναι σε θέση να του διασφαλίσουν στο μέγιστο βαθμό, την άνοδο της ποιότητας της ζωής του. Σύντομα ανέπτυξε τεχνικές με τις οποίες μπόρεσε σε μεγάλο βαθμό να πετύχει τους αρχικούς του στόχους. Παρόλα αυτά η μεγαλύτερη πρόκληση απ' όλες, είναι η εξασφάλιση της γεωργικής παραγωγής και η προστασία της από τα διάφορα φυτοπαθογόνα, μία πρόκληση που συνεχίζει με αμείωτη ένταση έως την σύγχρονη εποχή.

Απ' όλες τις τεχνικές που ανέπτυξε, πέραν των καλλιεργητικών, βιολογικών, διοικητικών και βιοτεχνολογικών, σύντομα κατέστη σαφές, ότι η χημική καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων αποτελεί την αποτελεσματικότερη και συγχρόνως οικονομικότερη μέθοδο αντιμετώπισης των ασθενειών, ιδίως των πλέον καταστροφικών (περονόσποροι, ωΐδια, σκωριάσεις, φουζικλάδια κτλ). Η χημική καταπολέμηση των ασθενειών, θεωρείται σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνη, για την αύξηση τόσο της παραγωγής, όσο και του εισοδήματος του παραγωγού. Έτσι καθίσταται σαφές, ότι η επάρκεια φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αγορά, κρίνεται ως απαραίτητη για την τόσο ποσοτική, όσο και ποιοτική αύξηση της γεωργικής παραγωγής.

Τα πλεονεκτήματα αυτά όμως, οδήγησαν στην δίχως σύνεση και αποκλειστική πολλές φορές, χρήση της χημικής καταπολέμησης. Αυτό το γεγονός είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση περιβαλλοντικών προβλημάτων, αλλά ταυτόχρονα και την απώλεια της αποτελεσματικότητας πολλών, αρκετά σημαντικών σκευασμάτων. Έτσι τα τελευταία χρόνια οι ενώσεις αυτές βρίσκονται υπό συνεχή πίεση, αποτέλεσμα των αυξημένων απαιτήσεων του κοινωνικού συνόλου, για ασφαλέστερα και φιλικότερα φυτοφάρμακα, τόσο ως προς τον άνθρωπο, αλλά και ως προς το περιβάλλον. Αυτή η

κοινωνική απαίτηση, έχει ως τελικό αποτέλεσμα, ένας σημαντικός αριθμός των έως σήμερα χρησιμοποιούμενων χημικών ενώσεων, να αποσύρονται από την κυκλοφορία.

Από τα παραπάνω καθίσταται σαφές, ότι άμεσος στόχος, θα πρέπει να είναι, η προστασία των χρησιμοποιούμενων σκευασμάτων, τα οποία παραμένουν σε χρήση, από το να μην χάσουν την αποτελεσματικότητά τους, λόγω της εμφάνισης και τελικώς της επικράτησης στελεχών των παθογόνων, ανθεκτικών σε αυτά. Ως ανθεκτικότητα των παθογόνων στις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, ορίζεται:

«Η σταθερή και κληρονομούμενη στους απογόνους προσαρμογή ενός μικροοργανισμού, στην παρουσία μιας αντιμικροβιακής ένωσης, που έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της ευαισθησίας του πληθυσμού του παθογόνου, στον συγκεκριμένο παρεμποδιστή.» (Ζιώγας., 2000)

Κοιτώντας πίσω στην ιστορία, αν και η χρήση χημικών ουσιών για την αντιμετώπιση ασθενειών, φαίνεται να πραγματοποιείται από αρχαιοτάτων χρόνων, παρόλα αυτά, η ανακάλυψη του βορδιγάλειου πολτού από τον Millardet το 1885, για την καταπολέμηση του περονόσπορου της αμπέλου, θεωρείται ως η πρώτη σημαντική ανακάλυψη στην ιστορία της χημικής καταπολέμησης, ενώ από πολλούς θεωρείται και ως η έναρξη της ιστορίας της χημικής καταπολέμησης.

Ο βορδιγάλειος πολτός μαζί με άλλα ανόργανα και οργανομεταλλικά μυκητοκτόνα, αποτελούν την **πρώτη γενιά** μυκητοκτόνων. Τα μυκητοκτόνα αυτά χαρακτηρίζονται ως προστατευτικά και δεν προκαλούν ζημιά στα φυτά, κυρίως λόγω της ύπαρξης φυσικών εμποδίων, όπως για παράδειγμα η εφυμενίδα τους. Χαρακτηρίζονται ως ευρέως φάσματος δράσης, αλλά ταυτόχρονα και από υψηλή τοξικότητα στους ζωντανούς οργανισμούς, οπότε η χρήση πολλών από αυτών, όπως πχ οι οργανομεταλλικές, αποφεύγεται.

Διάδοχοι της πρώτης γενιάς μυκητοκτόνων, αποτελούν οργανικές ενώσεις, οι οποίες χρονολογούνται από το 1934 (50 χρόνια αργότερα της ανακάλυψης του βορδιγάλειου πολτού), με την ανακάλυψη των διθειοκαρβαμιδικών, ενώ άλλες σημαντικές ομάδες αποτελούν οι κινόνες, τα φθαλιμίδια, οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες και τα δικαρβοξυμιδικά. Τα μυκητοκτόνα αυτά, γνωστά και ως μυκητοκτόνα **δεύτερης γενιάς**, όπως και τα μυκητοκτόνα πρώτης γενιάς, χαρακτηρίζονται από το ευρύ φάσμα δράσης τους, καθώς δεν παρουσιάζουν κάποια εξειδικευμένη δράση σε υποκυτταρικό επίπεδο. Ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται και ως προστατευτικά, καθώς δεν διαπερνούν τον φυτικό ιστό, αλλά παραμένουν στην

φυτική επιφάνεια. Έτσι είναι αποτελεσματικά μόνο εφόσον χρησιμοποιηθούν προληπτικά (de Waard, και συν., 1993). Παρόλα αυτά γνωστές είναι οι δυσμενείς επιδράσεις τους, σε ζώντες οργανισμούς όπως για παράδειγμα ο κίνδυνος εμφάνισης μεταλλαξιγένεσης, από την χρόνια επίδραση της ομάδας του captan.

Το πρόβλημα της μη διασυστηματικής και μη εξειδικευμένης δράσης, αντιμετωπίστηκε τριάντα περίπου χρόνια μετά, με την εμφάνιση της **τρίτης γενιάς** μυκητοκτόνων. Τα μυκητοκτόνα αυτά είναι σε θέση να εισέρχονται εντός του φυτικού ιστού. Η εξειδίκευση στην δράση τους πλέον, δεν βασίζεται στην ύπαρξη φυσικών εμποδίων, αλλά μάλλον σε χημικές διαφορές, σε υποκυτταρικό επίπεδο. Έτσι μπορούν και χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικά σκευάσματα, δηλαδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν μετά την εμφάνιση της ασθένειας, για την αντιμετώπισή της. Επέμβαση που ως την εμφάνισή τους δεν ήταν δυνατή. Σημαντικές ομάδες μυκητοκτόνων τρίτης γενιάς αποτελούν τα βενζιμιδαζολικά, τα καρβοξιμιδικά, τα φαινυλαμίδια, οι στρομπιλουρίνες, οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών κ.α. (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992; de Waard, και συν., 1993).

Τέλος τα τελευταία χρόνια έχουμε την εμφάνιση μυκητοκτόνων, γνωστών και ως **τέταρτης γενιάς**. Αυτά αποτελούν ενώσεις, οι οποίες δεν είναι άμεσα τοξικές για το παθογόνο, αλλά είτε μειώνουν την παθογόνο ικανότητά του, παρεμποδίζοντας βιοχημικές διαδικασίες, οι οποίες αν και δεν είναι άμεσα θνησιγενείς, είναι πολύ σημαντικές για την φυτοπαθογόνο ικανότητά του. είτε επάγουν τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας του ξενιστή. Παραδείγματα τέτοιων φυτοπροστατευτικών προϊόντων αποτελούν τα 2-αμινοπυριμιδινικά τα οποία παρεμποδίζουν το σχηματισμό της πλάκας συγκράτησης του παθογόνου, οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης μελανίνης MBIs (**Melanin Biosynthesis Inhibitors**), το fosetyl-Al που επάγει τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών και το probenazole, το οποίο επάγει μηχανισμούς αναγνώρισης μεταξύ ξενιστή-παθογόνου, που οδηγεί μέσα από διάφορες μεταβολικές διαδικασίες τόσο στην παραγωγή μυκητοκτόνων ενώσεων από το φυτό, στην αυξημένη δραστηριότητα ενζύμων, αλλά και στην εναπόθεση λιγνίνης γύρω από τις θέσεις εισόδου του παθογόνου (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2010). Ο έλεγχος των ασθενειών με αυτά τα μη μυκητοτοξικά σκευάσματα είναι πολύ σημαντικός, καθώς οι δευτερεύουσες επιδράσεις σε οργανισμούς μη στόχους, θεωρείται ότι είναι λιγότερο σοβαρές, σε σχέση με αυτές των συμβατικών μυκητοκτόνων (de Waard, et al., 1993).

A.1.2. Εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών

Η ανθεκτικότητα είναι ένα φαινόμενο επιλογής, δηλαδή το αποτέλεσμα αλλαγών στις συχνότητες των γονιδίων σε ένα παθογόνο. Πριν την εισαγωγή ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος σε μια περιοχή, ο πληθυσμός του στοχευμένου φυτοπαρασίτου είναι πολυμορφικός και θεωρητικά υπάρχουν άτομα που μπορεί να επιβιώσουν παρουσία του φυτοπροστατευτικού προϊόντος. Η πίεση επιλογής από την παρουσία του φυτοπροστατευτικού προϊόντος έχει ως αποτέλεσμα η συχνότητα των γονοτύπων που δεν επηρεάζονται από την έκθεση σε αυτό, να αυξάνει και να αλλάζει η κατανομή του πληθυσμού (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2010).

Η ανθεκτικότητα είναι συνδεδεμένη με την εκλεκτικότητα της δράσης των φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων. Έτσι καθίσταται σαφές ότι ως και την εμφάνιση των μυκητοκτόνων τρίτης γενιάς, τα προβλήματα στην γεωργική παραγωγή εξ' αιτίας της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών, ήταν πολύ σπάνιες. Η εξειδικευμένη δράση όμως των διασυστηματικών μυκητοκτόνων, παρά τα πολλά πλεονεκτήματα που παρουσιάζει, όπως το ότι **α)** έχουν τη δυνατότητα να καταπολεμούν τα παθογόνα που βρίσκονται στο εσωτερικό των φυτών, **β)** καταπολεμούν τα παθογόνα μετά τη μόλυνση του φυτού (έχουν δηλαδή θεραπευτική δράση), **γ)** δε χρειάζεται πλήρη κάλυψη της φυτικής επιφάνειας, καθώς και το φάρμακο εισέρχεται και κυκλοφορεί εντός των φυτικών ιστών, ενώ **δ)** μπορούν να προστατεύουν το υπέργειο τμήμα των φυτών, με εφαρμογή στον σπόρο, παρόλα αυτά, εμπεριέχει τον κίνδυνο της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών, καθώς ένα και μόνο συστατικό του παθογόνου αν μεταβληθεί, τότε υπάρχει ο κίνδυνος εμφάνισης ανθεκτικού, προς το μυκητοκτόνο, στελέχους. Έτσι παρά τα σημαντικά οφέλη από τη χρήση των διασυστηματικών μυκητοκτόνων, προκύπτει το πολύ σοβαρό μειονέκτημα, της απώλειας της αποτελεσματικότητά τους, από την ανάπτυξη ανθεκτικότητας, από τα παθογόνα. Μάλιστα η εμφάνιση ανθεκτικότητας αποτελεί τον κανόνα, παρά την εξαίρεση.

Για την ολοκληρωμένη κατανόηση του προβλήματος της ανθεκτικότητας, είναι απαραίτητη η εις βάθος γνώση για το γενετικό έλεγχο, τους βιοχημικούς μηχανισμούς ανάπτυξής της και στην επιδημιολογία των ανθεκτικών στελεχών (Dekker, 1987).

Στη συνέχεια δίνονται παραδείγματα μυκήτων, που έχουν εμφανίσει ανθεκτικότητα στις σπουδαιότερες ομάδες διασυστηματικών μυκητοκτόνων, είτε στο εργαστήριο, είτε στον αγρό (Frac 2006):

Παθογόνο	Καλλιέργεια	Πηγή	Παρατήρηση
<u>MBC (Βενζιμιδαζολικά)</u>			
<i>Alternaria alternata</i>	Σιτηρά	Sitton & Pierson 1982	Αγρός
<i>Aspergillus nidulans</i>	Μπανάνα	Hasti & Georgopoulos 1971	Εργαστήριο
<i>Botrytis cinerea</i>	Κυκλάμινο	Bollen & Scholten 1971	Εργαστήριο
<i>Botrytis cinerea</i>	Φασόλι	Harrison J G 1984	Αγρός
<i>Botrytis cinerea</i>	Σταφύλια	Ehrenhardt <i>et al.</i> 1973 Leroux <i>et al.</i> 1982 Elad <i>et al.</i> 1988	Αγρός, διασταυρωτή ανθεκτικότητα στα φαινυλοκαρβαμικά
<i>Cercospora beticola</i>	Ζαχαρότευτλο	Georgopoulos & Dovas 1973	Αγρός
<i>Cladosporium fulvum</i>	Φρούτα	Staunton 1975	Αγρός
<i>Drechslera oryzae</i>	Ρύζι	Annamali & Lalithakumari 1987	Εργαστήριο
<i>Erysiphe graminis</i>	Δημητριακά	Vargas 1973	Αγρός
<i>Fulvia fulva</i> also see <i>Cladosporium fulvum</i>	Τομάτα	Miao & Higgins 1986	Εργαστήριο
<i>Fusarium solani f. sp. pisi</i>	Σολανόδη	Richardson 1973	Αγρός, εργαστήριο
<i>Fusarium sulphureum</i>	Potato	Hanson <i>et al.</i> 1996	Αγρός
<i>Leveillula taurica</i>	Τομάτα	Jones & Thompson 1982	Αγρός
<i>Monilinia laxa</i>	Μηλοειδή	Ogawa <i>et al.</i> 1981	Αγρός
<i>Mycosphaerella citri</i>	Σιτηρά	Whiteside 1980b	Αγρός
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Banana	Stover 1979	Αγρός

<i>Penicillium digitatum</i>	Σιτηρά/Μηλοειδή	Wild 1983	Αγρός
<i>Penicillium expansum</i>	Μηλοειδή	Wicks 1977	Αγρός
<i>Penicillium fructigenum</i>	Διάφορα	Iida W 1975	Αγρός
<i>Penicillium italicum</i>	Σιτηρά	Muirhead 1974; Yu 1981	Αγρός
<i>Phomopsis citri</i>	Σιτηρά	Spalding 1982	Εργαστήριο
<i>Podospaera leucotricha</i>	Fruit trees	Suta & Radulescu 1986	Εργαστήριο
<i>Rhizoctonia solani</i>	Σολανόδη	Martin et al. 1984	Εργαστήριο
<i>Sclerotium spp.</i>	Alliaceae/Πατάτα/καρότο		
<i>Septoria tritici</i>	Δημητριακά	Griffin & Fisher 1985	Εργαστήριο
<i>Ucinula necator</i>	Σταφύλι	Naegler et al. 1977; Pearson 1980 Pearson & Taschenberg 1980	Αγρός
<i>Venturia inaequalis</i>	Μηλοειδή	Kiebacher & Hoffmann 1976	Αγρός
<i>Verticillium albo-atrum</i>	Μηλοειδή	Ververke 1983	Εργαστήριο
<i>Verticillium dahliae</i>	Μηλοειδή/Σολανώδη	Locke & Thorpe 1976 McHugh & Schreiber 1984	Αγρός
<u>Δικαρβοξυμιδικά</u>			
<i>Alternaria spp. alternata, tenuissima, arborescens group</i>	Φυστικά	Ma & Michailides 2004	Αγρός
<i>Botrytis cinerea</i>	Αγγουριά	Steekelenburg 1987	Αγρός
<i>Botrytis cinerea</i>	Αμπέλι	Holz 1979 Leroux et al. 1982	Αγρός
<i>Botrytis cinerea</i>	Φράουλα	Davis & Dennis 1979	Αγρός
<i>Monilinia laxa</i>	Μηλιά	Katan & Shabi 1981	Εργαστήριο
<i>Ustilago maydis</i>	Αραβόσιτος	Orth et al. 1994	Εργαστήριο

<u>DMI (παρεμποδιστές απομεθυλίωσης του C-14)</u>			
<i>Botrytis cinerea</i>	Διάφορα λαχανικά	Elad 1992 Stehmann & De Waard 1996	Αγρός
<i>Cercospora beticola</i>	Ζαχαρότευτλο	Henry & Trivellas 1989 Karaoglanidis et al.	Μεταλλαγμένα στο εργαστήριο, απομονώσεις στον αγρό
<i>Erysiphe graminis f. sp. hordei</i>	Κριθάρι	Fletcher & Wolfe 1981	Αγρός
<i>Puccinia horiana</i>	Χρυσάνθεμο	Cevat 1992 Cook 2001	Αγρός
<i>Puccinia striiformis</i>	Σιτάρι	Bayles et al. 2000	Εργαστήριο
<i>Uncinula necator</i>	Αμπέλι	Steva et al. 1990 Reidi & Steinkellner 1996	Αγρός Αγρός
<i>Ustilago avenae</i>	Oats	Hippe & Koller 1986	Εργαστήριο
<i>Ustilago maydis</i>	Maize	Walsh & Sisler 1981	Εργαστήριο
<i>Venturia inaequalis</i>	Apple	Stanis & Jones 1985; Köller et al. 1991	Αγρός Εργαστήριο
<i>Venturia nashicola</i>	Pear	Tomita & Ishii 1998	Αγρός
<u>Φαινολαμίδια</u>			
<i>Bremia lactucae</i>	Μαρούλι	Crute et al. 1987; Crute & Harrison 1988	Αγρός
<i>Peronospora destructor</i>	Κρεμμύδι	Wright 2004	-
<i>Peronospora hyoscyami (syn. P. tabacina)</i>	Καπνός	Bruck et al. 1982	Αγρός
<i>Peronospora tabacina</i>	καπνός	Bruck et al. 1981	Αγρός
<i>Peronospora viciae</i>	Φασόλι	Falloon et al. 2000	Αγρός
<i>Phytophthora cactorum</i>	Φράουλα	Bal et al. 1987	Αγρός
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Αβοκάντο	Darvas & Becker 1984	Αγρός
<i>Phytophthora infestans</i>	Πατάτα	Davidse et al. 1981 Hartill et al. 1983 Davidse et al. 1983	Αγρός Αγρός Αγρός

<i>Phytophthora megasperma fsp. medicaginis</i>	Μαρούλι	Davidse 1981	Εργαστήριο
<i>Phytophthora parasitica</i>	Βίγκα	Ferrin & Kabashima 1991	Αγρός/Εργαστήριο
<i>Phytophthora parasitica var. nicotianae</i>	Καπνός	Shew 1985	Εργαστήριο
<i>Plasmopara viticola</i>	Αμπέλι	Staub & Sozzi 1981 Bosshard & Schuepp 1983 Leroux & Clerjeau 1985	Αγρός Αγρός
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Αγκουριά	Reuveni et al. 1980	Αγρός
<i>Pythium ultimum</i>	Πατάτα	Taylor et al. 2002	Αγρός
<u>SBI Class II (Μορφολινικά)</u>			
<i>Erysiphe graminis tritici</i>	Σιτάρι	Napier et al. 2000	Εργαστήριο
<i>Erysiphe graminis hordei</i>	Κριθάρι	Napier et al. 2000	Εργαστήριο
<i>Ustilago maydis</i>	Κριθάρι	Markoglou & Ziogas 1999, 2000, 2001	Εργαστήριο
<i>Ustilago nuda</i>	Κριθάρι	Leroux & Berthier 1988	Αγρός
<u>Ανιλοπυριμιδίνες</u>			
<i>Botrytis cinerea (Botryotinia fuckeliana)</i>	Αμπέλι	Forster & Staub 1996 Chapeland et al. 1999 Sergeeva et al. 2002 Baroffio et al. 2003	Αγρός Αγρός Αγρός Αγρός
<u>QoI παρεμποδιστές</u>			
<i>Alternaria mali</i>	Μηλιά	Lu et al. 2003	Αγρός
<i>Alternaria solani</i>	Πατάτα	Pasche et al. 2002, 2004, Pasche et al. 2005	Αγρός Εργαστήριο
<i>Botrytis cinerea</i>		Markoglou et al. 2006	Μελέτη μεταλλαξιγένεσης
<i>Erysiphe graminis tritici</i>	Σιτάρι	Heaney et al. 2000 Sierotzki et al. 2000a	Αγρός μηχανισμός ανθεκτικότητας
<i>Erysiphe graminis hordei</i>	Κριθάρι	Heaney et al. 2000	Αγρός

<i>Mycosphaerella graminicola</i> See also <i>Septoria tritici</i>	Σιτάρι	Armand et al. 2003 Clark 2005 Fraaije et al. 2005 Gisi et al. 2005	Αγρός Αγρός Αγρός Αγρός
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Αγγουριά	Heaney et al. 2000	Αγρός
<i>Plasmopara viticola</i>	Αμπέλι	Heaney et al. 2000	Αγρός
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Αγγουριά	Heaney et al. 2000 Ishii et al. 2001	Αγρός
<i>Septoria tritici</i>	Σιτάρι	Fraaije & Lucas 2003	Αγρός
<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Αγγούρι	Heaney et al. 2000 Ishii et al. 2001	Αγρός Αγρός
<i>Uncinula necator</i>	Αμπέλι	Wilcox et al. 2003	Αγρός
<i>Ustilago maydis</i>	Καλαμπόκι	Ziogas et al. 2002	Εργαστήριο
<i>Venturia inaequalis</i>	Μηλιά	Zheng et al. 2000 Farber et al. 2002 Steinfeld et al. 2002 Dux et al. 2005	Εργαστήριο Αγρός
<u>Στρεπτομυκήνες</u>			
<i>Erwinia amylovora</i>	Μηλοειδή	Moller et al. 1972 Schroth et al. 1979 Basim et al. 2001 Manulis et al. 2003	Αγρός
<i>Erwinia caratovora</i>	Καλαμπόκι	Chakravarti & Anilkumar 1969.	In-vitro
<i>Pseudomonas cichorii</i>	Μαρούλι	Matsuzaki et al. 1981	Αγρός
<i>Pseudomonas lapsa</i>	Καλαμπόκι	Chakravarti & Anilkumar 1969.	In-vitro
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Τομάτα	Silva & Lopes 1995	Αγρός
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Μαρούλι	Matsuzaki et al. 1981	Αγρός
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Πιπεριά και τομάτα	Minsavage et al. 1990	
<u>Καρβοξυλικά οξέα</u>			
<i>Erwinia amylovora</i>	Κυδωνιά	Manulis et al. 2003, Kleitman et al. 2005	Αγρός

<i>Bremia lactucae</i>	Μαρούλι	Brown et al. 2004	Αγρό
<i>Phytophthora citrophthora</i>		Angeles Diaz Borrás & Vila Aguila 1988	in -vitro
<i>Plasmopara viticola</i>	Αμπέλι	Khilare et al. 2003	Αγρός
<i>Pythium aphanidermatum</i>	-	Sanders et al. 1990	in-vitro μεταλλαγή
<u>CAA fungicides (Carboxylic acid amides)</u>			
<i>Phytophthora capsici</i>	Πιπεριά	Young et al. 2001 Young et al. 2005	Εργαστήριο
<i>Phytophthora infestans</i>	Πατάτα	Dereviagina et al. 1999	Εργαστήριο
<i>Phytophthora parasitica</i>	Καπνό	Chabane et al. 1993	Εργαστήριο
<u>Φθαλιμίδια</u>			
<i>Botrytis cinerea</i>	-	Barak & Edgington 1984	Εργαστήριο
<i>Botrytis cinerea</i>	Αμπέλι	Fourie & Holz 2001	Εργαστήριο
<i>Botrytis cinerea</i>	Θερμοκηπιακή αγγουριά	Malathrakis 1989	Θερμοκήπιο
<i>Χλωρονιτρίλια</i>			
<i>Botrytis cinerea</i>	-	Barak & Edgington 1984	Εργαστήριο
<i>Botrytis cinerea</i>	Θερμοκηπιακή αγγουριά	Malathrakis 1989	Θερμοκήπιο
<u>Σουλφαμίδια</u>			
<i>Botrytis cinerea</i>	Θερμοκηπιακή αγγουριά	Malathrakis 1989	Θερμοκήπιο
<i>Penicillium italicum</i>	Λεμονιά	Hartill et al. 1983	in-vitro

A.1.3. Γενετικός έλεγχος της ανθεκτικότητας

Όπως γράφηκε και προηγουμένως, για την πλήρη κατανόηση του φαινομένου της ανθεκτικότητας, είναι απαραίτητη η εις βάθος γνώση του γενετικού ελέγχου της ανθεκτικότητας, καθώς και των βιοχημικών μηχανισμών, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια ανθεκτικότητας και είναι υπεύθυνα για τη μείωση της ευαισθησίας των οργανισμών στα φυτοπροστατευτικά σκευάσματα.

Από την σκοπιά του γενετικού ελέγχου της ανθεκτικότητας, μπορούμε να διακρίνουμε δύο περιπτώσεις:

α) Ανάπτυξη ανθεκτικότητας εξαιτίας της μεταλλαγής χρωμοσωματικών γονιδίων, δηλαδή γονιδίων που βρίσκονται εντός του πυρήνα των κυττάρων. Αυτή η περίπτωση αποτελεί και κληρονομούμενη ιδιότητα, η οποία πραγματοποιείται κατά το Μενδελικό τρόπο.

β) Ανάπτυξη ανθεκτικότητας εξαιτίας της μεταλλαγής εξωχρωματικών γονιδίων. Αυτά αποτελούν γονίδια, που βρίσκονται εκτός του πυρήνα των κυττάρων. Τέτοια γονίδια βρίσκονται σε οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια και - στην περίπτωση των βακτηρίων - τα πλασμίδια. Στην περίπτωση αυτή το χαρακτηριστικό κληρονομείται κατά το μη Μενδελικό τρόπο.

Από την άποψη του γενετικού ελέγχου, δηλαδή της ανθεκτικότητας αναλόγως του αποτελέσματος στα γονίδια ανθεκτικότητας στο φαινότυπο, διακρίνονται δύο τύποι ανθεκτικότητας (Ζιώγας, Παναγιωταράκου-Πέτσικου, & Καλαμαράκη, 1998; Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992):

α) Ολιγογονική ή μειζόνων γονιδίων. Σε αυτήν την περίπτωση, όπου η μεταλλαγή ενός μόνο γονιδίου, δύναται να οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας υψηλού επιπέδου. Ακόμη και αν υπάρχουν και άλλα γονίδια τα οποία μετέχουν στην ανθεκτικότητα, ο αριθμός τους είναι μικρός και δεν εμφανίζεται αθροιστική επίδραση, μεταξύ των μεταλλαγμένων γονιδίων. Μερικά γνωστά παραδείγματα ολιγογονικής ανθεκτικότητας είναι τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα στους μύκητες *Ustilago maydis* (Ziogas & Girgis, 1993), *Venturia inaequalis* (Shabi, Katan, & Marton, 1983), στα καρβοξιμιδικά (Georgopoulos & Ziogas, 1977) κ.α.

β) Πολυγονική ανθεκτικότητα. Σε αυτήν την περίπτωση, πολλά γονίδια μετέχουν στην εκδήλωση της ανθεκτικότητας. Έτσι αν και κάθε ένα γονίδιο από μόνο του δίνει μικρό επίπεδο ανθεκτικότητας, το οποίο πολλές φορές είναι και μη ανιχνεύσιμο σε

συνθήκες αγρού, αν στο ίδιο κύτταρο βρεθούν πολλά τέτοια γονίδια, τότε έχουμε αθροιστική επίδραση, αυξάνοντας και το επίπεδο της ανθεκτικότητας του οργανισμού. Παραδείγματα πολυγονικής ανθεκτικότητας έχουν βρεθεί στο dodine (Crute & Harrison, 1988) και στα καρβοξυμιδικά (Georgopoulos & Ziogas, 1977).

Το αν θα είναι η ανθεκτικότητα είναι πολυγονικού ή ολιγογονικού τύπου, εξαρτάται αποκλειστικά από το μυκητοκτόνο.

Από τα παραπάνω προκύπτει, ότι δυσκολότερη ως προς την αντιμετώπισή της αποτελεί η ολιγογονική ανθεκτικότητα, καθώς αρκεί η μεταλλαγή σε ένα και μόνο γονίδιο, ώστε να προκύψει ανθεκτικότητα υψηλού επιπέδου.

Τέλος υπάρχει και η περίπτωση της φαινοτυπικής ανθεκτικότητας, η οποία όμως δεν οφείλεται σε γενετικές αλλαγές και είναι μη κληρονομούμενη. Αυτού του τύπου η ανθεκτικότητα εμφανίζεται έπειτα από τη συνεχή έκθεση του παθογόνου στο μυκητοκτόνο και εξαφανίζεται με την μεταφορά του παθογόνου σε διαφορετικό περιβάλλον, απαλλαγμένου από το τοξικό παράγοντα (Georgopoulos, 1982).

A.1.4 Διασταυρωτή ανθεκτικότητα (cross-resistance)

Ως διασταυρωτή ανθεκτικότητα ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε ένα μυκητοκτόνο, συνοδεύεται από μειωμένη ή αυξημένη ευαισθησία σε άλλα μυκητοκτόνα (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992).

Όταν η ανθεκτικότητα σε ένα μυκητοκτόνο, οδηγεί στην αύξηση της ανθεκτικότητας του μύκητα και σε άλλα μυκητοκτόνα, τότε κάνουμε λόγο για θετική συσχέτιση διασταυρωτής ανθεκτικότητας, μεταξύ αυτών των μυκητοκτόνων. Θετική συσχέτιση είναι σύνηθες μεταξύ μυκητοκτόνων που ανήκουν στο ίδια ομάδα, είτε σε μυκητοκτόνα που έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης σε υποκυτταρικό επίπεδο.

Όταν η ανθεκτικότητα σε ένα μυκητοκτόνο, οδηγεί στην αύξηση της ευαισθησίας του μύκητα σε άλλα μυκητοκτόνα, τότε κάνουμε λόγο για αρνητική συσχέτιση διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των μυκητοκτόνων.

A.1.5. Βιοχημικοί μηχανισμοί ανάπτυξης ανθεκτικότητας.

Η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας από τα παθογόνα, δύναται να επιτευχθεί με ποικίλους βιοχημικούς μηχανισμούς.

α) Αλλαγή στην θέση δράσης του μυκητοκτόνου

Αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό για την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας ενός φυτοπαθογόνου, σε ένα φυτοπροστατευτικό προϊόν. Κατά τον μηχανισμό αυτό, έχουμε την δημιουργία γενετικών αλλαγών, με τις οποίες τροποποιείται η χημική δομή ενός ενζύμου, ή άλλου κυτταρικού συστατικού, το οποίο και αποτελεί στόχο του παρεμποδιστή. Έτσι μειώνεται η συγγενειά του με το μυκητοκτόνο, αλλά ταυτόχρονα δεν επηρεάζεται σημαντικά η λειτουργικότητά του στο κύτταρο. Έτσι επιτυγχάνεται η ανάπτυξη υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητας. Από αυτά καθίσταται σαφές ότι, ο μηχανισμός της αλλαγής της θέσης δράσης του μυκητοκτόνου, εμφανίζεται στην περίπτωση των εξειδικευμένων παρεμποδιστών. Παράδειγμα όπου εμφανίζεται αυτός ο μηχανισμός αποτελεί η περίπτωση της ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, στα καρβοξαμιδικά, στα φαινυλαμίδια, στις στρομπιλουρίνες και τους DMI's.

β) Αυξημένη απέκκριση

Αποτέλεσμα του μηχανισμού της αυξημένης απέκκρισης είναι η μείωση της συγκέντρωσης του τοξικού μορίου εντός του οργανισμού, άρα και η μείωση της τοξικής του δράσης. Για την πραγματοποίηση της αυξημένης απέκκρισης είναι απαραίτητη και η αύξηση της κατανάλωσης ενέργειας από το κύτταρο, υπό μορφή ATP. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της ανθεκτικότητας ενός παθογόνου σε ένα φυτοφάρμακο, είτε το τελευταίο είναι εξειδικευμένης δράσης, είτε είναι προστατευτικό. Παράδειγμα αποτελεί η ανθεκτικότητα του μύκητα *Aspergillus nidulans* στο fenarimol (de Waard & van Nistelrooy, 1979; de Waard & van Nisterooy, 1984) και του *Nectria haematococca var. curcubitae* (Kalamarakis, Waard, Ziogas, & Georgopoulos, 1991; Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992).

γ) Λειτουργία εναλλακτικών συστημάτων

Ως εναλλακτικά συστήματα εννοούνται εκείνα τα μεταβολικά συστήματα, τα οποία μπορούν να πραγματοποιήσουν τις κυτταρικές λειτουργίες, που παρεμποδίζονται από το μυκητοκτόνο. Αυτός ο μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας εμφανίζεται κυρίως στα εξειδικευμένης δράσης μυκητοκτόνα (τα οποία και παρεμποδίζουν συγκεκριμένους μηχανισμούς), παρά στα προστατευτικά. Παράδειγμα αποτελεί η ανθεκτικότητα του μύκητα *Septoria tritici* σε μυκητοκτόνα που δρουν στην αναπνευστική οδό. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι η έναρξη λειτουργίας του ενζυμικού συστήματος της αναπνοής, που παρακάμπει το σύμπλοκο III και IV της αναπνευστικής αλυσίδας, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της ανθεκτικότητας προς στις στρομπιλουρίνες, που δρουν στο σύμπλοκο III (Ziogas, Baldwin, & Young, 1997).

δ) Μειωμένη περατότητα μεμβρανών

Η είσοδος εξωγενών ουσιών εντός του κυττάρου πραγματοποιείται μέσω ειδικών ενζυμικών συστημάτων μεταφοράς, τα οποία εδράζονται στην κυτοπλασματική μεμβράνη και βρίσκονται υπό γενετικό έλεγχο. Αλλαγή στα γονίδια που ελέγχουν το ενζυμικό σύστημα μεταφοράς, μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της περατότητας της μεμβράνης στο τοξικό μόριο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην συσσωρεύονται επαρκείς ποσότητες του τοξικού μορίου στον οργανισμό κι έτσι να οδηγούμαστε σε ανθεκτικότητα (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992). Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να εμφανιστεί τόσο σε προστατευτικά, όσο και σε εξειδικευμένης δράσης μυκητοκτόνα. Παραδείγματα όπου η ανθεκτικότητα οφείλεται σε αυτόν τον μηχανισμό είναι η περίπτωση του βενζιμιδαζολικού μυκητοκτόνου carbendazim, καθώς και η δέσμευση στην μεμβράνη διαφόρων μορφολινικών μυκητοκτόνων (Ζιώγας., 2000).

ε) Μη ενεργοποίηση του τοξικού μορίου

Πολλές χημικές ουσίες δεν είναι τοξικές. Παρόλα αυτά μπορούν να μεταβολιστούν μετά την είσοδό τους στον οργανισμό σε τοξικές ουσίες. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως θανατηφόρος σύνθεση (Dekker, 1977). Παράδειγμα αυτού του μηχανισμού αποτελεί η περίπτωση της ανθεκτικότητας του μύκητα *Pyricularia oryzae* στο pyrazophos (de Waard & van Nistelrooy, 1980).

στ) Αποτοξικοποίηση του τοξικού μορίου

Ο μηχανισμός αυτός οφείλεται στον μεταβολισμό του τοξικού μορίου, σε άλλα μόρια μη τοξικά για τον οργανισμό στόχο. Η εξουδετέρωση της τοξικότητας μπορεί να πραγματοποιηθεί εντός, αλλά και εκτός του κυττάρου, μέσω ενζυμικής αποδόμησης, αλλά και μέσω της δέσμευσης της τοξικής ουσίας από διάφορα συστατικά, τα οποία δεν είναι σημαντικά για τον μεταβολισμό του κυττάρου (Georgopoulos, 1976; Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992).

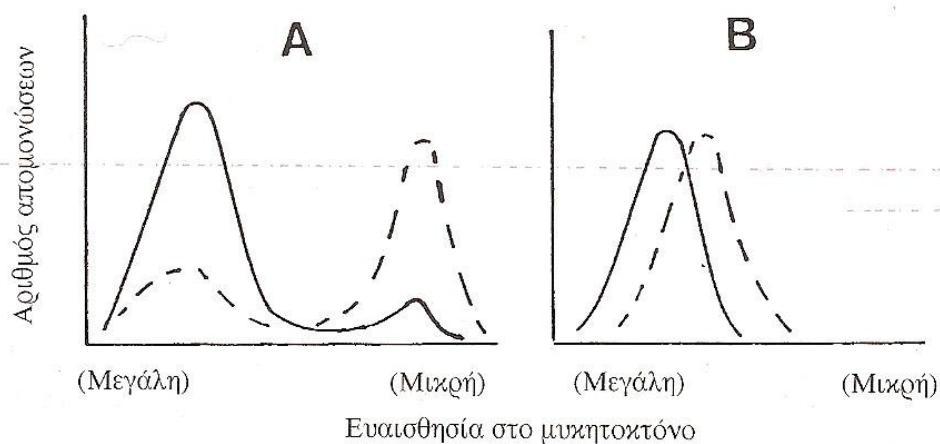
A.1.6 Εμφάνιση ανθεκτικότητας στον αγρό.

Η εμφάνιση και το μέγεθος του προβλήματος της ανθεκτικότητας σε ένα μυκητοκτόνο στον αγρό εξαρτάται από:

- 1) Την ύπαρξη και ενεργοποίηση των γονιδίων ανθεκτικότητας στον αρχικό πληθυσμό, ώστε να εμφανιστούν τα ανθεκτικά στελέχη στον αγρό
- 2) Την ταχύτητα επιλογής των ανθεκτικών στελεχών, ώστε να αποτελέσουν ικανοποιητικό τμήμα του πληθυσμού των παθογόνων και να καθίσταται αποτυχημένη η χημική καταπολέμησή τους και
- 3) Τη σταθερότητα της ανθεκτικότητας στον αγρό, δηλαδή το αν θα μπορούν τα ανθεκτικά στελέχη, να συναγωνιστούν επιτυχώς τα ευαίσθητα και όταν δεν υπάρχει το φάρμακο στο περιβάλλον (Ζιώγας., 2000).

Είναι γνωστό ότι στη φύση απαντώνται τόσο ευαίσθητα, όσο και ανθεκτικά στα μυκητοκτόνα. Η αρχική συχνότητα των ανθεκτικών στελεχών, βρίσκεται σε πολύ χαμηλότερο επίπεδο, σε σχέση με αυτό των ευαίσθητων στελεχών. Παρόλα αυτά με την εφαρμογή του μυκητοκτόνου, παρατηρείται το φαινόμενο της πίεσης επιλογής. Αυτή η πίεση επιλογής μεταβάλλει τη σχέση μεταξύ των ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών προς όφελος των τελευταίων. Έτσι στο τέλος επικρατούν τα ανθεκτικά στελέχη και οδηγούμαστε σε αποτυχία της χημικής καταπολέμησης. Η αρχική αυτή κατανομή του πληθυσμού και η μετέπειτα μεταβολή της, εξαρτάται από τον τύπο του γενετικού ελέγχου της ανθεκτικότητας.

Στην περίπτωση της ολιγονικού/μειζόνων γονιδίων τύπου ανθεκτικότητας, ο αρχικός πληθυσμός αποτελείται από δύο ή και περισσότερους υποπληθυσμούς γύρω από αντίστοιχες μέσες ευαισθησίες, οι οποίες διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Έχουμε δηλαδή μια ασυνεχή κατανομή αυτών των υποπληθυσμών. Στην αρχή τα ανθεκτικά στελέχη είναι ελάχιστα και δύσκολα αναγνωρίζονται. Έπειτα με την εφαρμογή του μυκητοκτόνου, έχουμε μια γρήγορη αύξηση του ανθεκτικού υποπληθυσμού, ο οποίος τελικά θα επικρατήσει. Στην εικόνα 10 φαίνεται η σχέση της γονοτυπικής συχνότητας του πληθυσμού, πριν και μετά την εφαρμογή του μυκητοκτόνου. Παραδείγματα αποτελούν και οι περιπτώσεις των βενζιμιδαζολικών και των φαινυλαμιδίων (Ζιώγας., 2000) καθώς και των DMI's (Nikou, Malandrakis, Konstantaki, Vontas, Markoglou, & Ziogas, 2009).



