

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

ΒΑΤΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ
ΜΥΚΗΤΑ *PENICILLIUM EXPANSUM* ΣΕ ΝΕΟΥΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ ΤΗΣ
ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ

**Π.Μ.Σ.: . Επιστήμη και Σύγχρονα Συστήματα Φυτικής Παραγωγής,
Φυτοπροστασίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου**

ΑΘΗΝΑ 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων:

Α. Μαρκόγλου, Επ. Καθηγητής Γ.Π.Α.

Μέλη:

Γ. Καραογλανίδης, Λέκτορας Α.Π.Θ.

Φ. Φλουρή, Λέκτορας Γ.Π.Α.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ- ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, με τη συνεργασία του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας της Γεωπονικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες και τον αμέριστο σεβασμό μου για τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Α. Μαρκόγλου για την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπό μου, τις πολύτιμες συμβουλές και την υποστήριξή του. Τον ευχαριστώ, ακόμα, και για την πολύτιμη καθοδήγησή του σε όλους τους τομείς της εκπόνησης της εργασίας αυτής, από το σχεδιασμό των πειραμάτων μέχρι και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον λέκτορα κ. Γ. Καραογλανίδη για την πολύ σημαντική συμβολή του στα πειράματα μοριακών αναλύσεων που απαιτήθηκαν για την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στο φίλο και συνεργάτη Δρα. Α. Μαλανδράκη, για τη συμβουλευτική, τη βοήθεια και την προθυμία σε όλες τις εκφάνσεις της εργασίας αυτής και ιδιαίτερα στην επεξήγηση των αποτελεσμάτων.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στο φίλο και συνάδελφο κ. Ι. Καλαμπόκη για τις χρήσιμες συμβουλές του στο κομμάτι της ενόργανης ανάλυσης των μυκοτοξινών, τη θετική ενέργεια και την υποστήριξή του.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας για τη φιλική τους διάθεση, τη συνεργασία και την υπομονή τους καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στη διδα Σ. Γεωργιάδη για την υποστήριξή της όσο εκπονούνταν η εργασία αυτή, αλλά και τη βοήθεια στη γραφιστική επεξεργασία των εικόνων, και στη διδα Τ. Αναστασοπούλου για την βοήθειά της στη σελιδοποίηση της εργασίας αυτής.

Τέλος οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την υποστήριξή και την υπομονή τους όσο καιρό εκπονούνταν αυτή η εργασία.

ΣΥΝΟΨΗ

Στελέχη του μυκοτοξικογόνου μύκητα *Penicillium expansum* με υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας ($R_f \geq 300$) στους νέους Παρεμποδιστές της Αφυδρογονάσης του Ηλεκτρικού Οξέος (Succinate Dehydrogenase Inhibitors-SDHIs) απομονώθηκαν σε συχνότητα 10^6 μετά από μεταλλαξινέυση με υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και επιλογή σε υλικό που περιείχε boscalid. Πειράματα διασταυρωτής ανθεκτικότητας έδειξαν ότι οι μεταλλαγές για ανθεκτικότητα στο boscalid στο isopyrazam μειώνουν την ευαισθησία όλων των μεταλλαγμένων στελεχών ($R_f \geq 30$), ενώ στο fluopyram μόνο σε ορισμένα στελέχη ($R_f: 8 \leq 10$). Αντίθετα σε κάποια στελέχη η ευαισθησία στο fluopyram αυξάνεται ($R_f: 0,2 \leq 0,3$). Οι μεταλλαγές για ανθεκτικότητα στο boscalid δε φαίνεται να επηρεάζουν την ευαισθησία των μεταλλαγμένων στελεχών σε μυκητοκτόνα που δρουν σε άλλες βαθμίδες του κυτταρικού μεταβολισμού, όπως τα τριαζολικά, τα φαινυλοπυρρολικά και τα βενζιμιδαζολικά. Αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα ($R_f: 0,3 \leq 0,1$) διαπιστώθηκε με τον παρεμποδιστή του συμπλόκου III (QoI) της μιτοχονδριακής αναπνοής pyraclostrobin. Μελέτη της προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών στο boscalid στελεχών έδειξε πως οι μεταλλαγές για ανθεκτικότητα στους SDHIs φαίνεται να επηρεάζουν ή να μην επηρεάζουν τη μυκηλιακή αύξηση, ενώ δε φαίνεται να επηρεάζουν την παραγωγή και βλάστηση των κονιδίων, την παθογόνο ικανότητα και δύναμη και την ευαισθησία των στελεχών στην ωσμωτική πίεση. Αναλύσεις εκχυλισμάτων από καλλιέργειες των αγρίων και των ανθεκτικών στο boscalid στελεχών του *P. expansum* με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), έδειξε πως οι μεταλλαγές για ανθεκτικότητα στο boscalid στα περισσότερα στελέχη που μελετήθηκαν αυξάνουν την ικανότητα παραγωγής μυκοτοξινών (πατουλίνη και κιτρινίνη), ενώ στα υπόλοιπα την μειώνουν έως και σταματούν. Ανάλογα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και σε εκχυλίσματα από μήλα που είχαν τεχνητώς μολυνθεί με στελέχη του μύκητα. Μοριακή διερεύνηση του βιοχημικού μηχανισμού της ανθεκτικότητας, με απομόνωση της Β υπομονάδας του συμπλόκου II, αποκάλυψε υποκαταστάσεις της ιστιδίνης της θέσης 272 του γονιδίου. Σε 3 περιπτώσεις βρέθηκε αντικατάσταση από τυροσίνη (H272Y), η οποία προσδίδει και αυξημένη ευαισθησία στο fluopyram, ενώ σε 1 περίπτωση βρέθηκε αντικατάσταση της ιστιδίνης από αργινίνη (H272R), η οποία δε φαίνεται να επηρεάζει την ευαισθησία στο fluopyram. Σε 1 περίπτωση δεν εντοπίστηκε μεταλλαγή στην Β υπομονάδα του συμπλόκου II, όμως το στέλεχος παρουσίασε υψηλή ανθεκτικότητα στο boscalid ($R_f=300$) και μέτρια ανθεκτικότητα στο fluopyram ($R_f=10$). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φανερώνουν ότι μη ορθή χρήση των νέων SDHIs ενέχει αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης και επικράτησης ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *P. expansum* στην αγροτική πράξη.

ABSTRACT

Mutants of the mycotoxigenic fungus *Penicillium expansum* highly resistant ($R_f \geq 300$) to the new Succinate Dehydrogenase Inhibitors (SDHIs) were isolated at a mutation frequency of 10^6 after UV-mutagenesis and selection on media containing boscalid. Cross resistance studies with other fungicides showed that the mutations for resistance to boscalid also reduced sensitivity to isopyrazam ($R_f \geq 30$) and, on some cases, to fluopyram ($R_f: 8 \leq 10$). On some strains, sensitivity to fluopyram was increased ($R_f: 0,2 \leq 0,3$). No effect of boscalid resistance mutation(s) were observed on the fungitoxicity of triazoles, phenylpyrroles and benzamides. However, an increased sensitivity ($R_f: 0,3 \leq 0,1$) of boscalid-resistant strains to the strobilurin-type fungicide pyraclostrobin was observed in all mutant strains tested. Studies of fitness determining parameters showed that the mutation(s) for resistance to boscalid may or may not affect mycelial growth rate, though no effects were observed on sporulation, conidial germination, pathogenicity, virulence and osmosensitivity. Analysis of mycelial extracts from the wild types and mutant strains, using thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC), showed that most *P. expansum* mutant strains produced mycotoxins (patulin and citrinin) at significantly higher concentrations than the wild-type parent strains. However some strains produced significantly lower or no mycotoxins at all. Similar results were found in tests with artificially inoculated apples. Gene sequence analysis of the subunit B gene of complex II, revealed single point mutations in a highly conserved region of the iron-sulphur protein (Ip) conferred resistance in most cases. Mutations resulted to histidine to arginine (H272R) or tyrosine (H272Y) replacements at position 272. The H272R mutation (1 case) had no effect on the strains' sensitivity to fluopyram, while the H272Y mutation (3 cases) induced increased sensitivity to fluopyram. However, on one strain no mutations were found in the Ip gene, though the strain showed high resistance to boscalid ($R_f=300$) and medium-high resistance to fluopyram ($R_f=10$). The data of the present study indicate the potential increase in resistance incidence of *P. expansum* strains after intensive use of new SDHIs.

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ- ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	i
ΣΥΝΟΨΗ	ii
ABSTRACT	iii
1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	1
1.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΠΝΟΗ ΚΑΙ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ II ΤΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SDHIs)	3
1.1.1. Η Διαδικασία της Αναπνοής.....	3
1.1.2. Παρεμποδιστές της Αφυδρογονάσης του Ηλεκτρικού Οξέος (SDHIs). ...	11
1.1.3. Προβλήματα Ανθεκτικότητας στους SDHIs	12
1.2. ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>Penicillium</i>	17
1.3. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	23
1.3.1. Γενικά	23
1.3.2. Μυκοτοξίνες του Γένους <i>Penicillium</i>	26
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	41
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	45
3.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	47
3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	49
3.3. ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ	50
3.4. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΟ BOSCALID ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>Penicillium expansum</i>	53
3.5. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΟ BOSCALID ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>Penicillium expansum</i>	54
3.5.1. Μελέτη του Επιπέδου Ανθεκτικότητας.....	54
3.5.2. Μελέτη του Ρυθμού Αύξησης.....	55
3.5.3. Μελέτη της Ικανότητας Παραγωγής και Βλάστησης των Κονιδίων	55
3.5.4. Μελέτη της Ευαισθησίας στην Ωσμωτική Πίεση.....	56
3.5.5. Μέτρηση του Ξηρού Βάρους του Μυκηλίου	56
3.5.6. Μελέτη της Παθογόνου Ικανότητας των Στελεχών του Μύκητα <i>Penicillium expansum</i>	56
3.5.7. Μελέτη Της Ύπαρξης Διασταυρωτής Ανθεκτικότητας	57
3.6. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ	58
3.7. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>Penicillium expansum</i>	61
3.7.1. Απομόνωση DNA από Στελέχη του Μύκητα <i>Penicillium expansum</i>	61
3.7.2. Ενίσχυση Τμήματος του Γονιδίου που Κωδικοποιεί την Β Υπομονάδα του Συμπλόκου II και Αλληλούχιση	62

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63
4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΓΡΙΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΟΥΣ SDHIs ΚΑΙ ΑΛΛΟΥΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ	65
4.1.1. Ευαισθησία των Αγρίων Στελεχών στους SDHIs	65
4.1.2. Ευαισθησία των Αγρίων Στελεχών σε Παρεμποδιστές Άλλων Χημικών Ομάδων	68
4.1.3. Σύνοψη Αποτελεσμάτων Ευαισθησίας των Άγριων Στελεχών σε Παρεμποδιστές	71
4.2. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΟ Boscalid ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>Penicillium expansum</i>	72
4.3. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΟ bodcalid	72
4.4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>Penicillium expansum</i>	73
4.4.1. Ρυθμός Αύξησης	73
4.4.2. Παραγωγή και Βλάστηση Κονιδίων	75
4.4.3. Επίδραση των Μεταλλαγών Ανθεκτικότητας στην Αντοχή στην Ωσμωτική Πίεση	77
4.4.4. Φυτοπαθογόνος Ικανότητα.....	78
4.4.5. Διασταυρωτή Ανθεκτικότητα.....	80
4.5. ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	90
4.6. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΑΠΟ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>Penicillium expansum</i>	92
4.6.1. Παραγωγή Μυκοτοξινών in vitro	92
4.6.2. Παραγωγή Μυκοτοξινών in vivo	95
4.7. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	99
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	101
Βιβλιογραφία.....	107

1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

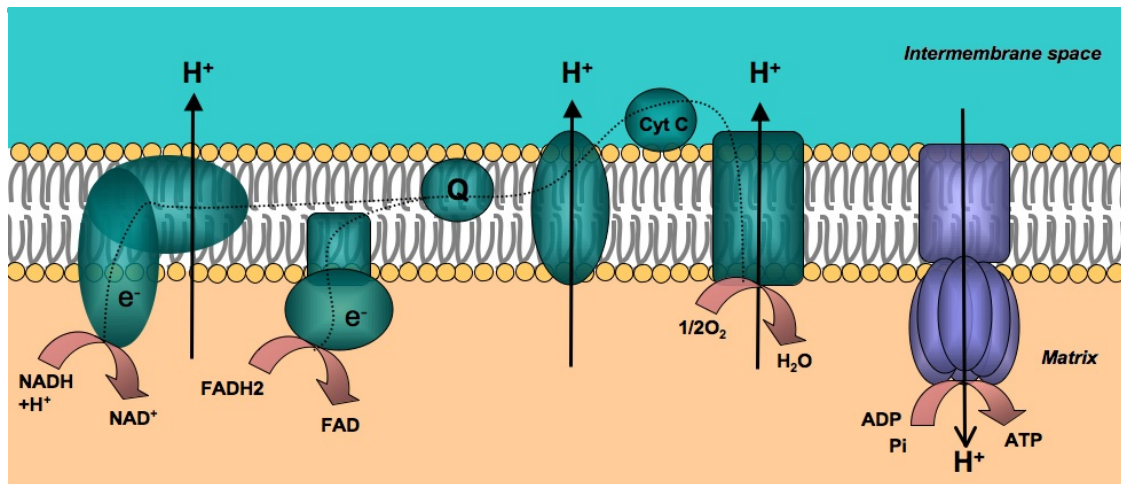
1.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΠΝΟΗ ΚΑΙ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ II ΤΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SDHIs)