Εικόνα 10: Σχέση μεταξύ κατανομής του πληθυσμού και του επιπέδου ανθεκτικότητας (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992)

Στην περίπτωση της πολυγονικής ανθεκτικότητας η κατανομή του πληθυσμού παραμένει συνεχής για όσο χρονικό διάστημα διαρκεί η επίδραση της επιλογής (εικόνα 10. B). Η μείωση της αποτελεσματικότητας του μυκητοκτόνου θα είναι βαθμιαία, καθιστώντας μια πιθανή ανάπτυξης ανθεκτικότητας μη αναγνωρίσιμη στον αγρό, διότι η παρατηρούμενη αύξηση του πληθυσμού των ανθεκτικών στελεχών, λαμβάνει χώρα πολύ πριν την αποτυχία της καταπολέμησης. Παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του dodine, των DMIs και των οργανοσφωρικών (Ζιώγας., 2000).

Άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη ή μη της ανθεκτικότητας στον αγρό, είναι και η **φυτοπαθογόνος προσαρμοστικότητα** των ανθεκτικών στελεχών. Όσο λιγότερο επηρεάζουν οι αλλαγές που προσδίδουν

ανθεκτικότητα, χαρακτηριστικά όπως ο ρυθμός αύξησης του παθογόνου, η δυνατότητα μόλυνσης, η ικανότητα παραγωγής αναπαραγωγικών οργάνων και γενικότερα την επιβίωση του παθογόνου, τόσο γρηγορότερα έχουμε την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας. Έτσι εξαιτίας της μικρότερης ικανότητας προς επιβίωση των ανθεκτικών στελεχών σε σχέση με τα ευαίσθητα, δεν είναι σπάνιο το ενδεχόμενο, μετά την διακοπή της χρήσης του μυκητοκτόνου, να επικρατήσουν στον αγρό, ξανά τα ευαίσθητα στελέχη. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί και η περίπτωση των ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *Erysiphe graminis* στο quinoxifen, που προκλήθηκαν είτε με μετάλλαξη, είτε έπειτα από απομόνωση στον αγρό, τα οποία είχαν μικρή προσαρμοστικότητα και απαιτούσαν την παρουσία φαρμάκου για να επικρατήσουν των ευαίσθητων στελεχών.

Τέλος υπάρχουν και άλλοι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν το βαθμό του προβλήματος της ανθεκτικότητας. Τέτοιοι παράγοντες αποτελούν **το είδος του παθογόνου και ο τύπος της ασθένειας που προκαλεί** (παθογόνα που προσβάλλουν υπέργεια τμήματα και παράγουν πολλές γενεές και πολλά σπόρια κατά τη διάρκεια μιας καλλιεργητικής περιόδου), **η πίεση επιλογής** (που προσδιορίζεται από παράγοντες όπως η έκταση εφαρμογής του μυκητοκτόνου, οι δόσεις, η συχνότητα εφαρμογής, τα διαστήματα μεταξύ των εφαρμογών), **η συχνότητα των ανθεκτικών στελεχών** στον αρχικό πληθυσμού του παθογόνου, **η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου και οι διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες**. Τέλος επικουρικό ρόλο διαδραματίζει και **η εφαρμογή άλλων μέτρων καταπολέμησης**, όπως η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών, οι διάφοροι φυτοϋγειονομικοί έλεγχοι, αλλά και τα γενικότερα νομοθετικά μέτρα κτλ.

A.1.7 Κατάταξη των μυκητοκτόνων, αναλόγως του κινδύνου απώλειας της αποτελεσματικότητά τους.

Σύμφωνα με τα έως τώρα αποτελέσματα, τα μυκητοκτόνα που κυκλοφορούν σήμερα, μπορούν να καταταγούν σε τρεις ομάδες, όσον αφορά στον κίνδυνο απώλειας της αποτελεσματικότητά τους:

α) Υψηλού κινδύνου

Αποτελούν μυκητοκτόνα, στα οποία το ενδεχόμενο της απώλειας της αποτελεσματικότητάς τους είναι υψηλό και στην πράξη αρκετά σύνηθες. Στα μυκητοκτόνα αυτά έχουμε ανθεκτικότητα μειζόνων γονιδίων, η οποία δεν επηρεάζει την προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών. Η καλή προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών, δεν επιτρέπει την επιλογή προς την κατεύθυνση του ευαίσθητου πληθυσμού, στις περιόδους μεταξύ των εφαρμογών του μυκητοκτόνου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον συνδυασμό της γρήγορης αύξησης της συχνότητας των ανθεκτικών στελεχών και την ταυτόχρονη γρήγορη απώλεια της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου. Επίσης αυτή η υψηλή συχνότητα των ανθεκτικών στελεχών, παραμένει ισχυρή, ακόμα και πολλά χρόνια μετά την διακοπή της χρήσης του φαρμάκου. Αυτό το γεγονός καθιστά αδύνατη τη χρήση του ιδίου, ή παρόμοιας δράσης μυκητοκτόνου στην περιοχή, για αρκετά χρόνια. Παραδείγματα μυκητοκτόνων υψηλού κινδύνου, αποτελούν τα βενζιμιδαζολικά, οι πολυοξίνες, τα φαινυλαμίδια και τα καρβοξιμιδικά, όπως η περίπτωση του νέου boscalid. Επίσης υπάρχουν αναφορές, ότι καινούριες χημικές ομάδες όπως οι ανιλοπυριμιδίνες (cyprodinyl) και οι στρομπιλουρίνες (azoxystrobin) φαίνεται να ανήκουν στην κατηγορία των ενώσεων υψηλού ή μέσου κινδύνου (Ζιώγας., 2000).

β) Μέσου κινδύνου

Στα μυκητοκτόνα της κατηγορίας αυτής η ανθεκτικότητα είναι είτε ολιγογονική που όμως επηρεάζει σημαντικά την προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών, είτε πολυγονική. Έτσι στον αγρό παρατηρείται μια αντίστροφη σχέση μεταξύ του βαθμού ανθεκτικότητας και της προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών στελεχών. Έτσι με μια αύξηση στην δόση ή την συχνότητα των επεμβάσεων, μπορούμε να ξαναπάρουμε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Παραδείγματα μυκητοκτόνων στα οποία η ανθεκτικότητα είναι ολιγογονική, είναι τα δικαρβοξιμιδικά, η ομάδα των αρωματικών υδρογονανθρακών και το αντιβιοτικό κασουγκαμυκίνη (αντίδραση του *Pyricularia oryzae* στην κασουγκαμυκίνη. Στην περίπτωση της πολυγονικής ανθεκτικότητας έχουμε το dodine, τα οργανοκασσιτερούχα, τα 2 αμινοπυριμιδινικά, τα οργανοφωσφορικά και πιθανότατα οι DMIs. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι νέες κατηγορίες των αντιμικροβιακών ενώσεων και συγκεκριμένα τα

φαινυλοπυρολικά μυκητοκτόνα (fludioxonil), ανήκουν και αυτά στα μυκητοκτόνα μέσου κινδύνου (Ζιώγας., 2000).

γ) Χαμηλού κινδύνου

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα προστατευτικά μυκητοκτόνα, δηλαδή τα μυκητοκτόνα μη εξειδικευμένης δράσης, όπως το θειάφι, τα χαλκούχα, τα διθειοκαρβαμιδικά, τα φθαλιμίδια οι κινόνες και το chlorothalonil. Παρά τις συνεχείς προσπάθειες που γίνονται εργαστηριακά, δεν έχει επιτευχθεί η απόκτηση στελεχών, τα οποία να χαρακτηρίζονται ανθεκτικότητα σημαντικού επιπέδου. Το πιθανότερο είναι ότι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί στερούνται των κατάλληλων γονιδίων για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αυτά τα μυκητοκτόνα. Έτσι παρά την διαρκή και επί δεκαετιών χρήση αυτών των μυκητοκτόνων, οι περιπτώσεις μειωμένης αποτελεσματικότητας είναι ελάχιστες και συνήθως χαμηλού επιπέδου. Ως παράδειγμα απώλειας της αποτελεσματικότητας ήταν και η περίπτωση των επιφανειοδραστικών guazatine και iminoctadine, έπειτα από εργαστηριακά πειράματα στους μύκητες *Penicillium*, *Botrytis* και *Geotrichum* (Ζιώγας., 2000). Τέλος φαίνεται ότι και οι αντιπαθογονικές ενώσεις που επάγουν την επίκτητη διασυστηματική ανθεκτικότητα (SAR) των φυτών ή μειώνουν την παθογένεια του παθογόνου, εμφανίζουν μικρό κίνδυνο απώλειας της αποτελεσματικότητάς τους. Αυτό φαίνεται να οφείλεται στο γεγονός ότι, η αύξηση της ανθεκτικότητας του ξενιστή έναντι των διαφόρων κατηγοριών παθογόνων (μύκητες, βακτήρια, ιοί) από τα νέα αντιπαθογονικά, είναι αποτέλεσμα της επαγωγής ενός αριθμού διαφορετικών μηχανισμών ανθεκτικότητας. Αυτό έχει ως συνέπεια, να καθίσταται δύσκολη η μεταλλαγή αρκετών γονιδίων σε έναν πυρήνα του παθογόνου, για την αντιμετώπιση των διαφόρων μηχανισμών άμυνας του ξενιστή (Ζιώγας., 2000).

A.1.8. Αντιμετώπιση του προβλήματος της ανθεκτικότητας

Από όλα όσα αναφέρθηκαν πριν είναι αναγκαία η λήψη διαφόρων μέτρων για την αποφυγή ή την καθυστέρηση της ανάπτυξης της ανθεκτικότητας, ή την αντιμετώπιση του προβλήματος, μετά την εμφάνισή του.

Έτσι τα μέτρα αυτά είναι (Ζιώγας, Παναγιωταράκου-Πέτσικου, & Καλαμαράκη, 1998):

- 1) Αποφυγή χρήσης μυκητοκτόνων, που μπορεί να οδηγήσουν προς ανθεκτικότητα, σε περιπτώσεις όπου καθίσταται δυνατή η καταπολέμηση με άλλους τρόπους
- 2) Εφαρμογή του μυκητοκτόνου μόνο στον χώρο που χρειάζεται, και με τις δόσεις και την ποσότητα που απαιτείται (και όχι με υπερβολική χρήση), ώστε ένα μέρος του ευαίσθητου πληθυσμού να μην εκτίθεται στην επίδραση του φαρμάκου κατά την επιλογή.
- 3) Εφαρμογή των αρχών της ολοκληρωμένης καταπολέμησης, ώστε να απαιτείται η χρήση της ελάχιστης ποσότητας εκλεκτικού φαρμάκου, για την επίτευξη καλής παραγωγής.
- 4) Αναζήτηση ενώσεων που να αντιστρέφουν την επίδραση των μεταλλαγών της ανθεκτικότητας. Για παράδειγμα η χρήση μυκητοκτόνων που εμφανίζουν αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα, ή παρουσιάζουν συνεργιστική δράση.
- 5) Χρήση μείγματος δύο μυκητοκτόνων, από τα οποία το ένα να είναι χαμηλού κινδύνου (χαλκούχα, διθειοκαρβαμιδικά, κτλ).
- 6) Εναλλαγή εκλεκτικών μυκητοκτόνων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, ώστε η πίεση επιλογής στο καθ' ένα να είναι ασυνεχής.
- 7) Ο καλύτερος τρόπος φαίνεται να είναι ένας συνδυασμός μιγμάτων και εναλλαγής, έτσι ώστε να έχουμε συνεχή παρουσία σε όλες τις επεμβάσεις του μη εκλεκτικού και να διακόπτεται η εφαρμογή μόνο του εκλεκτικού.
- 8) Έρευνα για τη διερεύνηση των παραγόντων που καθορίζουν το μέγεθος της ανθεκτικότητας (έλεγχος κατανομής του πληθυσμού, γνώση του γενετικού ελέγχου της προσαρμοστικότητας, της φύσης του παθογόνου, της πίεσης επιλογής, των περιβαλλοντικών συνθηκών)
- 9) Παρακολούθηση (monitoring) του πληθυσμού του παθογόνου πριν και μετά την εφαρμογή του φαρμάκου, για αξιολόγηση της ακολουθούμενης στρατηγικής.

- 10) Έρευνα για την ανακάλυψη ενώσεων με νέους μηχανισμούς δράσης, που δεν θα εμφανίζουν το πρόβλημα της διασταυρωτής ανθεκτικότητας με τα ήδη κυκλοφορούντα προϊόντα, ή με μηχανισμούς δράσης, που δεν ευνοούν το πρόβλημα της ανθεκτικότητας, όπως είναι οι αντιπαθογονικές ενώσεις.

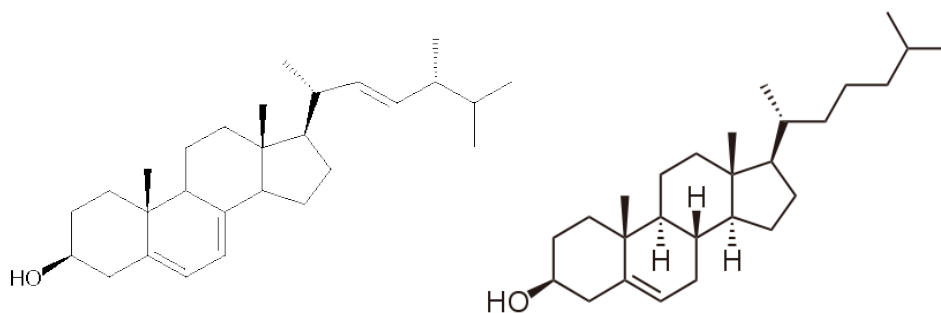
A.2 Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών

A.2.1 Η εργοστερόλη

A.2.1.1 Σημασία της εργοστερόλης

Η εργοστερόλη αποτελεί την κύρια στερόλη των κυτταρικών μεμβρανών των ανωτέρων μυκήτων, που είναι οι Βασιδιομύκητες, Ασκομύκητες και Αδηλομύκητες, καθώς και ορισμένων κατώτερων μυκήτων, όπως οι Ζυγομύκητες. Εξαιρέση αποτελούν οι Ωομύκητες και οι Χυτρίδιομύκητες (Nes, 1984; Koller W. , 1992), ενώ δεν απαντάται ούτε στα ανώτερα φυτά, στα έντομα, τα βακτήρια και στα θηλαστικά.

Στα φυτά κύριες στερόλες αποτελούν η ομάδα των φυτοστερολών, με σπουδαιότερες τη σιτοστερόλη, τη στιγμαστερόλη και τη καμπεστερόλη, τα βακτήρια σχηματίζουν τα οπανοειδή, ενώσεις παρόμοιες με τις στερόλες, ενώ στα θηλαστικά η κύρια στερόλη είναι η χοληστερόλη, μία χημικά συγγενή με την εργοστερόλη ένωση και χρησιμεύει ως πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση άλλων στεροϊδών. Ένα από αυτά τα στεροειδή αποτελεί και η ορμόνη εκδυσόνη, η οποία συμβάλλει στη διαδικασία έκδυσης και μεταμόρφωσης των εντόμων (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2010). Η παρουσία της εργοστερόλης μόνο σε ανώτερους μύκητες καθιστούν τη βιοσύνθεσή της κατάλληλο υποκυτταρικό στόχο για την αντιμετώπιση διαφόρων παθογόνων που ανήκουν στους ανώτερους μύκητες (Βασιδιομύκητες, Ασκομύκητες, Αδηλομύκητες) (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992).



Εικόνα 8: Η εργοστερόλη και η χοληστερόλη

Η εργοστερόλη αποτελεί βασικό δομικό και λειτουργικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών, συμβάλλοντας στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής δομής και φυσιολογικής λειτουργίας των κυτταρικών μεμβρανών (vanden Bossche, 1988) (Koller W. , 1992), καθώς και στην περατότητα των μεμβρανών, μέσω της μειωμένης περατότητας των μεμβρανών στα ιόντα καλίου (K^+) και υδρογόνου (H^+) (Kunemud & Hoefler, 1983). Η ύπαρξη της εργοστερόλης φαίνεται να σχετίζεται και με την ικανότητα ανάπτυξης του μύκητα σε σημαντικό εύρος θερμοκρασιών, ευρύτερο αυτού των θηλαστικών, τα οποία φέρουν χοληστερόλη αντί της εργοστερόλης (vanden Bossche, 1988; Parks & Cassey, 1995).

A.2.1.2 Βιοσύνθεση της εργοστερόλης

Η βιοσύνθεση της εργοστερόλης αποτελεί τμήμα του γενικότερου μεταβολισμού των λιποειδών και ειδικότερα των ισοπρενοειδών ενώσεων των οποίων αποτελούν τμήμα τους.

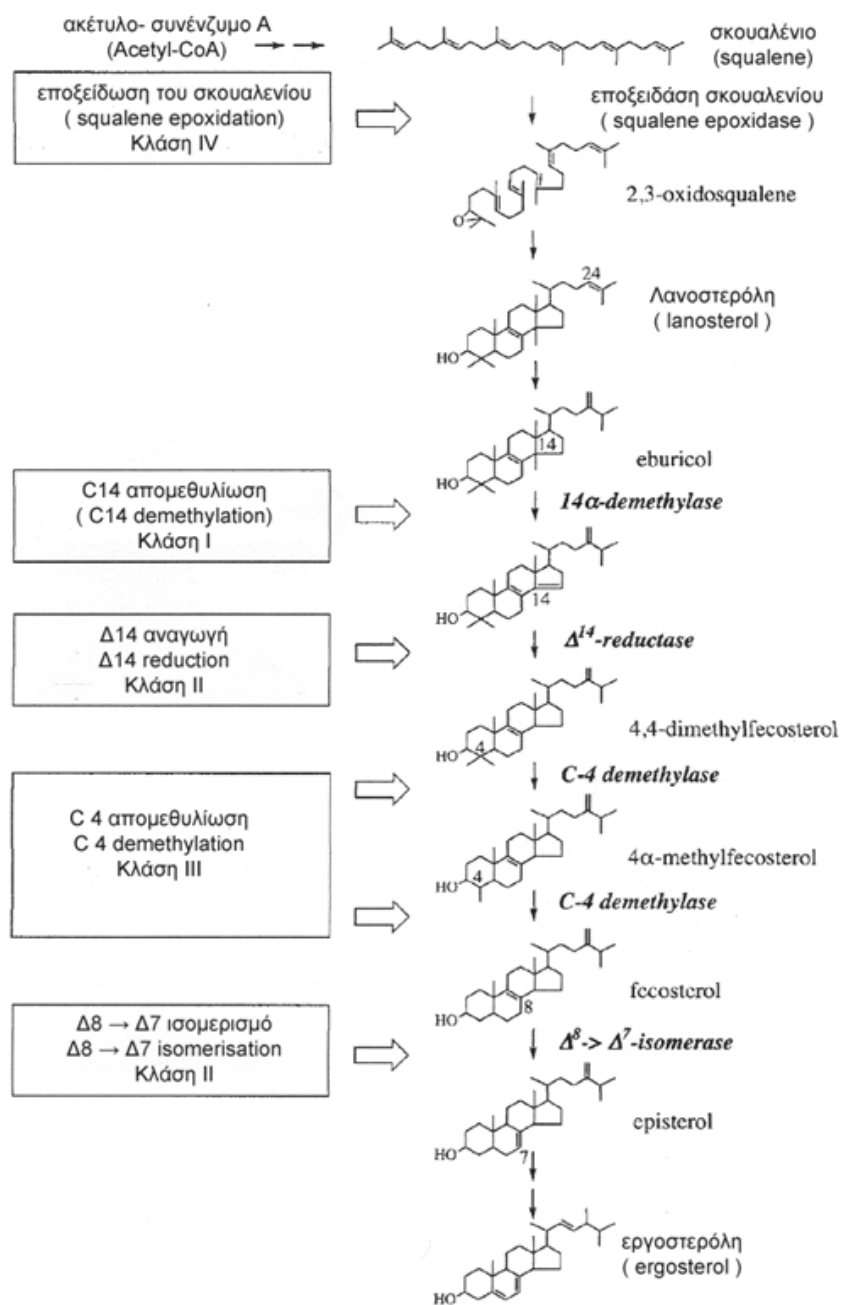
Τρία μόρια οξικού οξέος ενώνονται και δίδουν το πρόδρομο μόριο του μεβαλονικού οξέος. Η όλη διαδικασία της βιοσύνθεσης των στερολών μπορεί να διακριθεί σε δύο φάσεις, την αναερόβια και την αερόβια φάση (Lehninger, 2004; Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2010).

Κατά την Αναερόβια φάση η οποία ξεκινάει από το οξικό οξύ και το ακέτυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA) κι έπειτα από διαδοχικές βιοχημικές αντιδράσεις και παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων καταλήγει στο σχηματισμό του πρόδρομου μορίου, του σκουαλενίου. Πρόκειται για κοινό στάδιο στη βιοσύνθεση των στερολών στους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, καθώς και στη βιοσύνθεση των οπανοειδών στην περίπτωση των βακτηρίων.

Κατά την *Αερόβια φάση*: το σκουαλένιο μεταφέρεται στις κυτταρικές μεμβράνες, όπου έπειτα από σειρά οξειδωτικών κυρίως αντιδράσεων, κυκλοποιείται σε στερόλες στους μύκητες, φυτά, έντομα και θηλαστικά και οπανοειδή στα βακτήρια. Αρχικά και με τη δράση του ενζύμου *εποξειδάση του σκουαλενίου*, το μόριο του σκουαλενίου εποξειδώνεται σε 2,3-επόξυ-σκουαλένιο και εν συνεχεία πραγματοποιείται η κυκλοποίησή του με τη δράση του ενζύμου *οξειδάση του σκουαλενίου*, σχηματίζοντας τη λανοστερόλη, η οποία αποτελεί και την πρώτη στερόλη. Έπειτα ακολουθούν σειρά σταδίων που καταλύονται από σειρά ενζύμων των κυτταρικών μεμβρανών, μέσω των οποίων θα προκύψει τελικά η εργοστερόλη.

Τα κύρια στάδια βιοσύνθεσης της εργοστερόλης είναι τα:

- i) Απομεθυλίωση του C-24 του μορίου της λανοστερόλης
- ii) Αναγωγή του διπλού δεσμού $\Delta^{24(25)}$ κι σχηματισμός του διπλού δεσμού $\Delta^{24(28)}$
- iii) Απομεθυλίωση μιας μεθυλομάδας στη θέση C-14 και δύο από τη θέση C-4
- iv) Αναγωγή του διπλού δεσμού Δ^{14}
- v) Μετατόπιση του διπλού δεσμού από τη θέση $\Delta^{8,9}$ στη θέση $\Delta^{8,7}$
- vi) Εισαγωγή διπλών δεσμών στις θέσεις Δ^5 και Δ^{22}
- vii) Αναγωγή διπλού δεσμού $\Delta^{24(28)}$



Εικόνα 9: Βιοσύνθεση Εργοστερόλης (Μαρκόγλου Α. , 1997)

A.2.2. Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών

A.2.2.1. Γενικά

Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών (**Sterol Biosynthesis Inhibitors SBI's**) γνωστοί και ως αποτελούν τη μεγαλύτερη και σημαντικότερη ομάδα διασυστηματικών μυκητοκτόνων (de Waard M. , 1994).

Στη γεωργική πράξη πρωτοεμφανίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1960, με πλήθος χημικών ενώσεων, αρκετά σημαντικών τόσο για γεωργική και όχι μόνο πρακτική, όντας το αποτέλεσμα ερευνών πολλών ανεξάρτητων μεταξύ τους ερευνητικών ομάδων. Είναι ενώσεις χρήσιμες τόσο για την αντιμετώπιση πολλών μυκητολογικών ασθενειών των φυτών, των ζώων και του ανθρώπου.

Στη γεωργική πρακτική χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών που προκαλούνται από πολλούς βασιδιομύκητες, όπως οι διάφορες σκωριάσεις και τα ωΐδια σε πολλές καλλιέργειες όπως τα σιτηρά, τα μηλοειδή, τα κολοκυνθοειδή, τα καλλωπιστικά και τα ψυχανθή, καθώς και για την αντιμετώπιση άλλων ασθενειών που προκαλούνται από είδη των γενών *Monilinia*, *Septoria*, *Venturia*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia* κ.τ.λ (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2010)..

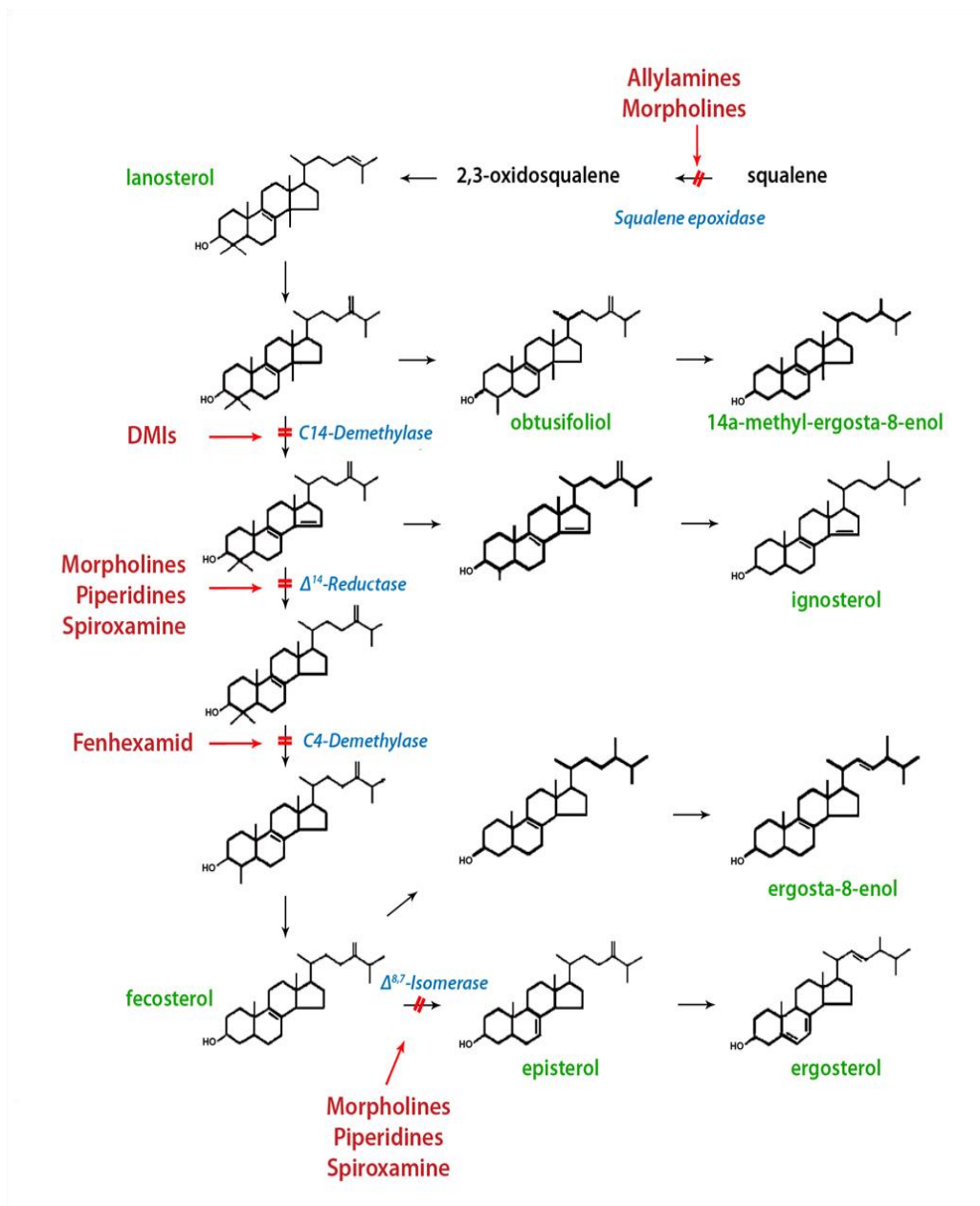
Όσον αφορά στη χημική τους δομή χωρίζονται σε δύο χημικές κατηγορίες αναλόγως του κορεσμού ή μη του αζωτο-ετεροκυκλικού δακτυλίου του μορίου τους. Η πρώτη χημική κατηγορία, αποτελείται από ενώσεις που φέρουν κορεσμένο αζωτο-ετεροκυκλικό δακτύλιο, η οποία αποτελείται από την ομάδα των πυριδινικών, των πυριμιδινικών, και των αζολών (ιμιδαζολικά και τριαζολικά), με τις αζόλες αποτελούν και την ομάδα με τους περισσότερους SBI's που χρησιμοποιούνται κατά τη γεωργική πρακτική. Η δεύτερη χημική κατηγορία αποτελείται από ενώσεις που φέρουν ακόρεστο αζωτο-ετεροκυκλικό δακτύλιο. Στην οποία ανήκουν τα πιπεραζινικά, μορφολινικά και πιπεριδινικά. Τέλος υπάρχουν και τα νεώτερα μυκητοκτόνα οι σπироκεταλαμίνες και τα υδρόξυανιλίδια, τα οποία αν και δρουν στη βιοσύνθεση στερολών, χαρακτηρίζονται από την απουσία αζωτο-ετεροκυκλικού δακτυλίου στο μόριό τους (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2010).

A.2.2.2. Δράση των SBI's

Οι παρεμποδιστές βιόσύνθεσης εργοστερόλης δρουν σε όλα τα στάδια βιόσύνθεσης της εργοστερόλης. Αποτελούν δε τη μοναδική κατηγορία φυτοφαρμάκων, της οποίας η κατάταξη των διαφόρων ομάδων της πραγματοποιείται βάση της δράσης τους και όχι της χημικής δομής τους. Διακρίνονται στις εξής τέσσερις κατηγορίες/κλάσεις αναλόγως της θέσης δράσης τους (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2010):

- 1) Ομάδα I: Παρεμποδιστές της απομεθυλίωσης του C-14 (C-14 DeMethylation Inhibitors **DMI's**). Εδώ ανήκουν εκείνες οι ομάδες της πρώτης χημικής κατηγορίας που φέρουν κορεσμένο αζωτο-ετεροκυκλικό δακτύλιο, δηλαδή οι ομάδες των πυριδινικών, πυριμιδινικών, και αζολών (ιμιδαζολικά και τριαζολικά). Αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα φυτοφαρμάκων.
- 2) Ομάδα II: Παρεμποδιστές της Δ^{14} αναγωγής που καταλύεται από το ένζυμο Δ^{14} αναγωγάση, ή τον $\Delta^{8\rightarrow7}$ ισομερισμό, που καταλύεται από το ένζυμο $\Delta^{8\rightarrow7}$ ισομεράση. Εδώ ανήκουν οι ομάδες των μορφολινικών και συγγενικών πιπεριδινικών και των σπιροκεταλαμινών.
- 3) Ομάδα III: Παρεμποδιστές απομεθυλίωσης C-4, η οποία καταλύεται από το ένζυμο 3-κέτο-αναγωγάση. Εδώ ανήκει η ομάδα των υδροξυανιλιδίων.
- 4) Ομάδα IV: Παρεμποδιστές της εποξειδάσης του σκουαλενίου, η οποία καταλύεται από το ένζυμο της εποξειδάσης του σκουαλενίου. Εδώ ανήκουν οι αλλυλαμίνες

Πέραν αυτών των θέσεων έχει διαπιστωθεί ότι πολλά από τα μυκητοκτόνα αυτά δρουν και σε άλλα στάδια της βιόσύνθεσης της εργοστερόλης.. Τέτοια αποτελούν το στάδιο της κυκλοποίησης του σκουαλενίου, αυτό της απομεθυλίωσης του C-24, της αναγωγής του $\Delta_{24}(28)$ διπλού δεσμού, καθώς και της εισαγωγής του Δ_{22} διπλού δεσμού.



Εικόνα 10: Θέσεις δράσης των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης στερολών, κατά τη βιοσύνθεση εργοστερόλης (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2010)

A.2.3. Παρεμποδιστές απομεθυλίωσης C-14 (DMI's)

Οι παρεμποδιστές απομεθυλίωσης του C-14, αποτελούν το σημαντικότερο εκπρόσωπο των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης στερολών, ακολουθούμενοι από τους παρεμποδιστές της αναγωγής του διπλού δεσμού D¹⁴ και της ισομερίωσης του διπλού δεσμού Δ^{8→7} που αποτελούν τα μορφολινικά και συγγενικά πιπεριδινικά.

Η παρεμπόδιση της απομεθυλίωσης του C-14 από τους DMI's έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση πρόδρομων 14α-μεθυλιωμένων στερολών (στερόλες με μεθυλική ομάδα στη θέση C-14) στις κυτταρικές μεμβράνες, στερόλες ακατάλληλες για την αντικατάσταση της εργοστερόλης στις μεμβράνες των μυκήτων (Koller W. , 1992; Buchenauer, 1995).

Η απομεθυλίωση του C-14 της λανοστερόλης, πραγματοποιείται μέσω σειράς οξειδώσεων που καταλύονται από οξυγενάση, που έχει ως προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P₄₅₀. Οι DMI's αλληλεπιδρούν με το μόριο του κυτοχρώματος P₄₅₀, προσκολλούμενοι στον αιμικό (πορφυρικό) σίδηρο με ένα άτομο αζώτου του αζωτοετεροκυκλικού δακτυλίου του μορίου τους, παρεμποδίζοντας έτσι τη δέσμευση του οξυγόνου και το σχηματισμό του πρώτου οξυγονονωμένου συμπλόκου κι εν συνεχεία την οξείδωση του υποστρώματος. Έτσι παρεμποδίζεται η μεταφορά οξυγόνου στη μεθυλομάδα του C-14 της λανοστερόλης, που αποτελεί και το σημαντικότερο στάδιο της απομεθυλίωσης. Το υπόλοιπο λιπόφιλο τμήμα του μορίου των DMI's φαίνεται να συμβάλλει στη σταθεροποίηση του συμπλόκου, μέσω της αλληλεπίδρασής του με τη γύρω από τη θέση δράσης, περιοχή του ενζύμου (Gadher, Mercer, Baldwin, & Wiggins, 1983; vanden Bossche, Willemsens, & Marichal, 1984; vanden Bossche, et al., 1987; Yoshida & Aoyama, 1987; Koller W. , 1992; Buchenauer, 1995; Μαρκόγλου Α. , 1997; Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2010).

Εξαιτίας αυτής της δράσης τους στο κυτόχρωμα P₄₅₀ εξηγείται και η παρεμπόδιση στα φυτά που έχει παρατηρηθεί (Murphy & West, 1969; Koller W. , 1987; Buchenauer, 1995). Φαίνεται ότι το κυτόχρωμα P-450 μετέχει στη βιοσύνθεση φυτοστερολών, καθώς και στη βιοσύνθεση γιβερελινών (το στάδιο της οξείδωσης του κουαρενίου προς κουαρενοϊκό οξύ καταλύεται από ενζυμικό σύστημα μέρος του οποίου αποτελεί και το κυτόχρωμα P-450). Οι δυσμενείς επιδράσεις όμως εμφανίζονται σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τους μύκητες, πιθανόν λόγω διαφορετικής δομής του κυτοχρώματος P-450, οπότε και μειώνεται η χημική συγγένειά του με τους DMI's (Buchenauer, 1995).

A.2.4. Η Ανθεκτικότητα στους DMI's

Η σημασία των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης στερολών και ειδικότερα της ομάδας των παρεμποδιστών της απομεθυλίωσης του C-14 (DMI's), οδήγησε στην αξιολόγηση του κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικότητας σε αυτούς, σχεδόν ταυτόχρονα με την εισαγωγή και χρήση των πρώτων DMI's στη γεωργική πρακτική (Sisler, 1988).

Σε πρώτο βαθμό εργαστηριακά η αξιολόγηση του κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικότητας στους DMI's πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαφόρων παθογόνων μυκήτων, όπως οι *Ustilago maydis* (Barug & Kerkeaar, 1984), ο *Aspergillus nidulans* (de Waard & Sisler, 1976) και ο *Botrytis cinerea* (Μαρκόγλου & Ζιώγας, 1994).

Σειρά πειραμάτων (de Waard & Sisler, 1976; Orth, Henry, & Sisler, 1990; de Waard & Fuchs, 1982; Kalamarakis, Demopoulos, Ziogas, & Georgopoulos, 1989), έδειξε ότι η συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών στους DMI's στελεχών, είναι συνήθως σημαντικά μεγαλύτερη της συχνότητας εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών σε παρεμποδιστές άλλων χημικών ομάδων. Για παράδειγμα η συχνότητα μεταλλαγών στους DMI's έχει βρεθεί ότι είναι ως και 30 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με αυτήν των βενζιμιδαζολικών (Koller & Scheinpflug, 1987; Koller W. , 1988; de Waard M. , 1994).

Στις περισσότερες περιπτώσεις στελέχη ανθεκτικά σε έναν DMI είναι ανθεκτικά και σε άλλους DMI's, φαινόμενο γνωστό ως διαστραυρωτή ανθεκτικότητα, καθώς δρουν στο ίδιο βιοσυνθετικό στάδιο της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (de Waard & Fuchs, 1982; Sherald & Ragsdale, 1973; Μαρκόγλου & Ζιώγας, 1994), δίχως όμως να αποκλείονται και οι εξαιρέσεις (Georgopoulos, 1977; Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992).

Αρνητική διαστραυρωτή ανθεκτικότητα, παρατηρείται συχνά μεταξύ των DMI's και των μορφολινικών και άλλων συγγενικών πιπεριδιδικών και αλλυλαμινών, ομάδων που δρουν στη βιοσύνθεση στερολών, αλλά σε διαφορετικά στάδια από αυτό των DMI's (de Waard M. , 1994; de Waard, Groeneweg, & van Nistelrooy; Hollomon, Butters, & Clark, 1984; Barug & Kerkeaar, 1984).

Η φυτοπαθογόνος προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών, συνήθως είναι μειωμένη σε σχέση με τα μη ανθεκτικά στελέχη, πολλές φορές με βαθμό ανάλογο του επιπέδου της ανθεκτικότητας (de Waard & Fuchs, 1982; Buchenauer, 1995). Η μείωση αυτή σχετίζεται σε αρκετές περιπτώσεις με μειωμένο ρυθμό μυκηλιακής ανάπτυξης, μειωμένη παραγωγή και βλάστηση των κονιδίων του παθογόνου και

μειωμένη επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα. (Georgopoulos, 1977; Kalamarakis, Waard, Ziogas, & Georgopoulos, 1991; de Waard & van Nistelrooy, 1990). Και σε αυτήν την περίπτωση όμως ο κανόνας δεν είναι απόλυτος, αλλά υπάρχουν και εξαιρέσεις (de Waard & van Nistelrooy, 1990; de Waard, et al., 1993).

Σύμφωνα με τις έως τώρα μελέτες η ανθεκτικότητα στους DMI's φαίνεται να ελέγχεται από πολυγονικά συστήματα (Kalamarakis, Waard, Ziogas, & Georgopoulos, 1991; Kalamarakis, Demopoulos, Ziogas, & Georgopoulos, 1989) (Hollomon, Butters, & Clark, 1984; Stanis & Johnes, 1985; Wellman & Schauz, 1992). Αυτός ο πολυγονικός έλεγχος δύναται να εξηγήσει και τη σημαντική επίπτωση που έχει η ανθεκτικότητα στους DMI's στα διάφορα φυτοπαθογόνα χαρακτηριστικά των ανθεκτικών στελεχών. Βέβαια έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις ολογονικού ελέγχου της ανθεκτικότητας, δηλαδή ανθεκτικότητα που ελέγχεται από τη μετάλλαξη ενός μόνο γόνου, όπως είναι οι περιπτώσεις των *Erysiphae graminis* f.sp. *hordei* και *Nectaria haematococca* var. *curcubitae* (Kalamarakis, Waard, Ziogas, & Georgopoulos, 1991) στα τριαζολικά μυκητοκτόνα.

Από τα προηγούμενα μπορεί να εξαχθεί το θεωρητικό συμπέρασμα ότι εξαιτίας της μειωμένης προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών στελεχών, ο κίνδυνος εμφάνισής τους στον αγρό είναι μειωμένος. Άλλωστε πολλά σημαντικά παθογόνα μπορούν να αντιμετωπισθούν αποτελεσματικά με τη χρήση DMI's ακόμη και σήμερα δίχως προβλήματα. (de Waard M. , 1994; Rubella., Goswami, & Kistler, 2004) (Dekker, 1982; Staub, 1991; Kuck, 1994). Υπάρχουν όμως περιπτώσεις παθογόνων που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στους DMI's, εξαιτίας της συχνής και διαρκούς εφαρμογής τους στον αγρό. Τέτοια παραδείγματα δίδονται στον ακόλουθο πίνακα (Μαρκόγλου Α. , 1997), ενώ και για το παθογόνο *Fusarium graminearum* έχουν διαπιστωθεί ανθεκτικά στους DMI's στελέχη από απομονώσεις αγρού τόσο στη Γερμανία, όσο και στην Κίνα (Becher, Hettwer, Karlovsky, Deising, & Wirsal, 2009)

Παθογόνο	Δραστική ουσία
<i>Sphaerotheca fulginea</i>	fenarimol, imazalil, triforine
<i>Erysiphae graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	triadimenol
<i>Erysiphae graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	triadimenol
<i>Puccinia hordei</i>	triadimefon propiconazole
<i>Tilletia foetida</i>	imazalil
<i>Penicilium digitatum</i>	imazalil
<i>Venturia inaequalis</i>	myclobutanil
<i>Botrytis cinerea</i>	triadimenol
<i>Fusarium graminearum</i>	epoxiconazole, tebuconazole

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικές περιπτώσεις εμφάνισης ανθεκτικών στους DMI's στελεχών (Μαρκόγλου Α. , 1997; Becher, Hettwer, Karlovsky, Deising, & Wirsal, 2009)

Οι κύριοι μηχανισμοί εμφάνισης ανθεκτικότητας στους DMI's, αν και έχουν περιγραφεί και προηγουμένως, περιληπτικά είναι οι ακόλουθοι:

1) Μεταλλαγή της θέσης δράσης.