1.1.1. Η Διαδικασία της Αναπνοής

Κατά τη διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής χρησιμοποιούνται τα ηλεκτρόνια που ελευθερώνονται κατά την γλυκόλυση, την οξείδωση των λιπαρών οξέων και τον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλος του Krebs), τα υδρογόνα που προκύπτουν από τις ίδιες αυτές λειτουργίες και μόρια οξυγόνου ώστε να δημιουργηθούν κατάλληλες συνθήκες για την παραγωγή ATP, αποδίδοντας μόρια νερού (Berg et al., 2012; Nelson & Cox, 2008). Η διαδικασία αυτή είναι πολύ αποδοτικότερη της αυτόνομης γλυκόλυσης, αποδίδοντας 36 μόρια ATP για κάθε μόριο γλυκόζης που εισέρχεται στην γλυκόλυση (Denniston et al., 2008).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και λειτουργεί εξίσου στο φως και στο σκοτάδι (Nelson & Cox, 2008). Αντίθετα με τον κύκλο του Krebs και τον καταβολισμό των υδρογονανθράκων, που γίνονται στην μήτρα του μιτοχονδρίου, η διαδικασία της αναπνοής λαμβάνει χώρα στην εσωτερική του μεμβράνη. Τα ενζυμικά σύμπλοκα που απαιτούνται για την διαδικασία αυτή είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, με εξαίρεση το σύμπλοκο II, οι οποίες καταλύουν τις αυθόρμητες και εξώεργες (exergonic reactions- αρνητικό ΔG) οξειδώσεις του οξυγόνου (O_2) από τα μόρια NADH και $FADH_2$. Τα ενζυμικά σύμπλοκα αυτά αποτελούν την ονομαζόμενη αναπνευστική αλυσίδα (Berg et al., 2012; Nelson & Cox, 2008). Τα συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας σχηματίζουν τέσσερεις δομικές και λειτουργικές μονάδες, οι οποίες ονομάζονται *σύμπλοκα* (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1, σε 3 σημεία της αναπνευστικής αλυσίδας (σύμπλοκο I, σύμπλοκο III και σύμπλοκο IV) μπορούν να αντληθούν πρωτόνια (H^+) από τη μήτρα στον διαμεμβρανικό χώρο, όπου σχηματίζεται μία δεξαμενή υψηλού δυναμικού H^+ . Σε κάθε ένα από τα σημεία αυτά, αντλούνται επαρκείς ποσότητες H^+ για να παραχθεί ένα μόριο ATP. Και οι 3 αυτές αντλίες ενεργοποιούνται όταν ένα μόριο NADH προσδένεται στην αφυδρογονάση του NADH (σύμπλοκο I), ενώ όταν ένα μόριο $FADH_2$ προσδένεται στην αντίστοιχη αφυδρογονάση του (σύμπλοκο II) μόνο οι 2 από αυτές ενεργοποιούνται. Το αποτέλεσμα είναι από κάθε μόριο NADH που προσδένεται να μεταφέρονται 6 H^+ και να παράγονται 3 μόρια ATP, ενώ από το κάθε μόριο $FADH_2$ να μεταφέρονται 4 H^+ και να παράγονται μόνο 2 μόρια ATP (Denniston et al., 2008).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της αναπνευστικής αλυσίδας και της συνθετάσης του ATP, με τις γενικές λειτουργίες τους και την πορεία των ηλεκτρονίων και των πρωτονίων. Προσαρμογή από www.bioscience.org

Εκτός των NAD και FAD⁺, άλλα τρία είδη μορίων μεταφοράς ηλεκτρονίων λειτουργούν στην αναπνευστική αλυσίδα: Μία κινόνη (ουμπικινόνη) και δύο διαφορετικοί τύποι μέταλλο-πρωτεϊνών (κυτοχρώματα και σίδηρο-θείο πρωτεΐνες). Η ουμπικινόνη (ή αλλιώς συνένζυμο Q) είναι μικρό και υδρόφοβο μόριο, κινείται εύκολα μέσα στο διπλό στρώμα των λιπιδίων της μεμβράνης και μπορεί να μεταφέρει ηλεκτρόνια (e⁻) μεταξύ των συμπλόκων. Έτσι λειτουργεί ως συνδετικός κρίκος μεταξύ δύο δωρητών ηλεκτρονίων και ενός παραλήπτη ηλεκτρονίων (Nelson & Cox, 2008).

Τα κυτοχρώματα είναι πρωτεΐνες με χαρακτηριστική, ισχυρή απορρόφηση ορατού φωτός, λόγω των προσθετικών ομάδων τους που περιλαμβάνουν αίμη. Υπάρχουν τρία είδη κυτοχρωμάτων στα μιτοχόνδρια (*a*, *b* και *c*) τα οποία διαφοροποιούνται ανάλογα με το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης που παρουσιάζουν (για παράδειγμα *b*₅₆₂). Σε κάθε κυτόχρωμα, το οξειδωτικό δυναμικό διαφέρει και εξαρτάται άμεσα από την αλληλεπίδρασή του με τις πλάγιες αλυσίδες της πρωτεΐνης (Nelson & Cox, 2008).

Στις σίδηρο-θείο πρωτεΐνες ο ανόργανος σίδηρος συνδέεται με τα άτομα θείου της κυστεΐνης ή με ανόργανα άτομα θείου ή και τα δύο. Τα κέντρα σιδήρου-θείου μπορούν να είναι από πολύ απλές κατασκευές, με ένα άτομο σιδήρου ενωμένο με τέσσερις κυστεΐνες, έως πιο πολύπλοκες κατασκευές με δύο ή τέσσερα άτομα σιδήρου. Όλες οι σίδηρο-θείο πρωτεΐνες λαμβάνουν μέρος στη μεταφορά μονών ηλεκτρονίων, κατά την οποία ένα άτομο σιδήρου ανάγεται και οξειδώνεται. Υπάρχουν τουλάχιστον οκτώ τέτοιες πρωτεΐνες στην αναπνευστική αλυσίδα, το δυναμικό των οποίων είναι διαφοροποιούμενο ανάλογα με το μικροπεριβάλλον του σιδήρου εντός της πρωτεΐνης (Nelson & Cox, 2008).

Σύμπλοκο I

Το σύμπλοκο I αποτελεί την αφυδρογονάση του NADH. Πρόκειται για ένα μεγάλο ενζυμικό σύμπλοκο που αποτελείται από 42 διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μεταξύ των οποίων και μια μονονουκλεοτιδική φλαβοπρωτεΐνη (FMN) και τουλάχιστον έξι σίδηρο-θείο πρωτεΐνες (Nelson & Cox, 2008; Berg et al., 2012).

Το σύμπλοκο I καταλύει δύο ταυτόχρονες διεργασίες. Η πρώτη είναι η εξώεργη μεταφορά ενός ιόντος υδριδίου (H) στην ουμπικινόνη από το NADH και ενός πρωτονίου από τη μήτρα. Η δεύτερη είναι η ενδόεργη μεταφορά τεσσάρων πρωτονίων από τη μήτρα στον διαμεμβρανικό χώρο (Nelson & Cox, 2008).

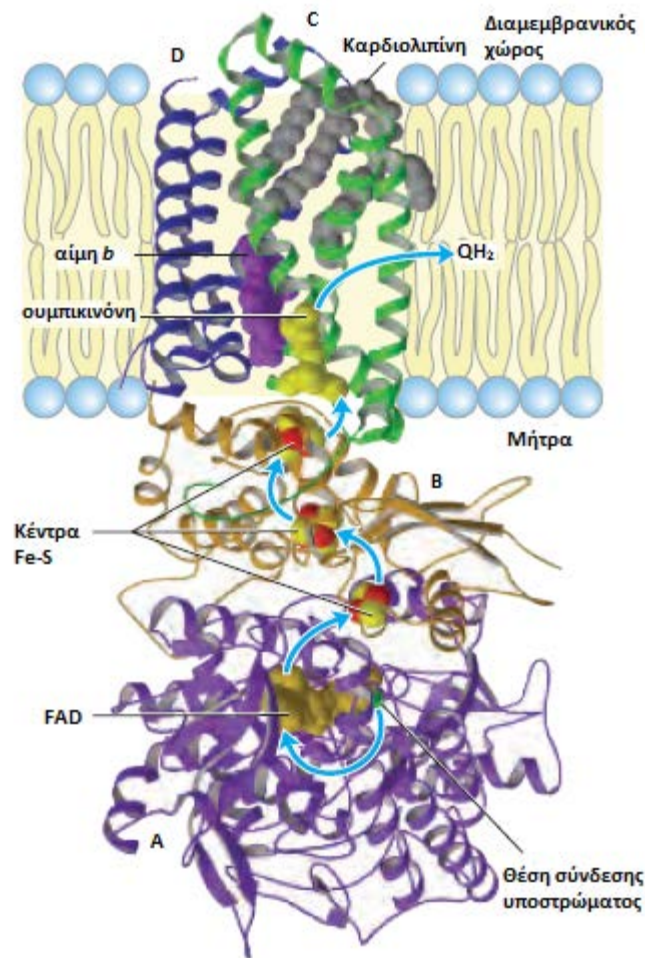
Αν και η ακριβής διεργασία δεν είναι πλήρως γνωστή ακόμα, φαίνεται πως οι δύο αυτές συνδεδεμένες αντιδράσεις μεταφοράς προς το συνένζυμο Q είναι ιδιαίτερης σημασίας. Το NADH προσδέεται και μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στην FMN. Τα ηλεκτρόνια αυτά περνούν μέσω των σίδηρο-θείο πρωτεϊνών και από εκεί στο προσδεμένο συνένζυμο Q. Η οξειδωση του συνενζύμου Q φαίνεται πως προκαλεί την απορρόφηση δύο πρωτονίων από τη μήτρα. Στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια του συνενζύμου Q μεταφέρονται προσωρινά σε ένα σίδηρο-θείο κέντρο και τα πρωτόνια απελευθερώνονται στο διαμεμβρανικό χώρο. Τέλος τα ηλεκτρόνια αυτά μεταφέρονται σε κινητή μορφή του συνενζύμου Q, προκαλώντας την απορρόφηση δύο ακόμα πρωτονίων από την μήτρα (Berg et al., 2012).

Σύμπλοκο II

Το σύμπλοκο II, ή αλλιώς σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος, αποτελεί το μόνο προσδεμένο σε μεμβράνη ένζυμο του κύκλου του Krebs (Nelson & Cox, 2008). Ταυτόχρονα, στην διεργασία της αναπνοής, η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού μεταφέρει τα ηλεκτρόνια που παραλαμβάνει από το FADH₂ κατά την οξειδωσή του στο συνένζυμο Q, χωρίς όμως να μεταφέρει πρωτόνια στον διαμεμβρανικό χώρο (Berg et al., 2012).

Το ένζυμο αυτό περιλαμβάνει πέντε διαφορετικές προσθετικές ομάδες δύο τύπων και τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες (A, B, C και D). Όπως φαίνεται και από την εικόνα 2, το FADH είναι σταθερά προσδεμένο επάνω στο σύμπλοκο.

Οι υπομονάδες C και D βρίσκονται εντός της μεμβράνης και η καθεμία περιλαμβάνει τρεις ενδομεμβρανικές έλικες. Οι έλικες αυτές συγκρατούν μία αιμική ομάδα, την αίμη *b*, και ένα σημείο πρόσδεσης της ουμπικονόνης. Οι υπομονάδες A και B επεκτείνονται εντός της μήτρας του μιτοχονδρίου και περιέχουν τρία κέντρα 2Fe-2S, το προσδεμένο FAD και ένα σημείο πρόσδεσης για το ηλεκτρικό οξύ.



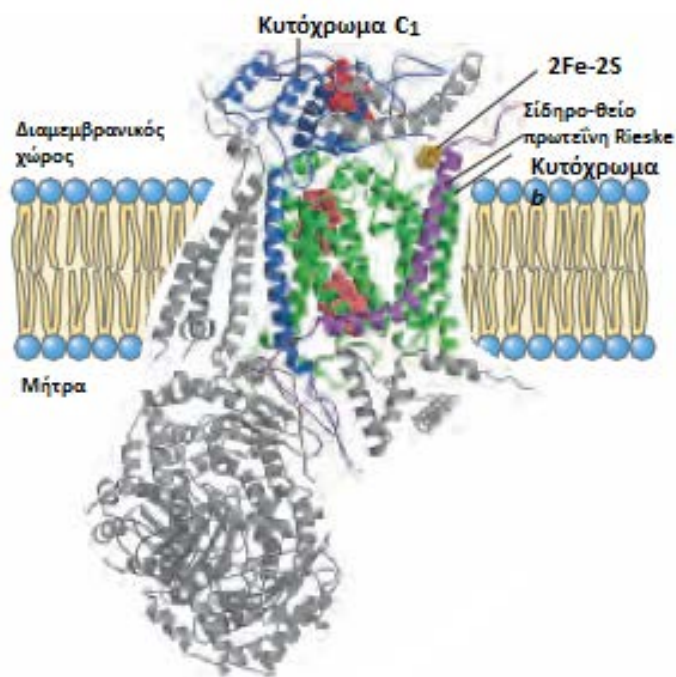
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του Συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας και της πορείας των ηλεκτρονίων σε αυτό. Προσαρμογή από Nelson & Cox, 2008.

Κατά τη μετατροπή του ηλεκτρικού οξέος προς φουμαρικό, ελευθερώνονται ηλεκτρόνια. Αυτά μεταφέρονται στο FAD και από εκεί μέσω των κέντρων Fe-S στην ουμπικινόνη. Το συνολικό μέγεθος του ενζύμου είναι μικρό και αποτελεί το ιδανικότερο μέσο ταχύτατης μεταφοράς ηλεκτρονίων στο συνένζυμο Q. Φαίνεται πως η αίμη δεν είναι στην άμεση πορεία του ηλεκτρονίου, εικάζεται όμως πως δρα περιορίζοντας τη διαρροή ηλεκτρονίων προς ελεύθερα μόρια οξυγόνου που αντιδρούν δημιουργώντας υπεροξείδιο (H₂O₂) και υπεροξειδικές ρίζες (Nelson & Cox, 2008).

Σύμπλοκο III

Το σύμπλοκο αυτό ονομάζεται και οξειδοοδουκτάση του Q-κυτοχρώματος *c*, ή σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων *bc₁*, και αποτελεί τη δεύτερη αντλία πρωτονίων της αναπνευστικής αλυσίδας. Στο σύμπλοκο αυτό ολοκληρώνεται η μεταφορά των

ηλεκτρονίων από το Co-Q στο κυτόχρωμα c με ταυτόχρονη μεταφορά πρωτονίων από τη μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο (Berg et al., 2012; Nelson & Cox, 2008).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση του Συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας. Προσαρμογή από Nelson & Cox, 2008.

Η λειτουργική μονάδα του συμπλόκου είναι ένα διμερές, κάθε μονομερές του οποίου αποτελείται από έντεκα υπομονάδες. Οι δύο μονομερείς μονάδες του κυτοχρώματος *b* κυκλώνουν μία σπηλαιώδη κατασκευή στη μέση της μεμβράνης, μέσω της οποίας το συνένζυμο Q έχει την ικανότητα να μεταφέρεται από την μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο, όπως αυτές φαίνονται στην εικόνα 3, καθώς οδηγεί τα ηλεκτρόνια και τα πρωτόνια μέσα από την μεμβράνη (Nelson & Cox, 2008).