Στην περίπτωση των DMIs ο μηχανισμός αυτός εκδηλώνεται μέσω της τροποποίησης του ενζύμου της απομεθυλάσης του C-14 (CYP51), με την πρόκληση σημειακών μεταλλαγών στο γονίδιο που την κωδικοποιεί (*cyp51*). Μεταλλαγή του γονιδίου έχει αναφερθεί στην περίπτωση του *Uninuclea necator* (Deleye, Laigret, & Corio-Coset, 1997), *Erysiphae graminis* f.sp. *hordei* (Deleye, Bousset, & Corio-Costet, 1998) *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (Yan, Yang, Zhou, Duan, & Ma, 2009) και σε πλήθος άλλων παθογόνων (Butters, Zhou, & Hollomon, 2000; Mellando, Garcia-Effron, Alcazar-Fuoli, Cuenca-Estrella, & Rodriguez-Tudela, 2004; Chen, Li, li, Bu, & Wan, 2005).

2) Υπερέκφραση του γονιδίου και παραγωγή αυξημένων αντιγράφων του γονιδίου.

Αν και πρόκειται για δύο διαφορετικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας, έχουν την ίδια κατάληξη, καθώς τελικά το παθογόνο παράγει αυξημένες ποσότητες του κυτοχρώματος P-450. Έτσι για την καταπολέμηση του παθογόνου απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις του παρεμποδιστή (Hippe, 1984). Ο μηχανισμός αυτός έχει διαπιστωθεί μεταξύ άλλων σε είδη του γένους *Aspergillus* (Marichal, et al., 1997; Δούκας, 2010), το *Penicillium digitatum* (Hamamoto, et al., 2000), *Blumeria Jaarpii* (Ma, Proffer, Jacobs, & Sundin, 2006) και *Monilinia fructicola* (Luo & Schnabel, 2008).

3) Επιβίωση με κατώτερες στερόλες.

Πρόκειται για την ικανότητα διαφόρων ανθεκτικών στελεχών να επιβιώνουν με κατώτερες C-14 μεθυλστερόλες, εξαιτίας της μη λειτουργίας του ενζυμικού συστήματος απομεθυλίωσης του C-14. Πρόκειται όμως για στερόλες που δεν μπορούν να αντικαταστήσουν με πλήρη επιτυχία την εργοστερόλη στις κυτταρικές μεμβράνες, έχοντας αντίκτυπο στα φυτοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ανθεκτικών στελεχών, τα οποία υπολοίπονται σημαντικά του αγρίου πληθυσμού (Leroux & Gredt, 1984; Aoyama, et al., 1983; Aoyama, et al., 1987; King, Wiseman, Kelly, & Kelly, 1985).

4) Τροποποίηση της δομής των κυτταρικών τοιχωμάτων του παθογόνου.

Η τροποποίηση της δομής των κυτταρικών τοιχωμάτων του παθογόνου έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη είσοδο του παρεμποδιστή στο εσωτερικό του παθογόνου. (Wellman & Schauz, 1992; Wellma & Schauz, 1993; Ryder, Wilson, & Barrett-Bee, 1984).

5) Αυξημένη απέκκριση του παρεμποδιστή.

Πρόκειται για σύστημα ενεργούς απέκκρισης, το οποίο απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας και δεν επιτρέπει τη συσσώρευση του παρεμποδιστή σε επίπεδα θανάσιμα για το παθογόνο. Η αυξημένες απαιτήσεις σε ενέργεια έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της φυτοπαθογόνου ικανότητας των ανθεκτικών στελεχών (de Waar & van Nisterooy, 1984; Kapteyn, 1993).

6) Μεταβολισμός του παρεμποδιστή

Πρόκειται για τις περιπτώσεις εκείνες όπου ο παρεμποδιστής είτε δεν μεταβολίζεται στην τοξική του μορφή από το παθογόνο, οπότε και αδυνατεί να εκφράσει την τοξικότητά του (Kalamarakis, Demopoulos, Ziogas, & Georgopoulos,

1989), είτε μεταβολίζεται σε προϊόντα λιγότερο τοξικά από το παθογόνο (Gasztony & Josepovits, 1984).

A.3. Οι μυκοτοξίνες

Οι μυκοτοξινές είναι οργανικές ενώσεις μικρού συνήθως μοριακού βάρους, που παράγονται κατά τον δευτερογενή μεταβολισμό ορισμένων μυκήτων και είναι τοξικές στα ζώα και τον άνθρωπο. Πρόκειται για χημικές ενώσεις που χαρακτηρίζονται από υψηλή σταθερότητα του μορίου τους σε διάφορες φυσικοχημικές δυνάμεις που τείνουν να μεταβάλλουν τη χημική τους δομή.

Ετυμολογικά η ονομασία τους αποτελεί σύνθετη λέξη, με πρώτο συνθετικό τη λέξη μύκο- που προέρχεται από τη λέξη μύκητας και δεύτερο συστατικό τη λέξη -τοξίνη, προδίδοντας έτσι τόσο την προέλευσή τους, όσο και τις τοξικές επιδράσεις επί των διαφόρων οργανισμών. Οι ουσίες αυτές παράγονται από μύκητες διαφόρων ειδών, έχοντας ως κύριους εκπροσώπους τα γένη *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* και *Alternaria*.

Αρχικά θεωρούνταν ότι οι ενώσεις αυτές συνέβαλαν στην παθογένεια των μυκήτων, νεκρώνοντας τα κύτταρα του ξενιστή, υποβοηθώντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη μόλυνση. Σύμφωνα με νεότερες μελέτες κάποιες μυκοτοξίνες συμβάλλουν σε φαινόμενα μυκόστασης καθώς νεκρώνουν άλλους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο σημείο της μόλυνσης, βοηθώντας κατ' αυτόν τον τρόπο στην άμβλυνση του ανταγωνισμού, δίδοντας ζωτικό χώρο στο παθογόνο, ώστε να πραγματοποιήσει την επικείμενη μόλυνση στον ξενιστή.

Σήμερα περισσότερες από 200 ουσίες έχουν χαρακτηριστεί ως μυκοτοξίνες, Οι παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν το αν και σε ποια ποσά θα πρέπει να τεθούν όρια σε αυτές είναι:

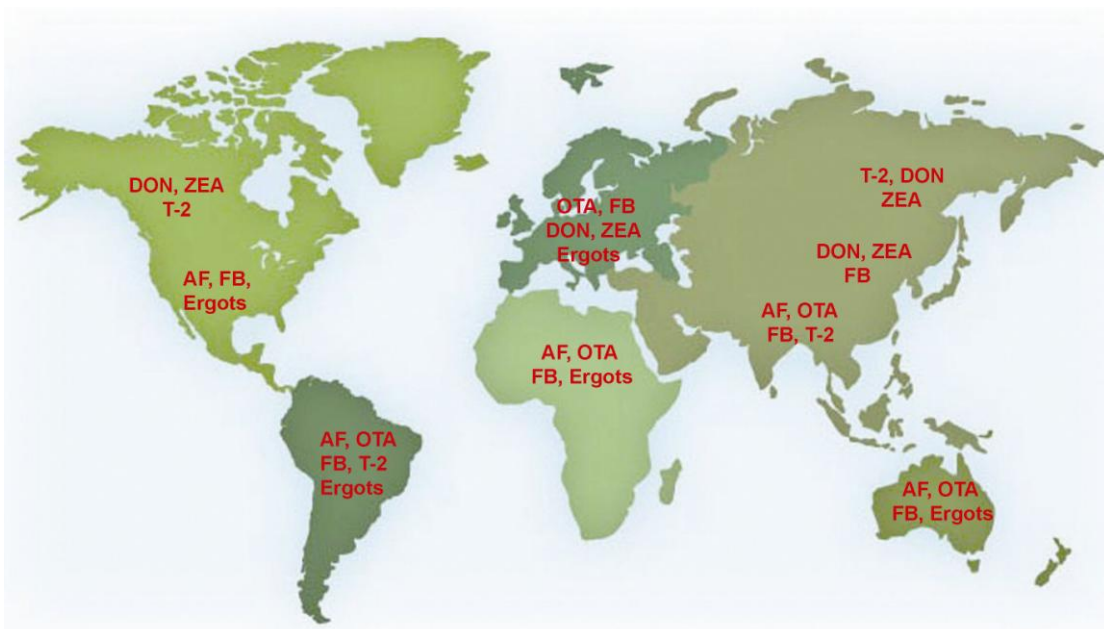
- Η ύπαρξη τοξικολογικών δεδομένων των μυκοτοξινών που να υποστηρίζουν την επικινδυνότητά τους.
- Η γνώση της γεωγραφικής κατανομής και των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη μυκοτοξινών σε δεδομένο μέρος.
- Η ύπαρξη κατάλληλων αναλυτικών μεθόδων για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των μυκοτοξινών.
- Η τυχόν θέσπιση ορίων σε άλλες χώρες
- Η ανάγκη για εξασφάλιση επαρκών ποσοτήτων σε τροφές

Οι πρώτοι δύο παράγοντες αφορούν τις απαραίτητες πληροφορίες όσον αφορά τον κίνδυνο των μυκοτοξινών και της έκθεσης σε αυτές, δίνοντας τις απαραίτητες πληροφορίες για την επαρκή αντιμετώπισή τους, μέσω των απαραίτητων

επιστημονικών εκτιμήσεων για την περίπτωση εμφάνισης προβλημάτων στην ανθρώπινη υγεία. Ο τρίτος και ο τέταρτος παράγοντας αποτελούν τα απαραίτητα στοιχεία, ώστε είναι δυνατή η εύρεση κατάλληλων μεθόδων για την ανίχνευσή τους στα τρόφιμα και αγροτικά προϊόντα. Οι τελευταίοι δύο αφορούν τις κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις στη λήψη ή μη ορίων για διάφορες μυκοτοξίνες.

Οκτώ είναι οι κύριοι μυκοτοξικογόνοι μύκητες οι οποίοι απαντώνται στα αγροτικά προϊόντα παγκοσμίως: οι *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *Penicillium verrucosum*, *P. expansum*, *Fusarium graminearum* και *Fusarium verticillioides* (Miller, 2002). Αντίστοιχα οι πέντε κυριότερες μυκοτοξίνες που απαντώνται στα αγροτικά προϊόντα είναι: η αφλατοξίνη που παράγεται κυρίως από τον *A. flavus*, η οχρατοξίνη που παράγεται κυρίως από τον *A. ochraceus* και το *Penicillium verrucosum*, η δεοξυनिβαλενόλη και ζεαραλενόνη που παράγονται κυρίως από τα είδη *Fusarium graminearum* και *Fusarium culmorum*, και τέλος η φουμανισίνη που παράγεται από το μύκητα *Fusarium verticillioides* (Miller, 1995).

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι μυκοτοξίνες απαντώνται σε αγροτικά προϊόντα ολόκληρης της υφελίου (Εικ.1), καθιστώντας σαφές το γεγονός ότι αποτελούν ένα παγκόσμιο πρόβλημα, το οποίο απαιτεί συντονισμένες δράσεις από το σύνολο των κρατών για την ορθή αντιμετώπισή τους.



Εικόνα 1 Παγκόσμια κατανομή των μυκοτοξινών (Don=δεοξυनिβαλενόνη, ZEA=ζεαραλενόνη, T-2=T-2 τοξίνη, AF₂=αφλατοξίνη AF₂, FB=φουμονισίνη B, OTA=οχρατοξίνη A, Ergots =εργοτιώδη αλκαλοειδή)

Οι μυκοτοξίνες αν και μόλις τη δεκαετία του '60 αποτέλεσαν αντικείμενο επιστημονικών ερευνών με την ανακάλυψη των αφλατοξινών (Blount, 1961), έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και ανάπτυξη επιδημιών κατά την πορεία της ανθρώπινης ιστορίας.

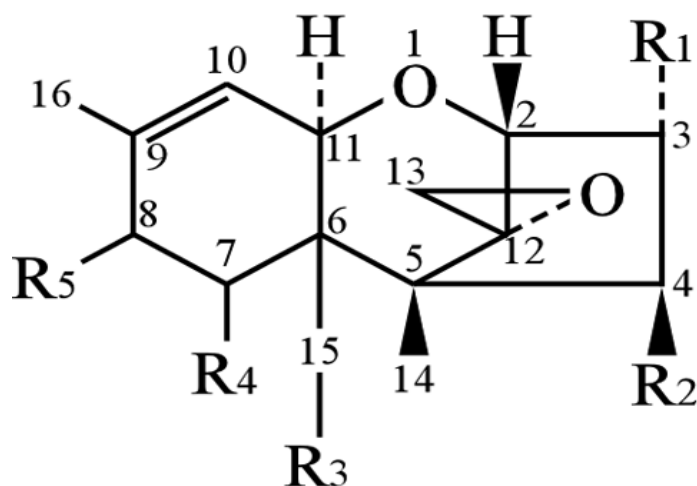
Το μεσαίωνα η κατανάλωση σιτηρών και των προϊόντων τους, που περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις αλκαλοϊδών, εξαιτίας της ανάπτυξης του παθογόνου μύκητα *Claviceps purpurea*, είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη εργοτίας, ασθένειας τότε γνωστής ως φωτιά του αγίου Αντωνίου (Matossian, 1989; van Rensburg & Altenkirk, 1974).

Γνωστή είναι και η περίπτωση της τροφικής τοξικής αλευκίας. Αρχικά αναφέρονταν περιστασιακά κατά τον 19^ο αιώνα στην κεντρική Ευρώπη και κυρίως τη Ρωσία. Η επιδημία που εκδηλώθηκε κατά τη δεκαετία του 1930, προκάλεσε το θάνατο περίπου 100,000 ανθρώπων στην περιοχή του Orenburg (Eriksen, 2003). Η επιδημία οφείλονταν στην κατανάλωση προϊόντων σιτηρών, τα οποία περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις τριχοθικινών και πιο συγκεκριμένα της τριχοθικίνης T-2. Αυτή η περιεκτικότητα οφείλονταν στη μόλυνση των σιτηρών από τα παθογόνα *Fusarium sporotricioides* και *Fusarium poe*.

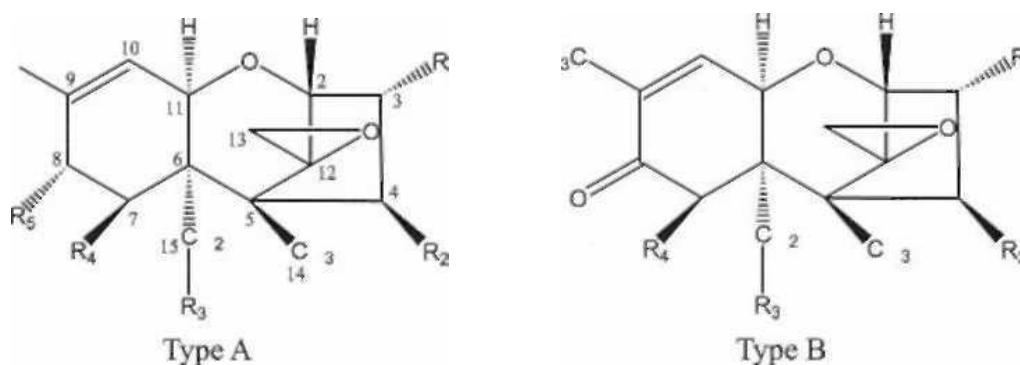
A.3.1. Οι τριχοθηκίνες

Οι τριχοθηκίνες αποτελούν τη σημαντικότερη ομάδα μυκοτοξινών που παράγονται από μύκητες του γένους *Fusarium*. Πέραν του γένους αυτού όμως, δύνονται να παράγουν τριχοθηκίνες και άλλα γένη μυκήτων όπως είναι τα *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, και *Verticimonosporium* (Betina, 1993). Αποτελούν μια ομάδα μη πτητικών, μικρού μοριακού βάρους (M.B.= 250–550), εποξειδικών σεσκιτερπενίων (τερπένια με 15 άτομα άνθρακα), που φέρουν τον εποξειδικό τους δακτύλιο στους άνθρακες 12-13, ένα διπλό δεσμό μεταξύ των ανθράκων 9-10, ενώ αναλόγως των υπολοίπων υποκαταστατών τους μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 4 υποομάδες (Organization, 1990):

- 1) Τύπου Α: με υποκαταστάτη διαφορετικό αυτού της κετόνης στον άνθρακα 8
- 2) Τύπου Β: με υποκαταστάτη καρβονύλιο στον άνθρακα 8
- 3) Τύπου Γ: με δεύτερο εποξειδικό δακτύλιο στους άνθρακες 7-8 ή 9-10
- 4) Τύπου Δ: με μακροκυκλικό δακτύλιο μεταξύ των ανθράκων 4-15 με δύο εστερικούς δεσμούς



Εικόνα 2: Γενική χημική δομή των τριχοθηκινών



	Όνομα	Υποκαταστάτης					MW
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	
Τύπου Α τριχοθηκίνες	HT-2 toxin (HT-2)	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	424
	T-2 toxin (T-2)	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	466
	Diacetoxyscirpenol (DAS)	OH	OAc	OAc	H	H	366
Τύπου Β τριχοθηκίνες	Deoxynivalenol (DON)	OH	H	OH	OH	-	294
	3-Acetyl-deoxynivalenol (3-ADON)	OAc	H	OH	OH	-	338
	15-Acetyl-deoxynivalenol (15-ADON)	OH	H	OAc	H	-	338
	Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH	-	312
	Fusarenon-X (FUS-X)	OH	OAc	OH	OH	-	354

Σχημα 1: Χημική δομή των τριχοθηκινών τύπου Α και τύπου Β (Novalina & Lahey, 2005)

Από μυκοτοξικολογική άποψη ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι τριχοθηκίνες τύπου Α που είναι και οι τοξικότερες και οι τριχοθηκίνες τύπου Β που είναι και οι πολυπληθέστερες (Larsen, Hunt, Perin, & Ruckebauer, 2004; D’Mello, Placinta, & Macdonald, 1999). Κύριοι εκπρόσωποι των τύπου Α τριχοθηκινών αποτελούν η T-2 τοξίνη και η HT-2 τοξίνη, ενώ αντίστοιχα κύριοι εκπρόσωποι των τύπου Β τριχοθηκινών αποτελούν η δεοξυνιβαλενόλη (DON) και οι κύριοι μεταβολίτες της 3Ακέτυλο-Δεοξυνιβαλενόνη (3AcDON) και 15Ακέτυλο-Δεοξυνιβαλενόνη (15AcDON), καθώς και η νιβαλενόλη (NIV). Έχει βρεθεί ότι τα διάφορα είδη φουζαρίων εμφανίζουν εκλεκτικότητα όσον αφορά το είδος της παραγόμενης

τριχοθηκίνης. Κύριοι παραγωγοί τύπου Α τριχοθηκινών είναι κυρίως τα είδη *Fusarium sporotricoides* και *Fusarium poe*, ενώ τύπου Β τριχοθηκίνες παράγονται κυρίως από τα είδη *Fusarium graminearum* και *Fusarium culmorum*.

Η πρώτη τριχοθηκίνη που ανακαλύφθηκε ονομάστηκε τριχοθεσίνη, δίνοντας το όνομα σε ολόκληρη την κατηγορία αυτών των μυκοτοξινών. Απομονώθηκε από το παθογόνο *Trichothecium roseum*, από το οποίο και πήρε το όνομά της και περιγράφηκε το 1949 από τους Freeman and Morrison. Έπειτα άνω των 180 τριχοθηκινών και παραγώγων τους έχουν ανακαλυφθεί έως σήμερα (Eriksen, 2003; Eriksen & Pettersson, 2004).

Οι τριχοθηκίνες είναι αδιάλυτες στο νερό, αλλά με υψηλή διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες όπως η ακετόνη, το χλωροφόρμιο, η αιθανόλη, η μεθανόλη, ο αιθυλεστέρας και το διμεθυλικό σουλφοξείδιο (DMSO) (Cole & Cox, 1981). Είναι σταθερές σε υψηλές θερμοκρασίες και δύσκολα αποδομούνται κατά την επεξεργασία των τροφίμων (Lancova, et al., 2008). Είναι σταθερές και σε συνθήκες ουδέτερου και οξικού pH, ενώ ταυτόχρονα δεν υδρολύονται στο στομάχι μετά την κατάποση (Rocha, Ansar, & Doohan, 2005). Αντίθετα μπορούν να απενεργοποιηθούν υπό ισχυρά αλκαλικές συνθήκες, συνθήκες κατάλληλες να διασπάσουν τον εποξειδικό δακτύλιο των τριχοθηκινών (Sudakin, 2003).

A.3.1.1 Τοξικότητα των τριχοθηκινών

Η τοξική δράση των τριχοθηκινών οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη του χαρακτηριστικού εποξειδικού δακτυλίου, και δευτερευόντως στην ύπαρξη του διπλού δεσμού στους άνθρακες 9-10, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι το σπάσιμο του εποξειδικού δακτυλίου έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της μυκοτοξικογόνου ικανότητας των μορίων (Pestka & Smolinski, 2005; Sudakin, 2003; Rocha, Ansar, & Doohan, 2005; Eriksen, 2003; Bamburg, 1976; Uenno, 1977).

Η τοξικογόνος δράση των τριχοθηκινών αν και δεν είναι ακόμη απόλυτα κατανοητός, φαίνεται να σχετίζεται με την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης πρωτεϊνών, της βιοσύνθεσης του DNA και του RNA, στην παρεμπόδιση διαφόρων μιτοχονδριακών λειτουργιών, καθώς και στην παρεμπόδιση διαφόρων λειτουργιών του κυττάρου και των μεμβρανών. Νεότερες έρευνες έχουν δείξει ότι αυτή η

παρεμπόδιση των πρωτεϊνών οφείλεται στη σύνδεση της τοξίνης με το ένζυμο πεπτιδική τρανσφεράση, το οποίο αποτελεί τμήμα του 60s ριβοσωματικής υπομονάδος των ριβοσωμάτων των θηλαστικών. Ειδικότερα οι τριχοθηκινών επάγουν την παραγωγή τρυπτοφάνης, που με τη σειρά της αυξάνει την παραγωγή σεροτονίνης. Διαταράσσουν καταυτόν τον τρόπο τη δράση της τελευταίας στο κεντρικό νευρικό σύστημα, η οποία φαίνεται να συσχετίζεται με τα προβλήματα στην ορθή διατροφή των ζώων που παρουσιάζουν όταν καταναλώσουν τροφές με υψηλή περιεκτικότητα σε τριχοθηκίνες (Eriksen & Pettersson, 2004; Technology, 2003). Σε πειράματα διατροφής, τρωκτικά στα οποία χορηγήθηκαν τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε τριχοθηκίνες βρέθηκε ότι οι τριχοθηκίνες έχουν και τερατογόνο δράση, δεν παρατηρήθηκε όμως τυχόν ογκογόνος δράση (Press, 1983)

Η κατανάλωση τροφών με υψηλή περιεκτικότητα σε τριχοθηκίνες, προκαλούν συμπτώματα όπως η απώλεια βάρους, ο μειωμένος μεταβολισμός των τροφών, αυξημένη διάρροια, έντονη δερματίτιδα, μειωμένη παραγωγή αυγών στα πουλικά, αυξημένα ποσοστά αποβολών και τελικώς η κατάρρευση και ο θάνατος των ζώων (Osweiler, 1986). Σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα έχει βρεθεί ότι η έκθεση σε τριχοθηκίνες οδηγεί σε απόπτωση διαφόρων οργάνων των οργανισμών (Eriksen, 2003; Rocha, Ansar, & Doohan, 2005; Pestka, 2007). Οξεία τοξικότητα των τριχοθηκινών είναι υπεύθυνη για την εκδήλωση συμπτωμάτων όπως λευκοκύτωση, αιμορροΐδες, κυκλοφοριακό σοκ και θάνατο. Αντίθετα χρόνια τοξικότητα σχετίζεται με ανορρεξία, μειωμένο βάρος των ζώων, μειωμένο μεταβολισμό των τροφών καθώς και με επιπτώσεις στο νευρικό και ανοσοποιητικό σύστημα.

Τα συμπτώματα αλλά και η ευαισθησία των διαφόρων οργανισμών στην επίδραση των τριχοθηκινών εξαρτώνται τόσο από το είδος της τριχοθηκίνης, όσο και από τον οργανισμό.

A.3.1.2 Βιοσύνθεση των τριχοθηκινών

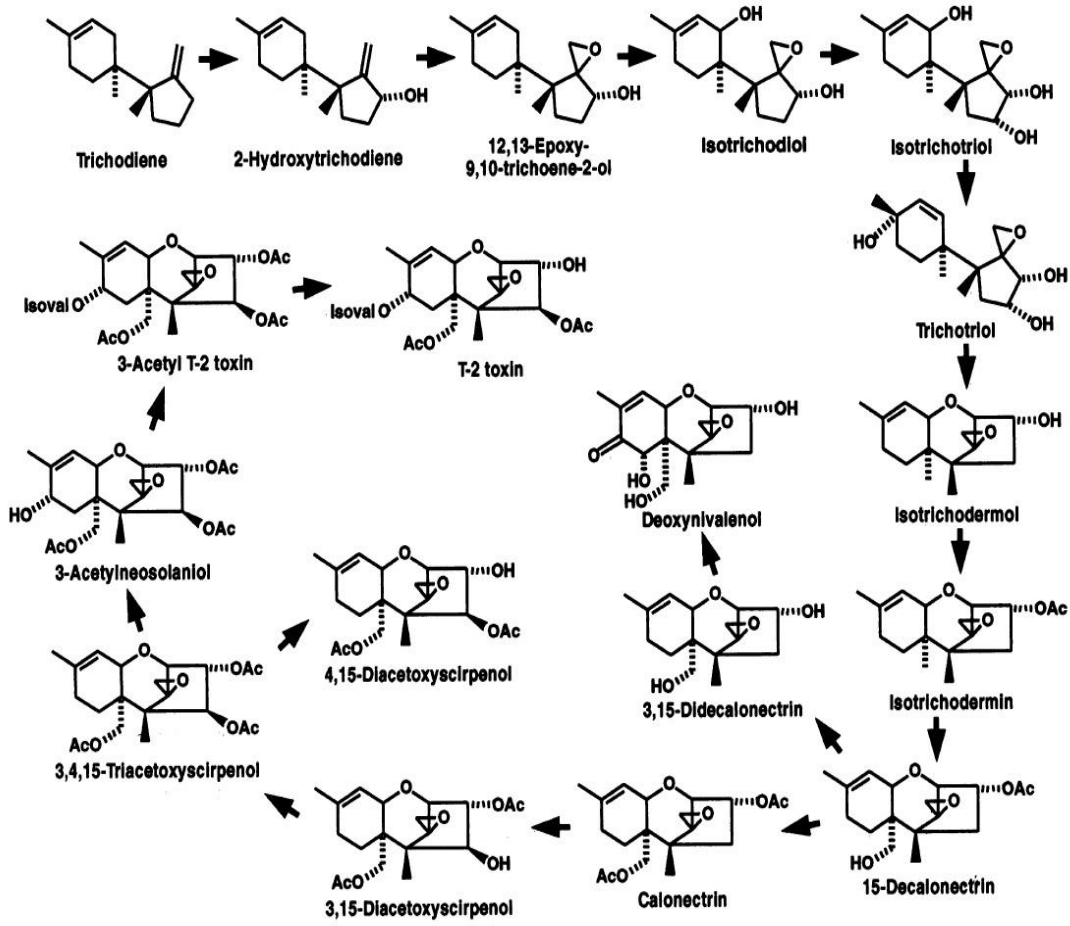
Η σημασία των τριχοθηκινών ώθησε στην εξεύρεση της πορείας βιοσύνθεσής τους, η οποία και είναι γνωστή σε ικανοποιητικό βαθμό. Η όλη διαδικασία, καθώς και τα πειράματα που οδήγησαν στην εύρεσή της, αναφέρονται με λεπτομέρεια από τους Desjardinis et al (Desjardinis, Hohn, & McCormick, 1993). Σε γενικές γραμμές η πορεία της βιοσύνθεσης των τριχοθηκινών έχει ως εξής:

Αρχικά τρία μόρια οξικού οξέος συμπυκνώνονται και δίνουν μεβαλονικό. Από αυτό και μέσω σειράς βιοχημικών αντιδράσεων παράγεται το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο. Με την κυκλοποίηση του μορίου αυτού βιοσυντίθεται το τριχοδιένιο, το πρόδρομο μόριο των τριχοθηκινών, διαδικασία που καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση του τριχοδιενίου. Μετά από μια σειρά οξυγονώσεων, ισομεριώσεων, κυκλοποιήσεων, και εστεροποιήσεων των διαφόρων ενδιάμεσων προϊόντων, παράγεται το μόριο της 15-δεκαλονεκτρίνης. Από το στάδιο αυτό και έπειτα η βιοσυνθετική οδός των τριχοθηκινών διαχωρίζεται, αναλόγως της ομάδας των παραγόμενων τριχοθηκινών.

Από το μόριο της 15-δεκαλονεκτρίνης η βιοσύνθεση δύναται να ακολουθήσει δύο μονοπάτια, αυτό που θα δώσει το μόριο της 3,15-Διδεκαλονεκτρίνης, το πρόδρομο μόριο της δεοξυνιβαλενόνης και των λοιπών τύπου-B τριχοθηκινών, καθώς και αυτό που θα δώσει το μόριο 3,15-Διακετοξυσκιρπενόλη, το πρόδρομο μόριο των τύπου-A τριχοθηκινών. Το πιο από τα δύο αυτά στάδια της βιοσύνθεσης θα ακολουθηθεί, σχετίζεται αποκλειστικά με το είδος του μύκητα, αν και η όλη διαδικασία δεν είναι απολύτως γνωστή.

Τα ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των τριχοθηκινών, πέραν αυτού της συνθετάσης του τριχοδιενίου, δεν είναι γνωστά, καθώς πρόκειται για μόρια ασταθή και δύσκολα όσον αφορά την απομόνωσή τους. Παρ' όλα αυτά σύμφωνα με αποτελέσματα πειραμάτων χρήσης ενεργού οξυγόνου, υποστηρίζεται ότι τα ένζυμα που συμμετέχουν στις οξυγονώσεις κατά τη βιοσύνθεση των τριχοθηκινών, είναι μονοξυγενάσες ή διοξυγενάσες και συγκεκριμένα μονοξυγενάσες του κυτοχρώματος P-450. Πειράματα δε, με παρεμποδιστές του κυτοχρώματος P-450 παρεμπόδισαν σε σημαντικό βαθμό και τη βιοσύνθεση των τριχοθηκινών, ενισχύοντας την εικασία αυτή (Desjardins, Plattner, & Beremand, 1987; Desjardins, Plattner, & Spencer, 1988; Hesketh, Gledhill, Marsh, Bycroft, Dewick, & Gilbert, 1990).

Από τα προηγούμενα προκύπτει ότι τα καθοριστικά στάδια για την παραγωγή των τριχοθηκινών είναι αφενός η παραγωγή του τριχοδιενίου, το οποίο αποτελεί και το πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση των τριχοθηκινών, καθώς και αυτό της παραγωγής 15-δεκαλονεκτρίνης, από το οποίο θα εξαρτηθεί ποια ομάδα τριχοθηκινών θα παραχθεί από τον οργανισμό.



Εικόνα 3: Πορεία βιοσύνθεσης των τριχοθηκινών (Desjardinis, Hohn, & McCormick, 1993)

A.3.1.3 Σημασία των τριχοθηκινών

Οι τριχοθηκίνες απαντώνται συχνά σε καλλιέργειες σιτηρών στις διάφορες περιοχές της Ευρώπης, της Αμερικής της Αφρικής και της Ασίας. Στον ακόλουθο πίνακα δίνονται διάφορες τριχοθηκίνες που έχουν βρεθεί σε προϊόντα ανά την υφήλιο κατά τα έτη 1999-2008 (Yazar & Omurtag, 2008).

Πίνακας 1: τριχοθηκίνες σε προϊόντα ανά την υφήλιο κατά τα έτη 1999-2008 (**DON:** δεοξυνυβαλενόνη, **NIV:** νιβαλενόνη, **T-2:** T-2 τοξίνη, **HT2:** HT2 τοξίνη, **FUS-X:** Fusarin -x, **ZEA:** Ζεαραλενόνη, **DAS:** διακετοξυσκιρπενόλη, **TTCs:** τριχοθηκίνες).

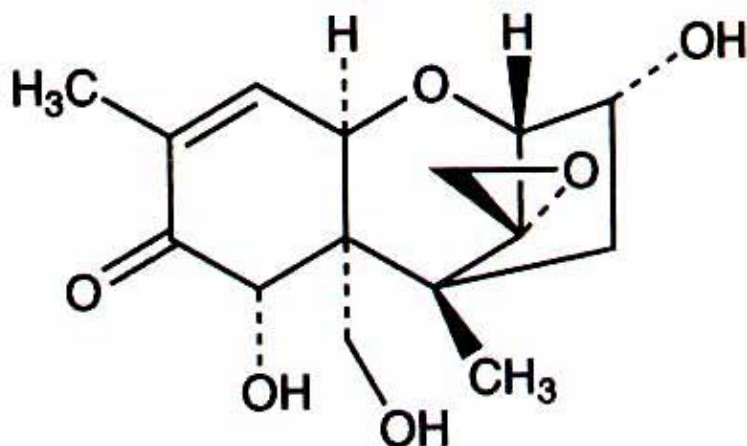
Προϊόν	Ανίχνευση/Σύνολο δειγμάτων	Όρια	Χώρες
Αραβόσιτος	DON: 0/38 ZEA: 0/38	DON: nd ZEA: nd	Αργεντινή
Αραβόσιτος	DON: 0/78 NIV: 0/78 DAS: 0/78 T-2: 1/78 HT-2: 1/78	DON: nd-60 ng/g NIV: nd-40 ng/g DAS: 20-120 ng/g T-2: 20-100 ng/g HT-2: 20-100 ng/g	Βραζιλία
Αραβόσιτος	DON: 3/4 NIV: 3/4	DON: 0.065 µg/g NIV: 0.13 µg/g	Πολωνία
Αραβόσιτος	DON: 8/40 DAS: 1.5/17	DON: 204-745 µg/kg DAS: 23-51 µg/kg	Νιγηρία
Αραβόσιτος	NIV: 6/31 DON: 6/31 FUS-X: 5/31 ZEA: 5/31	NIV: 12-2440 ng/g DON: 5-2060 ng/g FUS-X: 26-420 ng/g ZEA: nd-384 ng/g	Ιταλία (Κεντρική Ιταλία)
Αραβόσιτος	NIV: 1/11 DON: 11/11 FUS-X: 1/11 ZEA: 17/11	NIV: 200 ng/g DON: 45-3430 ng/g FUS-X: 34 ng/g ZEA: nd-969 ng/g	Ιταλία (Βόρειο-δυτική Ιταλία)
Αραβόσιτος	NIV: 0/4 DON: 3/4 FUS-X: 0/4 ZEA: 0/4	NIV: nd DON: 68-967 ng/g FUS-X: nd ZEA: nd	Ιταλία (κουιάδα Πο)

Αραβόσιτος	DON: 4/21 ZEA: 11/23	DON: nd- 834.4 µg/kg ZEA: nd- 2564.8 µg/kg	Αργεντινή
Αραβόσιτος	T-2: 8/30	T-2: 0.45-1.70 ppm	Τουρκία
Αραβόσιτος	DON: 47/175 NIV: 7/175	DON: 26.1-131.7 µg/kg NIV: 51.1-106.5 µg/kg	Ισπανία
Αραβόσιτος	ZEA: 3/20	ZEA: 12-17 µg/kg	Μαρόκο
Αραβόσιτος	TTCs: 42/196	TTCs: <2-600 µg/kg	Σαουδική Αραβία
Αραβόσιτος	ZEA: 10/10	ZEA: 20-50 µg/kg	Ακτή του Ελεφαντοστού
Αραβόσιτος	ZEA: 41/49	ZEA: 0.9-2.54 µg/kg	Κροατία
Αραβόσιτος	DON: 0/6 ZEA: 0/6 NIV-HT-2: 0/6	DON: nd ZEA: nd NIV-HT-2: nd	Καναδάς
Σιτάρι	DON: 58.8/60 NIV: 7.2/60 HT-2: 4.2/60 T-2: 1.2/60 ZEA: 22.8/60 FUS-X: 0/60	DON: 15-1379 µg/kg NIV: 25-40 µg/kg HT-2: 12 µg/kg T-2: 4 µg/kg ZEA: 1-24 µg/kg FUS-X: 0	Γερμανία
Σιτάρι	DON: 108/121 NIV: 57/120 HT-2: 6/36 T-2: 11/38 ZEA: 10/30	DON: 10-2591 µg/kg NIV: 10-234 µg/kg HT-2: nd-33 µg/kg T-2: nd-153 µg/kg ZEA: 1-2 µg/kg	Δανία
Σιτάρι	DON: 8/12	DON: 0.01 µg/g	Πολωνία
Σιτάρι	DON: 144/150 ZEA: 32/100	DON: Tr-642 µg/kg ZEA: Tr-95.6 µg/kg	Λιθουανία
Σιτάρι	T-2: 0/3	T-2: nd	Τουρκία
Σιτάρι	TTCs: 0/1 DON: 23.17/169	TTCs: nd DON: 350 µg/kg (max)	Σαουδική Αραβία
Σιτάρι	NIV: 0/169 HT-2: 1.86/169 T-2: 1.24/169	NIV: 10 µg/kg (max) HT-2: 20 µg/kg (max) T-2: 20 µg/kg (max)	Νορβηγία
Σιτάρι	ZEA: 22/24	ZEA: 11-860 µg/kg	Γερμανία

Κριθάρι	DON: 10/10 NIV: 10/10	DON: 0.025 µg/g NIV: 0.04 µg/g	Πολωνία
Κριθάρι	DON: 53/55 ZEA: 38/66	DON: Tr-372 µg/kg ZEA: Tr-193.4 µg/kg	Λιθουανία
Κριθάρι	DON: 157.45/292	DON: 500-10.000 µg/kg	Ουρουγουάη
Κριθάρι	TTCs: 8/93 DON: 17.6/102	TTCs: 3.1-4.000 µg/kg DON: 1440µg/kg (max)	Σαουδική Αραβία
Κριθάρι	NIV: 11.2/102 HT-2: 39.78/102 T-2: 8.16/102	NIV: 50 µg/kg (max) HT-2: 440 µg/kg (max) T-2: 220 µg/kg (max)	Νορβηγία
Κριθάρι	DON-NIV: 41/84 DON: 29/50	DON-NIV: 40-2340 µg/kg DON: 980 ng/g (max)	Εθιοπία
Κριθάρι	ZEA: 4/29 NIV-HT-2: 0/75 HT-2: 24/99	ZEA: 22 ng/g (max) NIV-HT-2: nd HT-2: 10-47 µg/kg	Καναδάς
Βρώμη	T-2: 15/99 ZEA: 19/99 DON: 12/12 NIV: 12/12	T-2: 10-703 µg/kg ZEA: 10-118 µg/kg DON: 0.027 µg/g NIV: 0.033 µg/g	Πολωνία
Βρώμη	DON: 13/14 ZEA: 4/7 T-2: 10/10	DON: Tr-204 µg/kg ZEA: Tr-16.3 µg/kg T-2: 10.8-121.5 µg/kg	Λιθουανία
Βρώμη	T-2: 0/1 HT-2: 24/99	T-2: nd HT-2: 10-47 µg/kg	Τουρκία
Βρώμη	T-2: 15/99 DAS: 12/99	T-2: 10-703 µg/kg DAS: 10-118 µg/kg	Πολωνία
Βρώμη	TTCs: 0/3 DON: 101.96/178	TTCs: nd DON: 849 µg/kg (max)	Σαουδική Αραβία
Βρώμη	NIV: 17.6/178 HT-2: 124.04/178 T-2: 53.32/178 DON: 33/53	NIV: 211 µg/kg (max) HT-2: 880 µg/kg (max) T-2: 380 µg/kg (max) DON: 90 ng/g (max)	Νορβηγία
Βρώμη	ZEA: 0/6 NIV-HT-2: 0/53-0/53	ZEA: nd NIV-HT-2: nd	Καναδάς
Σίκαλη	DON: 10/10 NIV: 5/10	DON: 0.023 µg/g NIV: 0.002 µg/g	Πολωνία

Σίκαλη	DON: 14/16 ZEA: 0/10 DON: 41/69 NIV: 9/69	DON: Tr-691 µg/kg ZEA: 0-28.8 µg/kg DON: 10-257 µg/kg NIV: nd-48 µg/kg	Λιθουανία
Σίκαλη	HT-2: 11/26 T-2: 12/25 ZEA: 2/30	HT-2: 10-70 µg/kg T-2: nd-193 µg/kg ZEA: 1-2 µg/kg	Δανία
Σίκαλη	DON: 3/88 NIV: 5/88 ZEA: 3/88	DON: 105- 159 ng/g NIV: 182- 462 ng/g ZEA: 21.7- 47.0 ng/g	Κορέα
Σίκαλη	TTCs: 0/2	TTCs: nd	Σαουδική Αραβία
Σίκαλη	ZEA: 10/10 DON: 0/9	ZEA: 50-200 µg/kg DON: nd	Ακτή του Ελεφαντοστού
Σίκαλη	ZEA: 1/7 NIV-HT-2: 0/27	ZEA: 1 ng/g (max) NIV-HT-2: nd	Καναδάς
Δημητριακά	DAS: 0/69	DAS: nd- 0.8 µg/g	Τουρκία
Δημητριακά	DON: 169.68/202	DON: 0.007-0930 µg/g	Ιταλία
Δημητριακά	T-2: 2/30 DON: 12/12	T-2: 1.60-33.30 ppm DON: 16-51 450 µg/kg	Τουρκία
Δημητριακά	NIV: 10/12 ZEA: 10/12 DON: 54/68	NIV: 10-6935 µg/kg ZEA: 46-3079 µg/kg DON: 5-111 µg/kg	Κίνα
Δημητριακά	NIV: 3/68 HT-2: 2/68 DON: 126/169 NIV: 0.21/4	NIV: 10-20 µg/kg HT-2: 10-20 µg/kg DON: 15-1670 µg/kg NIV: 25-231 µg/kg	Φινλανδία
Δημητριακά	FUS-X: 0 HT2: 11.38/43 T-2: 1.43/10	FUS-X: nd HT-2: 12-51 µg/kg T-2: 4-39 µg/kg	Γερμανία

A.3.1.4 Η δεοξυβαλενόλη (DON)



Εικόνα 4: Χημικός τύπος της Δεοξυνιβαλενόνης

A.3.1.4.1 Γενικές πληροφορίες

Η δεοξυνιβαλενόνη (DON) αποτελεί τον κυριότερο εκπρόσωπο των τύπου Β τριχοθηκινών, καθώς είναι η συχνότερη που απαντάται στα προϊόντα των σιτηρών, τα οποία προορίζονται τόσο για ανθρώπινη κατανάλωση, όσο και για την κτηνοτροφία (Eriksen & Pettersson, 2004; Wijnands & van Leusden, 2000). Είναι ευρύτερα γνωστή και ως βομιτοξίνη (vomitoxin), εξαιτίας του κυρίου συμπτώματος (εμετός) που προκαλείται στα οικόσιτα ζώα και κυρίως στους χοίρους, από την κατανάλωση τροφών που περιείχαν τη μυκοτοξίνη

Κύριοι παραγωγοί της δεοξυνιβαλενόνης είναι τα είδη *Fusarium graminearum* και *Fusarium culmorum* (Pestka & Smolinski, 2005; Eriksen, 2003; Eriksen & Pettersson, 2004), με το *Fusarium graminearum* να ευδοκίμει σε θερμότερα κλίματα με μέση ετήσια θερμοκρασία της τάξης των 25⁰C, το δε *Fusarium culmorum* να ευδοκίμει σε ψυχρότερα κλίματα μέσης θερμοκρασίας της τάξης των 21⁰C (Moss, 2002).

Χαρακτηριστικό του μορίου της δεοξυνιβαλενόνης είναι τη σταθερότητά του, όσον αφορά τη διακύμανση στη θερμοκρασία, καθώς ανθίσταται σε θερμοκρασίες ως και 240⁰C, στην οποία παρουσιάζει μείωση της τάξης του 20% σε σχέση με την

αρχική της συγκέντρωση στο δείγμα (Samar, Resnik, González, Pacin, & Castillo, 2007). Είναι μόριο σταθερό σε ήπιο οξικό περιβάλλον, αλλά σχετικά ασταθές σε ήπιο αλκαλικό περιβάλλον (Larsen, Hunt, Perin, & Ruckebauer, 2004).

Στα προϊόντα απαντάται τόσο στην κύρια μορφή της, αυτή της δεοξυνιβαλενόνης, όσο και με τα κύρια παράγωγά της. Αναλόγως του ποια είναι τα κύρια παράγωγα που απαντώνται στα προϊόντα, τα στελέχη του παθογόνου *Fusarium graminearum* μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες-χημειότυπους. **Χημειότυπος I:** Στελέχη που παράγουν δεοξυνιβαλενόνη και ως κύριο μεταβολίτη το παράγωγο 3-ακέτυλο-δεοξυνιβαλενόνη (3AcDON), **Χημειότυπος II:** Στελέχη που παράγουν δεοξυνιβαλενόνη και ως κύριο μεταβολίτη το παράγωγο 15-ακέτυλο-δεοξυνιβαλενόνη (15AcDON) και **Χημειότυπος III:** Στελέχη που παράγουν δεοξυνιβαλενόνη και τη μυκοτοξίνη νιβαλενόνη. Η κατηγοριοποίηση των στελεχών σε αυτούς τους τρεις χημειότυπους δεν είναι καθολικώς αποδεκτή, εξαιτίας του γεγονότος ότι το ίδιο στέλεχος σε διαφορετικές συνθήκες και ξενιστή, μπορεί να αλλάξει όσον αφορά την κύρια παραγωγή του κυρίου μεταβολίτη. Για παράδειγμα ενώ ένα στέλεχος παράγει κυρίως το μεταβολίτη 3AcDON, δύναται υπό συνθήκες να παράγει τον 15AcDON (Larsen, Hunt, Perin, & Ruckebauer, 2004; Miller, Greenhalgh, Wang, & Lu, 1991; Ward, Bielawski, Kistler, Sullivan, & O'Donnell, 2002).

A.3.1.4.2. Τοξικότητα Δεοξυνιβαλενόνης

Η τοξική δράση της δεοξυνιβαλενόνης αν και δεν είναι πλήρως γνωστή, φαίνεται να οφείλεται στη πρόσδεσή της στις ριβοσωμικές υπομονάδες, προκαλώντας κατ' αυτόν τον τρόπο παρεμπόδιση της πρωτεϊνοσύνθεσης, καθώς και της έκφρασης πρωτεϊνικών κινασών που εμπλέκονται στη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης. Διαδικασίες που με τη σειρά τους εμπλέκονται στη σεροτονεργική δραστηριότητα του περιφερειακού και κεντρικού νευρικού συστήματος, έχοντας ως αποτέλεσμα την εκδήλωση συμπτωμάτων που σχετίζονται με την ορθή διατροφή και θρέψη του οργανισμού (Pestka & Smolinski, 2005).

Τα κύρια συμπτώματα από την οξεία τοξικότητα στους ευαίσθητους οργανισμούς είναι γαστρικές διαταραχές, αυξημένη σιαλόρροια, αδιαθεσία, δοιάρεια, έμετο και ανορεξία. Σε περιπτώσεις χρόνιας τοξικότητας τα συμπτώματα αφορούν και απώλεια

βάρου, της επάρκειας σε θρεπτικά στοιχεία, της ανορεξίας και τελικώς σε ακραίες περιπτώσεις το θανάτου του οργανισμού (Yazar & Omurtag, 2008). Θεωρείται, όπως όλες οι τύπου Β τριχοθηκίνες, λιγότερο τοξική σε σχέση με τις τύπου Α τριχοθηκίνες (T-2, HT-2). Παρόλα αυτά εμφανίζει αθροιστική δράση, έχοντας ως αποτέλεσμα σημαντική χρόνια τοξικότητα (Pestka, 2007).

Όλα τα είδη ζώων θεωρούνται ευαίσθητα στην επίδραση της δεοξυνιβαλενόνης, με την ευαισθησία να εξαρτάται κυρίως στις διαφορές μεταξύ των ειδών όσον αφορά τον τρόπο λήψης μολυσμένων με δεοξυνιβαλενόνη προϊόντων, την απορρόφηση της δεοξυνοβαλενόνης από τον οργανισμό, καθώς και το μεταβολισμό και αποδόμησή της από τους οργανισμούς. Με τις έως τώρα μελέτες, οι πλέον ευαίσθητοι οργανισμοί είναι οι χοίροι, με τα αρσενικά άτομα είναι πιο ευαίσθητα σε σχέση με τα θηλυκά. (Pestka & Smolinski, 2005; technology, 2003).

Πέραν των δυσμενών επιπτώσεων στους οργανισμούς μελέτες έχουν δείξει και φυτοτοξική δράση της δεοξυνιβαλενόνης, συμβάλλοντας κατ' αυτόν τον τρόπο στην παθογένεια του ειδών που την παράγουν, όπως είναι το *Fusarium graminearum* και το *F. culmorum* (Miller & Young, 1985; Desjardins, Spencer, Plattner, & Beremand, 1989; Shimada & Otani, 1990; Xu, Yao, & Fang, 1990; Scholbrock, Fleener, & Berry, 1992; Cosette & Miller, 1995; McClean, 1996). Τα συμπτώματα που προκαλούνται από τη δράση της δεοξυνιβαλενόνης είναι χλώρωση και νέκρωση των προσβεβλημένων ιστών καθώς και τελικά μάρανση και νέκρωσή τους.

Όρια για τη δεοξυνιβαλενόνη δεν έχουν θεσπιστεί. Παρ' όλα η Ευρωπαϊκή Ένωση προτείνει στα κράτη μέλη όρια για διάφορα προϊόντα, όπως (FAO/WHO, 2003). 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ για μη επεξεργασμένο σκληρό σίτο, κριθάρι και αραβόσιτος, 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ για άλλα μη επεξεργασμένα σιτηρά, 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ για άλευρο ολικής αλέσεως, πίτουρα και ξηρά ζυμαρικά, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ για σιτηρά και λοιπών προϊόντων τους για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ για δημητριακά και σνακ αραβοσίτου και τέλος 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ για δημητριακά και προϊόντα για τη βρεφική κατανάλωση

Το 1993 η IARC (International Agency Research Cancer) εκτίμησε τη δεοξυνιβαλενόνη ως πιθανό καρκινογόνο μόριο και την αξιολόγησε ότι ανήκει στο Group 3, δηλαδή χαρακτηρίστηκε ως μη καρκινογόνο μόριο για τους ανθρώπους (Creppy, 2002; IARC, 1993).

A.3.2. Η ζεαραλενόνη (ΖΕΑ)

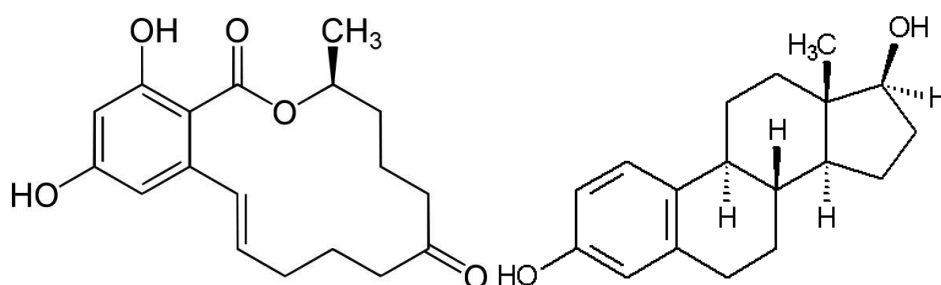
A.3.2.1. Γενικές πληροφορίες - χημική δομή

Η ζεαραλενόνη (ΖΕΑ), παλαιότερα γνωστή ως F-2 τοξίνη και RAL τοξίνη, αποτελεί μια από τις πλέον διαδεδομένες μυκοτοξίνες. Παράγεται από διάφορα είδη του γένους *Fusarium* σε συνδυασμό με άλλες μυκοτοξίνες που παράγονται από αυτά, όπως για παράδειγμα είναι οι τριχοθηκίνες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Ο χημικός της τύπος είναι: (3S,11E)-14,16-διυδροξυ-3-μεθυλ-3,4,5,6,9,10-εξαυδρο-1H-2-βενζοχακυκλοτετρα-δεκίνη-1,7(8H)-διόνη. Ο συντακτικός της τύπος είναι ο C₁₈H₂₂O₅, ενώ το μοριακό της βάρος είναι 318,36.

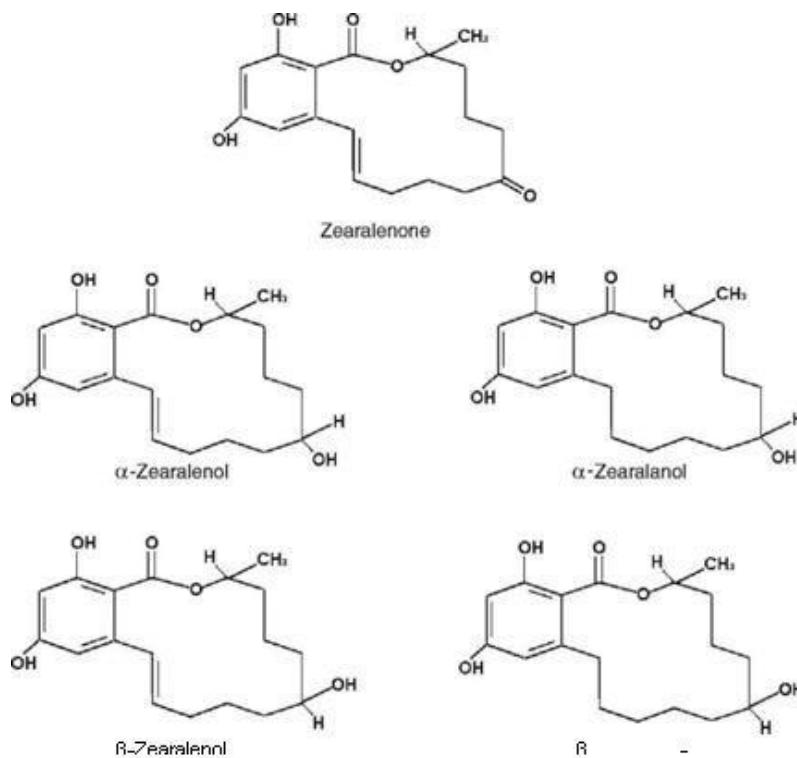
Για πρώτη φορά βρέθηκε το 1927 από τον Buxton (Buxton, 1927), ο οποίος δουλεύοντας με χοίρους, παρατήρησε διογκώσεις και αναστροφή του αιδοίου σε νεαρές χοιρομάνες. Μετέπειτα εργασίες φανέρωσαν, ότι το αίτιο της ασθένειας αυτής γνωστής ως βουβοβαγκινίτιδας, ήταν η κατανάλωση τροφών που μολύνθηκαν με μύκητες του γένους *Fusarium*. Ειδικότερα η ασθένεια αυτή οφείλονταν στη δράση ουσίας που ονομάστηκε ζεαραλενόνη, παίρνοντας το όνομά της από την τέλεια μορφή του παθογόνου *Fusarium graminearum* (*Giberella zea*) από το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά (McEarlin, 1952; Urry, Wehrmeister, & Hidy, 1966; McNutt, Purwin, & Murray, 1928).

A.3.2.2. Τοξικότητα της ζεαραλενόνης.

Η Ζεαραλενόνη χαρακτηρίζεται ως οιστρογόνος μυκοτοξίνη εξαιτίας του τρόπου δράσης της. Έπειτα από την κατανάλωση τροφών που περιέχουν ζεαραλενόνη, η τελευταία μετατρέπεται ταχέως στα δύο ισομερή της, τη α -ζεαραλενόλη και τη β -ζεαραλενόνη. Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ, καθώς το τελευταίο αποτελεί το όργανο μεταβολισμού των στεροϊδών. Τα ισομερή αυτά φέρουν χημική συγγένεια με το μόριο της 17β -εστραδιόλης (Shier, 1998), την κύρια φυλετική ορμόνη των θηλυκών ατόμων. Αυτή η χημική συγγένεια έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάστασή της στους οιστρογόνους υποδοχείς σε ιστούς, όπως είναι η μήτρα, το ήπαρ, ο υποθάλαμος και ο μαστικός αδένας (Ruhr, Osweiler, & Foley, 1983).



Εικόνα 5: Η ζεαραλενόνη και η 17β -οιστροδιόλη (Alldrick, 2004)



Εικόνα 6: Η Ζεαραλενόνη και οι κύριοι μεταβολίτες της (Alldrick, 2004).

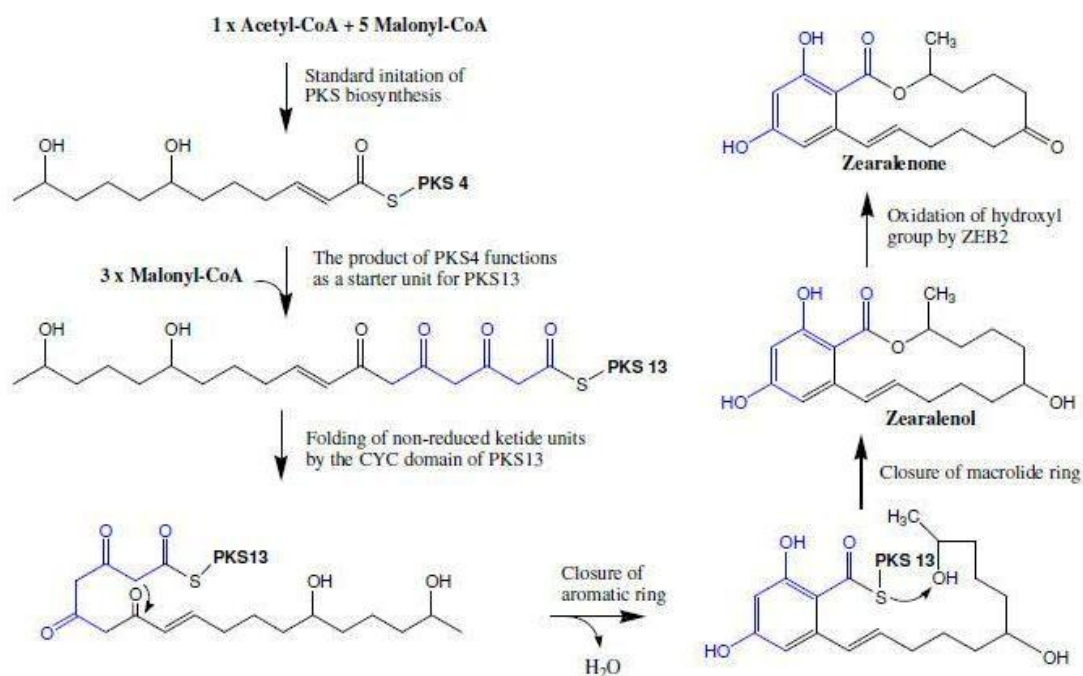
Για τη διερεύνηση της τοξικότητας της ζεαραλενόνης έχουν πραγματοποιηθεί σειρά πειραμάτων. Έχει βρεθεί ότι εμφανίζει χαμηλό κίνδυνο όσον αφορά στην οξεία τοξικότητά της (LD_{50} 4000-20000 mg/kg: ουσία/βάρους ζώου) (Kuiper-Goodman, Scott, & Watanabe, 1987), εμφανίζει όμως υψηλό κίνδυνο όσον αφορά τη χρόνια τοξικότητα, προκαλώντας αλλοιώσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα, με ποικιλία συμπτωμάτων όπως αυξημένες αποβολές εμβρύων, μειωμένη γονιμότητα, γεγονός που σχετίζεται με την οιστρογόνο δράση της συγκεκριμένης μυκοτοξίνης (Kordic, Pribicevic, Muntanola-Cvetkovic, Nikolic, & Nikolic, 1992; Long, Diekman, Tuite, Shannon, & Vesonder, 1982).

Τα όρια τα οποία προτείνει η Ε.Ε. για τη ζεαραλενόνη είναι 50 ppb για ψωμί και ζυμαρικά, 75 ppb για προϊόντα σιτηρών ή αλεύρων εκτός του αραβοσίτου και 20 ppb τρόφιμα βασισμένα σε σιτηρά για παιδικές τροφές. Στις Η.Π.Α. εν αντιθέσει με την Ε.Ε. έχουν θεσπιστεί όρια για την ζεαραλενόνη. Στα προϊόντα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση τα θεσπισμένα όρια είναι της τάξης των 2 ppm για κονιοροποιημένα προϊόντα αραβοσίτου, 4 ppm για ολικώς ή μερικώς αλεσμένα προϊόντα αραβοσίτου και 3 ppm στον αραβόσιτο για χρήση ως pop corn. Όσα προϊόντα προορίζονται για τη ζωική παραγωγή, τα όρια είναι 5 ppm για ίππους και κουνέλια, 20 ppm για χοίρους και χρυσόψαρα, 30 ppm για πουλερικά και 10 ppm για όλα τα άλλα είδη και κατηγορίες ζώων.

A.3.2.3 Βιοσύνθεση της Ζεαραλενόνης

Για τη βιοσύνθεση της Ζεαραλενόνης είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός μορίου ακέτυλο-συνενζύμου A (ακέτυλο-CoA) και 8 μορίων μαλονιλικού-συνενζύμου A (μάλονυλ-CoA). Αρχικώς το βιοσυνθετικό μονοπάτι καταλύεται από το ένζυμο FgPKS4, το οποίο καταλύει την συμπύκνωση ενός μορίου ακέτυλο-CoA και πέντε μορίων μάλονυλ-CoA, οπότε και προκύπτει ένα εξακετίδιο. Έπειτα στο εξακετίδιο δρα το ένζυμο FgPKS13, το οποίο είναι υπεύθυνο για την επιμήκυνση της πολυκετιδικής αλυσίδας, προσθέτοντας τρεις επιπλέον ακετιδικές μονάδες. Εν συνεχεία το μόριο υπόκειται σε δύο φάσεις ενδομοριακής κύκλωσης, έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός αρωματικού δακτυλίου και ενός μακρολυδικού δακτυλίου με έναν λακτονικό δεσμό, δίδοντας τελικά το μόριο της Ζεαραλενόλης. Τελικά η ζεαραλενόνη παράγεται μέσω της μετατροπής του μακρολυδικού δακτυλίου της ζεαραλενόλης σε μόριο ακετόνης, με τη δράση του ενζύμου ZEB2 (Kim, Lee, Jin, Han, Kim, & Kim, 2005b; Gaffoor & Trail, 2006).

Η βιοσύνθεση της Ζεαραλενόνης φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 7: Βιοσύνθεση της Ζεαραλενόνης (Rasmusfrandsen, 2010)

A.3.3 Μέθοδοι προσδιορισμού Δεοξυνιβαλενόνης και Ζεαραλενόνης

Οι μέθοδοι οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση της δεοξυνιβαλενόνης, στηρίζονται τόσο σε κλασικές μεθόδους όπως είναι η μέθοδος της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, ενόργανες μέθοδοι ανάλυσης αλλά και ανοσολογικές μέθοδοι.

Αρχικά για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί ανάλυση των τριχοθηκινών, και της ζεαραλενόνης χρειάζονται εκτενή στάδια συλλογής, απομόνωσης και καθαρισμού του δείγματος πριν οδηγηθεί σε ανάλυση, ώστε να απομακρυνθούν όσο το δυνατόν περισσότερες ουσίες που τυχόν μπλέκονται στην ανάλυση. Συνοπτικά τα στάδια αυτά έχουν ως εξής (Robert, Wannemacher, & Wiener; Kotal, Holadova, Hajslova, Poustka, & Radova, 1999; Krska, Baumgartner, & Josephs, 2001; Koch, 2004; Krska, Welzig, & Boudra, 2007):

A.3.3.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Πρόκειται για μια οικονομική και ταχεία μέθοδο που επιτρέπει τη διεξαγωγή αριθμού αναλύσεων σε σύντομο χρονικό διάστημα και με το μικρότερο δυνατό κόστος.

Επειδή όμως οι τριχοθηκίνες απορροφούν ασθενώς στην υπεριώδη ακτινοβολία και έχει χαμηλό μήκος κύματος απορρόφησης ($\lambda_{\max} = 220 \text{ nm}$) είναι απαραίτητο να ψεκάσει με κατάλληλο παράγοντα. Τέτοιοι παράγοντες είναι για παράδειγμα η 4-παρα-νιτροβενζυλπυριδίνη, ή η νικοτιναμίδη σε συνδυασμό με 2-ακετυλοπυριδίνη (Scott, Lawrence, & Van Walbeek, 1970), ενώ ο καλύτερος παράγοντας για την οπτικοποίηση της δεοξυνιβαλενόνης είναι ο χλωριούχος άργυρος (Eppley, Trucksess, Nesheim, Thorpe, & Pohland, 1986). Αντίθετα το στάδιο αυτό δεν είναι υποχρεωτικό για τη ζεαραλενόνη.

Παρά τα πλεονεκτήματά της, η μέθοδος έχει σημαντικά μειονεκτήματα. όπως το υψηλό σφάλμα της μεθόδου, όρια ανίχνευσης από 500ppb και άνω, που μόλις φτάνει τα κατώτερα όρια που έχει προτείνει η E.E., ενώ τέλος χαρακτηρίζεται και από υποκειμενικότητα στις παρατηρήσεις, καθώς τα αποτελέσματα λαμβάνονται από την χρήστη, εν ήδη ανιχνευτή. Αυτά τα χαρακτηριστικά αν και καθιστούν την μέθοδο

πολύ καλή για ένα γρήγορο σκρινάρισμα των υπό εξέταση δειγμάτων, την καθιστούν μη επαρκή για την ακριβή ποσοτική τους ανάλυση. Έτσι καθίσταται προφανές ότι χρειάζονται πιο ακριβείς μέθοδοι για την ανάλυσή τους, διατηρώντας το κόστος στο κατά το δυνατόν πιο χαμηλό επίπεδο (Scott, Lawrence, & Van Walbeek, 1970; Schaafsma, Nicol, Savard, Sinha, Reid, & Rottinghaus, 1998; Kotal, Holadova, Hajslova, Poustka, & Radova, 1999) Τέτοιες μέθοδοι αποτελούν οι ενόργανες μέθοδοι ανάλυσης.

A.3.3.2 Ενόργανες μέθοδοι

Οι μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης που έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση των τριχοθηκινών και της στηρίζεται σε μεθόδους αέριας (GC) και υγρής (LC) χρωματογραφίας. (Alldrick, 2004; AOAC, 2002; Koch, 2004; Krska, Welzig, & Boudra, 2007; Krska, Baumgartner, & Josephs, 2001; Larsen, Hunt, Perin, & Ruckebauer, 2004)

Όσον αφορά την αέρια χρωματογραφία προσοχή θα πρέπει να δοθεί στο γεγονός ότι οι τριχοθηκίνες και η ζεαραλενόνη αποτελούν μη πτητικές ενώσεις. Έτσι καθίσταται απαραίτητη η παραγωγοποίησή τους ώστε να μετατραπούν σε πτητικά μόρια και να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν στην αέρια χρωματογραφία. Καλά αποτελέσματα λαμβάνονται όταν χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής είτε ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) είτε ο ανιχνευτής μάζας (MS), καθώς και οι δύο ανιχνευτές πληρούν τα όρια ανίχνευσης που έχει προτείνει η Ε.Ε. (100 - 500 ppb)

Παρά το χαμηλό όριο ανίχνευσης που επιτυγχάνεται με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας, το αναγκαίο στάδιο της παραγωγοποίησης των τριχοθηκινών αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα, καθώς η πιθανότητα κάποιου λάθους αυξάνει, είτε λόγω της ατελούς παραγωγοποίησης του δείγματος, είτε εξαιτίας της μη εκλεκτικής παραγωγοποίησής του, έχοντας ως αποτέλεσμα την ύπαρξη ουσιών που παρεμβάλλονται στην ανάλυση. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο γίνεται προσπάθεια εύρεσης μιας μεθόδου που να μπορεί να την αντικαταστήσει. Σημαντικό βήμα προς την κατεύθυνση αυτή έχει επιτευχθεί με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας.

Το μεγάλο πλεονέκτημα της υγρής χρωματογραφίας είναι η ανυπαρξία του σταδίου της παραγωγοποίησης των τριχοθηκινών ώστε να καταστούν πτητικές. Αυτό ακριβώς το πλεονέκτημα είναι και ο λόγος για τον οποίο γίνεται προσπάθεια να αντικαταστήσει τις έως τώρα μεθόδους που στηρίζονται στην αέρια χρωματογραφία. Συνήθως για τη ζεαραλενόνη χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής ο φθοριζομετρικός, ενώ για τις τριχοθηκίνες ο ανιχνευτής UV-Vis, καθιστώντας όμως απαραίτητη προϋπόθεση την ύπαρξη χρωμοφόρου ομάδος στο μόριο, η οποία να απορροφά στο φάσμα του υπεριώδους ορατού. Τέτοια ομάδα αποτελεί η ακετυλομάδα (-C=O) που συνδέεται με τον C8 του μορίου των τύπου B τριχοθηκινών και το οποίο δίδει φάσμα στα 220-225nm περίπου. Αντιθέτως οι type A τριχοθηκίνες δεν χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη κάποιας χρωμοφόρας ομάδος, οπότε και δεν μπορούν να αναλυθούν ως έχουν με την χρήση UV-vis ανιχνευτή (Krska, Welzig, & Boudra, 2007). Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί μέσω της παραγωγοποίησης φθορισμού μετά τη χρωματογραφική στήλη. Παρόλα αυτά οι επιδόσεις από διάφορα τέτοια συστήματα παραγωγοποίησης είναι χαμηλά και γι' αυτό κρίνονται ως ανεπαρκή για την αντικατάσταση των GC Μεθόδων (Krska, Baumgartner, & Josephs, 2001).

Με τον συνδυασμό MS ανιχνευτών σε LC συστήματα (LC-MS), έχει δοθεί μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική μέθοδος για την ανίχνευση των τριχοθηκινών, έχοντας ως κύριο χαρακτηριστικό την αναγνώριση των τριχοθηκινών δίχως την οποιαδήποτε παραγωγοποίηση και σε πολύ χαμηλά επίπεδα της τάξης ακόμη και μεταξύ 1-40ppt (Krska, Baumgartner, & Josephs, 2001; Berthiller, Sulyok, Krska, & Schuhmasher, 2007; Krska, Welzig, & Boudra, 2007). Σημαντικό μειονέκτημα όμως της μεθόδου LC-MS αποτελεί το έως τώρα πολύ υψηλό κόστος απόκτησης και χρήσης αυτών των μηχανημάτων.

Από τα προηγούμενα γίνεται αντιληπτό ότι οι τριχοθηκίνες αποτελούν μόρια που εμφανίζουν δυσκολίες όσον αφορά την ανίχνευση και τον προσδιορισμό τους. Αυτή η δυσκολία καθώς και η ανυπαρξία έως τώρα κάποιας αξιόπιστης μεθόδου ανάλυσής τους αποτελεί και τον λόγο για τον οποίο δεν έχουν θεσπιστεί όρια από τις Η.Π.Α. και την Ε.Ε. παρά τη σοβαρότητά τους.

B. Σκοπός της μελέτης

Αν και μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν εγκεκριμένα μυκητοκτόνα για την αντιμετώπιση του παθογόνου *Fusarium graminearum*, το τελευταίο βρίσκεται υπό τη διαρκή επίδραση των χρησιμοποιούμενων μυκητοκτόνων για την αντιμετώπιση άλλων ασθενειών των σιτηρών. Για τον λόγο αυτό αρχικά στόχος της μελέτης ήταν η εύρεση της *in vitro* ευαισθησίας του παθογόνου στις διάφορες δραστικές που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των διαφόρων παθογόνων των σιτηρών.

Ακολούθησε η διερεύνηση του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας του παθογόνου στα μυκητοκτόνα της υποομάδας των παρεμποδιστών αποθεθλίωσης του C14 (DMI's) της ομάδας των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης στερολών (SBI's). Τα μυκητοκτόνα αυτά αποτελούν τη σημαντικότερη ομάδα μυκητοκτόνων που χρησιμοποιούνται στα σιτηρά, ενώ αποτελούν και τα πλέον αποτελεσματικά για την αντιμετώπιση του *Fusarium graminearum*. Ακολούθως αξιολογήθηκε η επίδραση της ανθεκτικότητας στη μυκηλιακή ανάπτυξη και την παραγωγή και βλάστηση των κονιδίων, παράγοντες που επηρεάζουν τη φυτοπαθογόνο προσαρμοστικότητα των στελεών, τόσο του αγρίου όσο και των ανθεκτικών στελεχών.

Τέλος επιχειρήθηκε να εξευρεθεί η όποια πιθανή συσχέτιση μεταξύ της ανθεκτικότητας και της παραγωγής δεοξυνιβαλενόνης (DON) και ζεαραλενόνης (ZEA), των δύο κύριων μυκοτοξινών που παράγει το παθογόνο.

Γ. Υλικά και μέθοδοι

Γ.1 Βιολογικό υλικό

Για την παρούσα μελέτη, ο μύκητας ο οποίος χρησιμοποιήθηκε είναι ο *Fusarium graminearum* Schwabe. Το στέλεχος του μύκητα προέρχεται από τράπεζα γενετικού υλικού και συγκεκριμένα την Ολλανδική Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), με την κωδική ονομασία CBS 110261.

Ο μύκητας σύμφωνα με την τράπεζα εμφανίζει τις εξής ιδιότητες:

- 1) Είναι γνωστός και με τους κωδικούς ATCC 46779, MAFF 237812, NRRL 5883, άλλων συλλογών
- 2) Προέρχεται από καλλιέργεια καλαμποκιού από το Οχάιο των Η.Π.Α.
- 3) Αναπτύσσονται σε oatmeal agar (OA) και synthetic nutrient-poor agar (SNA)
- 4) Για τη σποριοπαραγωγή καλλιεργούνται σε Plate count agar (PCA)
- 5) Παράγει τους εξής μεταβολίτες:
 - i) 3-ακέτυλο-δεοξυνιβαλενόνη (3AcDON)
 - ii) 15-ακέτυλο-δεοξυνιβαλενόνη (15AcDON)
 - iii) Δεοξυνιβαλενόνη (DON)
 - iv) Ζεαραλενόνη (ZEA)
 - v) Ζεαραλενόλη (ZOL)

Γ.1.1. Ταξινόμηση

Ο μύκητας *Fusarium graminearum* ανήκει στο γένος *Fusarium*, της οικογένειας *Moniliaceae*, της τάξης *Moniliales*, της κλάσης των αδηλομυκήτων. Το γένος *Fusarium* αποτελεί ένα από τα πλέον σημαντικά φυτοπαθογόνα γένη μυκήτων (Τζάμος, 2004). Φέρει τέλεια μορφή γνωστή ως *Gibberella zeae*, βάσει της οποίας πραγματοποιείται η επίσημη ταξινόμηση του παθογόνου. Έτσι σύμφωνα με την τέλεια μορφή του παθογόνου, προκύπτει η ακόλουθη κατάταξη (Rubella., Goswami, & Kistler, 2004):

Βασίλειο: *Fungi*

Φύλο: *Ascomycota*

Υπόφυλο: *Pezizomycotina*

Κλάση: *Sordariomycetidae*

Υποκλάση: *Hypocreomycetidae*

Τάξη: *Hypocreales*

Οικογένεια: *Nectriaceae*

Γένος: *Gibberella*

Κατά το παρελθόν θεωρούνταν ότι το είδος *Fusarium graminearum* χωρίζονταν σε δύο πληθυσμούς. Τον πληθυσμό τύπου I, ο οποίος αποτελούνταν από ετερόθαλλα άτομα, οπότε και είναι απαραίτητη η ύπαρξη δύο διαφορετικών συζευκτικών τύπων για την εγγενή αναπαραγωγή του παθογόνου, και τον πληθυσμό τύπου II, ο οποίος αποτελείται από απλοειδή ομόθαλλα άτομα, άτομα δηλαδή στα οποία δεν είναι απαραίτητη η ύπαρξη διαφορετικών συζευκτικών τύπων για την εγγενή αναπαραγωγή. Περαιτέρω έρευνες και κυρίως έρευνες σε μοριακό επίπεδο, έδειξαν ότι τελικά αυτοί οι δύο διαφορετικοί πληθυσμοί αποτελούνται από άτομα διαφορετικών ειδών, παρά από άτομα του ίδιου είδους. Τελικά ο παλαιός τύπου I πληθυσμός (ετερόθαλλα άτομα) αποτέλεσε ένα νέο είδος, το *Fusarium pseudograminearum*, αντίθετα με τον τύπου II πληθυσμό (ομόθαλλα άτομα), τα οποία και αποτελούν το είδος *Fusarium graminearum* (Leslie & Summerell, 2006).

Γ.1.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ο μύκητας *Fusarium graminearum* σχηματίζει περιθήκια υπομέλινα με κυανοϊώδεις ανταύγειες, διαστάσεων περίπου 200-300×70-220 μm, τα οποία είναι συνενωμένα και φέρουν θηλή. οι ασκοί είναι επιμήκεις διαστάσεων 60-70×10-12 μm,, φερόμενοι σε μικρό ποδίσκο, περιέχοντες 8 ατρακτοειδή ελαφρώς κεκαμένα υαλώδη ασκοσπόρια διαστάσεων 18-24×4-5 μm (Τζάμος, 2004).

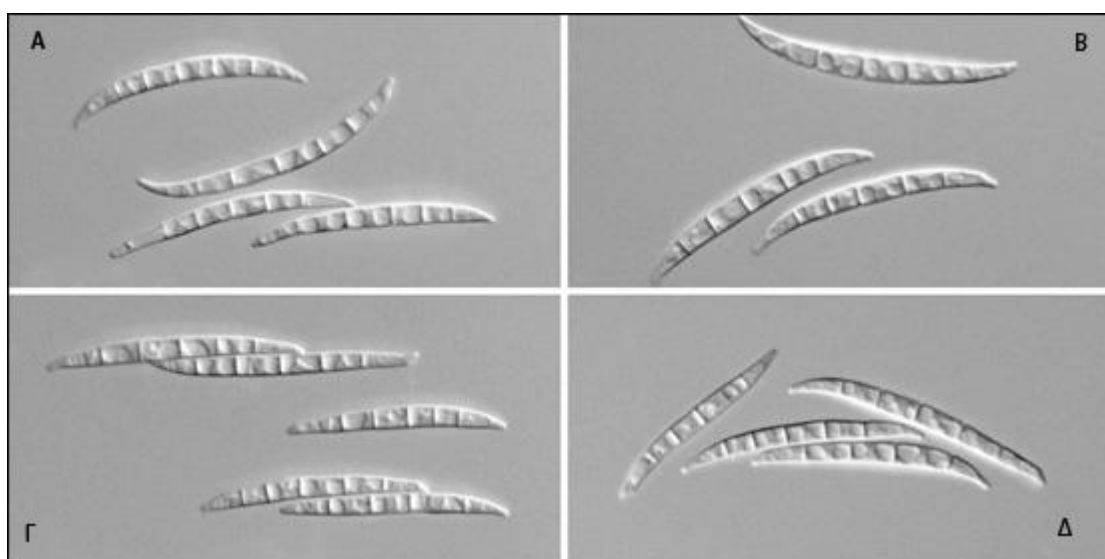
Σε θρεπτικό υλικό PDA ο μύκητας αναπτύσσεται ακτινωτά, γρήγορα και παράγει πυκνό μυκήλιο. Το χρώμα της αποικίας ποικίλει από λευκό σε κίτρινο, ως και πορτοκαλί, αναλόγως του pH του θρεπτικού υλικού, καθώς όσο ελαττώνεται το pH, τόσο αποκτά και πιο ανοιχτό χρώμα η αποικία, από βαθύ πορτοκαλί σε κίτρινο.

Τα μακροκονίδια είναι βελονοειδή, με παχιά τοιχώματα και σχετικά μέσου μήκους, αποτελούμενα από 5-6 κύτταρα, τα οποία διαχωρίζονται μέσω παχιών χωρισμάτων (septa). Φέρουν ελαφρά κλίση, με την κοίλη επιφάνεια να είναι ευθεία και τη ραχιαία να είναι καμπυλωτή, με τα μεσαία κύτταρα να είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος σε σχέση με τα ακραία. Χαρακτηριστικό του μύκητα *Fusarium graminearum* είναι η απουσία μικροκονιδίων.

Τα χλαμυδοσπόρια, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η επιβίωση του μύκητα, συνήθως αργούν να σχηματισθούν, καθώς εμφανίζονται έπειτα από την πάροδο περίπου 30 ημερών, όταν ο μύκητας αναπτύσσεται σε θρεπτικό υλικό PDA. Κυρίως σχηματίζονται στα σποριοδόχεια και ενίοτε στο μυκήλιο του μύκητα. Είναι σφαιρικά με σχετικά ανώμαλη, αλλά όχι πολύ τραχιά, επιφάνεια.