Στο σύμπλοκο περιλαμβάνονται συνολικά τρεις διαφορετικές μονάδες αίμης. Οι δύο βρίσκονται στα κυτοχρώματα *b* και ονομάζονται *αίμη b_L* και *αίμη b_H*, οπότε, τα κυτοχρώματα *b* ονομάζονται κυτόχρωμα *b_L* και κυτόχρωμα *b_H* αντίστοιχα. Η τρίτη, μία αίμη τύπου *c*, βρίσκεται στο κυτόχρωμα *c₁*. Η διαφορά μεταξύ των αιμών του κυτοχρώματος *b* και αυτής του κυτοχρώματος *c* είναι πως η αίμη του κυτοχρώματος *c* είναι ομοιοπολικά προσδεμένη πάνω στην πρωτεΐνη. Εκτός των αιμών, το σύμπλοκο περιλαμβάνει και μία σίδηρο-θείο- πρωτεΐνη με 2Fe-2S κέντρο, το οποίο ονομάζεται *κέντρο Rieske*. Το κέντρο αυτό αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό διότι είναι σταθεροποιημένο στην ανοιγμένη του μορφή, αυξάνοντας έτσι την αναγωγική ικανότητα του. Τέλος, το σύμπλοκο διαθέτει και δύο σημεία πρόσδεσης του συνενζύμου Q, τα Q₀ και Q_i, από τα οποία το Q_i είναι το πλησιέστερο στην μήτρα (Berg et al., 2012).

Η διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων και πρωτονίων εντός του συμπλόκου III είναι πολύπλοκη. Έχει προταθεί ένα μοντέλο που ονομάζεται κύκλος Q και περιγράφει την μεταβίβαση ηλεκτρονίων από το Co-Q (που μεταφέρει δύο ηλεκτρόνια) στα κυτοχρώματα b_{562} , b_{566} , c και c_1 (που μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο) και εξηγεί την στοιχειομετρία των ζευγών πρωτονίων που μεταφέρονται μέσα από το σύμπλοκο III στο κυτόχρωμα c . Το κυτόχρωμα c , είναι μία διαλυτή πρωτεΐνη του διαμεμβρανικού χώρου, η οποία μεταφέρει ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο III στο σύμπλοκο IV μέσω της μοναδικής της αίμης (Nelson & Cox, 2008).

Η διαδικασία ξεκινά με την πρόσδεση του συνενζύμου Q στο σημείο Q_0 . Ένα ηλεκτρόνιο κινείται πρώτα προς το κέντρο Rieske, έπειτα στο κυτόχρωμα c_1 και τέλος στο οξειδωμένο κυτόχρωμα c . Το ανοιγμένο πλέον κυτόχρωμα c είναι ελεύθερο να κινηθεί προς το σύμπλοκο IV. Το δεύτερο ηλεκτρόνιο μετακινείται πρώτα προς το κυτόχρωμα b_L , μετά προς το κυτόχρωμα b_H και τέλος σε ένα οξειδωμένο Co-Q που έχει προσδεθεί στη θέση Q_i . Καθώς το Co-Q στη θέση Q_0 χάνει τα ηλεκτρόνια του, ταυτόχρονα ελευθερώνει και δύο περισσευούμενα πρωτόνια που διέθετε στον διαμεμβρανικό χώρο και είναι ελεύθερο να αποκολληθεί. Καθώς το σημείο Q_0 είναι ελεύθερο πια, ένα ακόμα μόριο Co-Q προσδέεται επάνω του και αντιδρά με τον ίδιο ακριβώς τρόπο.

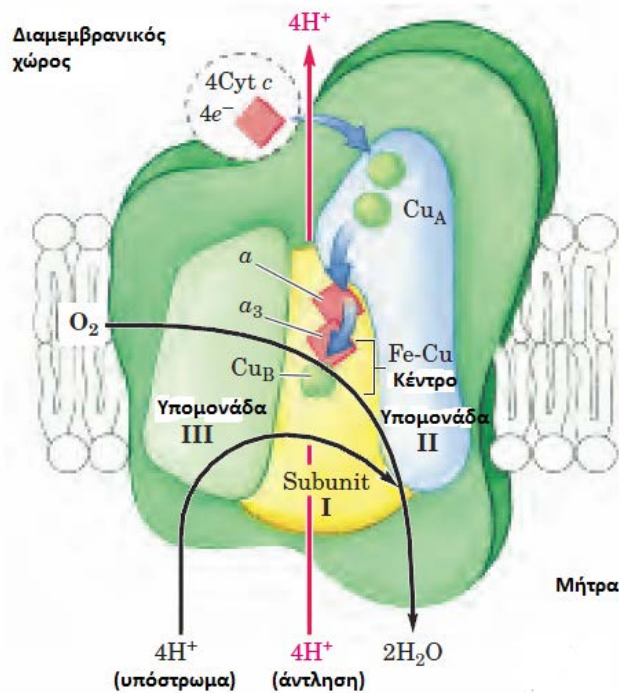
Μόλις το Co-Q που βρίσκεται προσδεμένο στο σημείο Q_i , παραλάβει το δεύτερο ηλεκτρόνιο του, μετατρέπεται σε ανιονική ρίζα και προσλαμβάνει αναγκαστικά και δύο πρωτόνια από τη μήτρα. Στο τέλος του κύκλου Q, δύο πρωτόνια έχουν παραληφτεί από τη μήτρα, τέσσερα πρωτόνια έχουν μεταφερθεί στον διαμεμβρανικό χώρο, δύο μόρια συνενζύμου Q έχουν οξειδωθεί και άλλο ένα έχει ανοιχθεί, όπως έχουν ανοιχθεί και δύο μόρια κυτοχρώματος c (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2012).

Σύμπλοκο IV

Το τελευταίο στάδιο της αναπνευστικής αλυσίδας είναι η οξείδωση του ανοιγμένου κυτοχρώματος c που προέκυψε από το σύμπλοκο III, με ταυτόχρονη αναγωγή μορίων O_2 προς νερό (H_2O). Για το λόγο αυτό, το σύμπλοκο IV αναφέρεται και ως *κυτοχρωμική οξειδάση* ή *σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων $a+a_3$* . Πρόκειται για ένα μεγάλο ενζυμικό σύμπλοκο με δεκατρείς υπομονάδες. Από αυτές μόνο οι τρεις είναι οι λειτουργικά απαραίτητες και είναι αυτές που κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακό DNA (υπομονάδες I, II και III), ενώ οι υπόλοιπες κωδικοποιούνται από πυρηνικό DNA (Berg et al., 2012; Nelson & Cox, 2008).

Το σύμπλοκο IV (Εικ 4) περιλαμβάνει δύο ομάδες αίμης A και τρία ιόντα χαλκού, χωρισμένα σε δύο κέντρα χαλκού (Berg et al., 2012). Συγκεκριμένα, στην υπομονάδα II υπάρχουν δύο ιόντα χαλκού συνδεδεμένα με τις SH ομάδες δύο

υπολειμμάτων κυστεϊνών, σε ένα σύστημα με δύο πυρήνες (Cu_A/Cu_A κέντρο A) που ομοιάζει με τα κέντρα 2Fe-2S των σίδηρο-θείο πρωτεϊνών. Η υπομονάδα I περιέχει δύο ομάδες αιμών (α και α_3) και ένα ακόμα ιόν χαλκού (Cu_B κέντρο B). Η αίμη α_3 και το Cu_B σχηματίζουν ένα δεύτερο κέντρο με δύο πυρήνες που δέχεται ηλεκτρόνια από την αίμη α και τα μεταφέρει στο οξυγόνο που είναι προσδεμένο στην αίμη α_3 (Nelson & Cox, 2008).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση του Συμπλόκου IV της αναπνευστικής αλυσίδας και της πορείας των ηλεκτρονίων και πρωτονίων σε αυτό. Προσαρμογή από Nelson & Cox, 2008.

Ο καταλυτικός κύκλος ξεκινάει με το ένζυμο σε πλήρως οξειδωμένη μορφή. Ένα μόριο ανοιγμένου κυτοχρώματος c μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο αρχικά στο κέντρο A. Από εκεί το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στην αίμη α , μετά στην αίμη α_3 και τέλος στο κέντρο B, το οποίο και ανάγεται σε Cu^{2+} . Ένα δεύτερο μόριο κυτοχρώματος c εισάγει ένα ακόμα ηλεκτρόνιο, το οποίο και ακολουθεί την ίδια πορεία, μέχρι να φτάσει στην αίμη α_3 , όπου και παραμένει, ανάγοντας την αίμη στην μορφή Fe^{2+} . Στην μορφή αυτή, το ένζυμο αναγκάζεται να προσλάβει οξυγόνο. Η εγγύτητα του συμπλόκου αίμης-οξυγόνου με το κέντρο B, επιτρέπει στο οξυγόνο να ανοιχθεί σε υπεροξείδιο (O_2^{2-}), το οποίο και σχηματίζει γέφυρα με το Fe^{3+} στην αίμη α_3 και το κέντρο B. Η προσθήκη τρίτου ηλεκτρονίου από κυτόχρωμα c , μαζί με την προσθήκη ενός πρωτονίου, οδηγεί στη διάσπαση του δεσμού μεταξύ των οξυγόνων και την δημιουργία φερρυλομάδας Fe^{4+}O στην αίμη α_3 και $\text{Cu}_B^{2+}\text{OH}$ στο κέντρο B. Η προσθήκη του τέταρτου και τελευταίου ηλεκτρονίου από κυτόχρωμα c με την προσθήκη ενός ακόμα πρωτονίου, ανάγει την φερρυλομάδα σε Fe^{3+}OH . Μία αντίδραση με δύο επιπλέον πρωτόνια απελευθερώνει δύο μόρια νερού και

επαναφέρει το ένζυμο στην αρχική, οξειδωμένη του μορφή (Berg et al., 2012). Για κάθε τέσσερα ηλεκτρόνια που περνάνε από το σύμπλοκο, το ένζυμο καταναλώνει τέσσερα πρωτόνια από την μήτρα του μιτοχονδρίου μετατρέποντας το O_2 σε $2H_2O$. Ταυτόχρονα όμως χρησιμοποιεί την ενέργεια από τις αντιδράσεις αυτές για να αντλήσει ένα πρωτόνιο από τη μήτρα προς τον διαμεμβρανικό χώρο, για κάθε ηλεκτρόνιο που δέχεται. Συνολικά το σύμπλοκο αντλεί από τη μήτρα οκτώ πρωτόνια σε κάθε κύκλο, αφήνοντας τα τέσσερα από αυτά να περάσουν στον διαμεμβρανικό χώρο, ενώ ταυτόχρονα δεν επιτρέπει στα ατελώς ανοιγμένα ενδιάμεσα να δράσουν ως ελεύθερες ρίζες, αλλά τις κρατά ισχυρά προσδεμένες στο σύμπλοκο μέχρι την πλήρη μετατροπή τους σε νερό (Nelson & Cox, 2008).

Αν και οι λεπτομέρειες για την μεταφορά των πρωτονίων δεν είναι πλήρως γνωστές ακόμα, φαίνεται πως το εσωτερικό φορτίο των πρωτεϊνών διατηρείται ουδέτερο. Αυτό σημαίνει πως για κάθε ηλεκτρόνιο που προστίθεται κατά τις αναγωγές, ένα πρωτόνιο θα πρέπει να προσδεθεί σε κάποιο κοντινό σημείο. Φαίνεται ακόμα πως γίνονται κάποιες διαμορφωτικές αλλαγές κατά τη διάρκεια του κύκλου, ειδικά γύρω από την περιοχή του κέντρου B, και οι αλλαγές αυτές θα πρέπει να επιτρέπουν την άντληση πρωτονίων από τη μήτρα και την ελευθέρωσή τους στον διαμεμβρανικό χώρο (Berg et al., 2012).

Παραγωγή ATP

Η παραγωγή ATP δεν αποτελεί λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, είναι όμως στενά συνδεδεμένη με αυτή.

Τα πρωτόνια που συσσωρεύονται στο διαμεμβρανικό χώρο κατά την αναπνοή απελευθερώνουν ένα ενεργειακό δυναμικό, το οποίο είναι υπεραρκετό για την παραγωγή ATP. Τα πρωτόνια αυτά χρησιμοποιούν, σύμφωνα με το χημειωσμητικό μοντέλο, ένα πρωτεϊνικό πόρο μεταφοράς πρωτονίων για να επανέλθουν στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Ο πόρος αυτός είναι συνδεδεμένος με τη συνθετάση του ATP, η οποία απορροφά την περισσευούμενη ενέργεια για τον σχηματισμό ATP από ADP (Nelson & Cox, 2008).

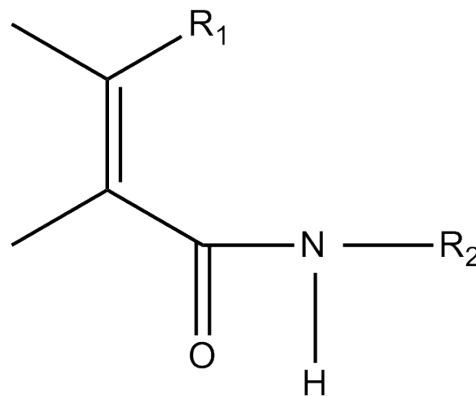
Η παραγωγή ATP είναι τόσο άμεσα συνδεδεμένη με την αναπνοή, που αν διακοπεί η μία λειτουργία, διακόπτεται και η άλλη. Αν, δηλαδή, διακοπεί η μεταφορά των πρωτονίων στο διαμεμβρανικό χώρο, τότε παύει και η λειτουργία της συνθετάσης του ATP και αντίστροφα. Αν διακοπεί η λειτουργία της συνθετάσης του ATP, τότε το δυναμικό των πρωτονίων στο διαμεμβρανικό χώρο αυξάνεται τόσο πολύ που το σύστημα φτάνει σε κορεσμό, δηλαδή η λειτουργία της μεταφοράς των πρωτονίων απαιτεί την ίδια ή περισσότερη ενέργεια από αυτή που παράγεται. Στο σημείο αυτό η λειτουργία του συστήματος σταματά (Nelson & Cox, 2008).

1.1.2. Παρεμποδιστές της Αφυδρογονάσης του Ηλεκτρικού Οξέος (SDHIs).

Οι SDHIs περιλαμβάνουν ενώσεις από δύο ομάδες. Η κύρια ομάδα είναι τα καρβοξαμιδικά μυκητοκτόνα, ενώ κάποια από αυτά ανήκουν στα βενζαμίδια (Klappach, et al., 2011). Στη διεθνή βιβλιογραφία, όμως, οι δύο ομάδες εμφανίζονται και αναλύονται ως μία και, όπου δεν αναφέρονται ως SDHIs, αναφέρονται ως καρβοξαμιδικά μυκητοκτόνα.

Τα καρβοξαμιδικά μυκητοκτόνα εμφανίστηκαν στο εμπόριο στα τέλη της δεκαετίας του '60, με πρώτο το carboxin και αργότερα το oxycarboxin (Plimmer, Gammon, & Ragsdale, 2003). Ήταν τα πρώτα διασυστηματικά μυκητοκτόνα που εμφανίστηκαν (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007). Η χρήση τους ήταν κυρίως για επενδύσεις σπόρων και η εμφάνισή τους επιταχύνθηκε λόγω της αναγκαστικής απόσυρσης των υδραργυρούχων σκευασμάτων επένδυσης σπόρων (Plimmer, Gammon, & Ragsdale, 2003). Το εύρος των δραστικών ουσιών της ομάδας έχει αυξηθεί σημαντικά από τη δεκαετία του '90 και μετά (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007). Σήμερα η ομάδα περιλαμβάνει τις δραστικές ουσίες benodanil, flutolanil, mepronil, fluopyram, carboxin, oxycarboxin, thifluzamide, bixafen, fluxapyroxad, furametpyr, isopyrazam, penflufen, penthiopyrad, sedaxane, fenfuram και boscalid (Klappach, et al., 2011).

Οι σχέσεις μεταξύ δομής και δραστηριότητας των SDHIs έχουν μελετηθεί εκτενώς σε σχέση με την μυκηλιακή αύξηση *in vitro*, τον έλεγχο της ασθένειας και τη λειτουργία βιοχημικών συστημάτων. Οι έρευνες έχουν δείξει πως η βιολογική δράση των μορίων οφείλεται στο *N*-φαινυλ-2-βουτεναμίδιο (Plimmer et al., 2003).



Εικόνα 5: Η δομική μονάδα *N*-Phenyl-2-butenamide, όπου R₁ = CH₃, CF₃, Cl ή I και R₂ = Φαινύλ ή Κυκλοεξύλ. Πηγή Plimmer, Gammon & Ragsdale, 2003.

Φάσμα Δράσης

Τα πρώτα μυκητοκτόνα της ομάδας είχαν δράση μόνο σε βασιδιομύκητες και χρησιμοποιούνταν κυρίως εναντίων ειδών του γένους *Rhizoctonia*, αλλά και σε

σκωριάσεις, ανθρακώσεις και δαυλίτες (Plimmer, Gammon, & Ragsdale, 2003; Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007). Στις δεκαετίες που ακολούθησαν εμφανίστηκαν μόρια τα οποία δρούσαν, όπως και τα πρώτα, σε βασιδιομύκητες των γενών *Puccinia*, *Ustilago*, *Tilletia*, *Rhizoctonia*, *Pythula*, *Sclerotium*, *Gymnosporangium* και άλλα (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Τα τελευταία χρόνια, έχουν εμφανιστεί στο εμπόριο SDHIs, όπως τα boscalid, isopyrazam, penythiozad, fluoxastrobin και fluopyram, τα οποία εμφανίζουν δράση σε περισσότερες κλάσεις. Έτσι κατέστη δυνατό να αντιμετωπιστούν με τα μυκητοκτόνα αυτά περισσότερα σοβαρά παθογόνα, όπως *Botrytis*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Monilinia*, *Venturia* και ωΐδια πολλών καλλιεργειών (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Πρόσφατα άρχισε να διερευνείται η πιθανότητα επέκτασης της άδειας χρήσης του boscalid και για τις σήψεις που προκαλούν είδη του γένους *Penicillium* (Xiao & Boal, 2009).

Μηχανισμός Δράσης

Οι SDHIs δρουν ως εξειδικευμένοι παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως τα μυκητοκτόνα αυτά δρουν στα κέντρα Fe-S των υπομονάδων A και B του συμπλόκου. Αν και δεν παρεμποδίζουν την αναγωγή τους, πειράματα έχουν δείξει πως παρεμποδίζουν την επανοξειδωσή τους, δηλαδή την μεταβίβαση του ηλεκτρονίου στο συνένζυμο Q (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007). Το αποτέλεσμα της παρεμπόδισης αυτής είναι η διακοπή της λειτουργίας του συμπλόκου II της αναπνοής, αλλά και του κύκλου του. Η διακοπή του κύκλου του Krebs, έχει ως αποτέλεσμα την παύση της αναγωγής του FAD προς FADH₂, αλλά και του σχηματισμού του μεγαλύτερου μέρους του NAD⁺ προς NADH (Nelson & Cox, 2008; Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007). Αποτέλεσμα αυτού είναι τόσο η συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος, όσο και η έλλειψη NADH, το οποίο προκαλεί μείωση, έως και διακοπή, της λειτουργίας και του συμπλόκου I. Με τη διακοπή της μεταφοράς ηλεκτρονίων προς το συνένζυμο Q, επέρχεται η μείωση, έως και διακοπή, της λειτουργίας των αντλιών πρωτονίων προς τον διαμεμβρανικό χώρο.

1.1.3. Προβλήματα Ανθεκτικότητας στους SDHIs

Η απώλεια της αποτελεσματικότητας πολύτιμων φυτοφαρμάκων λόγω ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε αυτά από τα παθογόνα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της παγκόσμιας γεωργικής παραγωγής. Με την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στα παθογόνα, υπάρχει αντίστοιχη μείωση της αποτελεσματικότητας των φυτοφαρμάκων (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Η ανθεκτικότητα είναι ένα φαινόμενο φυσικής επιλογής, δηλαδή το αποτέλεσμα αλλαγών στις συχνότητες των γονιδίων σε ένα πληθυσμό. Θεωρητικά, η γενετική παραλλακτικότητα ενός πληθυσμού του στοχευόμενου παρασίτου επιτρέπει σε κάποια άτομα να επιβιώσουν από την παρουσία του μέσου επιλογής (φυτοφάρμακο) σε κάποιο ποσοστό. Τα άτομα αυτά υπάρχουν στον αρχικό πληθυσμό πριν την εισαγωγή του φυτοφαρμάκου. Η εισαγωγή του φαρμάκου επιφέρει μία πίεση επιλογής, αποτέλεσμα της οποίας είναι η συχνότητα των γονοτύπων που είναι ικανοί να επιβιώσουν να αυξάνει και να αλλάζει η κατανομή του πληθυσμού (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007; Georghiou, 1986).

Το φαινόμενο της ανθεκτικότητας στους SDHIs έχει αρχίσει να διερευνείται και έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις απώλειας αποτελεσματικότητας διεθνώς. Αναφορές υπάρχουν ακόμα και για τις δραστικές ουσίες της νέας γενιάς, όπως boscalid και penythiopyrad, τα οποία εμφανίστηκαν στην αγορά από το 2005 και μετά.

Απομονώσεις του βασιδιομύκητα *Ustilago nuda* με μειωμένη ευαισθησία στα carboxin και fenfuram έχουν αναφερθεί από το 1988 (Leroux & Berthier, 1988; Newcombe & Thomas, 1991). Σύμφωνα με στοιχεία της FRAC (FRAC, 2010), ανθεκτικά στο carboxin στελέχη του μύκητα *Aspergillus nidulans* είχαν βρεθεί με αρκετά υψηλές συχνότητες από τους White και Georgopoulos (1986). Έρευνες με τον μύκητα *Coprinus cinereus* των Ito et al. (2004), έδειξαν υψηλή συχνότητα εμφάνισης στελεχών ανθεκτικών στο εργαστήριο στο carboxin και το flutolanil. Υψηλές συχνότητες εμφάνισης ανθεκτικότητας στο carboxin σε στελέχη του μύκητα *Mycosphaerella graminicola* αναφέρουν και οι Skinner et al. σε εργασία τους το 1998, ενώ και οι Keon et al. το 1991 ανέφεραν ανθεκτικότητα στο carboxin σε στελέχη του μύκητα *Ustilago maydis*. Εργασίες των Avenot et al. με στελέχη του μύκητα *Alternaria alternata* σε φιστικιές στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α., έδειξαν την ύπαρξη ανθεκτικών στο boscalid βιοτύπων στην καλλιέργεια, καθώς και σε μίγμα του boscalid με pyraclostrobin (Avenot & Michailides, 2007; Avenot et al., 2008; FRAC, 2010; Avenot et al., 2008; Avenot et al., 2009). Στο μύκητα *Botrytis cinerea* έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις μειωμένης ευαισθησίας στο boscalid σε πολλές καλλιέργειες ανά τον κόσμο (Leroux et al., 2010; Bardas et al., 2010; FRAC, 2010; Kim & Xiao, 2010; Veloukas et al., 2011) ενώ εργασίες που έχουν γίνει με τον ίδιο μύκητα υπό εργαστηριακές συνθήκες με το boscalid, αποδεικνύουν σχετική ευκολία στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών (De Miccolis-Angelini et al., 2010). Σε ένα συγγενικό του είδος, το *Botrytis elliptica*, έχει βρεθεί ανθεκτικότητα σε SDHIs σε καλλιέργειες καλλωπιστικών φυτών (FRAC, 2010). Στην Ιαπωνία φαίνεται πως υπάρχει σοβαρό πρόβλημα με στελέχη του μύκητα *Corynespora cassiicola* σε καλλιέργειες αγγουριού, καθώς έχουν αναφερθεί αρκετά περιστατικά ανθεκτικών στο boscalid στελεχών (Miyamoto, et al., 2010; Miyamoto et al., 2009; FRAC, 2010). Ανθεκτικά στελέχη του μύκητα *Didymella bryoniae* έχουν βρεθεί σε καλλιέργειες

κολοκυνθοειδών (Stevenson et al., 2008; Avenot et al., 2010; FRAC, 2010). Στον ιστότοπο FRAC υπάρχουν αναφορές και για ανθεκτικά στελέχη του *Podosphaera xanthii* σε καλλιέργειες πεπονιών (FRAC, 2010; Miyamoto et al., 2010). Πρόσφατα εμφανίστηκαν και μελετήθηκαν και στελέχη του μύκητα *Monilinia fructicola*, τα οποία παρουσιάζουν πολλαπλή ανθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα, μεταξύ των οποίων και το boscalid (Amiri & Brannen, 2010).

Οι εργασίες των Avenot et al. (2008, 2009) με το μύκητα *Alternaria alternata*, έδειξαν ανθεκτικότητα στο boscalid που στηρίζεται σε αλλαγή ενός αμινοξέος στα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες B,C και D (SdhB, SdhC, SdhD αντίστοιχα). Στις εργασίες που έχουν γίνει στο μύκητα *Botrytis cinerea* έχουν αναφερθεί θέσεις μεταλλαγών, κυρίως στην SdhB υπομονάδα (Keon, White, & Hargreaves, 1991). Φαίνεται πως στην SdhB υπομονάδα εμφανίζονται οι περισσότερες μεταλλαγές ανθεκτικότητας στο boscalid (με κοινότερες τις αλλαγές στις θέσεις 272 και 226) και τα περισσότερα στελέχη διαθέτουν μόνο μία ή δύο το πολύ τέτοιες μεταλλαγές (De Miccolis-Angelini et al., 2010; Veloukas et al., 2011), ενώ μόνο σε σπάνιες και τυχαίες περιπτώσεις εμφανίζονται μεταλλαγές στις υπομονάδες C και D (Leroux et al., 2010). Στην Ιαπωνία οι Miyamoto et al. αναγνώρισαν και χαρακτήρισαν το 2010 μεταλλαγές στις υπομονάδες B, C και D για τους μύκητες *Podosphaera xanthii* και *Corynespora cassiicola*, ενώ αναφέρονται και διαφορές στο επίπεδο ανθεκτικότητας που προσδίδει η καθεμία. Εργασίες με διάφορους SDHs στους μύκητες *Didymella bryoniae* (Avenot et al., 2011) και *Coprinus cinereus* (Ito et al., 2004) έχουν δείξει σημειακές μεταλλαγές (θέση 277 της B υπομονάδας και 80 της C υπομονάδας αντίστοιχα) που οδήγησαν σε ανθεκτικότητα. Στον πίνακα 1, αναφέρονται όλες οι σημειακές μεταλλαγές που έχουν αναφερθεί πως προσδίδουν ανθεκτικότητα στους SDHs.

Όπως γίνεται φανερό από τα ανωτέρω στοιχεία, τα στελέχη των παθογόνων που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στους SDHs έχουν υποστεί μία ή δύο το πολύ σημειακές μεταλλαγές ανθεκτικότητας. Το γεγονός αυτό χαρακτηρίζει την ανθεκτικότητα στους SDHs ως *ολιγογονική*. Ολιγογονική ανθεκτικότητα (ή ανθεκτικότητα μειζόνων γόνων) χαρακτηρίζεται η ανθεκτικότητα που ελέγχεται από ένα γόνο ή ένα μικρό αριθμό χρωματοσωματικών γόνων, με εύκολα αναγνωριζόμενη επίδραση του καθενός στον φαινότυπο. Πρόκειται για εξειδικευμένη, κατά κανόνα, ανθεκτικότητα η οποία προσδίδει μεγάλο βαθμό ανθεκτικότητας του παθογόνου στον τοξικό παράγοντα (φυτοφάρμακο) χωρίς προσθετική δράση των μεταλλαγών (Γεωργόπουλος & Ζιώγας, 1992).

Πίνακας 1: Μεταλλαγές στα γονίδια του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας που προκαλούν ανθεκτικότητα στους SDHIs (Avenot & Michailides, 2010; Miyamoto et al., 2010; Veloukas et al., 2011).