Εικόνα 11: Ανάπτυξη του μύκητα σε Θρεπτικό υλικό PDA



Εικόνα 12: Μακροκονίδια

Γ.1.3. Η ασθένεια Φουζαρίωση των κεφαλών των σιτηρών

Ο μύκητας *Fusarium graminearum* αποτελεί ένα αρκετά σημαντικό παθογόνο των σιτηρών, καθώς μετέχει στην ασθένεια γνωστή ως Φουζαρίωση των κεφαλών των σιτηρών (Fusarium Head Blight Disease), ασθένεια η οποία δύναται να καταστρέψει την παραγωγή μέσα σε λίγες εβδομάδες. Η ασθένεια αυτή περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1884 στην Αγγλία (McMullen, Jones, & Gallenberg, 1997) κι έκτοτε θεωρείται ως μια πολύ σημαντική ασθένεια των σιτηρών, καθώς αποτελεί το αίτιο για την απώλεια υψηλού μέρους της παραγωγής σιτηρών παγκοσμίως (Stack, 1999; Muriuki, 2001).

Οι απώλειες στην παραγωγή οφείλονται τόσο στην καταστροφή του γεωργικού προϊόντος από την άμεση παρουσία και ανάπτυξη του παθογόνου, όσο και από την παρουσία μυκοτοξινών, τόσο τριχοθηκίνες όσο και ζεαραλενόνη, που παράγονται από το παθογόνο και απαντώνται στα αγροτικά προϊόντα. Ενδεικτικό της σοβαρότητας της ασθένειας είναι ότι οι η οικονομική ζημία, τόσο εξαιτίας των άμεσων απωλειών στην αγροτική παραγωγή, όσο και εξαιτίας τις ακαταλληλότητας των αγροτικών προϊόντων από την παρουσία των μυκοτοξινών σε αυτά, εκτιμάται ανήλθε μόνο στις Η.Π.Α. και κατά τη διετία 1998-2000 στο ύψος των 2,7 δις \$ περίπου (Nganje, Bangsund, Leistritz, Wilson, & Tiapo, 2002).

Γ.1.3.1 Παθογόνο αίτιο

Για την ανάπτυξη της ασθένειας υπεύθυνα είναι περίπου 17 διαφορετικά είδη φουζαρίων, αλλά μόνο τρία από αυτά είναι τα πλέον σημαντικά, τόσο όσον αφορά τη αναλογία τους επί του πληθυσμού, όσο και όσον αφορά την παθογόνο ικανότητά τους, μιας και είναι τα πλέον καταστροφικά. Αυτά τα παθογόνα είναι το *Fusarium graminearum*, *F.culmorum* και *F. avenaceum* και ειδικότερα τα δύο πρώτα. Το ποιο από αυτά θα είναι και το κύριο αίτιο για την ανάπτυξη της ασθένειας εξαρτάται αποκλειστικά από τη γεωγραφική κατανομή της ασθένειας. Σε θερμότερα κλίματα όπως είναι αυτό της κεντρικής και νότιας Ευρώπης, της Αυστραλίας και ορισμένων τμημάτων των Η.Π.Α. και του Καναδά, κύριο παθογόνο είναι το *Fusarium*

graminearum. Αντίθετα σε ψυχρότερα κλίματα όπως αυτό της βορειοδυτικής Ευρώπης, κυριαρχεί το *Fusarium culmorum*.

Γ.1.3.2 Επιδημιολογία

Πρωταρχικό μόλυσμα για την ασθένεια αποτελεί το διαχειμάζων σαπροφυτικό μυκήλιο, καθώς και τα χλαμυδοσπόρια και τα ασκοσπόρια που αναπτύσσονται στα υπολείμματα των καλλιεργειών, καθώς και σε εναλλακτικούς ξενιστές, όπως αποτελούν διάφορα είδη ζιζανίων (Parry, Pettitt, Jenkinson, & Lees, 1994). Ζεστός καιρός και σχετικά υψηλή σχετική υγρασία την άνοιξη αποτελούν ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη και ωρίμανση των κονιδίων και των περιθηκίων που παράγουν τα ασκοσπόρια. Η απελευθέρωσή τους συμπίπτει με την περίοδο άνθησης των σιτηρών, η οποία και αποτελεί το ευαίσθητο στάδιο της καλλιέργειας (Markell & Francl, 2003). Τα κολλώδη ασκοσπόρια απελευθερώνονται από τα περιθήκια και μεταφέρονται μέσω του ανέμου κυρίως, αλλά και με τη βοήθεια διαφόρων εντόμων και της βροχής στις ανθοταξίες της οποίες και προσβάλλουν (Sutton, 1982; Parry, Jenkinson, & McLeod, 1995).

Στα πρώτα στάδια της ασθένειας ο μύκητας δε διαπερνά απ' ευθείας την επιφάνεια των ανθέων διά της επιδερμίδας, αλλά αναπτύσσεται υφές στις εξωτερικές επιφάνειες των αγάνων και των λεπύρων. Με αυτές τις υφές το παθογόνο αναπτύσσεται προς τα στομάτια και άλλες ευαίσθητες υφές εντός του άνθους, διά του φαινομένου γνωστού ως θιγμοτροπισμού. Μετά την είσοδο οι υφές του παθογόνου δύνονται να αναπτύσσονται μεταξύ τις εφυμενίδας και των κυτταρικών τοιχωμάτων του ξενιστή, παρέχοντας έναν μηχανισμό ανάπτυξης και εξάπλωσης του παθογόνου (Bushnell, Hazen, & Pritsch, 2003; Pritsch, Muehlbauer, Bushnell, Somers, & Vance, 2000). Άλλες οδοί άμεσης εισόδου αποτελούν ανοίγματα στα άνθη, είτε φυσικά, όπως είναι τα μερικώς ανοικτά ανθηρίδια, είτε μη φυσικά, όπως είναι η προσβολή των ανθέων από διάφορα έντομα.

Πέραν όμως του παθητικού μηχανισμού, το παθογόνο φέρει και ενεργητικό μηχανισμό μόλυνσεως των ευαίσθητων επιφανειών. Συγκεκριμένα στην κοίλη επιφάνεια των ανθηριδίων, σχηματίζει υφές που βοηθούν στην άμεση διάτρηση των τοιχωμάτων, προκαλώντας την ενεργητική είσοδο στον ξενιστή .

Η όλη διαδικασία της μόλυνσης διευκολύνεται από την ύπαρξη νερού (Atanasoff, 1920; Mains, Vestal, & Curtis, 1929). Μετά τη μόλυνση του άνθους από το μύκητα, φαίνεται να αναπτύσσει μια αρκετά σύντομη βιοτροφική σχέση με τον ξενιστή, η οποία μετατρέπεται σε νεκροτροφική. Κατά τη νεκροτροφική σχέση ο μύκητας αναπτύσσεται με ταχείς ρυθμούς, διά των ιστών της ράγχης των ανθέων, προκαλώντας την καταστροφή τόσο των ανθέων, όσο και των σπόρων που παράγονται από τα προσβεβλημένα άνθη.

Γ.1.3.3. Συμπτωματολογία

Αρχικά στα σημεία μόλυνσης παρατηρούνται μικρές υδατώδεις κηλίδες, καφέ χρώματος στη βάση ή τη μέση των αγάνων, καθώς και στα λέπυρα και εν συνεχεία οι κηλίδες και ο μεταχρωματισμός αυτός επεκτείνονται ακτινωτά (Martin, 1988). Οι προσβεβλημένοι σπόροι αποκτούν χρώμα καφέ, ενώ ακολουθεί και αποδιοργάνωση των εσωτερικών ιστών τους δίδοντάς τους αλευρώδη υφή. Ο πρώιμος θάνατος των σταχυδίων αποτελεί το κοινό τελικό σύμπτωμα της ασθένειας, κατά το οποίο τμήμα ή και ολόκληρη η ταξιανθία νεκρώνεται αποκτώντας λευκό χρώμα (Wiese, 1987).



Εικόνα 13: Συμπτώματα επί στάχως σιταριού



Εικόνα 14: Προχωρημένα στάδια προσβολής

Γ.1.3.4. Αντιμετώπιση

Για την αντιμετώπιση της ασθένειας είναι απαραίτητη η εφαρμογή σειράς μέτρων με διττό στόχο, αφ' ενός για την αντιμετώπιση του παθογόνου και αφ' ετέρου για την όσο το δυνατόν μείωση των επιπέδων των παραγομένων μυκοτοξινών, σε επίπεδα που να μην προκαλούν δυσμενείς επιπτώσεις στους οργανισμούς. Κύριος στόχος είναι η όσο το δυνατόν μείωση του αρχικού μολύσματος και η επιτυχής αντιμετώπιση του παθογόνου, αλλά και η μετασυλλεκτική μείωση των επιπέδων των μυκοτοξινών, όπου αυτό είναι εφικτό.

Τα μέτρα αυτά είναι (Parry, Jeckinson, & McLeod, 1995):

i) Καλλιεργητικά μέτρα.

Στόχος τους είναι η δημιουργία δυσμενών συνθηκών στο μικροκλίμα της καλλιεργούμενης έκτασης, ούτως ώστε να είναι δυσμενής η έναρξη της ασθένειας. Αυτά μπορεί να είναι:

- i) *Καταστροφή των υπολειμμάτων της προηγούμενης καλλιέργειας*, κυρίως μέσω της καύσης των υπολειμμάτων, αποτελεί το πλέον αποτελεσματικό καλλιεργητικό μέτρο για τη μείωση του αρχικού μολύσματος. Επειδή όμως η Ευρωπαϊκή Ένωση απαγορεύει για περιβαλλοντικούς λόγους την καύση των υπολειμμάτων της καλλιέργειας, πλέον καθίσταται απαραίτητη η χρήση άλλων μέτρων.
- ii) *Βαθιά άροση*, ώστε το διαχειμάζον μυκήλιο, τα χλαμυδοσπόρια, καθώς και τα ασκοσπόρια του μύκητα, να εκτεθούν στην ηλιακή ακτινοβολία και να μειωθεί έτσι ο αριθμός τους στο έδαφος
- iii) *Ορθή εναλλαγή καλλιεργειών*. Συνήθως οι καλλιεργητές σιτηρών καλλιεργούν χειμερινά σιτηρά, ακολουθούμενα από καλλιέργεια αραβοσίτου τους θερινούς μήνες. Παρ' όλα αυτά, ο αραβόσιτος αποτελεί τέλειο ξενιστή για το παθογόνο συμβάλλοντας στην αύξηση του μολύσματος για την επόμενη καλλιέργεια των σιτηρών. Κατάλληλα φυτά είναι η μηδική και η πατάτα, έτσι σύστημα σιτηρών-μηδικής είναι ικανοποιητικό για τον έλεγχο του πρωταρχικού μολύσματος.
- iv) *Καταπολέμηση των ζιζανίων*, καθώς αποτελούν εναλλακτικούς ξενιστές του παθογόνου.

v) *Αποφυγή άρδευσης κατά το στάδιο της άνθησης.* Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται τόσο η επικράτηση υψηλής σχετικά υγρασίας στην καλλιέργεια, όσο και η δημιουργία film νερού στις ανθοταξίες, συνθήκες που βοηθούν τη μόλυνση, κατά το ευαίσθητο στάδιο της άνθησης των σιτηρών.

vi) Χρήση ανθεκτικών ποικιλιών

Οι προσπάθειες για τη δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών ξεκινούν από το 1891 (Arthur, 1891), και αφορούν ποικιλίες που είναι ανθεκτικές τόσο όσον αφορά την αρχική μόλυνση του παθογόνου (τύπου I ανθεκτικότητα), αλλά και όσον αφορά την εξάπλωση της ασθένειας στο φυτό, δημιουργώντας ανεκτικά φυτά (τύπου II ανθεκτικότητα). Έως τώρα όμως και παρά το υψηλό κόστος για την ανάπτυξη τέτοιων ανθεκτικών φυτών, τα αποτελέσματα δεν είναι ικανοποιητικά, καθώς είτε τα ανθεκτικά φυτά υστερούν σε αγρονομικά και εμπορικά χαρακτηριστικά ("σκληροί" σπόροι ακατάλληλοι για την αλευροβιομηχανία και για τη θρέψη ζώων, οψίμιση παραγωγής και δυσχέρειες στην εναλλαγή των καλλιεργειών), είτε επειδή τα αποτελέσματα είναι παροδικά και χάνεται η ανθεκτικότητά τους, εξαιτίας της ταχείας προσαρμογής του παθογόνου. Εν τούτης θεωρείται ότι ακόμη έχει μέλλον η εξέλιξη των ανθεκτικών ποικιλιών.

ii) Χρήση βιολογικών μέτρων

Κατά τη βιολογική αντιμετώπιση, γίνεται μια αξιολόγηση των διαθέσιμων αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων για την επιτυχή αντιμετώπιση του παθογόνου, λαμβάνοντας υπ' όψιν το οριακό όσον αφορά το κέρδος της καλλιέργειας των σιτηρών. Αυτός είναι και ο λόγος που έχουν δοκιμαστεί σειρά βιοτικών παραγόντων, οι οποίοι στις πλείστες των περιπτώσεων αποτελούν τοπικούς πληθυσμούς.

Από τους μικροοργανισμούς οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί, αυτοί που έχουν δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα, αποτελούν διάφορες οικογένειες βακτηρίων και μυκήτων. Στα βακτήρια κύριες οικογένειες αποτελούν οι *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus* και *Lactococcus*, ενώ στους μύκητες κύριες οικογένειες αποτελούν οι *Cryptococcus*, *Streptomyces*, και *Trichoderma* (da Luz, Stockwell, & Bergstrom, 2003).

Παρά τα θετικά αποτελέσματα των διαφόρων ερευνών, η χρήση βιολογικών παραγόντων βρίσκεται ακόμη στα αρχικά στάδια, καθώς είτε οι διάφοροι οργανισμοί βρίσκονται στο στάδιο αξιολόγησης της καταλληλότητάς τους, είτε στο στάδιο έγκρισης της χρήσης τους για τη γεωργική πρακτική. Αποτελούν όμως ένα αρκετά σημαντικό μελλοντικό διαθέσιμο όπλο για την επιτυχή αντιμετώπιση της ασθένειας.

iii) Χρήση χημικών σκευασμάτων

Η χρήση χημικών σκευασμάτων αποτελεί το σημαντικότερο διαθέσιμο μέσο που έχει ο καλλιεργητής ως και σήμερα. Σειρά σκευασμάτων χρησιμοποιούνται για την επιτυχή αντιμετώπιση του μύκητα. Οι κυριότερες χρησιμοποιούμενες χημικές ομάδες είναι αυτή των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης στερολών και των βενζιμιδαζολικών (McMullen, Jones, & Gallenberg, 1997; Miller, 1995; Parry, Jeckinson, & McLeod, 1995; Parry, Pettitt, Jenkinson, & Lees, 1994; Rubella., Goswami, & Kistler, 2004; Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992; Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2010; Blamdino, Minelli, & Reyneri, 2006; Stoyan, Martin, & Peter, 2003).

Γ.2. Υλικά ανάπτυξης

Ως υλικό ανάπτυξης του μύκητα τόσο για καλλιέργειες διατήρησης όσο και πειραμάτων μυκοτοξικότητας επελέγη το Potato-Dextrose-Agar (PDA).

Η σύνθεση του υλικού αυτού είναι η εξής:

- 1) 200 gr πατάτα.
- 2) 20 gr γλυκόζη.2% άγαρ (περίπου 20 gr/l)
- 3) 1 λίτρο απιονισμένο νερό

Για την παρασκευή του υλικού αυτού ακολουθούνται τα εξής στάδια:

- 1) Αρχικώς η πατάτα καθαρίζεται και ζυγίζεται. Έπειτα τεμαχίζεται σε μικρά κομμάτια της τάξης των 2×2 εκατοστών περίπου.
- 2) Από το ένα λίτρο απιονισμένου νερού, αρχικώς επιλέγονται τα 500ml περίπου. Σε αυτό τα τεμαχίδια της πατάτας βράζονται για 45 περίπου λεπτά.
- 3) Ακολουθεί φιλτράρισμα του νερού, ώστε να απομακρυνθούν τα τεμαχίδια πατάτας και να απομείνει μόνο ο ζωμός.
- 4) Στα υπόλοιπα 500ml από το απιονισμένο νερό προστίθενται τα 20gr γλυκόζης και τα 20 gr άγαρ και βράζουν για περίπου 15 λεπτά ώστε να αναμιχθούν καλά.
- 5) Έπειτα μινύονται τα δύο μέρη του νερού (αυτό που φέρει το ζωμό και αυτό που φέρει το άγαρ με τη γλυκόζη) για περίπου 10 λεπτά στους 200°C ώστε να επιτευχθεί σωστή ομοιογενοποίηση του υλικού.
- 6) Έπειτα το υλικό μοιράζεται στις κατάλληλες ποσότητες σε μπουκαλάκια Duran.
- 7) Ακολουθεί αποστείρωση του υλικού στους 121°C για διάστημα 20 λεπτών.

Γ.3. In vitro ευαισθησία του *Fusarium graminearum* σε διάφορες δραστικές ουσίες.

Η χημική αντιμετώπιση του παθογόνου *Fusarium graminearum* στηρίζεται στη χρήση μυκητοκτόνων, τα οποία αν και χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση άλλων παθογόνων, όπως οι σκωριάσεις και τα ωΐδια, είναι αποτελεσματικά και για τα φουζάρια.

Για το λόγο αυτό αρχικά πραγματοποιήθηκε πείραμα αξιολόγησης της *in vitro* ευαισθησίας του στελέχους σε διάφορες δραστικές ουσίες, που αποτελούν συστατικά μυκητοκτόνων που έχουν πάρει έγκριση για χρήση στις καλλιέργειες σιτηρών και στα οποία το παθογόνο τελεί υπό διαρκή πίεση επιλογής. Οι δραστικές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν δίδονται στον ακόλουθο πίνακα:

Δραστική ουσία	Χημική ομάδα	Μηχανισμός δράσης	
Prochloraz	Ημιδαζολικό / Αζόλη	Παρεμπόδιση απομεθυλίωσης C-14 κατά τα στάδια βιοσύνθεσης στερολών	
Prothioconazole Epoxiconazole Difenconazole Flusilazole Triadimenol	Τριαζολικό / Αζόλη		
Fenhexamid	Υδροξυανιλίδιο		Παρεμπόδιση απομεθυλίωσης C-4 κατά τα στάδια βιοσύνθεσης στερολών
Fenpropimorph	Μορφολινικό		Παρεμπόδιση αναγωγής διπλού δεσμού Δ ¹⁴ κατά τα στάδια βιοσύνθεσης στερολών
Carbendazim	Βενζιμιδαζολικό		Παρεμπόδιση β-τουμπουλίνης κατά τη μιτωτική διαίρεση
Fludioxonil Fenpiclonil	Φαινυλοπυρολικό	Όχι απόλυτα γνωστός. Σχετίζεται με τη δομή και λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών, μέσω της πιθανής δράσης σε πρωτεϊνικές κινάσες	
Cyprodinil Pyrimethanil	Ανιλοπυριμιδινικό	Αντιπαθογονικό. Παρεμπόδιση έκκρισης λυτικών ενζύμων, μέσω της παρεμπόδισης βιοσύνθεσης μεθειονίνης με πιθανή δράση στο ένζυμο β-λυάση της κυσταθειονίνης	

Boscalid	Καρβοξαμιδικό	Εξειδικευμένος παρεμποδιστής του ενζυμικού συμπλόκου της αφυδογονάσης του ηλεκτρικού οξέος, που μετέχει στο σύμπλοκο II της αναπνευστικής αλυσίδας
Trifloxystrobin + SHAM Pyraclostrobin + SHAM Azoxystrobin + SHAM	Στρομπιλουρίνη	Qo παρεμποδιστής του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας

Πίνακας 7: Δραστικές που αξιολογήθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους.

Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας των στελεχών του μύκητα *Fusarium graminearum* στα διάφορα μυκητοκτόνα, έγινε με την παρακολούθηση της επίδρασης του κάθε μυκητοκτόνου στην γραμμική αύξηση του μυκηλίου σε θρεπτικό υλικό που περιείχε PDA.

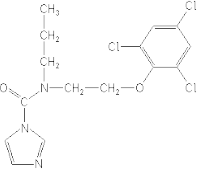
Μπλοκάκια διαμέτρου 4mm από νεαρή καλλιέργεια, εμβολιάζονταν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό, που περιείχε το εκάστοτε μυκητοκτόνο στις επιθυμητές συγκεντρώσεις και μεταφέρονταν για επώαση στους 25°C για 5 ημέρες. Ακολούθησε η μέτρηση της διαμέτρου των αποικιών που αναπτύχθηκαν. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν δύο κάθετες μεταξύ τους διαμέτροι στην κάθε αποικία του κάθε στελέχους και εν συνεχεία υπολογίζονταν ο μέσος όρος των δύο διαμέτρων. Αυτός ο μέσος όρος χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των απαραίτητων συγκρίσεων.

Οι καμπύλες που προέκυψαν είναι πολυονυμικές, από των οποίων την εξίσωση βρέθηκε η Ec_{50} κάθε στελέχους, δηλαδή εκείνη η συγκέντρωση φαρμάκου που προκάλεσε το 50% της ανάπτυξής του σε σχέση με αυτήν απουσίας φαρμάκου.

Γ.4 Δραστική ουσία

Για τους σκοπούς της εργασίας χρησιμοποιήθηκε το μυκητοκτόνο Prochloraz. το οποίο προμηθεύτηκε από την εταιρία Sigma Aldrich. Βρίσκεται υπό τη μορφή σκόνης υψηλής καθαρότητας της τάξης του >99% (Analytical Master Standard). Αποθηκεύεται με τη συσκευασία της σε κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C.

Το prochloraz ανήκει στα ημιδαζολικά μυκητοκτόνα της ομάδας των αζολών. Όντως χημική ομάδα που ανήκει στους παρεμποδιστές της απομεθυλίωσης του C-14, αποτελεί σημαντικό μυκητοκτόνο με ευρύ φάσμα δράσης εναντίον πολλών σημαντικών ασθενειών των σιτηρών, όπως είναι το Ωίδιο, ο Άνθρακας, ο Δαυλίτης, η Ελμινθιοσπορίαση, η Σεπτορίαση, η Ρυγχοσποτίωση, καθώς και διάφορες Φουζαριώσεις των σιτηρών, που προκαλούνται από παθογόνα που ανήκουν στις οικογένειες *Erysiphae*, *Ustilago*, *Sphacelotheca*, *Tilletia*, *Helminthosporium*, *Septoria*, *Rhynchosporium* και *Fusarium*.

Κοινό όνομα	Prochloraz
Χημικό όνομα κατά IUPAC	N-propyl-N-[2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl]imidazole-1-carboxamide
CasRN	67747-09-5
Χημικός τύπος	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂
Μοριακό βάρος	376,7
Χημική δομή	
Διαλυτότητα στο νερό	34,4mg/l (25°C)
K_{oc}	500
LogK_{ow}	4,12
pK_a	3.8 (Πρόκειται περί ασθενούς βάσεως)

Πίνακας 8: Σημαντικότερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του prochloraz

Γ.5. Επιλογή ανθεκτικών στο prochloraz στελεχών

Για τη λήψη ανθεκτικών στελεχών στο prochloraz πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της μεταλλαξιγένεσης με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

Αρχικώς απλώθηκε σε υλικό PDA αιώρημα κονιδίων του μύκητα, το οποίο και καλλιεργήθηκε για 6 ημέρες. Στόχος ήταν η δημιουργία αποικίας νεαρής ηλικίας ομοιόμορφης ηλικιακής κατανομής στο τρυβλίο. Ακολούθησε τεμαχισμός του υλικού των τρυβλίων σε στενές λωρίδες. Έπειτα το τεμαχισμένο μυκήλιο τοποθετήθηκε σε κωνική η οποία περιείχε 50ml απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού. Με τη βοήθεια Vortex αναδεύθηκε το υλικό της κωνικής για περίπου 5 λεπτά. Στόχος ήταν μέσω της βίαιης ανατάραξης η απελευθέρωση των κονιδίων από το μυκήλιο του μύκητα. Έπειτα το υλικό μεταφέρθηκε σε δεύτερη κωνική, της οποίας το στόμιό της έφερε τούλι, ώστε να συλλεχθεί το αιώρημα των κονιδίων,

Με τη χρήση αιματοκυτομέτρου μετρήθηκε ο αριθμός των κονιδίων της δεύτερης κωνικής, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μεταλλαξιγένεση. Συγκεκριμένα το αιώρημα ακτινοβολήθηκε στη UV για 4,5 λεπτά. Έπειτα το αιώρημα τοποθετήθηκε σε σκότος για περίπου μισή ώρα και με συχνή ανάδευση, ώστε να αποφευχθεί τυχόν φωτοενεργοποίηση και επιδιόρθωση των όποιων αλλαγών προέκυψαν από τη δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας.

Το ακτινοβολημένο αιώρημα απλώθηκε σε τρυβλία που έφεραν ως υλικό επιλογής PDA με συγκέντρωση του μυκητοκτόνου prochloraz της τάξης των $10\times$ αυτής της ελάχιστης παρεμπόδισης του αγρίου.

Τέλος τα τρυβλία με το απλωμένο ακτινοβολημένο αιώρημα επώαστηκαν στους 25°C , σε συνθήκες σκότους. Κατά τη διάρκεια των επομένων δύο εβδομάδων πραγματοποιήθηκε η λήψη των ανθεκτικών στελεχών, με ημερήσιες παρατηρήσεις.

Γ.6 Προσδιορισμός επιπέδου ανθεκτικότητας της στο prochloraz στο άγριο και τα ανθεκτικά στελέχη

Για το prochloraz ο προσδιορισμός της ανθεκτικότητας των στελεχών πραγματοποιείται βάση που παράγοντα ανθεκτικότητας RF (resistance factor) κάθε στελέχους, ο οποίος προκύπτει από το λόγο:

$$Rf \text{ ανθεκτικού στελέχους} = \frac{\text{---}}{\text{---}}$$

Δ.7 Αξιολόγηση του κινδύνου ανάπτυξης διασταυρωτής ανθεκτικότητας

Για την αξιολόγηση του κινδύνου ανάπτυξης διασταυρωτής ανθεκτικότητας των στελεχών με μυκητοκτόνα άλλων χημικών ομάδων, αξιολογήθηκε η in vitro ευαισθησία τους στα μυκητοκτόνα αυτά. Χρησιμοποιήθηκαν μυκητοκτόνα που δρουν τόσο στον ίδιο υποκυτταρικό βιοχημικό στόχο, όσο και σε διαφορετικούς.

Για το λόγο αυτό αξιολογήθηκε η ευαισθησία των στελεχών στο τριαζολικό **Flusilazole**, το οποίο όπως και το ημιδαζολικό **Prochloraz** παρεμποδίζει την απομεθυλίωση του C-14 κατά τα στάδια βιοσύνθεσης εργοστερόλης, στο υδροξιανιλίδιο **Fenhexamid** το οποίο δρα παρεμποδίζοντας την απομεθυλίωση του C-4 κατά τα στάδια βιοσύνθεσης εργοστερόλης, στο βενζιμιδαζολικό **Carbendazim**, το οποίο παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση της β-τουμπουλίνης, συστατικό των ινιδίων της μιτωτικής ατράκτου που δημιουργούνται κατά την κυτταρική διαίρεση και τέλος στο φαινυλοπυρρολικό **Fludioxonil**, του οποίου η δράση αν και όχι απόλυτα γνωστή, φαίνεται ότι σχετίζεται με τη δομή και λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών, μέσω της πιθανής δράσης σε πρωτεϊνικές κινάσες.

Γ.8 Μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στην προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών

Γ.8.1 Μέτρηση του ρυθμού αύξησης (growth rate)

Η μέτρηση του ρυθμού αύξησης του αγρίου και των ανθεκτικών στο prochloraz στελεχών, έγινε με μετρήσεις της διαμέτρου των αποικιών κάθε στελέχους.

Τεμάχια νεαρής αποικίας των στελεχών τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με PDA. Στην συνέχεια τα τρυβλία αυτά επώαστηκαν στους 25°C και σε συνθήκες σκότους. Οι μετρήσεις ελήφθησαν κατά τη 2^η, 3^η, 5^η και 7^η ημέρα, κατά την οποία παρατηρείται ανάπτυξη του μύκητα στο εσωτερικό του υλικού, προκαλώντας αλλοιώσεις στο τελικό αποτέλεσμα (Becher, Hettwer, Karlovsky, Deising, & Wirsal, 2009).

Γ.8.2. Μέτρηση της παραγωγής και βλάστησης των κονιδίων

Σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υλικό PDA εμβολιάστηκαν μπλοκάκια διαμέτρου της τάξης περίπου των 4mm, τα οποία περιείχαν τμήμα από νεανική ταχέως αναπτυσσόμενη αποικία κάθε στελέχους. Εν συνεχεία επωάζονταν στους 25°C και σε συνθήκες σκότους για περίοδο 7 ημερών. Στη συνέχεια ελήφθησαν 5 μπλοκάκια διαμέτρου της τάξης περίπου των 10mm και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιείχε 5 ml απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού. Ακολούθησαν δεκαδικές αραιώσεις, στόχος των οποίων είναι να καταστεί ευκολότερη η μέτρηση των κονιδίων. Ακολουθήθηκε ανατάραξη με τη βοήθεια Vortex για να απελευθερωθούν τα κονίδια από τα μυκήλια των στελεχών. Οι μετρήσεις του αριθμού των κονιδίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αιματοκυτόμετρου Neubauer και με τη βοήθεια του σύνθετου μικροσκοπίου.

Για τη βλάστηση των κονιδίων χρησιμοποιήθηκαν τα αιωρήματα από τους δοκιμαστικούς σωλήνες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της παραγωγής κονιδίων. Τα αιωρήματα απλώθηκαν σε τρυβλία που φέρουν υλικό PDA. Τα τρυβλία αυτά επώαστηκαν σε συνθήκες σκότους και στους 25°C για μία μέρα. Την επομένη μετρήθηκε ο αριθμός των κονιδίων που βλάστησαν στα τρυβλία.

Γ.9 Προσδιορισμός μυκοτοξινών.

Χρησιμοποιήθηκαν 50gr σπόροι καλαμποκιού για κάθε δείγμα, οι οποίοι μολύνθηκαν 5 μπλοκάκια των 10mm από νεαρή καλλιέργεια του μύκητα.

Ακολούθησε ανάπτυξη του μύκητα σε συνθήκες φυσικού φωτισμού, ώστε να προσομοιωθεί κατά το δυνατόν ο φυσικός φωτισμός του αγρού. Μετά την πάροδο δεκαπέντε ημερών πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός των μυκοτοξινών.

Αρχικά οι μολυσμένοι σπόροι αλέστηκαν και ομογενοποιήθηκαν. Προστέθηκε 200ml διαλύματος ακετονιτριλίου:νερό (84:16) ανά δείγμα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό θάλαμο rocking incubator στις 200 στροφές το λεπτό για διάστημα τριών ωρών. Έπειτα ακολούθησε φιλτράρισμα των δειγμάτων, ώστε να ληφθεί η φάση του ακετονιτριλίου:νερού. Τα δείγματα συμπυκνώθηκαν με τη χρήση rotary evaporator μέχρι ξηρού, στους 50°C και σε χαμηλές στροφές. Ακολούθησε συλλογή με τη χρήση 3ml μεθανόλης και καθαρισμός με τη χρήση στηλών C-18. Μετά τον καθαρισμό το δείγμα συμπυκνώθηκε μέχρις ξηρού με τη χρήση ροής αζώτου, ώστε να απομακρυνθεί το νερό. Στα δείγματα προστέθηκαν 2ml μεθανόλης, τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

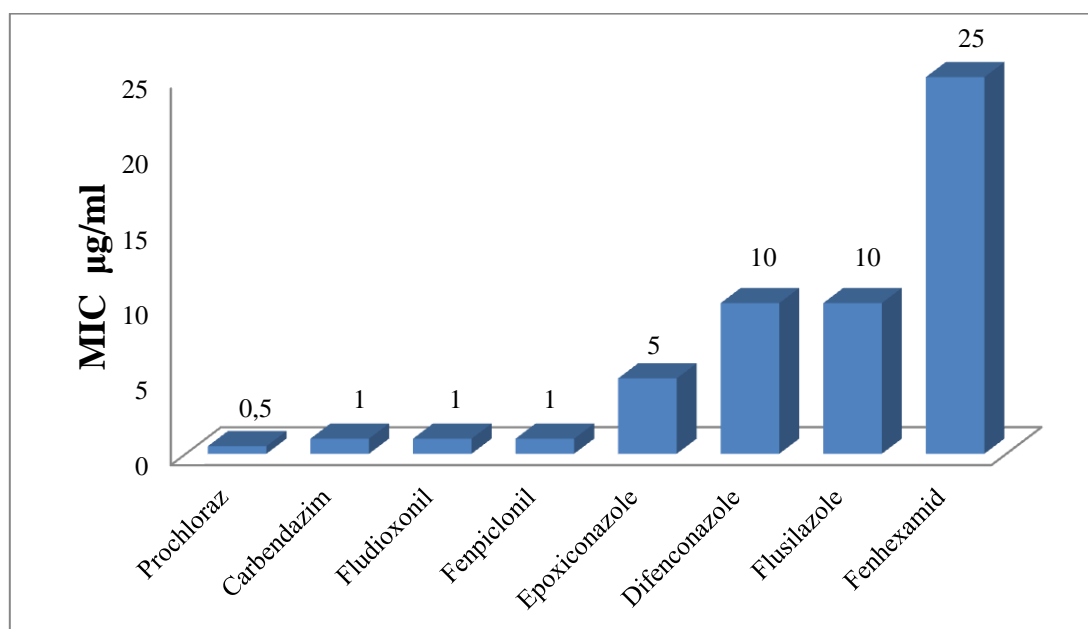
Για την δεοξυνιβαλενόνη οι συνθήκες της υγρής χρωματογραφίας έχουν ως εξής. Χρησιμοποιήθηκε σύστημα κινητής φάσης μεθανόλη/νερό 30/70 με ροή 0,7ml/min. Ως χρωματογραφική στήλη επιλέχθηκε η supelco C18 χαρακτηριστικών 250mm×4,6mm×5μm. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 40 °C. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση UV-Vis ακτινοβολίας στα 200nm μήκος κύματος.

Για τη ζεαραλενόνη οι συνθήκες της υγρής χρωματογραφίας έχουν ως εξής. Χρησιμοποιήθηκε σύστημα κινητής φάσης ακετονιτρίλιο/0,1% τριφθοροξικό οξύ 60/40 ροής 1ml/min. Ως χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιήθηκε η supelco C18 χαρακτηριστικών 250mm×4,6mm×5μm. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 40 °C. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του φθοριζομετρικού ανιχνευτή ρυθμισμένου σε excitation wavelength 273nm και emission wavelength 460nm.

Δ. Αποτελέσματα

Δ.1 In vitro ευαισθησία του *Fusarium graminearum* σε διάφορες δραστικές ουσίες.

Στο ακόλουθο σχήμα παρουσιάζονται κατά σειρά αποτελεσματικότητας οι δραστικές ουσίες, με τον κατακόρυφο άξονα να φέρει την ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (M.I.C.) κάθε δραστικής και τον οριζόντιο τις δραστικές:

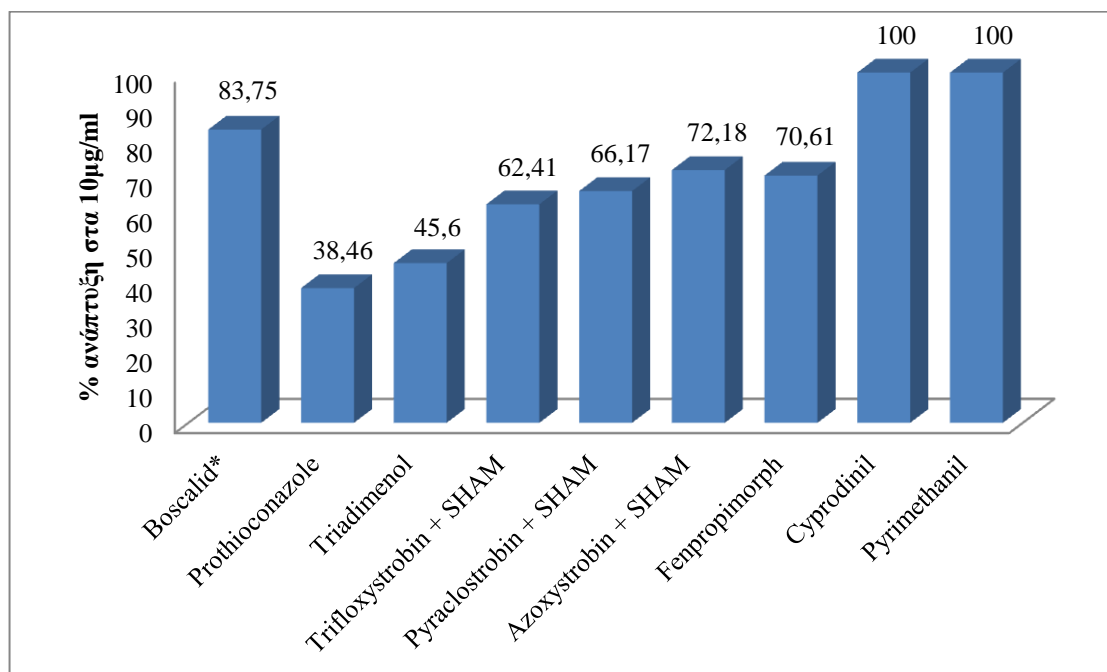


Σχήμα 1: Κατάταξη των αποτελεσματικών δραστικών ουσιών κατά σειρά αποτελεσματικότητας

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η πλέον αποτελεσματική δραστική ουσία είναι το prochloraz των ημιδαζολικών, καθώς παρεμπόδισε την ανάπτυξη του μύκητα στη συγκέντρωση των 0,5 µg/ml. Ακολούθησαν τα carbendazim (βενζιμιδαζολικό), fludioxonil και fenpiclonil (φαινυλοπυρολικά) τα οποία παρεμπόδισαν την ανάπτυξη του μύκητα στη συγκέντρωση του 1 µg/ml. Έπειτα ακολούθησαν τα τριαζολικά epxiconazole, difenconazole και flusilazole τα οποία παρεμπόδισαν την ανάπτυξη του μύκητα, το μεν πρώτο στη συγκέντρωση των 5 g/ml, τα υπόλοιπα δύο στη συγκέντρωση των 10µg/ml. Τέλος το λιγότερο αποτελεσματικό βρέθηκε να είναι το

υδροαξινιλικό fenhexamid καθώς παρεμπόδισε τον μύκητα σε συγκέντρωση της τάξης των 25μg/ml.

Εν συνεχεία στο ακόλουθο σχήμα παρουσιάζονται εκείνες οι δραστικές, οι οποίες δεν φάνηκαν να είναι αποτελεσματικές για την αντιμετώπιση του παθογόνου. Στον οριζόντιο άξονα δίδονται οι δραστικές, ενώ στον κατακόρυφο δίδεται η ανάπτυξη του παθογόνου σε ενδεικτική συγκέντρωση 10 μg/ml της κάθε δραστικής.



Σχήμα 2: Κατάταξη μη αποτελεσματικών δραστικών ουσιών, ανά χημική ομάδα

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι ανυλοπυριμιδίνες (cyprodinil, pyrimethanil) βρέθηκαν να μην είναι καθόλου αποτελεσματικές για το παθογόνο, όπως και το καρβοξαμιδικό boscalid. Χαμηλή αποτελεσματικότητα βρέθηκε και για τις στρομπιλουρίνες (trifloxystrobin, pyraclostrobin, azoxystrobin) ακόμη και με την προσθήκη υδροξαμικού οξέος (SHAM) για την αντιμετώπιση τυχόν εναλλακτικής αναπνοής. Ως μη αποτελεσματικό μπορεί να χαρακτηριστεί και το μορφολινικό fenpropimorph, ενώ και χαμηλής αποτελεσματικότητας βρέθηκε να είναι τα τριαζολικά prothioconazole και triadimenol

Δ.2 Επιλογή ανθεκτικών στο prochloraz στελεχών

Μετά το πέρας της διαδικασίας της μεταλλαξιγενέσεως όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα, προέκυψαν τα εξής:

Η εμφάνιση των ανθεκτικών στελεχών ξεκίνησε από την 3^η ημέρα, ενώ η διαδικασία τερματίστηκε μετά την πάροδο 14 ημερών (2 εβδομάδες). Ο λόγος για τον οποίο επελέγη αυτό το χρονικό διάστημα, είναι η πιθανή μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο υλικό εξαιτίας της αποδόμησής του, δίδοντας τελικά στελέχη μειωμένης ανθεκτικότητας.

Με την παραπάνω διαδικασία ελήφθησαν συνολικά 235 στελέχη. Από αυτά επελέγησαν τόσο λαμβάνοντας υπ' όψιν τον χρόνο εμφανίσεώς τους, όσο και με ταυτόχρονα συνοπτικά πειράματα εκτίμησης της ευαισθησίας τους (σκριναρίσματα) 35. Από αυτά με περαιτέρω πειράματα εκτιμήσεως της ανθεκτικότητάς τους ελήφθησαν 11 χαρακτηριστικά στελέχη, έχοντας ως στόχο την όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφη και ικανοποιητική εκπροσώπηση του ολικού πληθυσμού των στελεχών.