Αντικατάσταση αμινοξέος στο σύμπλοκο Sdh		Οργανισμός	Τύπος μεταλλαγής	Πηγή	
Υπομονάδα	Σημειακή Μεταλλαγή				
B	H252L	<i>Ustilago maydis</i>	Εργαστήριο	Keon et al., 1991; Broomfield and Hargreaves, 1992	
	H267Y	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Εργαστήριο	Skinner et al., 1998	
	H239L	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Εργαστήριο	Honda et al., 2000	
	H229L	<i>Xanthomonas campestris</i>	Εργαστήριο	Li et al., 2006	
	H228N	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Εργαστήριο	Matsson & Hederstedt, 2001	
	H277Y,R	<i>Alternaria alternata</i>	Αγρός	Avenot et al., 2008	
	H278Y,R	<i>Corynespora cassiicola</i>	Αγρός	Ishii et al., 2008	
	P225L,T,F; H272Y,R,L; N230I	<i>Botrytis cinerea</i>	Εργαστήριο+ Αγρός	Stammler et al., 2007; Veloukas et al., 2011	
	H -> Y	<i>Didymella bryoniae</i>	Αγρός	Stevenson et al., 2008	
	H -> Y	<i>Podospaera xanthii</i>	Αγρός	BASF, 2007; FRAC	
	H249Y, L,N	<i>Aspergillus oryzae</i>	Εργαστήριο	Shima et al., 2009	
	C	N80K	<i>Coprinus cinereus</i>	Εργαστήριο	Ito et al., 2004
		H134R	<i>Alternaria alternata</i>	Αγρός	Avenot et al., 2009
S73P		<i>Corynespora cassiicola</i>	Αγρός	Glaettli et al., 2009	
T90I		<i>Aspergillus oryzae</i>	Εργαστήριο	Shima et al., 2009	
D	D89G	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Εργαστήριο	Matsson et al., 1998	
	D123E, D133R	<i>Alternaria alternata</i>	Αγρός	Avenot et al., 2009	
	S89P, G109V	<i>Corynespora cassiicola</i>	Αγρός	Glaettli et al., 2009; Miyamoto et al., 2010	
	D132R	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Αγρός	Glaettli et al., 2009	
	D124E	<i>Aspergillus oryzae</i>	Εργαστήριο	Shima et al., 2009	

Σε μία προσπάθεια να διερευνηθούν πιθανές εναλλακτικές λύσεις μεταξύ των SDHIs έχουν γίνει μία σειρά εργασιών οι οποίες ελέγχουν τις πιθανές σχέσεις διασταυρωτής ανθεκτικότητας που μπορούν να αναπτυχθούν με καθεμία από τις μεταλλαγές αυτές. Οι εργασίες των Avenot et al. (2010) και Miyamoto et al. (2010) αναφέρουν και συνοψίζουν τις εργασίες αυτές. Σύμφωνα με τους ερευνητές αυτούς, σχέσεις θετικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας έχουν εμφανιστεί μεταξύ του boscalid και του penthioopyrad, σχεδόν σε όλες τις μεταλλαγές. Αντίθετα οι περισσότερες μεταλλαγές ανθεκτικότητας στο boscalid δε φαίνεται να επηρεάζουν

την αποτελεσματικότητα του fluorgam. Ως εξαιρέσεις, αναφέρονται η σχετικά κοινή μεταλλαγή H272Y που προσδίδει αυξημένη ευαισθησία στο fluorgam και η P226Fη οποία αναφέρεται πως προσδίδει αυξημένη ανθεκτικότητα και στο fluorgam.

1.2. ΤΟ ΓΕΝΟΣ *Penicillium*

Ταξινόμηση

Το γένος *Penicillium* είναι ένα από τα πιο μελετημένα γένη και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τόσο λόγω των δευτερευόντων μεταβολιτών του (Frisvad et al., 2004), όσο λόγω και των ιδιαιτεροτήτων του στην ταξινόμηση των ειδών (Samson et al., 2004). Περιλαμβάνει συνολικά 4 υπογένη (*Aspergilloides*, *Furcatum*, *Penicillium* και *Biverticillium*) και περισσότερα από 225 είδη (Visagie, 2008). Το καθένα από τα υπογένη αυτά έχει ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά που όμως δεν είναι πάντα απόλυτα καθοριστικά για το διαχωρισμό των ειδών (Samson et al., 2011).

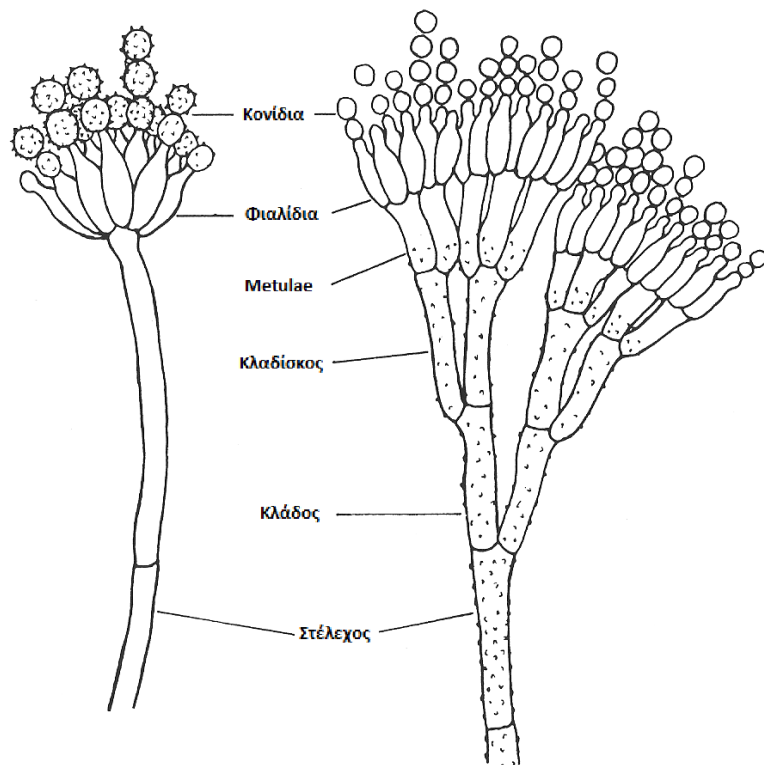
Το υπογένος *Penicillium* έχει διαχωριστεί σε τέσσερις σειρές, με βάση κυρίως τις διαμέτρους των αποικιών και την υφή των κυτταρικών τοιχωμάτων των στελεχών. Η σειρά *Exransa* περιλαμβάνει τα είδη *P. expansum*, *P. chrysogenum* και *P. atramentosum*. Από αυτά, τα δύο πρώτα είναι κοσμοπολίτικα, ενώ το *P. atramentosum* απαντάται σπάνια. Συνήθως ο διαχωρισμός των ειδών γίνεται μέσω του χρώματος της αποικίας, όμως υπάρχουν και περιπτώσεις ασυνήθιστων απομονώσεων στις οποίες η αποικία δεν εμφανίζει χαρακτηριστικό χρωματισμό. Στις περιπτώσεις αυτές, ως ικανοποιητικό χαρακτηριστικό γνώρισμα των ειδών, χρησιμοποιείται το χρώμα των κονιδίων. Όλα τα είδη εμφανίζουν παρόμοιους τύπους κονιδιοφόρου και παρόμοια ταχύτητα ανάπτυξης στα θρεπτικά μέσα σε θερμοκρασίες από 5°C έως και 37°C. Οι καρποφορίες τους εμφανίζονται ως μονές ή σε στοιχειώδη κορέμια, με χαρακτηριστικές, τελικές, τριών διακλαδώσεων κονιδιοφόρους και αμπουλοειδή φιαλίδια (Pitt, 1979).

Μορφολογία

Σύμφωνα με τον Pitt (1979), η κύρια πηγή διαφοροποίησης και καθορισμού των ατελών ειδών του γένους είναι ο κονιδιοφόρος και τα κονίδια του μύκητα.

Στο γένος *Penicillium* παρουσιάζονται 5 διαφορετικοί τύποι κονιδιοφόρων οι οποίοι στηρίζονται στον αριθμό των σημείων διακλάδωσης μεταξύ του στελέχους και των κονιδίων. Υπάρχουν κονιδιοφόροι με 1, 2, 3 και 4 σημεία διακλάδωσης και υπάρχουν κονιδιοφόροι με ακανόνιστες διακλαδώσεις (Pitt, 1979; Visagie, 2008)

Τα κονίδια (φιαλοσπόρια) γεννώνται από ειδικά κονιδιογόνα κύτταρα, τα *collula*, τα οποία ομοιάζουν με φιαλίδια. Από μία γόνιμη υφή εκπύσσεται το στέλεχος του κονιδιοφόρου, το οποίο προσφέρει στήριξη στα φιαλίδια, ανεξάρτητα αν παρεμβάλλονται κλάδοι, κλαδίσκοι και *metulae* (Εικ 12). Ολόκληρη η κατασκευή από τα κονίδια μέχρι και το στέλεχος ονομάζεται *penicillum* (Pitt, 1979).



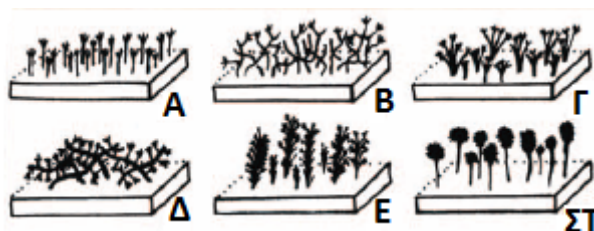
Εικόνα 6: Κονιδιοφόροι του απλούστερου και πολυπλοκότερου τύπου που συναντώνται συνήθως στα είδη του γένους *Penicillium*. Προσαρμογή από Pitt, 1979.

Τα κονίδια είναι εξαιρετικά μικρά και παρουσιάζουν κατά κύριο λόγο πράσινο ή κυανό χρωματισμό, ο οποίος οφείλεται στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Το κυτταρικό τοίχωμα είναι παχύ, συνήθως με ανώμαλη επιφάνεια και μέσω του χρωματισμού του προστατεύει τον μοναδικό πυρήνα του κυττάρου από την υπεριώδη ακτινοβολία (Pitt, 1979).

Τα φιαλίδια αποτελούν τις οντογενετικές μονάδες των κονιδίων. Είναι δύο διακριτών τύπων, αλλά υπάρχουν και ενδιάμεσοι τύποι. Ο πρώτος τύπος, ή τύπος *αμπούλας*, μοιάζει με αρχαίο οινοδοχείο, με κωνική collula και σχετικά ευρεία κορυφή. Ο άλλος τύπος, ή *έντονος* τύπος, μοιάζει περισσότερο με κύλινδρο και έχει κωνοειδή collula που καταλήγει σε μικροσκοπικούς κορυφαίους πόρους (Pitt, 1979). Από την κορυφή των φιαλιδίων παράγονται σε μακριές αλυσίδες τα υδρόφοβα κονίδια (Visagie, 2008).

Σε όλα τα πενικίλια φαίνεται πως μόνο οι υφές που σχηματίζουν το ασκοκάρπιο και οι περιφερειακές τους δεν είναι *γόνιμες υφές*. Σε μερικά είδη είναι δύσκολο να γίνει ο διαχωρισμός μεταξύ γόνιμης υφής με μικρές, χωρίς διακλαδώσεις κονιδιοφόρους και κονιδιοφόρου με διακλαδώσεις (Pitt, 1979). Σε ορισμένα είδη, όπως το *P. claviforme*, οι κονιδιοφόροι είναι συνδεδεμένοι μεταξύ τους σε ροπαλοειδείς καρποφορίες ή κορέμια (Webster, 1970).

Το μυκήλιο παρουσιάζει μεγάλη ανομοιογένεια μεταξύ των ειδών του γένους, τόσο στην υφή, όσο και στην πυκνότητά του. Κάποια είδη εμφανίζουν πιο πυκνό στρώμα μυκηλίου, το οποίο τείνει να αναπτύσσεται εντός του υλικού, και κονιδιοφόρους που εμφανίζονται ως ένα πυκνό βελούδινο στρώμα. Άλλα είδη εμφανίζουν πιο αραιό μυκήλιο και αναπτύσσονται στην επιφάνεια, με τους κονιδιοφόρους να αναπτύσσονται κάπως πιο αραιά (Pitt, 1979; Visagie, 2008). Όπως φαίνεται στην εικόνα 13, υπάρχουν και ενδιάμεσοι τύποι μυκηλίου, γεγονός που καθιστά την ακριβή περιγραφή και ταξινόμηση των ειδών, με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, δυσκολότερη.



Εικόνα 7: Διάφορες υφές μυκηλίου που εμφανίζονται στο γένος *Penicillium*. Α. Βελουτοειδές, Β. Φλοκωτό, Γ. Δεσμώδες, Δ. Γραμμώδες, Ε. Αδιαχώριστο σύμπλεγμα, ΣΤ. Διαχωριζόμενο σύμπλεγμα. Πηγή Visagie, 2008.

Συνήθως το μυκήλιο είναι λευκό (WikiProject-Fungi, 2011), όμως πολλά είδη εμφανίζουν χρωματισμό στο μυκήλιο είτε στην άνω είτε στην κάτω επιφάνειά του. Το χαρακτηριστικό αυτό δεν φαίνεται να έχει ιδιαίτερο ταξινομικό χαρακτήρα και η ύπαρξή του είναι συνυφασμένη με το περιβάλλον ανάπτυξης του μυκηλίου (Pitt, 1979).

Ορισμένα είδη του γένους παράγουν και σκληρώτια, τα οποία μοιάζουν με ανώριμα κλειστοθήκια χωρίς ασκούς. Η διαφοροποίηση έγκειται στον χρωματισμό τους, κυρίως, ο οποίος αποτελεί και σημαντικό ταξινομικό χαρακτηριστικό (Pitt, 1979; Visagie, 2008).

Βιολογία και Οικολογία

Από οικολογικής άποψης τα πενικίλλια είναι σαπροφυτικοί οργανισμοί. Τα περισσότερα είδη εμφανίζουν βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης σε μέτριες προς σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες. Πολλά από τα είδη είναι εδαφογενή και τα περισσότερα αυτών αναπτύσσονται σε σηπόμενη βλάστηση. Μερικά είδη έχουν αναπτύξει την ικανότητα να αναπτύσσονται σε φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς, κανένα όμως δεν είναι υποχρεωτικό παράσιτο (Pitt et al., 2002).

Τα πενικίλλια τείνουν να παράγουν πολύ μεγάλο αριθμό κονιδίων, τα οποία βλαστάνουν πολύ εύκολα (Pitt et al., 1979). Όσα είδη έχουν τέλεια μορφή παράγουν ασκοκάρπια, συνήθως κίτρινου χρώματος. Τα ασκοκάρπιά τους είναι δύο κυρίως τύπων: αραιά υφασμένες, βαμβακώδεις κατασκευές που περικλείουν τους

ασκούς (όπως στο *P. wortmanni*), ή πιο συμπαγείς ψευδοπαρεγχυματικές καρποφορίες (όπως στο *P. brefeldianum*). Αξίζει να σημειωθεί πως όλα τα είδη που έχουν βρεθεί να παράγουν ασκούς είναι ομόθαλλοι μύκητες (Webster, 1970).