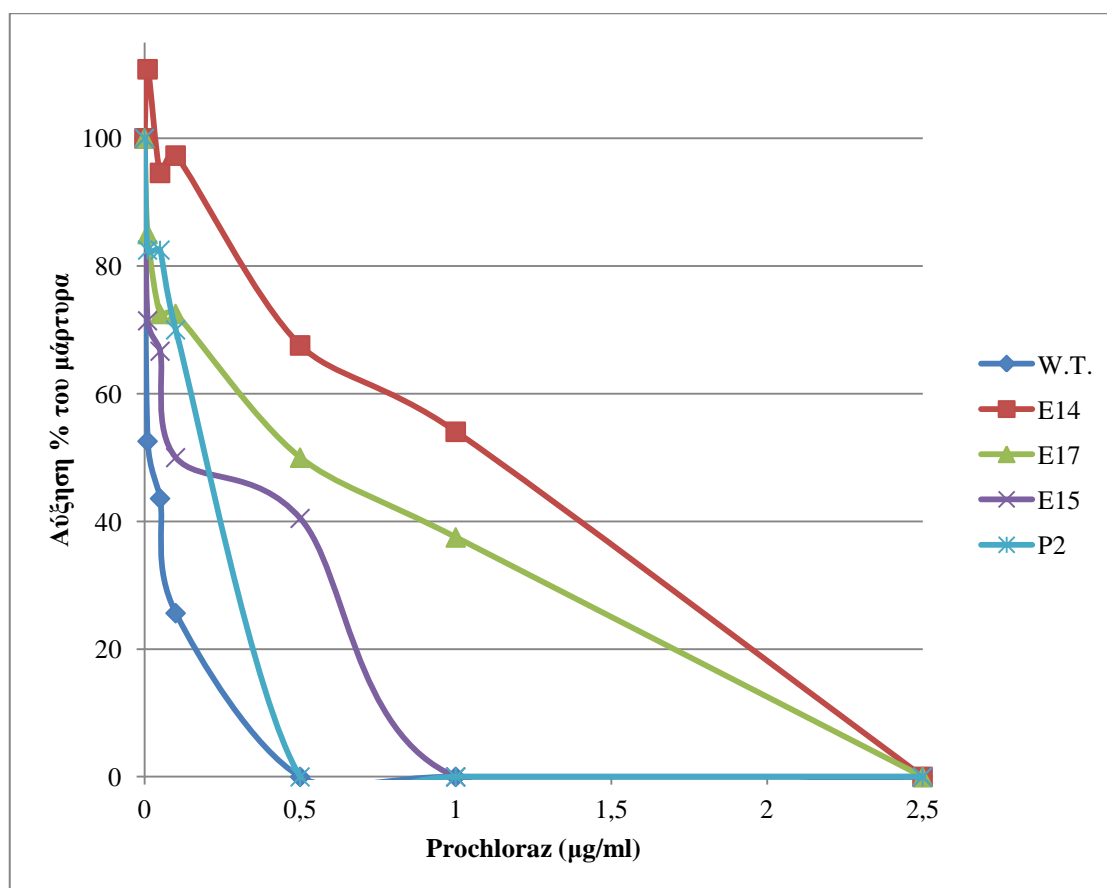
Η συχνότητα εμφάνισης των ανθεκτικών στελεχών προσδιορίστηκε ως εξής:

Η αρχική πυκνότητα του αιωρήματος κονιδίων ήταν της τάξης των $1,5 \times 10^{-7}$. Από τη στιγμή που ακτινοβολήθηκαν 7ml από αυτό τότε ο ολικός αριθμός των ακτινοβολημένων κονιδίων ισούται με $7 \times 1,5 \times 10^{-7} = 10,5 \times 10^{-7}$. Η θνησιμότητα βρέθηκε να ισούται με 91%, άρα επιβίωσε το 9% των κονιδίων. Άρα από το σύνολο των κονιδίων επιβίωσαν $10,5 \times 10^{-7} \times 0,09 = 0,945 \times 10^{-7} = 94,5 \times 10^{-5}$. Βρέθηκαν συνολικά 235 στελέχη κατά τη διάρκεια της επιλογής των ανθεκτικών στελεχών, άρα η συχνότητα εμφάνισής τους θα είναι $(235/94,5) \times 10^{-5} \approx 2,95 \times 10^{-5} \approx 3 \times 10^{-5}$.

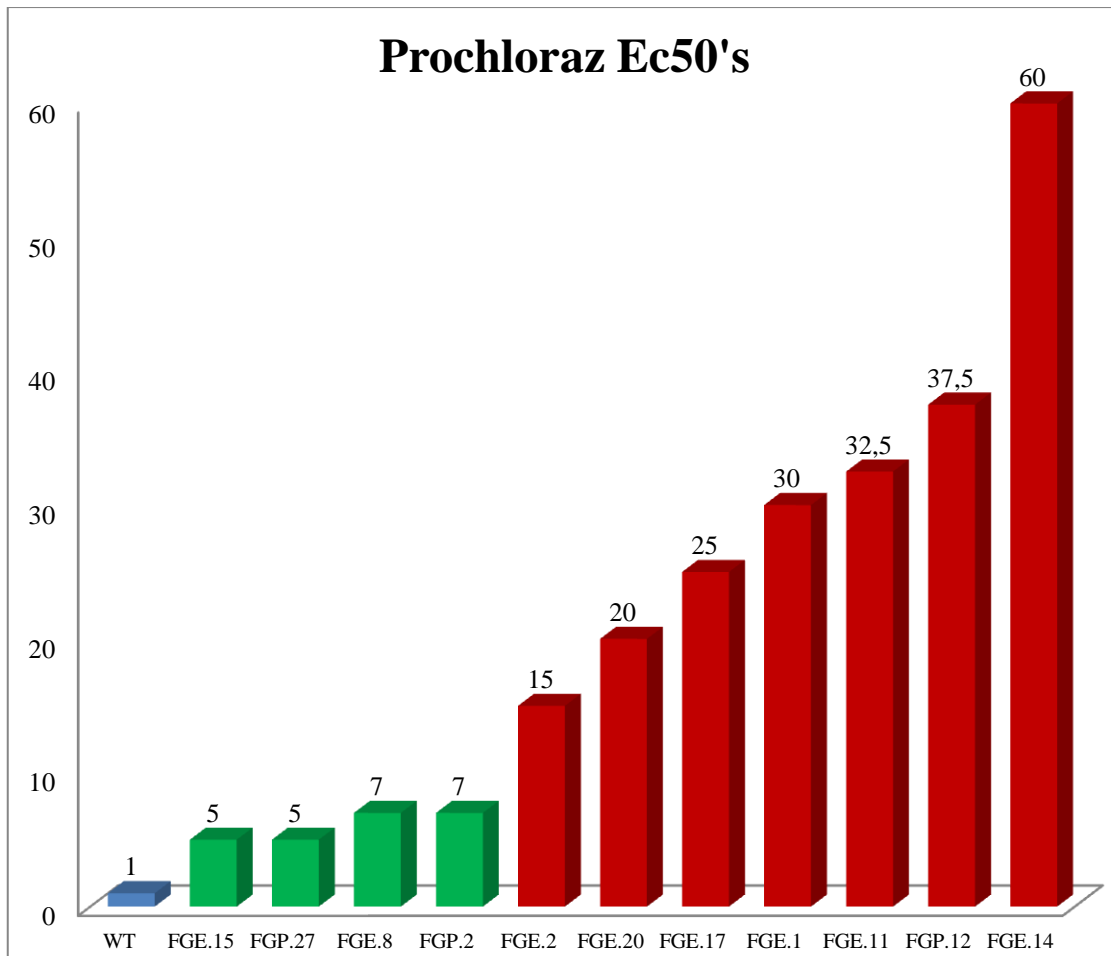
Φαίνεται να υπάρχει μέσος κίνδυνος εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στο prochloraz.

Δ.3 Επίπεδο ανθεκτικότητας στο prochloraz των ανθεκτικών στελεχών.

Εν συνεχεία παρουσιάζονται οι καμπύλες μυκοτοξικότητας, του αγρίου και τεσσάρων αντιπροσωπευτικών στελεχών (FGE.14, FGE.17, FGE.15, FGP.2) καθώς και ραβδόγραμμα με τις τιμές EC_{50} όλων των στελεχών



Σχήμα 3: Επίδραση του prochloraz στην αύξηση του αγρίου (wt) και 4 αντιπροσωπευτικών στελεχών FGE.14, FGE.17, FGE.15, FGP.2)



Σχήμα 4: Κατάταξη των στελεχών βάσει της Ec50

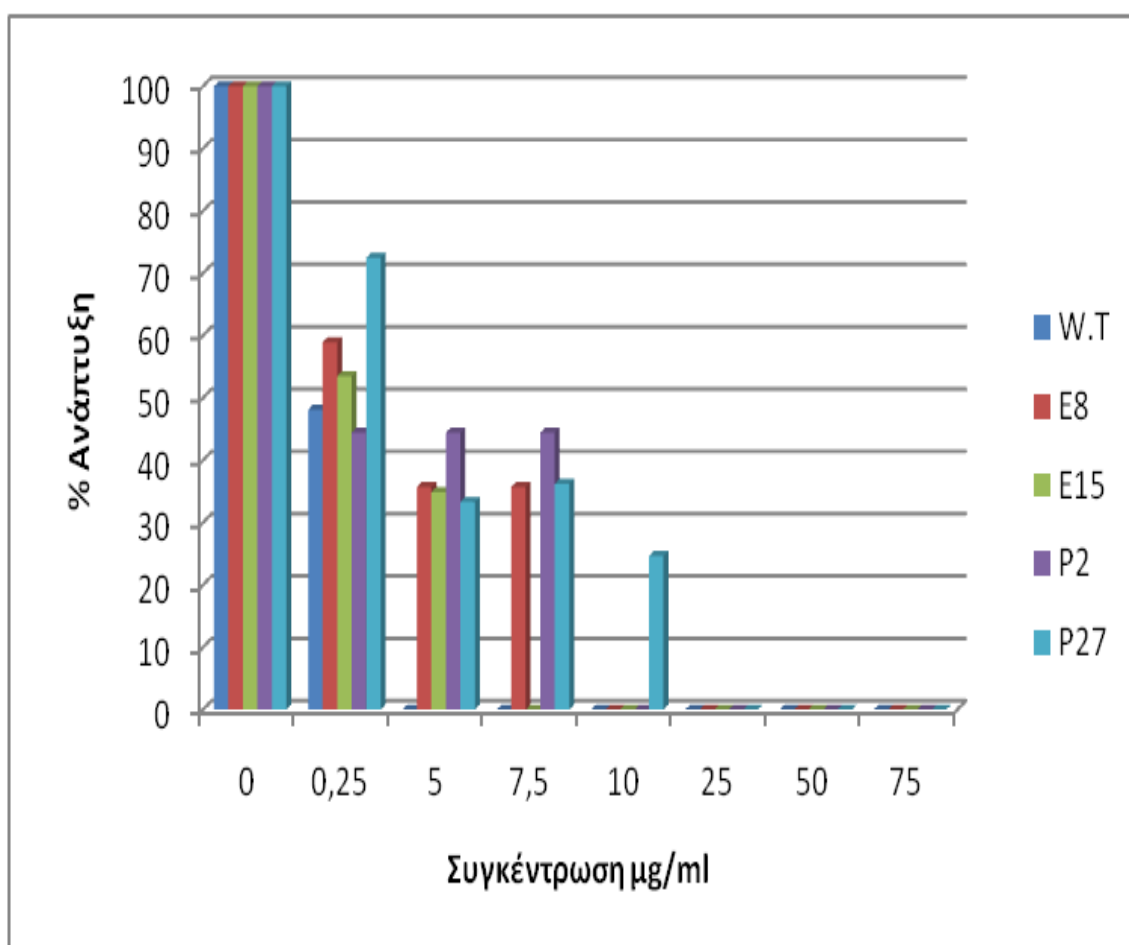
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα στελέχη βάσει του επιπέδου ανθεκτικότητας, μπορούν να διαχωριστούν σε δύο φαινοτυπικές κατηγορίες. Στη φαινοτυπική κατηγορία χαμηλής ανθεκτικότητας ανήκουν όσα στελέχη εμφάνισαν rf έως 10. Τα στελέχη αυτά είναι το FGE.15 (rf=5), FGP.27 (rf=5), FGE.8 (rf=7) και FGP.2 (rf=7). Στη φαινοτυπική κατηγορία μέσου επιπέδου ανθεκτικότητας ανήκουν τα στελέχη με δείκτη rf από 10 έως 60. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα περισσότερα στελέχη και συγκεκριμένα τα FGE.2 (rf=15), FGE.20 (rf=20), FGE.17 (rf=25), FGE.1 (rf=30), FGE.11 (rf=32,5), FGP.12 (rf=37,5) και FGE.14 (rf=60).

Δ.4 Αξιολόγηση του κινδύνου ανάπτυξης διασταυρωτής ανθεκτικότητας

Στη συνέχεια δίνονται τα αποτελέσματα για κάθε μυκητοκτόνο ομαδοποιημένα ανά φαινοτυπική κατηγορία, ακολουθούμενα από συνοπτικό πίνακα κατάταξης βάσει του μέσου όρου του δείκτη Rf των ομάδων αυτών. Η πρώτη συγκέντρωση ισούται περίπου με την Ec50 του αγρίου στελέχους ενώ οι υπόλοιπες με συγκεντρώσεις που παρεμποδίζουν πλήρως την ανάπτυξη του.

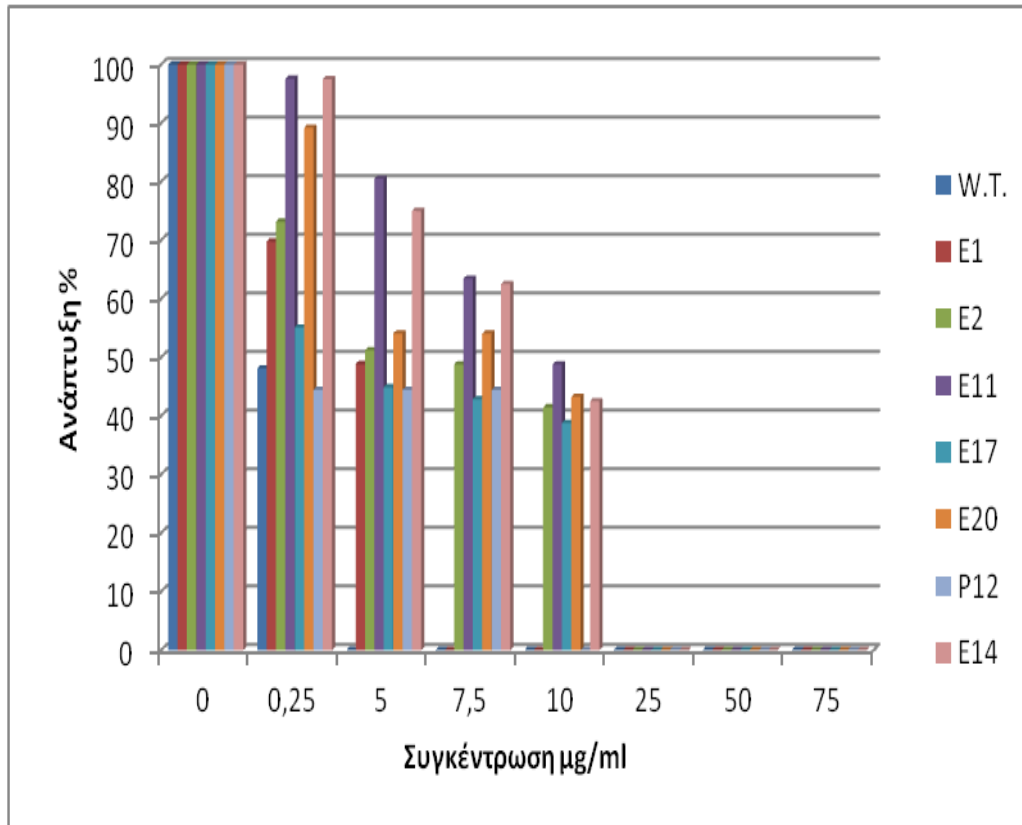
Δ.4.1 Flusilazole

- 1) Φαινοτυπική κατηγορία χαμηλής ανθεκτικότητας (στελέχη FGE.8, FGE.15 FGP.12, και FGP.27) και άγριο στέλεχος (W.T)



Σχήμα 5: Αποτελέσματα διασταυρωτής ανθεκτικότητας των στελεχών χαμηλής ανθεκτικότητας

- 2) Φαινοτυπική κατηγορία μέσης ανθεκτικότητας (στελέχη FGE.1, FGE.2, FGE.11, FGE.17, FGE.20 και FGP.12, FGE.14) και άγριο στέλεχος (W.T)

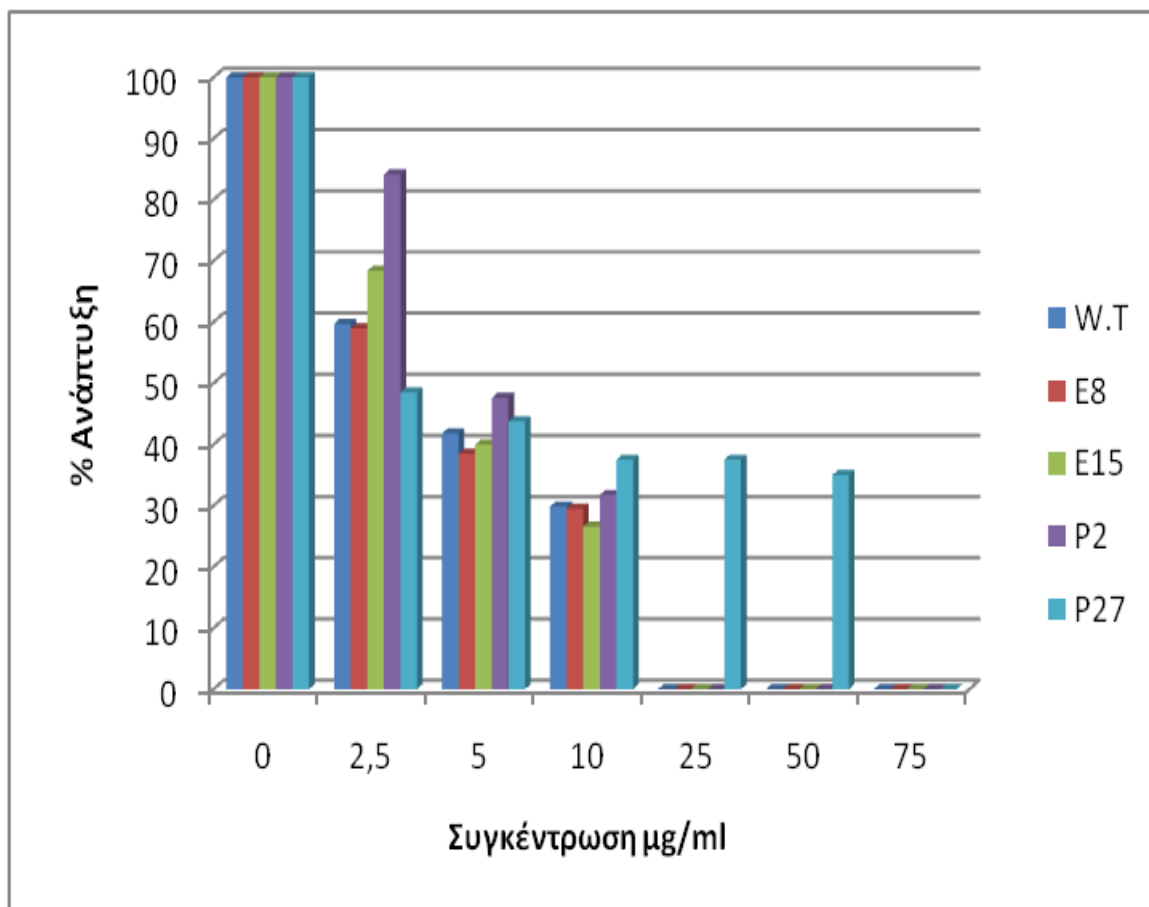


Σχήμα 6: Αποτελέσματα διασταυρωτής ανθεκτικότητας στελεχών μέσης ανθεκτικότητας

Στην περίπτωση του τριαζολικού Flusilazole παρατηρείται εικόνα παρόμοια αυτής του ημιδαζολικού Prochloraz, καθώς τα στελέχη και των δύο φαινοτυπικών κατηγοριών δίνουν παρόμοιο επίπεδο ανθεκτικότητας.

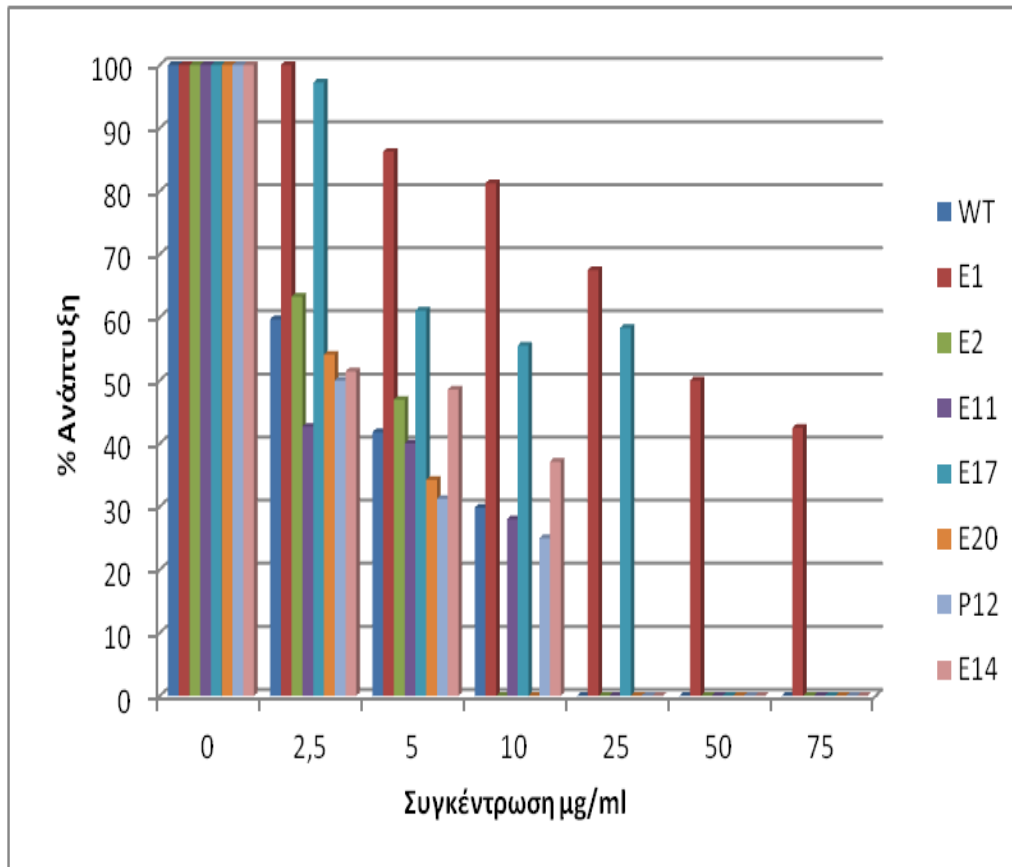
Δ.4.2 Fenhexamid

- 1) Φαινοτυπική κατηγορία χαμηλής ανθεκτικότητας (στελέχη FGE.8, FGE.15 FGP.12, και FGP.27) και άγριο στέλεχος (W.T)



Σχήμα 7: Αποτελέσματα διασταυρωτής ανθεκτικότητας των στελεχών χαμηλής ανθεκτικότητας

- 2) Φαινοτυπική κατηγορία μέσης ανθεκτικότητας (στελέχη FGE.1, FGE.2, FGE.11, FGE.17, FGE.20 FGP.12 και FGE.14) και άγριο στέλεχος (W.T)

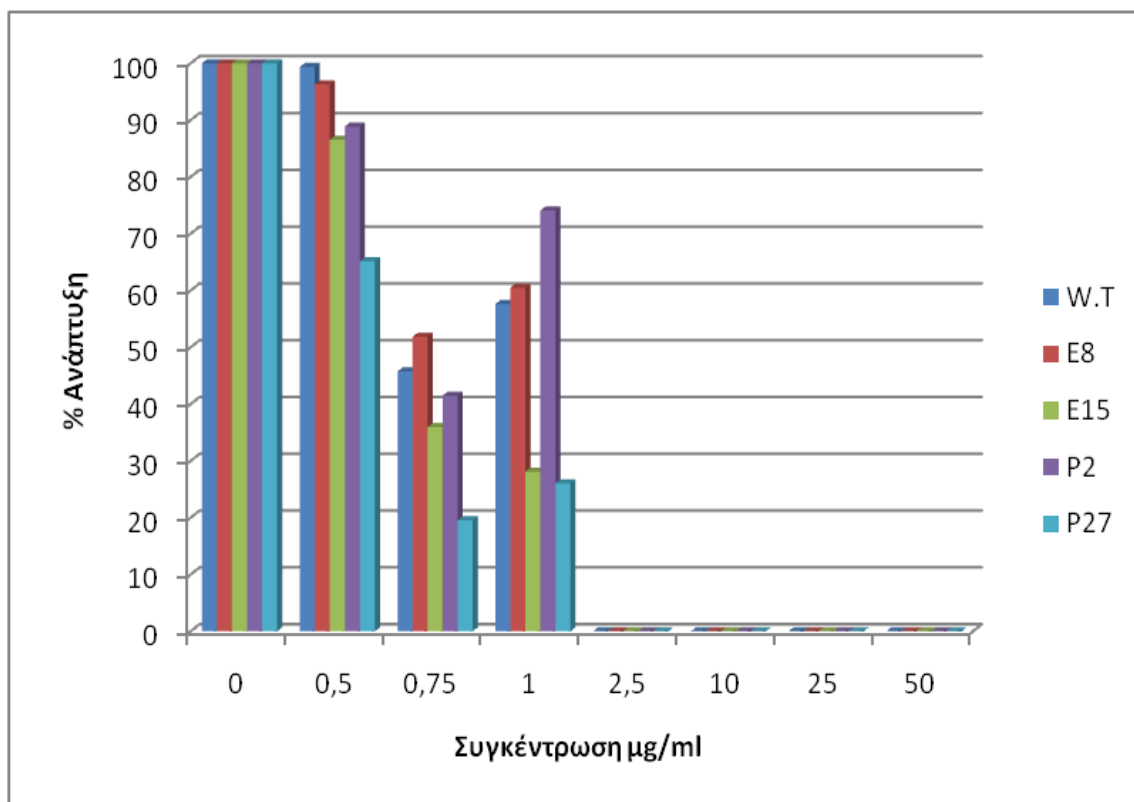


Σχήμα 8: Αποτελέσματα διασταυρωτής ανθεκτικότητας στελεχών μέσης ανθεκτικότητας

Στην περίπτωση του υδροξυανιλιδίου Fenhexamid τα στελέχη δίνουν εικόνα αγρίου στελέχους, καθώς δεν είναι ανθεκτικά. Εξάιρεση αποτελεί το στέλεχος FGE.1 το οποίο είναι ανθεκτικό ακομη και σε συγκέντρωση της τάξης των 75 mg/ml.

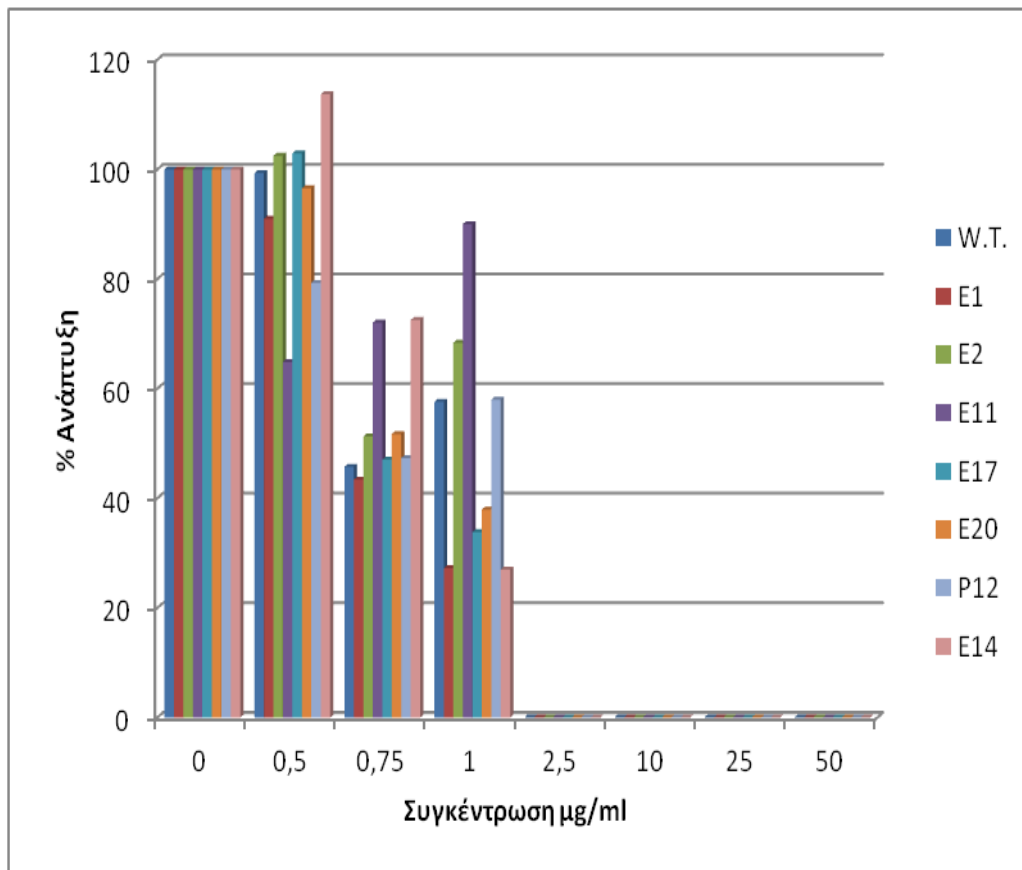
Δ.4.3 Carbendazim

- 1) Φαινοτυπική κατηγορία χαμηλής ανθεκτικότητας (στελέχη FGE.8, FGE.15 FGP.12, και FGP.27) και άγριο στέλεχος (W.T)



Σχήμα 9: Αποτελέσματα διασταυρωτής ανθεκτικότητας των στελεχών χαμηλής ανθεκτικότητας

- 2) Φαινοτυπική κατηγορία μέσης ανθεκτικότητας (στελέχη FGE.1, FGE.2, FGE.11, FGE.17, FGE.20, FGP.12 και FGE.14) και άγριο στέλεχος (W.T)

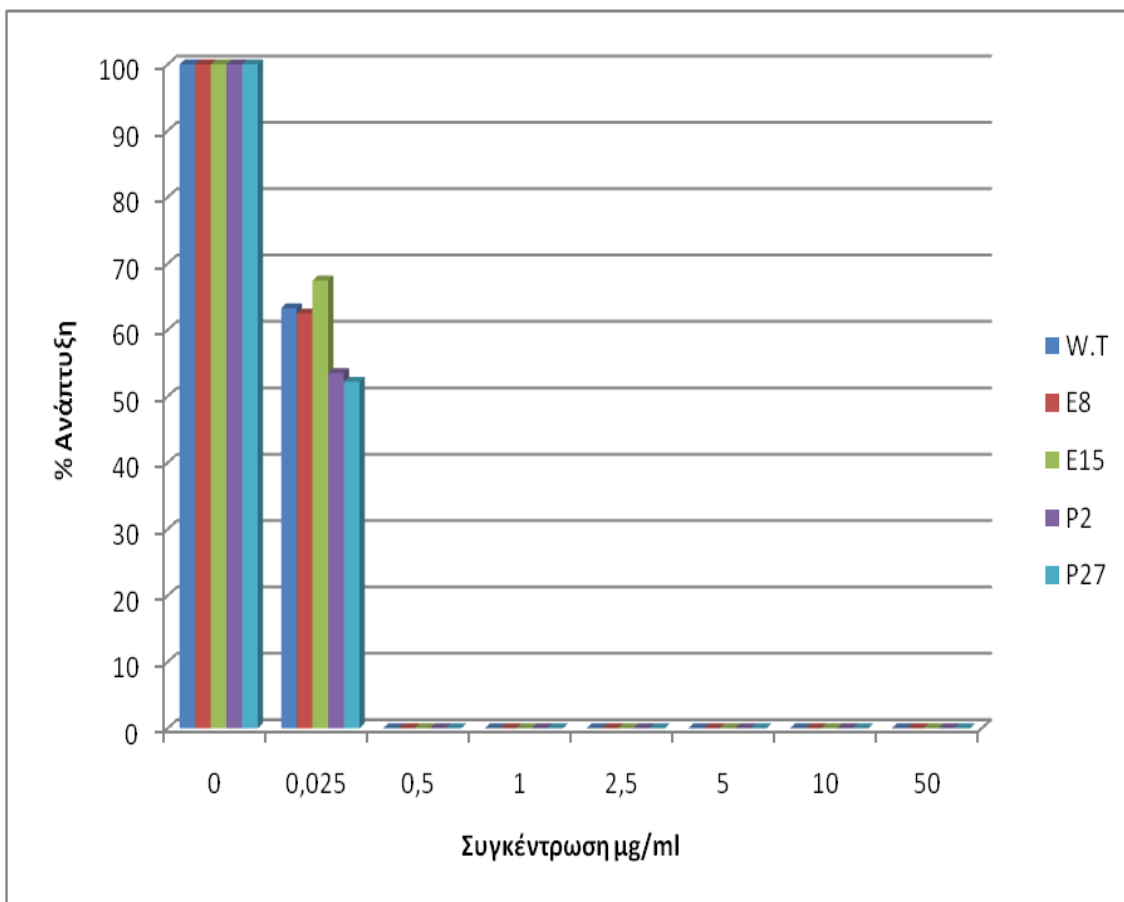


Σχήμα 10: Αποτελέσματα διασταυρωτής ανθεκτικότητας στελεχών μέσης ανθεκτικότητας

Στην περίπτωση του βενζιμιδαζολικού carbendazim κανένα στέλεχος δεν βρέθηκε να είναι ανθεκτικό, δίδοντας εικόνα αγρίου στελέχους.

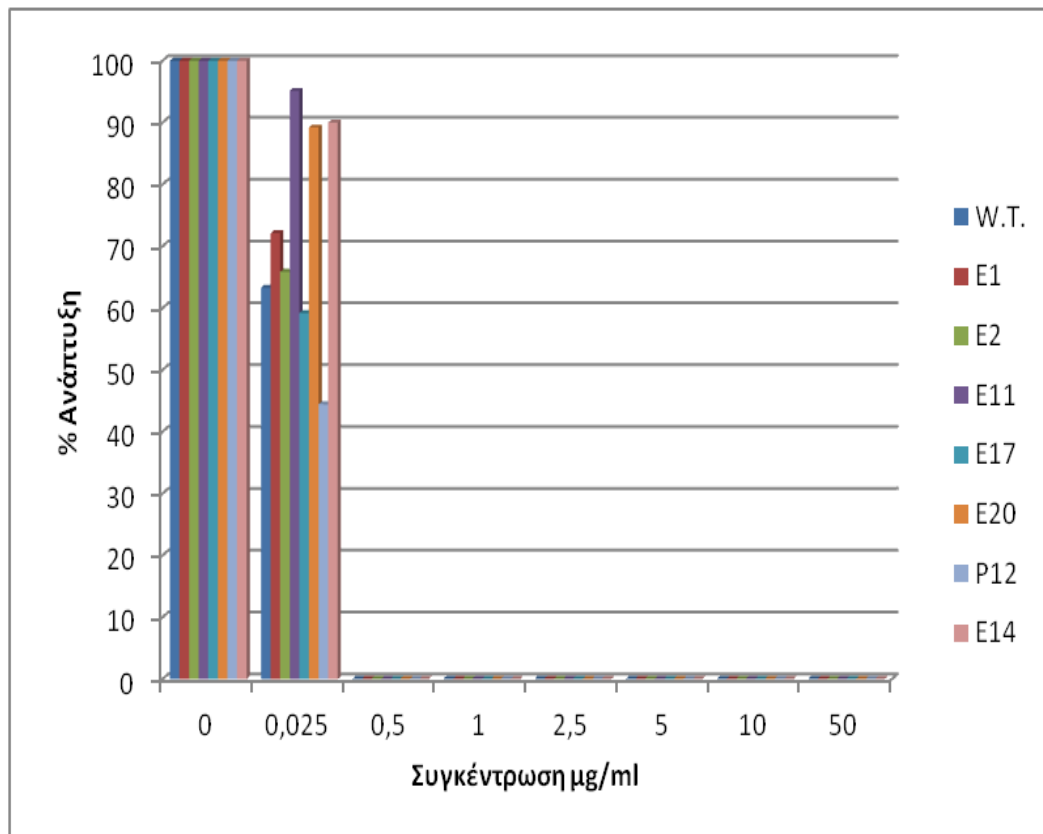
Δ.4.4 Fludioxonil

- 1) Φαινοτυπική κατηγορία χαμηλής ανθεκτικότητας (στελέχη FGE.8, FGE.15 FGP.12, και FGP.27) και άγριο στέλεχος (W.T)



Σχήμα 11: Αποτελέσματα διασταυρωτής ανθεκτικότητας των στελεχών χαμηλής ανθεκτικότητας

- 2) Φαινοτυπική κατηγορία μέσης ανθεκτικότητας (στελέχη FGE.1, FGE.2, FGE.11, FGE.17, FGE.20, FGP.12 και FGE.14) και άγριο στέλεχος (W.T)

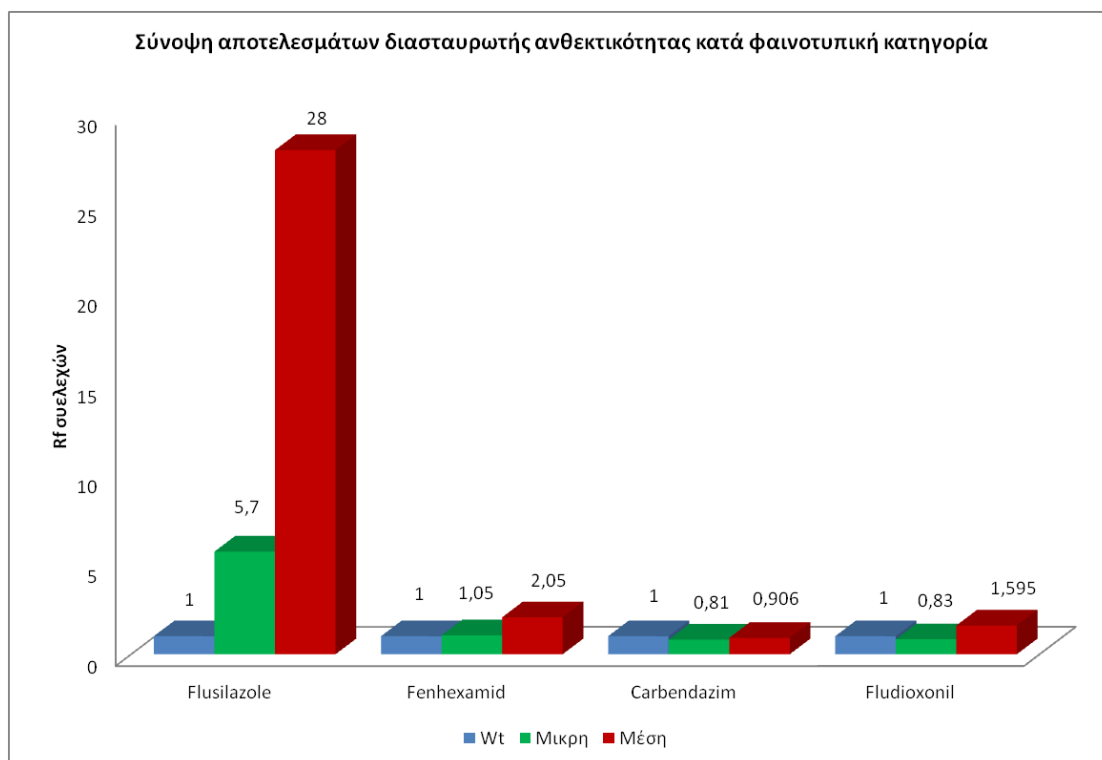


Σχήμα 12: Αποτελέσματα διασταυρωτής ανθεκτικότητας στελεχών μέσης ανθεκτικότητας

Στην περίπτωση του φαινυλοπυρρολικού fludioxonil κανένα στέλεχος δεν βρέθηκε να είναι ανθεκτικό, δίδοντας εικόνα αγρίου στελέχους.

Δ.4.5 Σύνοψη αποτελεσμάτων διασταυρωτής ανθεκτικότητας

Όσον αφορά τις τιμές του μέσου όρου του παράγοντα Rf κάθε φαινοτυπικής κατηγορίας για κάθε προκύπτει το ακόλουθο ραβδόγραμμα:



Σχήμα 13: Σύνοψη αποτελεσμάτων διασταυρωτής ανθεκτικότητας κατά φαινοτυπική κατηγορία

Από τα αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι στην πλειοψηφία των στελεχών διαπιστώθηκε διασταυρωτή ανθεκτικότητα μόνο με μυκητοκτόνα της υποομάδας των DMI's. Εξαιρέση αποτελεί το στέλεχος FGE.1 (της μέσου επιπέδου ανθεκτικότητας), στο οποίο βρέθηκε πολλαπλή ανθεκτικότητα και με το υδροξινιλίδιο Fenhexamid.