Τα περισσότερα από τα είδη του γένους *Penicillium* προσβάλλουν τρόφιμα μόνο από ατύχημα και δεν προκαλούν σοβαρά προβλήματα. Πολλά είδη όμως προκαλούν σοβαρές μετασυλλεκτικές ασθένειες, γνωστές ως πράσινες και κυανές σήψεις (για παράδειγμα *Penicillium digitatum*, *P. expansum*, *P. italicum*) (Pitt & Hocking, 2009). Τα είδη αυτά προσβάλλουν ετησίως τα περισσότερα φρούτα και λαχανικά, προκαλώντας σημαντικές οικονομικές ζημιές (Agrios, 2005), κυρίως όμως εσπεριδοειδή, μηλοειδή και πυρηνόκαρπα (Τζάμος, 2004). Σε ορισμένες περιπτώσεις φρούτων, κάποιες προσβολές λαμβάνουν χώρα στον αγρό, όμως το 90% των σήψεων εμφανίζονται μετασυλλεκτικά (Agrios, 2005).

Τα πενικίλλια είναι παράσιτα πληγών, ευνοούνται από την υψηλή θερμοκρασία και υγρασία, ενώ αναπτύσσονται ευκολότερα στους πολύ ώριμους καρπούς. Οι προσβολές γίνονται από πληγές του καρπού, τον ποδίσκο ή από τα φακίδια και συνήθως ξεκινάνε κατά τη συγκομιδή ή τη συσκευασία. Οι καρποί εμφανίζουν αρχικά κυκλικές, διαφόρου μεγέθους, υδατώδεις, ανοιχτού καστανού χρώματος κηλίδες. Στην αρχή είναι επιφανειακές, αλλά γρήγορα μεγαλώνουν σε έκταση και βάθος. Οι προσβεβλημένοι καρποί αποκτούν μαλακή, υδαρή υφή (Παναγόπουλος, 1997). Από το διαμορφωμένο μυκήλιο στο φυτικό ιστό πολλές υφές διαφοροποιούνται σε γόνιμες και από το διαφοροποιημένο πλάγιο κέντρο της υφής αναπτύσσεται αρχικά το στέλεχος, το οποίο διακλαδίζεται. Κατά τη διακλάδωση αυτή σχηματίζονται κατά σειρά οι κλάδοι, οι κλαδίσκοι, οι *metulae* και τέλος τα φιαλίδια (Pitt, 1979). Από τα φιαλίδια σχηματίζονται σε αλυσίδες τα κονίδια. Μετά τον αρχικό σχηματισμό του σπορίου ξεκινά η διαδικασία της ωρίμανσης. Επειδή τα φιαλίδια σχηματίζουν συνεχώς καινούρια κονίδια, παρουσιάζεται το φαινόμενο το πλέον απομακρυσμένο από το φιαλίδιο κονίδιο να είναι στο πλέον προχωρημένο στάδιο ωρίμανσης σε σχέση με τα υπόλοιπα κονίδια της αλυσίδας. Η ωρίμανση είναι μία διαδικασία καθορισμένης διαφοροποίησης, η οποία ξεκινά με την ολοκλήρωση του σχηματισμού του *septum* μεταξύ του φιαλιδίου και του κονιδίου. Η διαδικασία αυτή δεν είναι πλήρως γνωστή, είναι γνωστό όμως πως περιλαμβάνει αλλαγές στο κύτταρο τόσο μορφολογικές όσο και χημικής σύστασης. Είναι επίσης γνωστό πως είναι μία διαδικασία η οποία μπορεί να διακοπεί σε περίπτωση που οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνουν αντίξοες και να συνεχιστεί μόλις οι συνθήκες ευνοήσουν και πάλι τη σποροποίηση (Borkovich & Ebbole, 2010).

Οι συνθήκες του περιβάλλοντος επηρεάζουν σημαντικά τα διάφορα είδη, όχι όμως την ασθένεια. Υπάρχουν είδη τα οποία μπορούν να αναπτύσσονται ακόμα και σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας (*P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P.*

implicatum), ή σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (*P. roqueforti*) ή ακόμα και σε συνθήκες ψυγείου. Τα συμπτώματα που προκαλούν τα διάφορα είδη είναι τόσο όμοια που δύσκολα διαχωρίζονται. Αποτέλεσμα αυτού είναι πολλές σήψεις τροφίμων να μην μπορούν να αποδοθούν σε συγκεκριμένο είδος (Pitt & Hocking, 2009). Υπάρχουν είδη που είναι παρασιτικά ανθρώπων και ζώων, αλλά είναι σπάνια και εμφανίζονται μόνο σε μεμονωμένες περιοχές,. Το *P. marneffeii*, για παράδειγμα, προσβάλλει ποντικούς στην Νοτιοανατολική Ασία, αλλά μπορεί να προσβάλλει και ανθρώπους, ιδιαίτερα, άτομα με προβλήματα στο ανοσοποιητικό σύστημα (MicrobeWiki, 2010).

Εντός του φυτού ο μύκητας έχει να αντιμετωπίσει μία σειρά αμυντικών μηχανισμών, μεταξύ των οποίων η παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (O_2^- και H_2O_2) στο σημείο της προσβολής, η οποίες μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές οξειδωτικές βλάβες σε πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα. Για να ανταπεξέλθει ο μύκητας παράγει ενώσεις όπως η γλουταθιόνη, η θειορεδοξίνη, η δισμουτάση του υπεροξειδίου και καταλάσες που τις εξουδετερώνουν (Qin et al., 2007). Με την ανάπτυξη της προστασίας από τις ενεργές ρίζες, ο μύκητας μπορεί να προσβάλλει τα φυτικά κύτταρα διαπερνώντας τα κυτταρικά τοιχώματα. Το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από μία σειρά πολυσακχαριτών, μεταξύ των οποίων κυτταρίνη, ημικυτταρίνες και πηκτίνες, μαζί με λιγνίνη. Για να διασπάσει τα μόρια αυτά ο μύκητας παράγει μία σειρά όπως κύτταρο-βίο-υδρολάσες, ενδο-γλουκανάσες, β-γλυκοσιδάσες, ξυλάνες, ξυλογλουκάνες, γαλακτομαννάνες και γαλακτογλουκομαννάνες. Το κοινό χαρακτηριστικό όλων αυτών των μορίων είναι ότι δρουν συνεργιστικά (Borkovich & Ebbole, 2010). Κυρίαρχο μόριο είναι η πολυγαλακτουρονάση, η οποία υδρολύει, μαζί με άλλα ένζυμα, διάφορα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί και έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες παθογένειας (Prusky et al., 2004).

Η ανάπτυξη του μυκηλίου συνεχίζεται κάτω από την επιδερμίδα του φρούτου, η οποία εμφανίζεται πιο μαλακή και υδαρής, καθώς τα λυτικά ένζυμα διασπούν τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών κυττάρων. Ταυτόχρονα, φαίνεται πως αρχίζει και η παραγωγή της πατουλίνης, η οποία έχει σημαντική επίδραση στη μολυσματική ικανότητα και στην παθογένεια του μύκητα (Sanzani et al., 2012).

Τα είδη του γένους *Penicillium* προκαλούν πολυκυκλικές. Τα κονίδια αποτελούν το μόλυσμα τόσο για την πρωτογενή όσο και για τη δευτερογενή μόλυνση. Έρευνες έχουν δείξει πως η συγκέντρωση των κονιδίων αυξάνει εκθετικά την πιθανότητα μόλυνσης (Amiri & Bompreix, 2005). Στην ίδια εργασία αναφέρεται πως από χρόνο σε χρόνο το ποσοστό του μολύσματος στους αποθηκευτικούς χώρους υπέρ-πολλαπλασιάζεται αν δεν παρθούν απαραίτητα μέτρα καθαρισμού και απολύμανσης των αποθηκευτικών χώρων.

Δευτερογενείς Μεταβολίτες του γένους *Penicillium*

Είδη του γένους *Penicillium* παράγουν πλήθος δευτερογενών μεταβολιτών, μεταξύ των οποίων μυκοτοξίνες, όπως είναι οι ωχρατοξίνες, το κυκλοπιαζονικό οξύ, η πατουλίνη, η κιτρινίνη και το πενικιλλικό οξύ. Δεν παράγουν όλα τα είδη τις ίδιες τοξίνες. Για παράδειγμα η πατουλίνη παράγεται τόσο από το *Penicillium ratulum* όσο και από το *Penicillium expansum*, ενώ το τελευταίο παράγει τόσο πατουλίνη όσο και κιτρινίνη (Pitt, 1979).

Δεν είναι όμως όλοι οι δευτερογενείς μεταβολίτες των πενικιλίων τοξικοί για τον άνθρωπο και τα θηλαστικά. Ο πρώτος μεταβολίτης που απομονώθηκε και μελετήθηκε ήταν τοξικός μόνο στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Η πενικιλίνη ανακαλύφθηκε το 1928 από τον Alexander Fleming στο *Penicillium rubrum* και αργότερα στο *P. chrysogenum*. Το είδος *P. griseofulvum* παράγει γκρισεοφουλβίνη, η οποία είναι αντιμυκητιακός παράγοντας και πιθανός χημειοθεραπευτικός παράγοντας (WikiProject-Fungi, 2011). Το είδος *P. brevicompactum* παράγει μυκοφαινολικό οξύ, που χρησιμοποιείται στις μεταμοσχεύσεις για την αποφυγή απόρριψης του μοσχεύματος, ενώ το *P. solitum* παράγει κομπακτίνες, οι οποίες βοηθούν στην καταπολέμηση της χοληστερίνης (Frisvad et al., 2004). Άλλα είδη παράγουν βοηθητικές ουσίες για την βιοτεχνολογία, αλλά και τη χημική βιομηχανία. Προϊόντα όπως γλουκονικό, ταρταρικό και κιτρικό οξύ, καθώς και πεκτινάσες, λιπάσες, αμυλάσες κυτταράσες και προτεάσες απομονώνονται από είδη του γένους *Penicillium* (WikiProject-Fungi, 2011). Η βιομηχανία τροφίμων, όμως, φαίνεται πως έχει το μεγαλύτερο όφελος από το γένος *Penicillium* (Macmillan, 2001). Στην τυροκομία, τα πενικίλλια χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες στη ζύμωση των τυριών. Το *P. camamberti* χρησιμοποιείται στο τυρί camembert και το *P. roqueforti* για το τυρί Roquefort. Άλλα είδη χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του brix και άλλων παρόμοιων τυριών. Μερικά είδη χρησιμοποιούνται με πολλαπλούς τρόπους. Το *P. nalgiovense*, για παράδειγμα, χρησιμοποιείται στην παρασκευή αλλαντικών για τη βελτίωση της γεύσης των λουκάνικων. Ταυτόχρονα όμως, χρησιμεύει και για την πρόληψη προσβολών από άλλους μύκητες και βακτήρια στα προϊόντα αυτά (Macmillan, 2001; WikiProject-Fungi, 2011).

1.3. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

1.3.1. Γενικά

Οι μυκοτοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες ορισμένων μόνο ειδών μυκήτων, κυρίως των γενών *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* και *Fusarium* (Visconti & Perone, 2008; Brera et al., 2008; Chu & Bhatnagar, 2003). Η λέξη «μυκοτοξίνη» είναι σύνθετη και προέρχεται από τις λέξεις *μύκος* και *τοξίνη*. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι κυριότερες μυκοτοξίνες και ενδεικτικοί μύκητες που τις παράγουν.

Οι μυκοτοξίνες είναι μικρού μοριακού βάρους ενώσεις, οι οποίες ανήκουν σε διάφορες χημικές ομάδες (Chu & Bhatnagar, 2003; Diaz et al., 2011). Ορισμένες από αυτές μπορούν να έχουν σημαντικές επιπτώσεις για την υγεία τόσο του ανθρώπου, όσο και των οικόσιτων ζώων και μπορούν να παραχθούν σε μία πληθώρα αγροτικών προϊόντων, κάτω από διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Όπως είναι γεγονός για τους περισσότερους δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων, οι λόγοι παραγωγής τους είναι άγνωστοι (Visconti & Perone, 2008) και μόνο πρόσφατα έχει αρχίσει η διερεύνησή τους.

Ο όρος *μυκοτοξίκωση* χρησιμοποιείται για την περιγραφή της δράσης των μυκοτοξινών στον οργανισμό, που συχνά μεταφέρονται και προκαλούν σοβαρά προβλήματα σε αρκετά όργανα. Τα σοβαρότερα προβλήματα συνήθως παρουσιάζονται στους νεφρούς, το ήπαρ, τους πνεύμονες και το νευρικό, ανοσοποιητικό και ενδοκρινικό σύστημα. (Chu & Bhatnagar, 2003).

Οι μυκοτοξίνες στους φυτικούς ιστούς μπορούν να εμφανιστούν προ- ή μετά- συλλεκτικά. Οι κύριες κατηγορίες τροφίμων που ελέγχονται για μυκοτοξίνες είναι τα σιτηρά και τα φρούτα, καθώς και τα παράγωγα της μεταποίησής αυτών. Ταυτόχρονα, ελέγχονται και παράγωγα κτηνοτροφίας, όπως το κρέας, τα αυγά και το γάλα, καθώς έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις στις οποίες μυκοτοξίνες φαίνονται να έχουν εισέλθει μέσω φυραμάτων στον οργανισμό οικόσιτων ζώων (Battilani et al., 2008; Brera et al., 2008). Ετησίως μολύνεται πάνω από το ένα τέταρτο της παγκόσμιας αγροτικής παραγωγής, το οποίο αντιστοιχεί σε απώλειες δισεκατομμυρίων δολαρίων (Diaz et al., 2011).

Μερικές από τις μεταποιητικές εργασίες είναι ικανές να μειώσουν ως ένα βαθμό τα επίπεδα των μυκοτοξινών στο παραγόμενο προϊόν. Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό το γεγονός πως οι περισσότερες μυκοτοξίνες είναι ανθεκτικές στις υψηλές θερμοκρασίες και χημικά σταθερές ενώσεις (Brera et al., 2008).

Η διαδικασία της αποτοξικοποίησης των μυκοτοξινών είναι τόσο κοστοβόρα, όσο και δύσκολη. Για το λόγο αυτό, οι οδηγίες που εκδίδονται από τους

οργανισμούς ελέγχου αναφέρουν ως προτιμότερη δράση την πρόληψη των μολύνσεων από τοξικογόνους μύκητες (Brera et al., 2008).

Πίνακας 2: Οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες με είδη μυκήτων που τις παράγουν και ενδεικτικά προϊόντα με συχνές μολύνσεις.

ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	ΕΙΔΗ ΜΥΚΗΤΩΝ
Ωχρατοξίνες	Φασόλια, δημητριακά, καφές, ζωοτροφές, προϊόντα αμπέλου	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicillium Viridicatum</i> , <i>P. verrucosum</i>
Αφλατοξίνες	Φιστίκια, βαμβακόσπορος, δημητριακά, σύκα, φουντούκια, σόργο, γάλα	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
Φουμονισίνες	Αραβόσιτος, σόργο, ρύζι	<i>Fusarium verticillioides</i>
Τριχοθηκίνες	Αραβόσιτος, ζωοτροφές, δημητριακά	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. graminearum</i>
Ζεαραλενόνη	Αραβόσιτος, ζωοτροφές, δημητριακά	<i>Fusarium graminearum</i>
Τενουαζονικό οξύ, αλτερναριόλ	Σπόροι δημητριακών, τομάτα, ζωοτροφές	<i>Alternaria alternata</i>
Πατουλίνη	Μηλοειδή, πυρηνόκαρπα, χυμοί φρούτων, σιτάρι, φασόλια	<i>Penicillium patulum</i> , <i>P. urticae</i> , <i>P. expansum</i>
Κυκλοπιαζονικό οξύ	Ξηροί καρποί, αραβόσιτος, τυρί	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium cyclopium</i>
Κιτρινίνη	Κριθάρι, αραβόσιτος, ρύζι, φουντούκια, μηλοειδή, πυρηνόκαρπα, χυμοί φρούτων	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. expansum</i>
Μονιλιφορμίνη	Αραβόσιτος	<i>Fusarium moniliforme</i>
Δεοξυνιβαλενόλη	Σιτάρι, Αραβόσιτος	<i>Fusarium graminearum</i>
Λουτεοσκυρίνη	Ρύζι, σόργο	<i>Penicillium islandicum</i> , <i>P. rugulosum</i>
Penitrem A	Ζωοτροφές, αραβόσιτος	<i>Penicillium palitans</i>
Ροκφορτίνη	Τυρί	<i>Penicillium roqueforti</i>
Ρουμπρατοξίνη Β	Αραβόσιτος, σόγια	<i>Penicillium rubrum</i> , <i>P. purpurogenum</i>
Στεριγματοκουστίνη	Σιτηρά	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>A. nidulans</i>

Από τα στοιχεία του πίνακα 2, γίνεται φανερό, ότι υπάρχουν σοβαροί κίνδυνοι από την κατανάλωση τροφών που περιέχουν μυκοτοξίνες. Για το λόγο αυτό, έχουν γίνει πολλές έρευνες για τον καθορισμό *Ανεκτών Ορίων Ημερήσιας*

Πρόσληψης (Tolerable Daily Intake, TDI) για τις περισσότερες μυκοτοξίνες από διάφορους οργανισμούς, ο καθένας από τους οποίους αποδίδει διαφορετικό όριο TDI, όπως φαίνεται και στον πίνακα 3 (Kuiper-Goodman, 2004).

Πίνακας 3: Προσωρινά όρια Ανεκτής Ημερήσιας Πρόσληψης (TDI) για διάφορες μυκοτοξίνες από διάφορους οργανισμούς.

Μυκοτοξίνη	TDI ng/kg bw ανά ημέρα	Οργανισμός
Ωχρατοξίνη Α	4	Health Canada, 1989; 1996
	5	Nordic Council, 1991
	5	EU, 1998
	14	JECFA, 1996, 2001
Φουμονισίνες	2000	EU, 2000
	2000	JECFA, 2001
	400	Health Canada, 2001
Δεοξυνιβαλενόλη	3000	Health Canada, 1985
	1000	Health Canada, 2001
	1000	Nordic Council, 1998
	1000	EU, 1999
	1000	JECFA, 2001
Ζεαραλενόνη	100	Health Canada, 1987
	100	Nordic Council, 1998
	500	JECFA, 2000
	200	EU, 2000b
Πατουλίνη	400	JECFA, 1996
	400	EU, 2000
	400	Health Canada, 1996
Αφλατοξίνες	0,11-0,19	Health Canada, 1994
	0,05	JECFA, 2002

Στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν επαρκή τοξικολογικά και επιδημιολογικά στοιχεία για τον καθορισμό των TDIs, καθορίζονται τα επίπεδα στα οποία δεν παρατηρείται αρνητική επίδραση (No Observable Adverse Effect Level, NOAEL) αλλά και τα επίπεδα στα οποία παρατηρείται η μικρότερη δυνατή αρνητική επίδραση (Lowest Observable Adverse Effect Level, LOAEL). Βάση των NOAEL για διάφορα είδη θηλαστικών και της διαφοράς τους από τα LOAEL γίνεται μια εκτίμηση του πιθανού κινδύνου εμφάνισης αρνητικών επιπτώσεων για τον άνθρωπο και της ανάγκης μείωσης του κινδύνου αυτού, μέσω καθορισμού χαμηλότερων ορίων μυκοτοξινών στα διάφορα τρόφιμα (Kuiper-Goodman, 2004).

Έχει γίνει γνωστό, μέσω διάφορων εργασιών, πως οι ιστοί που ρυπαίνονται από μόλυνση τοξικογόνου μύκητα είναι πιο τοξικοί από ιστούς στους οποίους έχει γίνει τεχνητή έγχυση της ίδιας ποσότητας μυκοτοξίνης. Ορισμένοι από τους ερευνητές θεωρούν πως οι μύκητες πιθανό να παράγουν διαφορετικούς, μη τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι όμως ενισχύουν τη δράση των μυκοτοξινών. Ως παραδείγματα μπορούν να αναφερθούν η περίπτωση του φουζαρικού οξέος, το οποίο παράγεται από πολλά είδη φουζαρίων και συνυπάρχει με την δεοξυνιβαλενόλη (DON) ενισχύοντας τα συμπτώματα της, όπως και η περίπτωση του πενικιλλικού οξέος και της κιτρινίνης, οι οποίες από μόνες τους ως ουσίες δεν προκαλούν πολύ σοβαρά προβλήματα, ενώ ο συνδυασμός τους είναι θανατηφόρος για τα πειραματόζωα. Τα αποτελέσματα των εργασιών αυτών υποδεικνύουν πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μυκοτοξινών είναι πολύ σημαντικές και πιθανόν σημαντικότερες από τις επιδράσεις μεμονομένων μυκοτοξινών (Diaz et al., 2011).

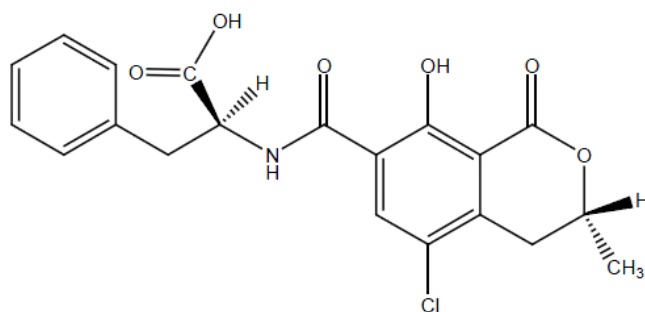
1.3.2. Μυκοτοξίνες του Γένους *Penicillium*.

Όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο 3.1.1, είδη του γένους *Penicillium* παράγουν ένα μεγάλο εύρος μυκοτοξινών.

Ωχρατοξίνες

Η κατηγορία των ωχρατοξινών περιλαμβάνει μία σειρά τοξικών μορίων, όπως η ωχρατοξίνη Α, η ωχρατοξίνη Β, η ωχρατοξίνη C, η α ωχρατοξίνη και η β ωχρατοξίνη, από τα οποία το τοξικότερο και πλέον επικίνδυνο είναι η ωχρατοξίνη Α (OTA). Η OTA είναι ένα κυκλικό πεντακετίδιο, παράγωγο της δι-ύδρο-ισοκουμαρίνης με L-φαιτυλαλανίνη. Εμφανίζει μεγάλη αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες και στα οξέα. Έχει αποδειχτεί, ότι σε κανονικές μαγειρικές συνθήκες η OTA αποδομείται μόνο μερικώς, ενώ συνθήκες αποστείρωσης υψηλής πίεσης σε θερμοκρασία έως και 250°C δεν είναι ικανές να την καταστρέψουν τελείως (Khoury & Atoui, 2010).

Εμφανίζεται συχνά σε σιτηρά, στον καφέ, σε ξηρούς καρπούς, στο κακάο, στη μπύρα, στο κρασί, στα μπαχαρικά και σε αμπελοοινικά προϊόντα. Οι τοξικές επιδράσεις της OTA περιλαμβάνουν νεφροτοξικότητες, ηπατοτοξικότητες, ανοσοκαταστολή, τερατογενέσεις και καρκινογενέσεις (Varga et al., 2009).



Εικόνα 8: Το μόριο της Ωχρατοξίνης Α.

Αν και δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα η πλήρης δράση της ΟΤΑ, έχουν βρεθεί ένζυμα τα οποία παρεμποδίζονται από την ΟΤΑ. Μερικά παραδείγματα είναι η καρβοξυπεπτιδάση Α, η καρβοξικινάση του φωσφοενολοπυρουβικού οξέος των νεφρών, η συνθετάση του φαινυλαλανιν-*t*RNA και η υδροξυλάση της φαινυλαλανίνης. Έχει βρεθεί ακόμα πως αντιδρά με συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από το μιτογόνο, όπως η *c-jun* αμινο-τελική-κινάση. Τέλος έχει επιβεβαιωθεί πως στα νεφρικά επιθήλια η ΟΤΑ παρεμβαίνει Ca^{2+} των ορμονών προκαλώντας μεταβολές στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ο πιθανότερος μηχανισμός που έχει προταθεί είναι αυτός της δημιουργίας ελευθέρων ριζών, χωρίς όμως να έχει επιβεβαιωθεί (Chu & Bhatnagar, 2003).

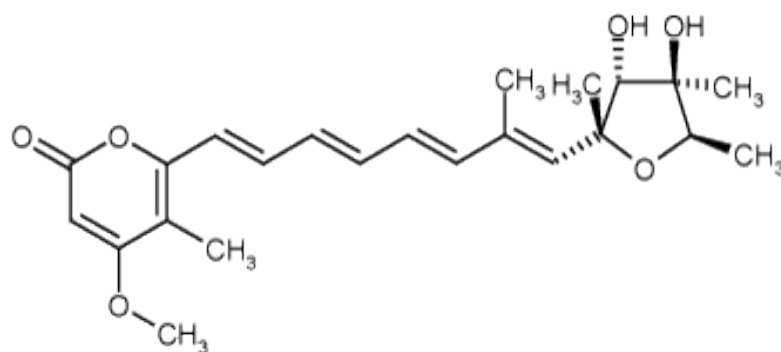
Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της ΟΤΑ δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως. Είναι ευρέως αποδεκτό πως το τμήμα της ισοκουμαρίνης προέρχεται από οξικό και μηλονικό οξύ, μέσω του μονοπατιού βιοσύνθεσης πολυκετιδίων. Πιθανώς μία χλωροπεροξειδάση να συμβάλει στην ενσωμάτωση του ατόμου χλωρίου στην ισοκουμαρίνη. Η φαινυλαλανίνη είναι ένα αμινοξύ που παράγεται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και συνδέεται στην ΟΤΑ μέσω μίας ακόμη καρβοξυλικής ομάδας. Αν και έχουν αναγνωριστεί πολλά από τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της ΟΤΑ και τα περισσότερα στοιχεία υποστηρίζουν ένα τέτοιο βιοσυνθετικό μονοπάτι, ακόμη δεν έχει βρεθεί ο πλήρης βιοσυνθετικός μηχανισμός (Khoury & Atoui, 2010; Varga et al., 2009).

Κιτρεοβιριδίνη

Η κιτρεοβιριδίνη ήταν ανάμεσα στις πρώτες μυκοτοξίνες που μελετήθηκαν. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα στην Ιαπωνία, η μυκοτοξίνη αυτή συνδέθηκε με την οξεία καρδιακή ασθένεια που ονομάστηκε *beri-beri*. Η ίδια ασθένεια παρουσιάστηκε το 1958 στην Ιταλία, την Ισπανία, την Ταϊλάνδη και πολλές ακόμη χώρες και η παραγωγή της κιτρεοβιριδίνης συνδέθηκε με είδη του γένους *Penicillium* όπως το *P. pulvillum*, *P. ochrasalmoneum*, *P. charlesii* και το *P. citreo-viride*, από το οποίο και πήρε το όνομά της (D'Mello, 1997).

Σε μεταγενέστερες δεκαετίες έχει βρεθεί τόσο σε τροφές για σκύλους και γάτες, όσο και σε καρύδια πεκάν και καλαμπόκι για ανθρώπινη κατανάλωση (Cole et al., 1981).

Η κitreοβιριδίνη είναι παρεμποδιστής της συνθετάσης του ATP τόσο σε βακτήρια, όσο και σε μιτοχόνδρια των ευκαριωτικών κυττάρων (Gause et al., 1981; Linnett et al., 1978). Η κύρια δράση της μυκοτοξίνης εντοπίζεται στους καρδιακούς μύες, το διάφραγμα και το νευρικό σύστημα. Δεν προκαλεί τοξικές επιδράσεις στα υπόλοιπα όργανα, με εξαίρεση μία μικρή αύξηση του βάρους των επινεφριδίων. Ακόμη, δεν έχει καμία επίδραση στη συχνότητα κύησης, την εναπόθεση του ωαρίου και τον αρχικό σχηματισμό του εμβρύου (Nishie et al., 1988). Αντίθετα, φαίνεται ότι σε δόσεις στις οποίες η μητέρα αρχίζει να εμφανίζει τοξικές επιδράσεις, υπάρχει πιθανότητα εμβρυοτοξικότητας και τερατογένεσης (Morrissey & Vesonder, 1986). Τέλος, φαίνεται πως η παρεμπόδιση του ATP προκαλεί έμμεσα τη μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης, παρεμποδίζοντας έτσι και την αναπαραγωγή ιών, μεταξύ των οποίων και του HIV (Vieta et al., 1996).



Εικόνα 9: Το μόριο της Κιτρεοβιριδίνης.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 7, πρόκειται για ένα trans πολυένιο. Εργασίες που έχουν γίνει πάνω στη βιοσύνθεση του μορίου έδειξαν πως το τετραυδροφουράνιο προέρχεται από D-γλυκόζη. Αρχικά ένα ακέτυλο-συνένζυμο-A συνδυάζεται με οκτώ μονάδες μηλότυλο-συνενζύμου-A και σχηματίζεται ένα C₁₈-πολυκετίδιο. Έχει δειχθεί πως το C₁₈-πολυκετίδιο και πέντε μονάδες άνθρακα (C) συνθέτουν τελικώς το μόριο της κitreοβιριδίνης. Οι μονάδες του άνθρακα προέρχονται από μεθειονίνη (Vleggaar, 1986).