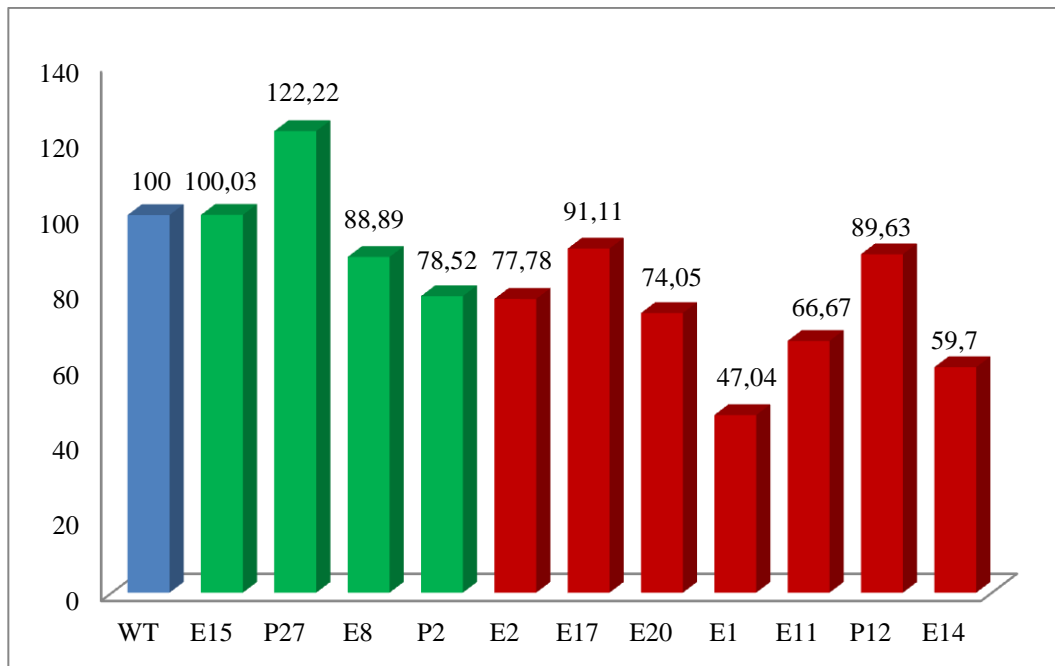
Δ.5 Μελέτη της επίδρασης της ανθεκτικότητας σε διάφορες παραμέτρους φυτοπαθογόνου προσαρμοστικότητας του παθογόνου

Δ.5.1. Επίδραση της ανθεκτικότητας στο ρυθμό αύξησης των ανθεκτικών στο prochloraz στελεχών.

Η μελέτη του ρυθμού αύξησης της ανάπτυξης του αγρίου στελέχους του αγρίου και των ανθεκτικών στο prochloraz στελεχών μύκητα *Fusarium graminearum* στο PDA πραγματοποιήθηκε με την μέτρηση της μυκηλιακής ανάπτυξής του. Η καμπύλη τα ανάπτυξης του μύκητα έγινε, λαμβάνοντας τους μέσους όρους των διαμέτρων των αποικιών στο τρυβλίο, σε διαφορετικούς χρόνους, σε σχέση με τις μέρες επώασης.

Τα αποτελέσματα δίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Στέλεχος	Ανάπτυξη σε εκατοστά (cm) ανά ημέρες			
	μέρες			
	2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	5 ^η ημέρα	7 ^η ημέρα
WT	1,85	2,425	3,7	6,75
E1	0,7	1,85	2,775	3,175
E2	0,6	1,875	2,45	5,25
E8	1,05	2,35	3,35	6
E11	1,2	1,85	2,773	4,5
E14	1,1	1,575	2,6	4
E15	0,9	2,05	2,925	6,95
E17	0,8	2,125	3,175	6,15
E20	0,7	1,975	2,7	5
P2	0,6	2,15	3,475	5,3
P12	0,9	2	3,125	6,05
P27	1,9	3,6	3,5	8,25

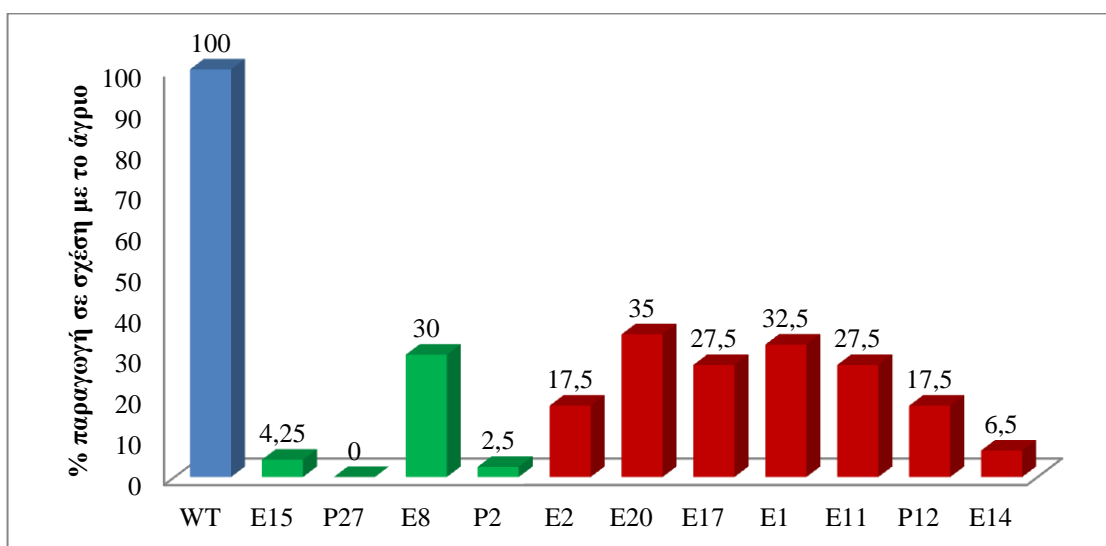


Σχήμα 14: % ανάπτυξη των στελεχών σε σχέση με την ανάπτυξη του αγρίου (WT) στις 7 ημέρες.

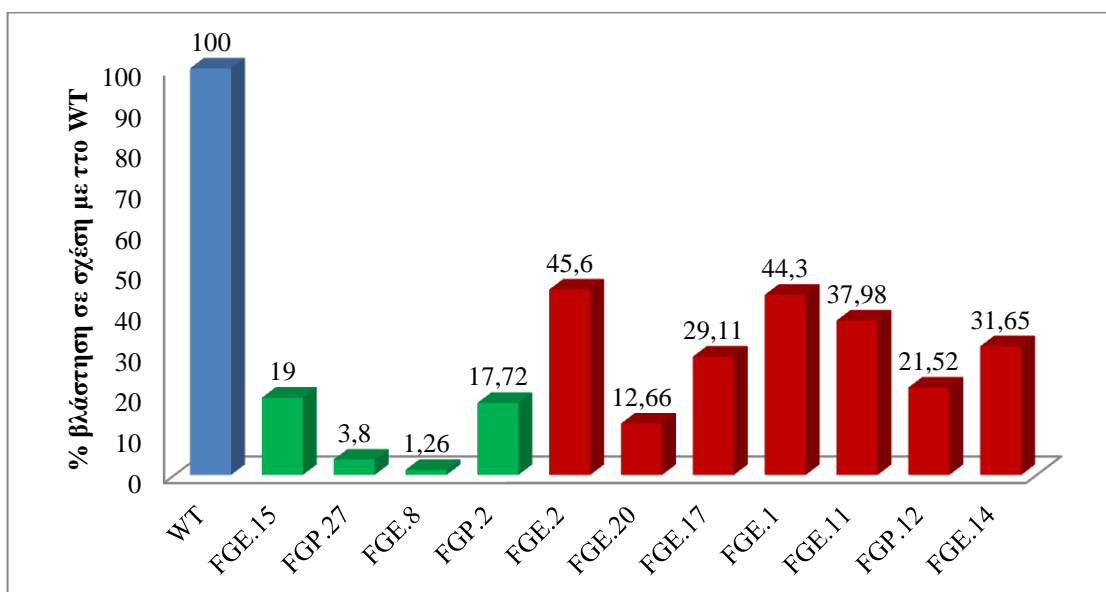
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα περισσότερα στελέχη δεν υπολείπονται σημαντικά του αγρίου σε ανάπτυξη, εκτός των στελεχών FGE.1 FGE.11 και FGE.14.

Δ.5.2. Επίδραση της ανθεκτικότητας στην ικανότητα παραγωγής και βλάστησης κονιδίων των ανθεκτικών στο prochloraz στελεχών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα όπως φαίνονται στα σχήματα 3 και 4, η επίδραση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στην ικανότητα παραγωγής και βλάστησης των κονιδίων φαίνεται να είναι σημαντική, καθώς τα ανθεκτικά στελέχη υπολείπονται σε σημαντικό βαθμό του αγρίου.



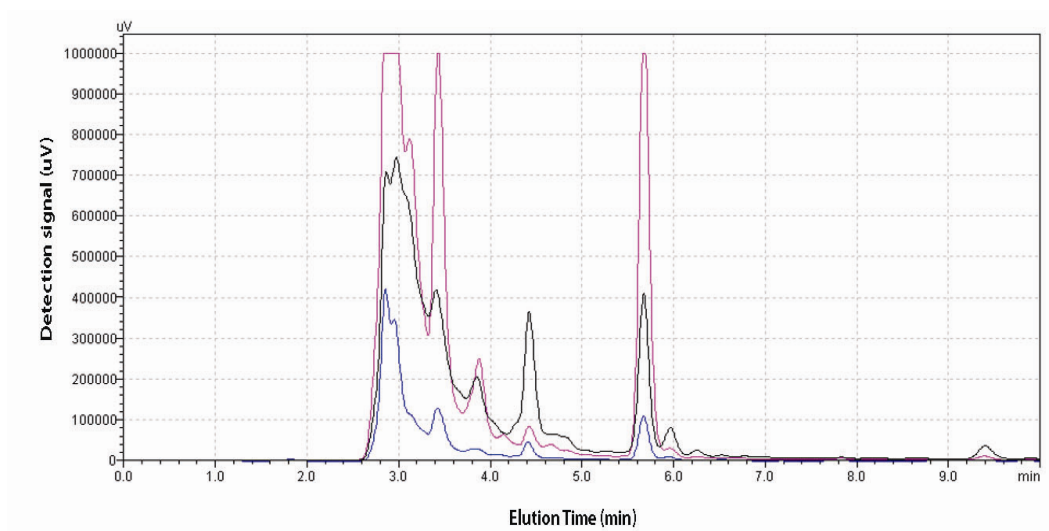
Σχήμα 3: Παραγωγή κονιδίων αγρίου και ανθεκτικών στελεχών



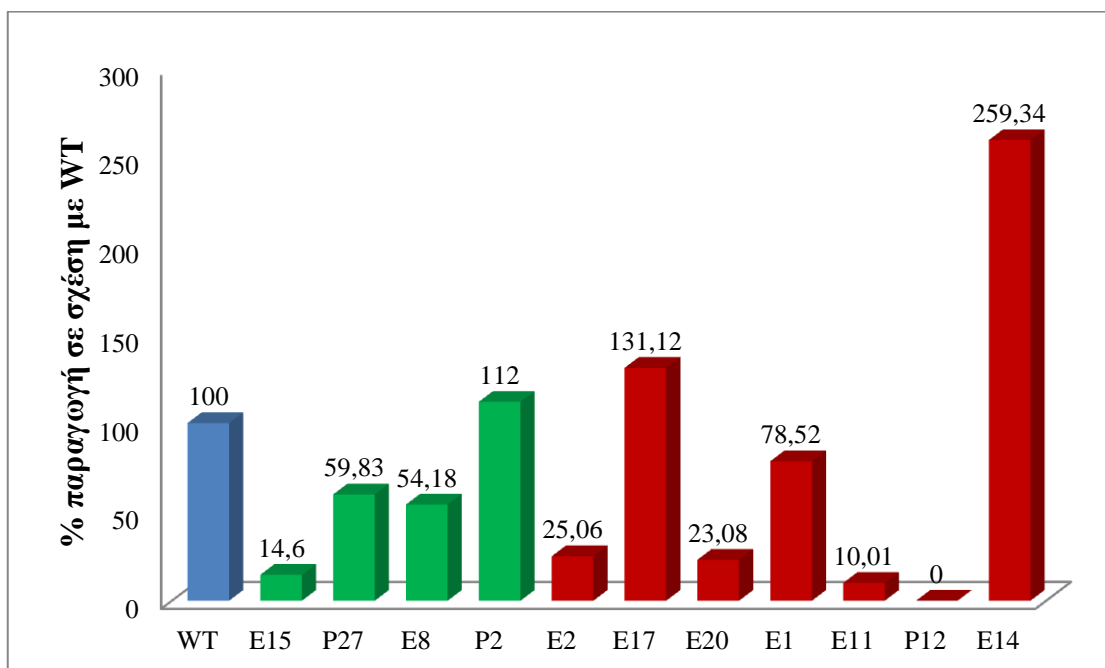
Σχήμα 4: Βλάστηση κονιδίων αγρίου και ανθεκτικών στελεχών

Δ.6. Αποτελέσματα ανάλυσης Ζεαραλενόνης

Στην παρακάτω εικόνα δίνεται το γράφημα από την ανάλυση της ζεαραλενόνης τόσο για το άγριο στέλεχος (μαύρη καμπύλη) όσο και για στέλεχος με μικρότερη παραγωγή ζεαραλενόνης, όπως το στέλεχος FGE1 (μπλε καμπύλη) όσο και για στέλεχος με υψηλότερη παραγωγή όπως το FGE14 (μωβ καμπύλη)



Αναλυτικά τα αποτελέσματα χωρισμένα κατά φαινοτυπική κατηγορία δίνονται στο ακόλουθο ραβδόγραμμα:

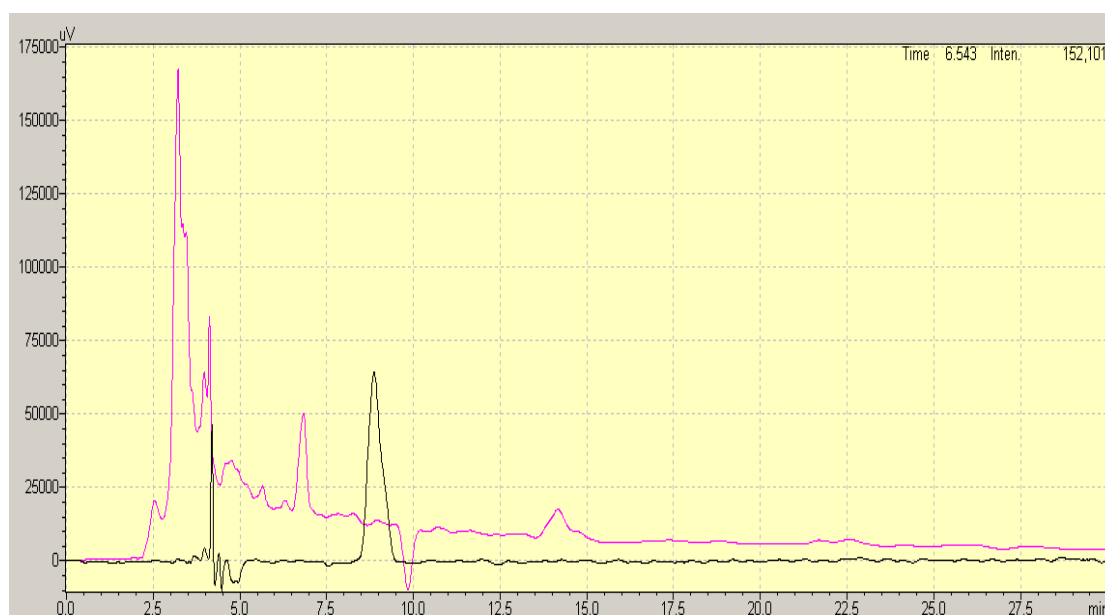


Σχήμα 5: Παραγωγή ζεαραλενόνης

Η παραγωγή ζεαραλενόνης φαίνεται να είναι μειωμένη στα ανθεκτικά στελέχη, με εξαίρεση των στελεχών FGE17 και FGP2 των οποίων η παραγωγή φαίνεται να μην υπολείπεται του αγρίου και του στελέχους FGE14 που έδωσε και την υψηλότερη ανθεκτικότητα, του οποίου η παραγωγή είναι 2,5 φορές υψηλότερη αυτής του αγρίου στελέχους.

Δ.7. Αποτελέσματα ανάλυσης δεοξυνιβαλενόνης

Στην παρακάτω εικόνα δίνεται το γράφημα από την ανάλυση της δεοξυνιβαλενόλης. Με μαύρο χρώμα δίνεται η ανάλυση προτύπου δεοξυνιβαλενόλης συγκέντρωσης 10μg/ml, ενώ με κόκκινο χρώμα η ανάλυση του αγρίου στελέχους



Εικόνα

Απ' ότι φαίνεται στην παρούσα μελέτη δεν κατέστη δυνατή η ανάλυση της δεοξυνιβαλενόλης, παρά την ανάπτυξη μεθόδου, ικανής να την ανιχνεύσει. Τα πιθανά αίτια αναλύονται στη συζήτηση

Ε. Συμπεράσματα - συζήτηση

Στη χημική ομάδα των DMI's έχουν πραγματοποιηθεί κατά το παρελθόν σειρά ερευνών, με αντικείμενο τον κίνδυνο εμφάνισης ανθεκτικότητας σε αυτούς, τόσο εργαστηριακά, όσο και με πειράματα αγρού. Σύμφωνα με τα όσα είναι γνωστά στη διεθνή βιβλιογραφία, αν και οι μεταλλαγές για ανθεκτικότητα στους DMI's ελέγχονται από πολυγονικά συστήματα, και με δυσμενείς επιδράσεις στα φυτοπαθολογικά χαρακτηριστικά των μυκήτων, όπως είναι ο ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης και η παραγωγή και βλάστηση κονιδίων, ανθεκτικά στελέχη έχουν εμφανισθεί στον αγρό (Nikou, Malandrakis, Konstantaki, Vontas, Markoglou, & Ziogas, 2009)..

Ειδική περίπτωση στην αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών των φυτών, αποτελούν και οι μυκοτοξικογόνοι μύκητες και πως η ανθεκτικότητα μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή μυκοτοξινών. Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές έρευνες με αντικείμενο την επίδραση της ανθεκτικότητας των μυκοτοξικογόνων μυκήτων στους διάφορους παρεμποδιστές, αλλά λίγες μελέτες για το πως μπορεί να επιδρά η ανθεκτικότητα και στην παραγωγή μυκοτοξινών από αυτούς (Δούκας, 2004; Karaoglanidis, Markoglou, Bardas, Doukas, Konstantinou, & Kalambokis, 2001; Δούκας, 2010; Zhou, et al., 2009; Becher, Hettwer, Karlovsky, Deising, & Wirsal, 2009).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανότητα εμφάνισης στελεχών του μύκητα *Fusarium graminearum* ανθεκτικών στους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών και συγκεκριμένα στην ομάδα των παρεμποδιστών της απομεθυλίωσης του C-14 (DMI's) καθώς και η επίδρασή των μεταλλαγών στην παραγωγή μυκοτοξινών.

Ο μύκητας *Fusarium graminearum* αποτελεί ένα σημαντικό παθογόνο των σιτηρών, το οποίο παράγει μυκοτοξίνες που ανήκουν στις τύπου Β τριχοθηκίνες και κυρίως της δεοξυνιβαλενόνης (DON) και την ζεαραλενόνη (ZEA). Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στην εκτενή έρευνα διεθνώς για την εύρεση κατάλληλων μεθόδων αντιμετώπισης του παθογόνου (Rubella., Goswami, & Kistler, 2004; Gary & Susan, 2007; Blamدينo, Minelli, & Reyneri, 2006; Akos, et al., 2011). Από τα μ'λεχρι στιγμής δεδομένα προκύπτει ότι τα καλύτερα αποτελέσματα για την αντιμετώπιση του παθογόνου δίνει η χημική καταπολέμηση.

Για το λόγο αυτό αρχικά πραγματοποιήθηκε πείραμα αξιολόγησης της in vitro ευαισθησίας του αγρίου στελέχους σε διάφορα μυκητοκτόνα. Από τα αποτελέσματα

των βιοδοκιμών, προκύπτει ότι η πλέον αποτελεσματική χημική ομάδα ήταν αυτή των ιμιδαζολικών (prochloraz). Ακολούθησαν κατά σειρά αποτελεσματικότητας το βενζιμιδαζολικό carbendazim, τα φαινυλοπυρολικά fenpiclonil και fludioxonil, και τέλος τα τριαζολικά epxiconazole, flusilazole και difenconazole,. Ως μη αποτελεσματικά, χαρακτηρίστηκαν διάφορες μη ενδεικνυόμενες για το *Fusarium graminearum* τριαζόλες, όπως είναι το triadimenol. Αυτή η αναποτελεσματικότητα πιθανόν να σχετίζεται με μειωμένη συγγένεια του παρεμποδιστή-στόχου. Οι στρομπιλουρίνες απέτυχαν να παρεμποδίσουν πλήρως το παθογόνο, ακόμη και μετά την προσθήκη του σαλικυλδροξαμικού οξέος (SHAM) για το μπλοκάρισμα πιθανής εναλλακτικής αναπνοής. Ακολούθησε το μορφολινικό fenpropimorph, ενώ η ομάδα των ανυλοπυριμιδανών (cyprodinil και pyrimethanil), αποδείχθηκε ως η πλέον αναποτελεσματική, καθώς απέτυχαν πλήρως να παρεμποδίσουν το μύκητα. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύουν τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών (Akos, και συν., 2011; Arthur, 1891; Blammino, Minelli, & Reyneri, 2006; McMullen, Jones, & Gallenberg, 1997; Nganje, Bangsund, Leistritz, Wilson, & Tiapo, 2002; Parry, Jeckinson, & McLeod, 1995; Rubella., Goswami, & Kistler, 2004; Paul, Lipps, Hershman, McMullen, Draper, & Madden, 2008). Η αναποτελεσματικότητά του boscalid μπορεί να οφείλεται και στη χρήση λανθασμένου θρεπτικού υλικού και συγκεκριμένα του PDA, καθώς πολύ πρόσφατα μέσω προσωπικής επικοινωνίας, έγινε γνωστό ότι για την in vitro αξιολόγηση του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου χρησιμοποιείται φτωχό θρεπτικό υλικό.

Η υψηλή αποτελεσματικότητα του prochloraz αποτέλεσε την αιτία ανάπτυξης ανθεκτικών σε αυτό στελεχών με τη μέθοδο της UV ακτινοβολίας. Η συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών βρέθηκε να είναι υψηλή, της τάξης του 3×10^{-5} . Υψηλή συχνότητα μεταλλαγών για ανθεκτικότητα έδωσαν και πειράματα με το μύκητα *Cercospora beticola* (Henry & Trivellas, 1989), το *Penicillium caseicolum* (falendre et al 1987) και το *Botrytis cinerea* (Μαρκόγλου & Ζιώγας, 1994). Άλλωστε η υψηλή συχνότητα μεταλλαγών αποτελεί χαρακτηριστικό της κατηγορίας των DMI's (Buchenauer, 1995).

Μελέτη του κινδύνου ανθεκτικότητας στο prochloraz έδειξε την ύπαρξη δύο φαινοτυπικών κατηγοριών. Στην κατηγορία χαμηλής ανθεκτικότητας, χαρακτηρίστηκαν όσα στελέχη εμφάνισαν rf έως 10 (FGE.15, FFP.27, FGE.8, FGP.2), ενώ ως μέσου προς υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητας χαρακτηρίστηκαν όσα στελέχη εμφάνισαν rf που κυμαίνεται από 10-60 (FGE.2, FGE.20, FGE.17, FGE.1,

FGE.11, FGP.12, FGE.14). Σύμφωνα με τους Becher et al. (Becher, Hettwer, Karlovsky, Deising, & Wirsal, 2009) η ανθεκτικότητα του μύκητα *Fusarium graminearum* στο τριαζολικό μυκητοκτόνο tebuconazole, έδωσε στελέχη που το *if* τους κυμαίνονταν από 2-10,9. Παρόμοια επίπεδα έδωσαν και πειράματα με το μύκητα *Nectria haematococca var curcubitae* στο fenarimol, και το imazalil (Kalamarakis, Waard, Ziogas, & Georgopoulos, 1991). Το χαμηλό προς μέσο επίπεδο ανθεκτικότητας των στελεχών, καθώς και ότι ο συντελεστής ανθεκτικότητας αυξάνει σταδιακά στα ανθεκτικά στελέχη, φανερώνει την πιθανή ύπαρξη πολυγονικού ελέγχου της ανθεκτικότητας. Πολυγονικός έλεγχος της ανθεκτικότητας στους DMI's έχει παρατηρηθεί από παλιά, χαρακτηρίζοντας την ομάδα (Koller W. , 1988; Koller & Scheinpflug, 1987; de Waard M. , 1994; Kuck, 1994; Kalamarakis, Waard, Ziogas, & Georgopoulos, 1991).

Πειράματα διασταυρωτής ανθεκτικότητας έδειξαν ότι όλα τα στελέχη εμφάνισαν διασταυρωτή ανθεκτικότητα με το τριαζολικό flusilazole., ενώ κατά κανόνα οι μεταλλαγές για ανθεκτικότητα δεν επηρέασαν την ευαισθησία σε παρεμποδιστές που ανήκουν σε ομάδες διαφορετικές αυτών των DMI's, όπως το fenhexamid (υδροξιανιλίδιο), το carbendzim (βενζιμιδαζολικό) και το fludioxonil (φαινυλοπυρολικό). Εξαιρέση αποτελεί το στέλεχος FGE.1, το οποίο εμφανίζει μειωμένη ευαισθησία στο fenhexamid. Αυτή η εξειδικευμένη ανθεκτικότητα με μυκητοκτόνα της υποομάδας των DMI's πέραν του στελέχους FGE.1, μπορεί να ερμηνευθεί μέσω της ύπαρξης εξειδικευμένου μηχανισμού ανθεκτικότητας. Για το στέλεχος FGE.1 στο οποίο βρέθηκε θετική διασταυρωτή ανθεκτικότητα και με το υδροξιανιλίδιο Fenhexamid, πιθανόν να εμπλέκεται κάποιος μη εξειδικευμένος μηχανισμός ανθεκτικότητας, όπως είναι η περίπτωση των ABC μεταφορέων, είτε να εμπλέκεται ο μηχανισμός της επιβίωσης με κατώτερες στερόλες..

Η ανθεκτικότητα στους DMI's έχει μελετηθεί εκτενώς, με αποτέλεσμα ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας να είναι σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό γνωστός. Οι μέχρι σήμερα γνωστοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας στους DMI's είναι η πρόκληση σημειακών μεταλλαγών στο ένζυμο απομεθυλάση του C14 της λανοστερόλης (CYP51), η βιοσύνθεση του οποίου κωδικοποιείται από το γονίδιο *Cyp51*, οι οποίες επηρεάζουν τη συγγένεια του ενζύμου με το στόχο, η υπερέκφραση του γονιδίου *Cyp51*, η οποία οδηγεί στην παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων του ενζύμου CYP51 και ο μηχανισμός της αυξημένης απέκκρισης.

Στην περίπτωση των *Uninuclea necator* (Deleye, Laigret, & Corio-Coset, 1997), *Erysiphe graminis f. sp. hordei* (Deleye, Bousset, & Corio-Costet, 1998) και *Blumeria graminis f. sp. tritici* (Yan, Yang, Zhou, Duan, & Ma, 2009) έχει βρεθεί ότι σημειακή μεταλλαγή του γονιδίου *Cyp51* που οδηγεί στην αντικατάσταση της φαιλυλαλανίνης από τυροσίνη στη θέση 136 (Y136F) του ενζύμου *Cyp51*, απαντάται σε στελέχη ανθεκτικά στους DMI's. Αλλαγή της φαινυλαλανίνης από λευκίνη στη θέση 180 του *Cyp51* γονιδίου βρέθηκε ότι σχετίζεται με την ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών αγρού στους DMI's του *Tapesia acuformis* (Albertini, Gredt, & Leroux, 2003). Αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη από τρυπτοφάνη στη θέση G54 (G54W) του ενζύμου *Cyp51A* βρέθηκε σε δύο ανθεκτικά στους DMI's στελέχη του μύκητα *Aspergillus parasiticus* (Δούκας, 2010). Πέραν από αυτές τις σημειακές μεταβολές του *Cyp51* και άλλες σημειακές μεταβολές στο γονίδιο αυτό εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στους DMI's, όπως στην περίπτωση των *Penicillium italicum* (Joseph-Horne & Hollomon, 1997), *Ustilago maydis* (Butters, Zhou, & Hollomon, 2000) και *Aspergillus fumigatus* (Diaz-Guerra, Mellado, Cuenca-Estrella, & Rodriguez-Tudela, 2003; Mann, et al., 2003; Mellando, et al., 2007; Howard, et al., 2006).

Η ύπαρξη στελεχών εξειδικευμένης ανθεκτικότητας στους DMI's, η οποία δε βρέθηκε να σχετίζεται με σημειακές μεταλλαγές του γονιδίου *Cyp51*, οδηγεί στο συμπέρασμα της ύπαρξης εναλλακτικού μηχανισμού ανθεκτικότητας. Στο μύκητα *Candida glabrata* υπερέκφραση του *Cyp51* οδήγησε σε ανθεκτικότητα (Marichal, et al., 1997). Σε ανθεκτικά στελέχη αγρού του *Penicillium digitatum* (Hamamoto, et al., 2000) βρέθηκε η ύπαρξη 126bp αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου *Cyp51*, που οδήγησε στην έκφραση έως και πέντε φορών του γονιδίου, σε αντίθεση με τα ευαίσθητα στελέχη, στα οποία το γονίδιο εκφράστηκε μόνο μία φορά. Μετασχηματισμός του γονιδίου μαζί με τον υποκινητή από ανθεκτικά σε ευαίσθητα στελέχη, οδήγησε στην υπερέκφραση του γονιδίου και ανθεκτικότητα στους DMI's των μετασχηματισμένων στελεχών. Στα στελέχη αυτά η έκφραση του γονιδίου και η ανθεκτικότητα μειώθηκαν όταν οι επανάληψη του υποκινητή μειώθηκε από πέντε φορές σε δύο. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι οι 126 bp επαναλήψεις επάγουν την υπερέκφραση του γονιδίου *Cyp51*, οδηγώντας σε ανθεκτικότητα στους DMI's. Πέραν της 126 αλληλουχίας, έως σήμερα έχουν βρεθεί άλλες δύο που σχετίζονται με υπερέκφραση του *Cyp51* γονιδίου. Στην περίπτωση του *Blumeriella jaarii* βρέθηκε η ύπαρξη 2,1-5,2kb ενθέματος (Ma & Michailides, 2005) και η ύπαρξη 553bp στην περίπτωση του *Venturia inaequalis* (Schnabel & Jones, 2001). Ο μηχανισμός της

υπερέκφρασης του γονιδίου *Cyp51* έχει βρεθεί σε πολλούς άλλους φυτοπαθογόνους μύκητες, όπως οι *Penicillium italicum*, *Venturia inaequalis*, *Monilinia fruticola* (Hamamoto, et al., 2000; Schnabel & Jones, 2001; vanNistelrooy, vandenBrink, vanKan, vanGorcom, & deWaard, 1996; Luo & Schnabel, 2008) *Aspergillus westerdijiae* (Δούκας, 2010) και *Cercospora beticola* (Nikou, Malandrakis, Konstantaki, Vontas, Markoglou, & Ziogas, 2009).

Η εμφάνιση ανθεκτικών στους DMI's στελεχών με μειωμένη ευαισθησία και σε μυκητοκτόνα με διαφορετική δράση σε βιοχημικό επίπεδο, δεν μπορεί να ερμηνευθεί με τους προηγούμενους δύο μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση εξειδικευμένης ανθεκτικότητας. Σε παλαιότερες εργασίες έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη ενός ενεργητικού μηχανισμού αυξημένης απέκκρισης σε στελέχη των *Aspergillus nidulans*, *Penicillium italicum* και *Nectria haematococca*, που είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης των DMI's στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον (Kalamarakis, Demopoulos, Ziogas, & Georgopoulos, 1989; de Waard & van Nistelrooy, 1980; deWaard & vanNistelrooy, 1988). Ο μηχανισμός της αυξημένης απέκκρισης στηρίζεται στη λειτουργία πρωτεϊνικών μεταφορέων γνωστών ως ABC transporters (deWaard, 1997; DelSorbo, Andrade, vanNistelrooy, vanKan, Baltzi, & deWaard, 1997; DelSorbo, Schoonbeek, & deWaard, 2000). Σήμερα ο μηχανισμός αυτός έχει διαπιστωθεί σε διάφορα παθογόνα όπως τα *Aspergillus flavus*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. westerdijiae*, *A. parasiticus*, *Bitrytis cinarea*, *Penicillium italicum*, *P. digitatum*, *Mycosphearella graminicola* και *Phytophthora infestans* (Guan, Kapteyn, Kerkenaar, & deWaard, 1992; DelSorbo, Schoonbeek, & deWaard, 2000; Tobin, Peery, & Skatrud, 1997; Nakaune, Adachi, Nawata, Tomiyama, Akutsu, & Hidi, 1998; Hayashi, Schoonbeek, Sugiura, & deWaard, 2001; Zwiers, Stergiopoulos, vanNistelrooy, & deWaard, 2002; Ziogas, Markoglou, Theodosiou, Anagnostou, & Boutopoulou, 2006; Δούκας, 2004) (Δούκας, 2010).

Ο μηχανισμός της επιβίωσης του παθογόνου με κατώτερες στερόλες, ο οποίος απαντάται μόνο στην περίπτωση των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης στερολών. Κατά το μηχανισμό αυτό παρακάμπτεται η βιοσύνθεση εργοστερόλης στο στάδιο της απομεθυλίωσης του C-14. έχοντας ως αποτέλεσμα την παραγωγή κατώτερων C-14 μεθυλστερολών. Πρόκειται όμως για στερόλες που δεν μπορούν να αντικαταστήσουν με πλήρη επιτυχία την εργοστερόλη στις κυτταρικές μεμβράνες, έχοντας αρνητικό αντίκτυπο στα φυτοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ανθεκτικών στελεχών, τα οποία υπολείπονται σημαντικά του αγρίου πληθυσμού (Leroux & Gredt, 1984; Aoyama, et

al., 1983; Aoyama, et al., 1987; King, Wiseman, Kelly, & Kelly, 1985). Επειδή η απομεθυλίωση του C-14 λαμβάνει χώρα κατά τα αρχικά στάδια της βιοσύνθεσης στερολών, παράκαμψή του οδηγεί στην απώλεια της αποτελεσματικότητας των παρεμπιδιστών στερολών που δρουν από το στάδιο αυτό και μετά..

Εκτός από το επίπεδο και τις σχέσεις διασταυρωτής ανθεκτικότητας σημαντικό ρόλο στον κίνδυνο επικράτησης ανθεκτικών στελεχών κατέχουν και οι επιπτώσεις της ανθεκτικότητας σε διάφορες παραμέτρους προσαρμοστικότητας του παθογόνου. Μελέτη των φυτοπαθογόνων χαρακτηριστικών έδειξε ότι τα στελέχη χαμηλής ανθεκτικότητας φαίνεται να μην υπολείπονται, τουλάχιστον σε σημαντικό βαθμό, της μυκηλιακής ανάπτυξης του αγρίου στελέχους. Τα στελέχη μέσης ανθεκτικότητας υπολείπονται ελαφρώς του αγρίου στελέχους, εξαιρουμένων των στελεχών FGE.1 και FGE.14, τα οποία υπολείπονται σημαντικά της ανάπτυξης του αγρίου στελέχους. Σε γενικές γραμμές μπορεί να υποστηριχθεί ότι με εξαίρεση των στελεχών FGE.1 και FGE.14 ο ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης δεν φαίνεται να επηρεάζεται αρνητικά, τουλάχιστον σε σημαντικό βαθμό σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Κατά την παραγωγή και βλάστηση των κονιδίων τα αποτελέσματα είναι ξεκάθαρα. Όλα τα στελέχη ανεξαρτήτως φαινοτυπικής κατηγορίας υπολείπονται σημαντικά του αγρίου στελέχους. Ειδικά στα στελέχη της χαμηλής ανθεκτικότητας η παραγωγή κονιδίων είναι σχεδόν μηδενική, ενώ υπολείπονται σημαντικά και όσον αφορά τη βλάστησή τους. Η ανθεκτικότητα του στελέχους FGE.1 τόσο στους DMIs, όσο και στο fenhexamid, καθώς και η σημαντική επίδραση της ανθεκτικότητάς στην προσαρμοστικότητά του, δείχνει ότι ο πιθανός μηχανισμός της ανθεκτικότητας είναι αυτός της επιβίωσης με κατώτερες στερόλες.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι στην περίπτωση του *Fusarium graminearum* οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας στο ημιδαζολικό prochloraz πιθανόν να είναι πλειοτροπικές. Παρόμοια πλειοτροπική επίδραση έχει βρεθεί τόσο στην περίπτωση του *Nectria haematococca var. curcubitae* (Kalamarakis, Waard, Ziogas, & Georgopoulos, 1991), *Aspergillus parasiticus* (Δούκας, 2004), *A. westerdijkiae* (Δούκας, 2010), όσο και σε πλήθος άλλων παθογόνων, καθώς οι μεταλλαγές για ανθεκτικότητα στους DMI's θεωρούνται κατά κανόνα πλειοτροπικές (de Waard & van Nistelrooy, 1990; de Waard, και συν., 1993).

Στην περίπτωση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων πέραν της εκτίμησης του κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών σε διάφορα μυκητοκτόνα, είναι πολύ σημαντική και η πιθανή επίδραση της ανθεκτικότητας στην παραγωγή μυκοτοξινών.

Παρόλα αυτά μέχρι σήμερα η πιθανή επίδραση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στους διάφορους παρεμποδιστές και εν προκειμένω στους DMI's στην παραγωγή μυκοτοξινών δεν έχει διερευνηθεί, εκτός ελαχίστων περιπτώσεων.

Η παραγωγή της ζεαραλενόνης βρέθηκε να είναι μειωμένη στα ανθεκτικά στελέχη σε σχέση με το άγριο, ανεξαρτήτως του επιπέδου ανθεκτικότητάς τους με εξαίρεση τα στελέχη FGP.2, FGE.17 και FGE.14. Σε μία μόνο εργασία (Becher, Hettwer, Karlovsky, Deising, & Wirsel, 2009) έγινε προσπάθεια σύνδεσης τυχόν επιπτώσεων της ανθεκτικότητας του *Fusarium graminearum* στο tebuconazole στην παραγωγή ζεαραλενόνης, αλλά η παραγωγή ζεαραλενόνης διέφερε σημαντικά μεταξύ των επαναλήψεων κάθε στελέχους, καθιστώντας σύμφωνα με τους ερευνητές αδύνατη την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ανθεκτικότητα στο flusilazole στους μύκητες *Aspergillus parasiticus* και *A. westerdijkiae* είχε ως αποτέλεσμα την ύπαρξη στελεχών που παρήγαγαν αφλατοξίνες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με την παραγωγή του αγρίου, καθώς και στελέχη τα οποία δεν παρήγαγαν (Δούκας, 2010). Στελέχη του *A. parasiticus* ανθεκτικά στα φαινυλοπυρρολικά και ανιλνοπυριμιδινικά παρουσίασαν μυκοτοξικογόνο ικανότητα υψηλότερη σε σχέση με αυτήν του αγρίου στελέχους (Markoglou, Doukas, & Ziogas, 2008; Markoglou, Doukas, & Ziogas, 2009).

Στην παρούσα μελέτη δεν κατέστη δυνατή η ανάλυση της δεοξυνιβαλενόλης, καθώς τόσο το άγριο όσο και τα ανθεκτικά στελέχη δεν την παρήγαγαν. Σύμφωνα με τους Mudge και Voigt (Mudge, Macky, Dong, Gardiner, White, & Manners, 2006; Voigt, Schafer, & Salomon, 2005) η παραγωγή της Don που προήλθε από μόλυνση ζωντανών ιστών είναι υπερπολλαπλάσια της *in vitro* παραγωγής της, οδηγώντας τους στο συμπέρασμα της ύπαρξης κάποιας ουσίας από τον ξενιστή, που δρα ως σήμα για την παραγωγή της. Η συσχέτιση μεταξύ Don και μολυσματικότητας (Desmond, et al., 2008; Nishiuchi, et al., 2006) καθώς και ότι οι τριχοθηκίνες παράγονται κατά τα αρχικά στάδια της μόλυνσης στη διάρκεια της άνθισης, όντας απαραίτητες για την εξάπλωση του παθογόνου στους ιστούς του ξενιστή (Noddu, Cho, Kruger, & Muehlbauer, 2006), οδηγεί στην υπόθεση ότι η παραγωγή της μπορεί να συμβάλλει στη νέκρωση των κυττάρων του ξενιστή, βοηθώντας κατ' αυτόν τον τρόπο την εξάπλωση του παθογόνου στους ιστούς του ξενιστή (Nishiuchi, et al., 2006). Σύμφωνα με τους Gardiner et al (Gardiner, Kazan, & Manners, 2009) η παραγωγή τριχοθηκινών σχετίζεται με διάφορα υποπροϊόντα που παράγονται κατά το βιοσυνθετικό μονοπάτι της σπερμιδίνης από αργινίνη. Βρήκαν ότι αυξημένες

συγκεντρώσεις πουτρεσίνης συμπίπτουν με την παραγωγή της Don, οδηγώντας τους στο συμπέρασμα της πιθανής δράσης τους σαν σήμα για την βιοσύνθεση της Don. Τα στάδια αυτά τα οποία λαμβάνουν χώρα κατά τη μόλυνση ζωντανών, πιθανόν δείχνουν ότι η μόλυνση των σπόρων όπως πραγματοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη δεν ενδείκνυται για την παραγωγή της Don σε ανιχνεύσιμες τουλάχιστον συγκεντρώσεις, ώστε να καταστεί δυνατή η μελέτη της..

Η υψηλή συχνότητα μεταλλαγών για ανθεκτικότητα στους DMIs, καθώς και η σχετικά μη σημαντική επίπτωση της ανθεκτικότητας στην μυκηλιακή αύξηση των ανθεκτικών στελεχών, φανερώνει ότι η πιθανότητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στον αγρό είναι πιθανή, παρά τις όποιες δυσμενείς επιπτώσεις της ανθεκτικότητας σε διάφορες παραμέτρους προσαρμοστικότητας όπως η παραγωγή και βλάστηση των κονιδίων. Εξάλλου η ύπαρξη ανθεκτικών στους DMIs στελεχών αγρού του *Fusarium graminearum* τόσο στην Ευρώπη, όσο και την Κίνα (Becher, Hettwer, Karlovsky, Deising, & Wirsal, 2009), δείχνει ότι μπορεί να εμφανιστούν ανθεκτικά στελέχη στον αγρό, παρά τις δυσμενείς επιδράσεις της ανθεκτικότητας στους DMIs, στα διάφορα φυτοπαθογόνα χαρακτηριστικά του παθογόνου.

Το δεδομένο αυτό σε συνδυασμό με την ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών, τα οποία παράγουν μυκοτοξίνες σε παρόμοια επίπεδα της παραγωγής του αγρίου, αλλά κυρίως η ύπαρξη του ανθεκτικού στελέχους που παρήγαγε υπερδιπλάσια ποσότητα ζεαραλενόνης σε σχέση με την παραγωγή του αγρίου, δείχνει ότι ενέχει ο κίνδυνος εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών του *F.graminearum* στον αγρό, τα οποία μπορεί να παράγουν ποσότητες μυκοτοξινών, υψηλότερες των προτινόμενων από την Ε.Ε. επιπέδων, καθιστώντας τη διάθεση των προσβεβλημένων αγροτικών προϊόντων δυσχερή.

Για την αντιμετώπιση του ανωτέρω κινδύνου, επιβάλλεται η ορθή διαχείριση του κινδύνου ανθεκτικότητας στους DMIs, μέσω της λήψης κατάλληλων μέτρων. Τέτοια μέτρα αποτελούν, i) η καλλιέργεια σύμφωνα με τα πρότυπα της ολοκληρωμένης διαχείρισης, ώστε η επίδραση του μυκητοκτόνου να είναι η μικρότερη δυνατή, ii) η χρήση μιγμάτων μυκητοκτόνων με σχέσεις που να αντιστρέφουν τον κίνδυνο ανθεκτικότητας (σχέσεις αρνητικής ανθεκτικότητας), iii) η εναλλαγή μυκητοκτόνων με διαφορετική δράση σε υποκυτταρικό επίπεδο, ώστε να είναι συνεχής η πίεση επιλογής του παθογόνου, iv) η χρήση μυκητοκτόνων μη εξειδικευμένης δράσης στα

οποία ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας είναι μικρός και φυσικά ν) η χρήση των μυκητοκτόνων σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Τέλος ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη αποτελεί και η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης μεταξύ ανθεκτικότητας και μυκοτοξικογόνου ικανότητας των μυκήτων, καθώς θα προσφέρει γνώση που θα βοηθήσει στην περαιτέρω κατανόηση του σύμπλοκου αυτού φαινομένου, έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα την εύρεση μεθόδων κατάλληλων για την αντιμετώπιση των σοβαρών αυτών παθογόνων.

Z. Βιβλιογραφία

Akos, M., Beata, T., Monika, V., Tibor, B., Agnes, S.-H., Laszlo, F., και συν. (2011). Role of fungicides application of nozzle types and the resistance level of wheat varieties in the control of Fusarium head blight and deoxynivalenol. *toxins* , σσ. 1453-1483.

Albertini, Gredt, & Leroux. (2003). Polymorphism of the 14 α -demethylase gene (CYP51) in the cereal eyespot fungi *Tapesia acuformis* and *Tapesia yallundae*. *European Journal of Plant Pathology* , σσ. 117-128.

Alldrick, A. (2004). *Mycotoxins in food Detection and Control*. Woodhead Publishing Limited.

AOAC. (2002). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Horwitz, W.

Aoyama, Y., Yoshida, Y., Hata, S., Nishini, T., Katsuki, H., Maitra, U., και συν. (1983). Isolation and characterization of an altered cytochrome P-450 in yeast mutant blocked in demethylating C-32 oh lanosterolanosterol. *The journal of Biological Chemistry* 258 , σ. 9040.

Aoyama, Y., Yoshida, Y., Nishini, T., Katsuki, H., Maitra, U., Mohan, V., και συν. (1987). Isolation and characterization of an altered cytochrome P-450 from a yeast mutant defective in lanosterol 14 α -demethylating. *The Journal of Biological Chemistry* 260 , σ. 14260.

Arthur, J. (1891). Wheat scab. *Indiana Agricultural Experimental Station Bulletin* 36 , σσ. 129-32.

Atanasoff, D. (1920). Fusarium blight (scab) of wheat and other cereals. *Journal of Agricultural Research* 20 , σσ. 1-32.

Atkins, D., & Norman, J. (1998). Mycotoxins and food safety. *Nutrition & Food Science* , σσ. 260–266.

Bamburg. (1976). Chemical and biochemical studies of trichothecene mycotoxins. In *mycotoxins and other Fungal related food problems*. *Amer Chem Soc* , σσ. 144-162.

Barug, D., & Kerkeear, A. (1984). Resistance in muagen-induced mutants of *Ustilago maydis* to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis. *Pesticide science* 15 , σ. 78.

Becher, R., Hettwer, U., Karlovsky, P., Deising, H., & Wirsal, S. (2009). Adaptation of fusarium graminearum to Tebuconazole, Yielded Descendants Diverging for Levels of Fitness, Fungicide Resistance, Virulence and Mycotoxin Production. *Phytopathology* , σσ. 444-453.

Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2007). Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *Internal journal of Food Microbiology 119* , σσ. 33-37.

Betina, V. (1993). *Chemical, Biological and Environmental Aspects*. Amsterdam: Elsevier.

Betina, V. (1985). Thin layer chromatography of mycotoxins. *J. Chromatogr. 334* , σσ. 211–276.

Blamolino, M., Minelli, L., & Reyneri, A. (2006). Strategiew for the chemical control of Fusarium head blight:Effect on yield, alveographic parameters and deoxynivalenol contamination in winter wheat grain. *European journal of Agronomy* , σσ. 193-201.

Blount, W. (1961). Turkey “X” disease. *Journal of the British Turkey Federation* , σσ. 52-54.

Buchenauer, H. (1995). DMI-fungicides side effects on the plant and problems of resistance. Στο *Modern Selective Fubgicides*.

Bushnell, W., Hazen, B., & Pritsch, C. (2003). Histology and physiology of Fusarium head blight. Στο *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley* (σσ. 44–83). APS press.

Butters, Zhou, & Hollomon. (2000). The mechanism of resistance to sterol 14 α -demethylase inhibitors in a mutant (Erg 40) of *Ustilago maydis*. *Pesticide Management Science* , σσ. 257-263.

Buxton, E. (1927). Mycotic vaginitis in gilts. *Veterinary Record*, 22 , σσ. 451–2.

Cole, R. J., & Cox, R. H. (1981). The trichothecenes. Στο *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. (σσ. 152–263). NY: Academic Press;.

Cosette, F., & Miller, J. (1995). Phytotoxic effect of deoxynivalenol and Gibberella ear rot resistance of corn. *Natural Toxins 3* , σσ. 383-388.

Creppy, E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett. 127* , σσ. 19-28.

Crute, I., & Harrison, J. (1988). Studies in the inheritance of resistance to metalaxyl in *Bremia lactucea* and on the stability and fitness of field isolates. *Plant pathology* , σσ. 231-250.

D'Mello, J., Placinta, C., & Macdonald, A. (1999). Fusarium mycotoxins: A review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Technol* , σσ. 183-205.

da Luz, W. C., Stockwell, C. A., & Bergstrom, G. C. (2003). Biological control of *Fusarium graminearum*. Στο APS, *Fusarium head blight of wheat and barley* .

Dahl, J., & Dahl, C. (1985). Stimulation of cell proliferation and polyphosphoinositide metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* GL7 by ergosterol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 133 , σ. 844.

Davis, N. D., Diener, U., & Eldridge, D. (1966). Production of aflatoxin B1 and G1 by *Aspergillus Flavus* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol* 14 , σσ. 378-380.

de Waar, M., & van Nisterooy, J. (1984). Differential accumulation of fenarimol by a wild type isolate and fenarimol resistant isolates of *Penicillium italicum*. *Netherlands journal of plant pathology* , σσ. 143-153.

de Waard, M. (1994). Resistance to Fungicides which inhibit Sterol 14a-demethylation, an Historical perspective. Στο *Fungicide resistance*. 3.

de Waard, M. (1994). Resistance to fungicides Which Inhibit Sterol 14a-Demethylation, an Historical Perspective, BCPC Monograph No 60. *Fungicide Resistance* , σ. 3.

de Waard, M., & Fuchs, A. (1982). Resistance to ergosterol biosynthesis inhibitors II. Genetic and physiological aspects. Στο *Fungicide resistance in Crop protection* (σ. 87).

de Waard, M., & Sisler, H. (1976). Resistance to fenarimol in *Aspergillus nidulans*. *Meded. van den Fachltheit der Landb* 41 , σ. 571.

de Waard, M., & van Nistelrooy, J. (1979). Mechanism of resistance to fenarimol in *Aspergillus nidulans*. *Pesticide biochemistry and Physiology* , σσ. 219-229.

de Waard, M., & van Nistelrooy, J. (1980). Mechanism of resistance to pyrazophos in *Pyricularia oryza*. *Netherlands journal of Plant pathology* , σσ. 251-258.

de Waard, M., & van Nistelrooy, J. (1990). Stepwise development of laboratory resistance to DMI's fungicides in *Penicillium italicum*. (σ. *Netherland journal of Plant Pathology* 96). 321.

de Waard, M., Georgopoulos, S., Hollomon, D., Ishii, H., Leroux, P., Ragsdale, N., και συν. (1993). Chemical control of plant diseases: Problems and prospects. *Annual Review of Phytopathology* , σσ. 403-421.

de Waard, M., Groeneweg, H., & van Nistelrooy, J. (n.d.). Laboratory resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in *Penicillium italicum*. *Netherlands journal of Plant Pathology* .

Dekker, J. (1982). Counter measures for avoidin fungicide resistance. Στο *Fungicide resistance in Crop Protection* (σ. 177).

Dekker, J. (1987). Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. *Modern selective fungicides* , σσ. 19-52.

Dekker, J. (1977). Resistance. Στο *Systematic fungicides* (σσ. 177-197).

Deleye, Bousset, & Corio-Costet. (1998). PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 α demethylase (CYP51) gene from *Erysiphe graminis* f. sp. hordei, a "recalcitrant" fungus. *Current Genetics* , σσ. 399-403.

Deleye, Laigret, & Corio-Coset. (1997). A mutation in the 14 α -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Applied Environmental Microbiology* , σσ. 2966-2970.

DelSorbo, Andrade, vanNistelrooy, vanKan, Baltzi, & deWaard. (1997). Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters. *Molecular and General Genetics* , σσ. 417-426.

DelSorbo, Schoonbeek, & deWaard. (2000). Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genetics and Biology* , σσ. 417-426.

Desjardinis, A. E., Hohn, T. M., & McCormick, S. P. (1993). Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium* Species: Chemistry, Genetics, and Significance. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS* , σσ. 595-604.

Desjardins, A. E., & Plattner, R. D. (1989). Trichothecene Toxin Production by Strains of *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*) in Liquid Culture and in Potato Tubers. *Agricultural & Food Chemistry* , σσ. 388-392.

Desjardins, A., Plattner, R., & Beremand, M. (1987). Ancymidol blocks trichothecene biosynthesis and leads to accumulation of trichodiene in *Fusarium sporotrichioides* and *Gibberella pulicaris*. *Appl. Environ. Microbiol* 53 , σσ. 1860-1865.

Desjardins, A., Plattner, R., & Spencer, G. (1988). Inhibition of trichothecene toxin biosynthesis by naturally occurring shikimate aromatics. *Phytochemistry* 27 , σσ. 767-771.

Desjardins, A., Spencer, G., Plattner, R., & Beremand, M. (1989). Furano-coumarin phytoalexins, trichothecene toxins and infection of *Pastinaca saliva* by *Fusarium sporotrichioides*. *Phytopathology* 79 , σσ. 170-175.

Desmond, Manners, Stephens, Maclean, Schenk, Gardiner, και συν. (2008). The fusarium mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogenperoxide production programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular Plant Pathology* , σσ. 435-445.

deWaard. (1997). Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance. *Pesticide Science* , σσ. 271-275.

deWaard, & vanNistelrooy. (1988). An energy -dependent efflux mechanism for fenarimol in a wild type strain and fenarimol resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* , σσ. 255-266.

Diaz-Guerra, Mellado, Cuenca-Estrella, & Rodriguez-Tudela. (2003). A point mutation in the 14 α -demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobiological agents and Chemotherapy* , σσ. 1120-1124.

Eppley, R., Trucksess, M., Nesheim, S., Thorpe, C., & Pohland, A. (1986). Thin layer chromatographic method for determination of deoxynivalenol in wheat, collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69 (1) , σσ. 37-40.

Eriksen, G. (2003). *Metabolism and Toxicity of Trichothecenes*. Uppsala, Sweden: Doctoral thesis.

Eriksen, G., & Pettersson, H. (2004). Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114 , σσ. 205-239.

FAO/WHO, C. A. (2003). Discussion paper on deoxynivalenol. *Codex Committee on Food Additives and Contaminants, 35th Session*. Tanzania: FAO/WHO.

Gadher, P., Mercer, E., Baldwin, B., & Wiggins, T. (1983). A comparison of the potency of some fungicides as inhibitors of sterol 14-demethylation. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 19 , σ. 1.

Gaffoor, I., & Trail, F. (2006). Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology* 72 , σσ. 1793-1799.

Gardiner, Kazan, & Manners. (2009). Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal genetics and Biology* , σσ. 604-613.

Gary, Y., & Susan, S. (2007). Strategies for managing *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *International Journal of Food Microbiology* , σσ. 126–130.

Gasztony, M., & Josepovits, G. (1984). Metabolism of some sterol inhibitors in fungi and higher plants, with special reference to the selectivity of fungicidal action. *Pesticide science* 15 , σ. 48.

Georgopoulos, S. (1982). Genetic and Biochemical background of fungicide resistance. Στο *Fungicide resistance in Crop protection* (σσ. 46-52).

Georgopoulos, S. (1977). Development of fungal resistance to fungicides. Στο *Antifungal compounds* (σ. 439).

Georgopoulos, S. (1976). The genetics and biochemistry of resistance to chemicals in plant pathogens. *Proceedings of the American Phytopathological Society*, (σσ. 327-345).

Georgopoulos, S., & Ziogas, B. (1977). A new class of carboxin resistant mutant of *Ustilago maydis*. *Netherlands journal of Plant pathology* , σσ. 235-242.

Guan, Kapteyn, Kerkenaar, & deWaard. (1992). Characterisation of energy-dependent efflux of imazalil and fenarimol in isolates of *Penicillium italicum* with a low medium risk and high degree of resistance to DMI-fungicides. *Netherlands Journals of Plant Pathology* , σσ. 313-324.

Hadiani, M. R., Yazdanpanah, H., Ghazi-Khansar, M., Cheraghali, A. M., & Goodarzi, M. (2003). Survey of the natural occurrence of zearalenone in maize from northern Iran by thin-layer chromatography densitometry. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 20, No. 4 , σσ. 380–385.

Hamamoto, Hasegawa, Nakaune, Lee, Makizumi, Akutsu, και συν. (2000). Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 α -demethylase gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*. *Applied Environmental Microbiology* , σσ. 3421-3426.

Hayashi, Schoonbeek, Sugiura, & deWaard. (2001). Multidrug resistance in *Botrytis cinerea* associated with decreased accumulation of the azole fungicide oxpoconazole and increased transcription of the ABC transporter gene BcatrD. *Pesticide Biochemistry and Physiology* , σσ. 168-179.

Henry, & Trivellas. (1989). Laboratory induced Fungicide resistance to Benzimidazole and Azole fungicides in *Cercospora beticola*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* , σ. 89.

Hesketh, A., Gledhill, L., Marsh, D., Bycroft, B., Dewick, P., & Gilbert, J. (1990). Isotrichodiol: a post-trichodiene intermediate in the biosynthesis of trichothecene mycotoxins. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* , σσ. 1184-1186.

Hippe, S. (1984). Ultrastructural changes induced by the systemic fungicides triadimefon, triarimol and imazalil nitrate in sporidia of *Ustilago avenae*. *Pesticide science* , σ. 210.

Hollomon, D., Butters, J., & Clark, J. (1984). Genetic control of triadimenol resistance in powdery mildew. *Proceedings of British Crop protection Conference - Pests and diseases*, (σ. 477).

Howard, Webster, Moore, Gardiner, Park, Perlin, και συν. (2006). Multi-azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* , σσ. 450-453.

Howell, M., & Taylor, P. (1981). Determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in mixed feeds, with detection by thin layer chromatography of high performance liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64 , σσ. 1356–1363.

IARC. (1993). *Toxins derived from Fusarium moniliforme: Fumonisin B1 and B2 and fusarin C*. Lyon: IARC.

Joseph-Horne, & Hollomon. (1997). Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. *FEMS Microbiology Letters* , σσ. 141-149.

Kalamarakis, A., Demopoulos, V., Ziogas, B., & Georgopoulos, S. (1989). A highly mutable major gene for triadimenol resistance in *Nectria haematococca* var *curcubitae*. *Netherlands journal of Plant Pathology* 95 , σ. 109.

Kalamarakis, Waard, d., Ziogas, & Georgopoulos. (1991). resistance to fenarimo; in *Nectria haematococca* var. *curcubitae*. *Pesticide Chemistry and Ohysiology* , σσ. 212-220.

Kapteyn, J. (1993). *Biochemical mechanisms involved in selective Fungitoxicity of Fungicides which inhibit Sterol 14a-Demethylation*. Phd thesis.

Karaoglanidis, Markoglou, Bardas, Doukas, Konstantinou, & Kalambokis. (2001). Sensitivity of *penicillium expansum* field isolates to tebuconazole, iprodione, fludioxonil and cyprodinil and characterization of fitness parameters and patulin production. *International journal of Food Microbiology* .

Kim, Y., Lee, Y., Jin, J., Han, K., Kim, H., & Kim, J. (2005b). Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Molecular Microbiology* 58 , σσ. 1102-1113.

King, D., Wiseman, A., Kelly, D., & Kelly, S. (1985). Differences in the cytochrome P-450 enzymes of sterol C-14 demethylase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* 10 , σ. 261.

Koch, P. (2004). State of the art of trichothecenes. *Toxicology Letters* 153 , σσ. 109–112.

Koller, W. (1992). Antifungal agents with target sites in sterol functions and biosynthesis. Στο *Target sites of Fungicide Action*.

Koller, W. (1987). Isomers of sterol synthesis inhibitors: Fungicidal effects and plant growth regulator activities. *Oesticide science* 18 , σ. 129.

Koller, W. (1988). Sterol demethylation inhibitors: Mechanism of action and resistance. Στο *Fungicide resistance in North America*.

Koller, W., & Scheinpflug. (1987). Fungal resistance to sterol-biosynthesis inhibitors: a new challenge. *Plant disease* 71 , σ. 1066.

Kordic, B., Pribicevic, S., Muntanola-Cvetkovic, M., Nikolic, P., & Nikolic, B. (1992). Experimental study of the effects of known quantities of zearalenone on swine reproduction. *J. Environ. Pathol., Toxicol. Oncol.*, 11 , σσ. 53–6.

Kotal, F., Holadova, K., Hajslova, J., Poustka, j., & Radova, Z. (1999). Determination of trichothecenes in cereals. *Journal of Chromatography A*, 830 , σσ. 219-225.

Krska, R., Baumgartner, S., & Josephs, R. (2001). The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius J Anal Chem* 371 , σσ. 285–299.

Krska, R., Welzig, E., & Boudra, H. (2007). Analysis of Fusarium toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology* 137 , σσ. 241–264.

Kuck, K. (1994). Evaluation of antiresistance strategies. Στο *Fungicide resistance* (σ. 43).

Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M., & Watanabe, H. (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 7 , σσ. 253–306.

Kunemud, A., & Hoefler, M. (1983). Passive fluxes of K and H in wild strain and nystatin-resistant mutant of *Rhodotorula gracilis*. *Biochemical et Biophysical Acta* 735 , σ. 203.

Lancova, K., HAJŠLOVA, J., KOSTELANSKA, M., KOHOUTKOVA, J., NEDELNIK, J., MORAVCOVA, H., και συν. (2008). Fate of trichothecene mycotoxins during the processing: Milling and baking. *Food Additives and Contaminants* , σσ. 650–659.

Larsen, J., Hunt, J., Perin, I., & Ruckebauer, P. (2004). Workshop on trichothecenes with a focus on DON: Summary report. *Toxicol. Lett.* , σσ. 1-22.

Lehninger. (2004). *Lehninger's principles of biochemistry 4th edition* .

Leroux, P., & Gredt, M. (1984). Resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in laboratory strains of *Botrytis cinerea* and *Ustilago maydis*. *Pesticide science* 15 , σ. 85.

Leslie, J., & Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*.

Long, G. G., Diekman, M., Tuite, J. F., Shannon, G. M., & Vesonder, R. F. (1982). Effect of *Fusarium roseum* corn culture containing zearalenone on early pregnancy in swine. *Am.J.Vet. Res.*, 43 , σσ. 1599–603.

Luo, & Schnabel. (2008). The cytochrome P450 lanosterol 14 α demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. *Applied and Environmental Microbiology* , σσ. 359-366.

Ma, & Michailides. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop protection* , σσ. 853-863.

Mains, E., Vestal, C., & Curtis, P. (1929). Scab of small grains and feeding trouble in Indiana in 1928. *Proceedings of the Indiana Academy of Science* 39 , σσ. 101-110.

Malandrakis, Nikou, Konstantaki, Vontas, Markoglou, & Ziogas. (2009). Molecular characterization and detection of overexpressed C-14 alpha-demethylasebased DMI resistance in *Cercospora beticola* field isolates. *Pesticide Biochemistry and Physiology* , σσ. 18-27.

Mann, Parmegianni, Wei, Mendrick, Li, Loebenberg, και συν. (2003). Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14 α -demethylase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , σσ. 577-581.

Marichal, Bossche, v. d., Odds, Nobels, Warnock, Timmerman, και συν. (1997). Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrobial Agents Chemother* , σσ. 2229-2237.

- Markell, S., & Franci, L. (2003). Fusarium head blight inoculum: species prevalence and Gibberella zeae spore type. *Plant Dis.* 87 , σσ. 814–820.
- Martin, R. (1988). Use of a high throughput jet sampler for monitoring viable air born of fusarium in wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* , σσ. 359-360.
- Matossian, M. (1989). *Poisons of the Past: Molds, Epidemics, and History*. Yale University Press.
- McClellan, M. (1996). The phytotoxicity of Fusarium metabolites: An update since 1989. *Mycopathologia* 133 , σσ. 163-179.
- McEarlin, B. A. (1952). Vulvovaginitis in swine. *Veterinary Record*, 64 , σσ. 539–40.
- McMullen, M., Jones, R., & Gallenberg, D. (1997). Scab of wheat and barley: a reemerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81 , σσ. 1340–1348.
- McNutt, S. H., Purwin, P., & Murray, C. (1928). Vulvovaginitis in swine Preliminary report. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 73 , σσ. 484–92.
- Mellando, Garcia-Effron, Alcazar-Fuoli, Melchers, Verweij, Cuenca-Estrella, και συν. (2007). A new Aspergillus fumigatus resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungal involves a combination of cyp51A alternations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , σσ. 1897-1904.
- Miller, J. (2002). Aspects of the ecology of Fusarium toxins in cereals. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 504 , σσ. 19-27.
- Miller, J. (1995). Fungi and mycotoxins in grain: Implication for stored product research. *Journal of Stored Products Research* 31 , σσ. 1-16.
- Miller, J., & Young, J. (1985). Deoxynivalenol and Fusarium head blight resistance in spring cereals. *Phytopath. Z.* 113 , σσ. 354-367.
- Miller, J., Greenhalgh, R., Wang, Y. Z., & Lu, M. (1991). Trichothecenes chemotypes of three Fusarium species. *Mycologia* 83 , σσ. 121-130.
- Miller, J., Taylor, A., & Greenhalgh, R. (1983). Production of deoxynivalenol and related compounds in liquid culture by Fusarium graminearum. *Can. J. Microbiol.* 29 , σσ. 1171-1178.
- Moss, M. (2002). Mycotoxin review-2. Fusarium. *Mycologist* 16 , σσ. 158-161.
- Mudge, Macky, Dong, Gardiner, White, & Manners. (2006). A role for the mycotoxin deoxynivalenol in stem colonisation during crown rot disease of wheat caused by Fusarium graminearum and Fusarium pseudograminearum. *Physiology Molecular Plant Pathology* , σσ. 73-85.

Muriuki, J. (2001). Deoxynivalenol and nivalenol in pathogenesis of Fusarium head blight in wheat. Στο *Doctoral Thesis*. University of Minnesota.

Murphy, P., & West, C. (1969). The role of mixed function oxiaases in kaurene metabolism in *Echinocystis macrocarpa* greene endosperm. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 133 , σ. 395.

Nakaune, Adachi, Nawata, Tomiyama, Akutsu, & Hidi. (1998). A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Applied and Enviromental Microbiology* , σσ. 3983-3988.

Nes, W. (1984). Uniformity vs Diversity in the structure, biosynthesis and function of sterols. Στο W. Nes, *Isoprenoids in Plants: Biochemistry and Function*.

Nganje, W., Bangsund, D., Leistritz, F., Wilson, W., & Tiapo, N. (2002). Estimating the economic impact of a crop disease: the case of Fusarium head blight in U.S. wheat and barley. *National Fusarium Head Blight Forum Proceedings* (σσ. 275–281). East Lansing: Michigan State University.

Nishiuchi, Masuda, Ichimura, N., Shinozaki, Yoshida, Kimura, και συν. (2006). Fusarium trichothecenes have an elicitor-like activity in *Arabidopsis thaliana*, but the activity differed significantly among their molecular species. *Molecular Plant-Microbe Interact* , σσ. 512-520.

Noddu, Cho, Kruger, & Muehlbauer. (2006). Transcriptome analysis of the barley-Fusarium graminearum interaction. *Molecular-Plant interaction* , σσ. 407-417.

Novalina, I., & Lahey, C. M. (2005, December). Analysis of Trichothecenes by Gas Chromatography-Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Application news* .

Orth, A., Henry, M., & Sisler, H. (1990). Mechanism of resistance to terbinafine in two isolates of *Ustilago maydis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 37 , σ. 182.

Oswailer, G. (1986). Diagnosis of mycotoxicoeses. In Occurrence and clinical manifestations of trichothecene toxicoses and zearalenone toxicoses. *National Animal Disease Center* , σσ. 31-42.

Parks, L., & Cassey, W. (1995). Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 49 , σ. 95.

Parry, D., Jeckinson, P., & McLeod, L. (1995). Fusarium ear blight in small grain cereals. *Plant Pathology* 44 , σσ. 207-238.

Parry, D., Pettitt, T., Jenkinson, P., & Lees, A. (1994). The cereal Fusarium complex. Στο *Ecology of Plant Pathogens* (σσ. 301-320). CAB International.

Paul, Lipps, Hershman, McMullen, Draper, & Madden. (2008). Efficacy of Triazole Based Fungicides for Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol; Control in Wheat: A Multivariate Meta-Analysis. *Disease Control and Pest Management* , σσ. 999-1011.

Pestka. (2007). Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. *Anim. Feed Sci. Technol.* , σσ. 283-298.

Pestka, J. J., El-Bahrawy, A., & Hart, P. L. (1985). Deoxynivalenol and 15-monoacetyl deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* R6576 in liquid media. *Mycopathologia* 91 , σσ. 23-28.

Pestka, J., & Smolinski, A. (2005). Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans. *J. Environ. Sci. Health B* 8 , σσ. 39-69.

Press, N. A. (1983). Protection against trichothecene mycotoxins.

Pritsch, C., Muehlbauer, G., Bushnell, W., Somers, D., & Vance, C. (2000). Fungal development and induction of defence response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13 , σσ. 159-169.

Rasmusfrandsen. (2010, 07 10). <http://www.rasmusfrandsen.dk/zealenone.htm>.

Razzazi-Fazeli, I. E., Bohm, J., & Luf, W. (n.d.). Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography-mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. *J Chromatogr A* 854 , σσ. 45-55.

Robert, W., Wannemacher, J., & Wiener, S. R. *Trichothecene mycotoxins*.

Rocha, O., Ansar, K., & Doohan, F. (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Addit. Contam* 22 , σσ. 369-378.

Rocha, O., Ansar, K., & Doohan, F. (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Addit. Contam.* , σσ. 369-378.

Rubella., Goswami, & Kistler. (2004). Pathogen profile Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY* 5 , σσ. 515-525.

Ruhr, L., Osweiler, G., & Foley, C. (1983). Effect of the estrogenic mycotoxin zearalenone on reproductive potential in the boar. *Am. J. Vet. Res.* 44 , σσ. 483-485.

Ryder, J., Wilson, R., & Barrett-Bee, K. (1984). Azole resistance in *Candida albicans*, Sabiuraundia. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 22 , σ. 53.

Samar, M., Resnik, S., González, H., Pacin, A., & Castillo, M. (2007). Deoxynivalenol reduction during the frying process of turnover pie covers. *Food Control*. 18 , σσ. 1295-1299.

Schaafsma, A., Nicol, R., Savard, M., Sinha, R., Reid, L., & Rottinghaus, G. (1998). Analysis of Fusarium toxins in maize and wheat using thin layer chromatography. *Mycopathologia 142*: , σσ. 107–113.

Schaafsma, A., Nicol, R., Savard, M., Sinha, R., Reid, L., & Rottinghaus, G. (1998). Analysis of Fusarium toxins in maize and wheat using thin layer chromatography. *Mycopathologia 142* , σσ. 107–113.

Schnabel, & Jones. (2001). The 14 α -demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistance to mycobutanil. *Phytopathology* , σσ. 102-110.

Scholbrock, L., Fleener, B., & Berry, J. (1992). Comparison of wheat seedling leaf reactions to deoxynivalenol in relation to wheat scab (*Fusarium graminearum*) resistance classes. *Phytopathology* 82 , σ. 1167.

Scott, P., Lawrence, J., & Van Walbeek, W. (1970). Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: application to screening of fungal extracts. *Appl. Microbiol.* 20 , σσ. 839–842.

Shabi, E., Katan, T., & Marton, K. (1983). Inherancitance of resistance to benomyl in isolates of *Venturia inaequalis*. *israel Plant Pathology* , σσ. 207-211.

Sherald, J., & Ragsdale, N. S. (1973). Similarities between the systematic fungicides trifirine and triarimol. *Pesticide science* 4 , σ. 1.

Shier, W. T. (1998). Estrogenic mycotoxins. *Rev. Med. Vet.*, 149 , σσ. 599–604.

Shimada, T., & Otani, M. (1990). Effects of Fusarium mycotoxins on the growth of shoots and roots at germination in some Japanese wheat cultivars. *Cereal Res. Commun.* 18 , σ. 229:232.

Sisler, H. (1988). Fungicidal action and fungal resistance mechanism. Στο *Fungicide resistance in North America*.

Sokolovic, M., & impraga, B. (2006). Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. *Food Control* 17 , σσ. 733–740.

Stack, R. (1999). A comparison of the inoculum potential of ascospores and conidia of *Gibberella zeae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11 , σσ. 137–142.

Stanis, V., & Johnes, A. (1985). Reduced sensitivity to Sterol-inhibiting Fungicides in Field isolates of *Venturia inaequalis* Disease control and pest management. *Phytopathology* , σ. 1098.

Staub, T. (1991). Fungicide resistance: Practical experience with antiresistance Strategies and the role of Integrated use. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29 , σ. 421.

Stoyan, P., Martin, E. S., & Peter, J. (2003). Strategies for the control of Fusarium head blight in cereals. *European journal of plant pathology* , σσ. 731-742.

Sudakin, D. (2003). Trichothecenes in the environment: Relevance to human health. *Toxicol. Lett.* 143 , σσ. 97-107.

Sudakin, D. (2003). Trichothecenes in the environment: Relevance to human health. *Toxicol. Lett.* , σσ. 97-107.

Sutton, J. (1982). Epidemiology of wheat headblight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4 , σσ. 195-209.

Tanaka, T., Yoneda, A., Inoue, S., Dugiura, Y., & Ueno, Y. (2000). Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 882 , σσ. 23–28.

Technology, C. f. (2003). Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human system. σσ. 48-58.

technology, C. f. (2003). Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human system; Task Force Report, No.139., (σσ. 48-58).

Tobin, Peery, & Skatrud. (1997). Genes encoding multiple resistance-like proteins in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Gene* , σσ. 243-263.

Trebstein, A., Lauber, U., & Humpf, H.-U. (2009). Analysis of Fusarium toxins via HPLC-MS/MS multimethods: matrix effects and strategies for compensation. *Mycotox Res* 25 , σσ. 201–213.

Uenno. (1977). *Trichothecenes: Overview adress In mycotoxin in human and animal health*. Pathotox Publishers.

Urry, W. H., Wehrmeister, H. L., & Hidy, P. H. (1966). The structure of zearalenone. *Tetrahedron Let.*, 27 , σσ. 3109–14.

van Rensburg, S., & Altenkirk, B. (1974). Mycotoxins, *Claviceps purpurea*:. *I.F.H.* , σσ. 69–96.

vanden Bossche, H. (1988). Mode of action of Pyrine, Pyrimidine an Azole antifungals. Στο *Sterol Biosynthesis Inhibitors - Pharmaceutical and Agrochemical Aspects*.

vanden Bossche, H., Marichal, P., Gorrens, J., Bellens, D., Verhoeven, H., Coene, M., και συν. (1987). interaction of azolw derivaties with cytochrome P450 isozymes in yeast, fungi, plants and mammalian cells. *Pesticide Science* 21 , σ. 289.

vanden Bossche, H., Willemsens, G., & Marichal, P. (1984). Cytochrome P450 inhibitors at the origin of the deteriorated fungal membranes. *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis* , σ. 307.

vanNistelrooy, vandenBrink, vanKan, vanGorcom, & deWaard. (1996). Isolation and molecular charecterization of the gene encodng eburicol 14 α -demethylase 9CYP51) from *Penicillium italicum*. *Molecular and General Genetics* , σσ. 725-733.

Vendl, O., Berthiller, F., Crews, C., & Krska, R. (2009). Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, and their major masked metabolites in cereal-based food by LC–MS–MS. *Anal Bioanal Chem* 359 , σσ. 1347–1354.

Voigt, Schafer, & Salomon. (2005). A sexreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *Plant journal* , σσ. 364-375.

Ward, T., Bielawski, J., Kistler, H., Sullivan, E., & O'Donnell, K. (2002). Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 , σσ. 9278–9283.

Wellma, H., & Schauz, K. (1993). DMI resistance in *Ustilago maydis*. II Effect of triadimefon on regenerating protoplasts and analysis of fungicide uptake. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 46 , σ. 55.

Wellman, H., & Schauz, K. (1992). DMI resistance in *Ustilago maydis*. I. Characterisation and genetic analysis of triadimefon resistant laboratory mutants. *Pesticide Biochemistru and Physiology* 43 , σ. 171.

WHO. (1990). Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. Environmental Health Criteria 10 International Programme on Chemical Safety. *World Health Organization* , σσ. 71–154.

Wiese, M. (1987). *Compendium of Wheat Diseases*. American Phytopathological Society Publication.

Wijnands, L., & van Leusden, F. (2000). An overview of adverse health effects caused by mycotoxins and biossays for their detection. *RIVM report*.

Xu, Y.-G., Yao, C.-L., & Fang, Z.-D. (1990). Toxic effect of DON from scabby kernels on wheat. *J. Nanjing Agric. Univ.* 2 , σσ. 58-63.

Yan, Yang, Zhou, Duan, & Ma. (2009). A real time PCR assay for quantification of Y136F allele in the CYP51 gene associated with *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* resistance to sterol demethylase inhibitor fungicides. *Crop protection in press*.

Yazar, S., & Omurtag, G. Z. (2008). Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *Int. J. Mol. Sci.*, σσ. 2062-2090.

Yoshida, Y., & Aoyama, Y. (1987). Interaction of azole antifungals agents with cytochrome P450 purified from *Saccharomyces cerevisiae* microsomes. *Biochemical Pharmacology* 36, σ. 229.

Zhou, M.-G., Zhang, Y.-J., Yu, J.-J., Zhang, Y.-N., Zhang, X., Cheng, C.-J., και συν. (2009). Effect of Carbendazim Resistance on Trichothecene Production and Aggressiveness of *Fusarium graminearum*. *The American Phytopathological Society*, σσ. 1143–1150.

Ziogas, B., & Girgis, S. (1993). Cross resistance relationships between benzimidazole fungicides and dietofencarb in *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*. *Pesticide science*, σσ. 199-205.

Ziogas, B., Baldwin, B., & Young, J. (1997). Alternative respiration: a Biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin in *Septoria tritici*. *Pesticide science*, σσ. 28-34.

Ziogas, B., Sisler, H., & Lusby, W. (1983). Sterol content and other characteristics of pimaricin-resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 20, σ. 320.

Ziogas, B., Vitoratos, A., Sideris, E., & Georgopoulos, S. (1990). Effects of sterol biosynthesis inhibitors on mitosis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 37, σ. 254.

Ziogas, Markoglou, Theodosiou, Anagnostou, & Boutopoulou. (2006). A High Multidrug Resistance to Chemically Unrelated Oomycete Fungicides in *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology*, σσ. 283-292.

Zwiers, Stergiopoulos, vanNistelrooy, & deWaard. (2002). ABC transporters and azole susceptibility in laboratory strains of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, σσ. 3900-3906.

Γεωργόπουλος, Σ., & Ζιώγας, Β. (1992). *Αρχές και Μέθοδοι Καταπολέμησης Ασθενειών των φυτών*.

Δούκας. (2010). *Βιοχημική και Μοριακή Διερεύνηση της Επίδρασης των Μεταλλαγών Ανθεκτικότητας στα Τριαζολικά Μυκητοκτόνα στην Παραγωγή Μυκοτοξινών από Μύκητες του Γένους *Aspergillus**. Διδακτορικό.

Δούκας. (2004). *Διερεύνηση της επίδρασης των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα στην παραγωγή μυκοτοξινών από το μύκητα Aspergillus parasiticus*. Μεταπτυχιακή διατριβή.

Ζιώγας, Β., & Μαρκόγλου, Α. (2010). *Γεωργική Φαρμακολογία*.

Ζιώγας, Β., Παναγιωταράκου-Πέτσικου, Ν., & Καλαμαράκη, Α. (1998). Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας των παθογόνων των φυτών στις αντιμικροβιακές ενώσεις. *Πρακτικά 2ης πανελλήνιας συνάντησης φυτοπροστασίας*, (σσ. 31-41).

Ζιώγας. (2000). Ανθεκτικότητα των φυτοπαθογόνων στα μυκητοκτόνα. *Γεωπονικά 308*, σσ. 9-19.

Μαρκόγλου, Α. (1997). *Διερεύνηση της Ανθεκτικότητας του μύκητα Ustilago maydis στα Μορφολινικά Μυκητοκτόνα*. Αθήνα: Γ.Π.Α.

Μαρκόγλου, Α., & Ζιώγας, Β. (1994). Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του μυκητοκτόνου pyraclostrobin στον μύκητα Botrytis cinerea. *Μεταπτυχιακό*.

Τζάμος, Ε. (2004). *Φυτοπαθολογία*.