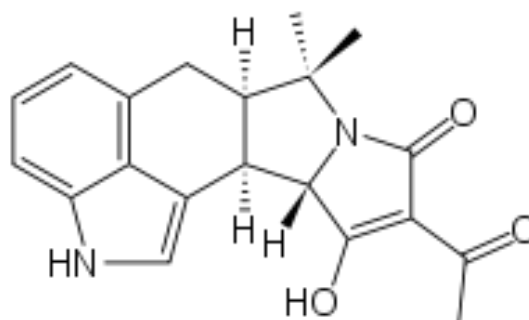
Κυκλοπιαζονικό οξύ

Το κυκλοπιαζονικό οξύ (CPA) είναι ένα ινδολο-τετραμικό οξύ (Εικ 8), το οποίο έχει υποτεθεί πως παράγεται από το αμινοξύ τρυπτοφάνη (Barkai-Golan, 2008). Αν και αρχικά απομονώθηκε από το *P. cyclospium*, είναι μεταβολίτης πολλών ακόμη ειδών του γένους *Penicillium*, μεταξύ των οποίων και του *P. camamberti* από το

οποίο παράγεται στο τυρί camembert. Έχει ακόμα βρεθεί στους γαλακτοφόρους αδένες των γαλακτοπαραγωγών ζώων, στο γάλα και στο κρέας. Εντοπίζεται όμως και σε αβγά, καλαμπόκι και φιστίκια (Scott, 2004).

Έρευνες έχουν δείξει πως η δράση του CPA οφείλεται στην ικανότητά του να μεταβάλλει τη φυσιολογική ροή ασβεστίου μεταξύ των κυττάρων, παρεμποδίζοντας τη λειτουργία της ασβεστο-εξαρτώμενης ΑΤΡάσης του ενδοπλασματικού ή σαρκοπλάσματικού δικτύου (Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Calcium-dependent ATPase/SERCA). Η SERCA καθορίζει τη ροή του ασβεστίου τόσο για τη ρύθμιση του μυϊκού τόνου, στα μυοκύτταρα, όσο και για τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο (Chang, Ehrlich, & Fujii, 2009).

Το CPA προκαλεί σπασμούς, εκφυλιστικές αλλαγές και νέκρωση του ήπατος, του σπλήνα, του παγκρέατος, των νεφρών και άλλων ζωτικών οργάνων (Scott, 2004), ενώ έχει βρεθεί πως έχει συνεργιστική δράση με τις αφλατοξίνες (από είδη του γένους *Aspergillus*) και το τενουαζονικό οξύ (από είδη του γένους *Alternaria*) (Barkai-Golan, 2008; Scott, 2004). Η τερατογενετική δράση του CPA είναι μικρή και οφείλεται κυρίως στην καθυστέρηση της ανάπτυξης του σκελετού του εμβρύου. Στους ανθρώπους και τα μεγάλα θηλαστικά προκαλεί μη θανατηφόρες ασθένειες, με ήπια συμπτώματα όπως κόπωση, τρέμουλο, ναυτία και ακαταληψία (D'Mello, 1997).



Εικόνα 10: Το μόριο του Κυκλοπιαζονικού Οξέος.

Η βιοσύνθεση του CPA ξεκινά με τη βιοσύνθεση διφωσφορικού διμεθυλαλλιλίου (DMAPP). Από το DMAPP μέσω του ενζύμου τρανσφεράση του κυκλοακετοακετυλ-τρυπτοφανυλ-διμεθυλαλλιλίου (ή συνθετάση του δις-σεκοδιυδρο-κυκλοπιαζονικού οξέος συνθετάση του β-CPA), παράγεται το β-CPA από α-ακέτυλο-γ-(β-ινδολυλ)μεθυλοτετραμικό οξύ, από το οποίο, τελικά, παράγεται το CPA (Chang, Ehrlich, & Fujii, 2009).

Άλλες γνωστές μυκοτοξίνες του γένους Penicillium

Η πένιτρεμ Α είναι μία πολύ ισχυρή νευροτοξίνη η οποία συχνά προκαλεί σοβαρά προβλήματα στην κτηνοτροφία. Πρόκειται για ένα πολυκυκλικό αιθέρα με

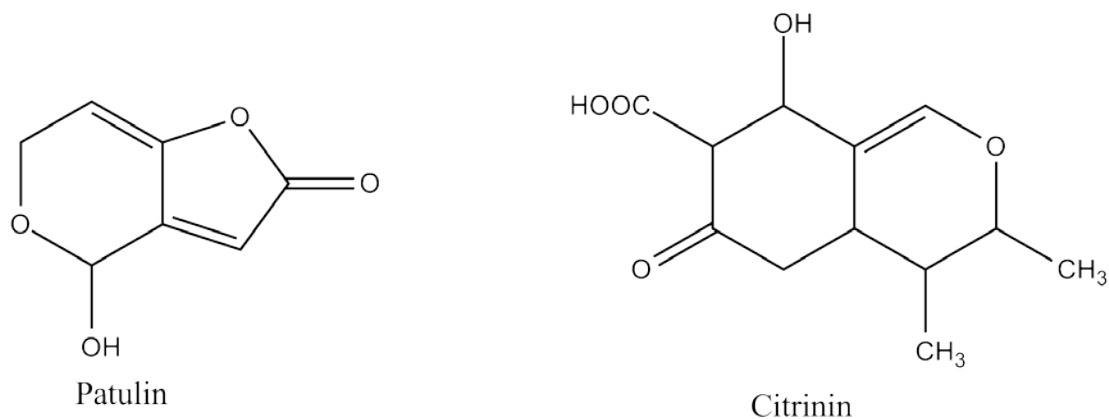
δέκα δακτυλίου (D'Mello, 1997). Σε μικρές δόσεις (0,025 mg/kg σωματικού βάρους), προκαλεί έντονο τρέμουλο τροφική δηλητηρίαση σε οικόσιτα ζώα (Scott, 2004), άρνηση τροφής και μείωση του ανοσοποιητικού συστήματος (Chu & Bhatnagar, 2003).

Η ροκφορτίνη C είναι επίσης μία νευροτοξίνη που εμφανίζεται συχνά σε τυριά και ιδιαίτερα στα ονομαζόμενα blue- cheeses. Παράγεται κυρίως από το *P. roqueforti*, ενώ δεν έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα στελέχη μη τοξικογόνα για τυροκομική χρήση (D'Mello, 1997). Η ροκφορτίνη C συχνά συνυπάρχει με το πένιτρεμ A και είναι πολύ πιθανό να δρα συνεργιστικά με αυτό (Scott, 2004).

Τέλος, το πενικιλικό οξύ είναι η πρώτη ουσία η οποία αναφέρθηκε και καταγράφηκε ως μυκοτοξίνη. Προκαλεί τοξικότητες στο ήπαρ και προάγει τους επιθετικούς και μεταστατικούς όγκων. Μετά από τις αρχικές αναφορές για τοξικότητες, η τοξίνη αυτή δεν έχει προκαλέσει προβλήματα και δεν αποτελεί πλέον παράγοντα ανησυχίας (Scott, 2004).

Πατουλίνη

Η πατουλίνη είναι δευτερογενής μεταβολίτης για πολλούς μύκητες των γενών *Aspergillus* και *Penicillium*. Το είδος με την μεγαλύτερη παραγωγή, όμως, είναι το *Penicillium expansum*.



Εικόνα 11: Η μοριακή δομή της πατουλίνης και της κιτρινίνης.

Η πατουλίνη απομονώθηκε το 1943 από τα είδη *Penicillium griseofulvum* και *Penicillium expansum* από τον Biskinshaw και τους συνεργάτες του (Puel et al., 2010). Παγκοσμίως αναφέρεται κυρίως σε μήλα, ροδάκινα, σταφύλια, αχλάδια, σιτηρά και ελιές, αλλά και στα προϊόντα της μεταποίησής τους (Brera et al., 2008; Spreijers, 2004). Έχει αποδειχτεί πως η πατουλίνη παραμένει σταθερή στο χυμό

σταφυλιών, μήλων και στα ξηρά σιτηρά, ενώ αντίθετα σε υγρά δημητριακά και στις διαδικασίες ζύμωσης για την παραγωγή κρασιού και μηλίτη αποδομείται (Speijers, 2004).

Υπάρχει ένας αριθμός παραγόντων που επηρεάζουν την παραγωγή της πατουλίνης στα μήλα. Μεταξύ αυτών είναι η ποικιλία του φρούτου, η γεωγραφική περιοχή ανάπτυξης και ωρίμανσης του καρπού, οι κλιματικοί παράγοντες, οι προσυλλεκτικοί χειρισμοί, η μέθοδος συγκομιδής, οι ατέλειες στην επιδερμίδα των καρπών, οι μετα-συλλεκτικοί χειρισμοί και οι συνθήκες αποθήκευσης. Ακόμα, όμως, δεν έχει διευκρινιστεί ποιοι από αυτούς επηρεάζουν περισσότερο την παραγωγή της πατουλίνης και πως μπορούν να διαχειριστούν για τη μείωση ή την αποτροπή της εμφάνισής της στα προϊόντα (Jackson & Al-Taher, 2008). Η πατουλίνη διαθέτει αντιβακτηριδιακές ιδιότητες και παίζει ρόλο στην ευαισθησία του μύκητα σε οξειδωτικά στρες. Πολύ πρόσφατα διατυπώθηκε η άποψη πως η πατουλίνη επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη του μύκητα στο φυτικό ιστό, αυξάνοντας την παθογένεια του μύκητα αλλά και την ταχύτητα αύξησης της σήψης (Sanzani et al., 2012).

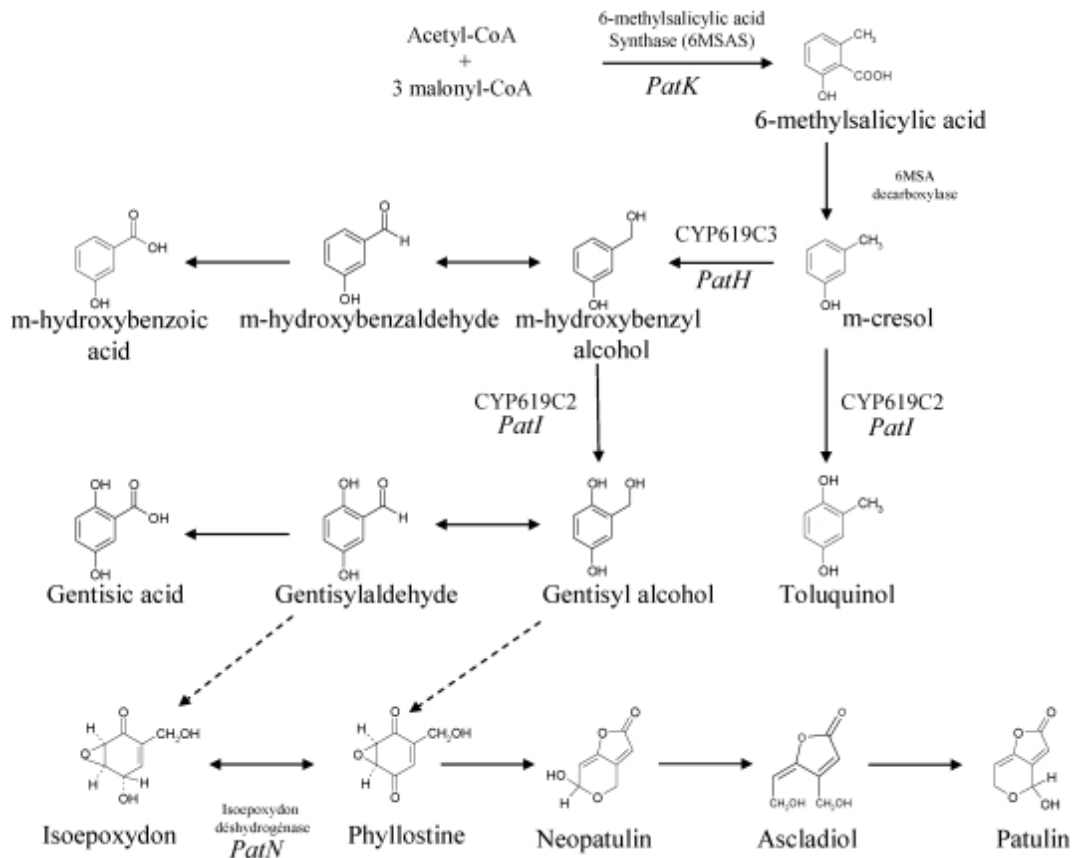
Η πατουλίνη ανήκει στις μυκοτοξίνες (μαζί με τις αφλατοξίνες, τις ωχρατοξίνες, τις φουμονισίνες, τη ζεαραλενόνη και τις τριχοθηκίνες) για τις οποίες έχουν θεσπιστεί ανώτατα όρια στα τρόφιμα από διάφορες χώρες παγκοσμίως. Από το 2003 ο Ευρωπαϊκός κανονισμός 1425/2003 θέτει μέγιστο όριο τα 50 µg/L για χυμούς φρούτων και συναφή προϊόντα, 25 µg/L για στερεά προϊόντα μήλου και 10 µg/L για προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση από βρέφη και παιδιά. Αντίστοιχα, η Αρχή Διαχείρισης Τροφίμων και Φαρμάκων της Αμερικής (FDA), έχει θεσπίσει ως όριο τα 50 µg/L (Puel et al., 2010).

Μελέτες με ποντίκια έχουν δείξει πως η πατουλίνη απορροφάται και αποβάλλεται από τον οργανισμό με μέτριο ρυθμό. Εντός επτά ημερών, το 49% της χορηγηθείσας δόσης αποβλήθηκε με τα κόπρανα και το 36% με τα ούρα. Το μεγαλύτερο μέρος της αποβολής έγινε εντός των πρώτων 24 ωρών, ενώ μετά από 7 ημέρες μόλις το 2-3% της χορηγηθείσας δόσης εντοπίστηκε στους ιστούς και το αίμα (Speijers, 2004).

Η βιοσύνθεση της πατουλίνης:

Η βιοσύνθεση της πατουλίνης πραγματοποιείται σε δέκα στάδια (Εικ. 10). Το πρώτο στάδιο είναι ο σχηματισμός του 6-μεθυλοσαλικυλικού οξέος (6MSA) από ακέτυλο-συνένζυμο Α και 3 μόρια μηλότυλο-συνενζύμου Α, με τη δράση της συνθετάσης του 6-μεθυλοσαλικυλικού οξέος (6MSAS). Το ένζυμο αυτό επιτελεί πολλές ενζυμικές λειτουργίες, μεταξύ των οποίων τρανσφεράση του μηλότυλο και ακέτυλο συνενζύμου Α, συνθετάση του κετοακυλικού, κετορεδοκτάση και

αφυδρογονάση. Στη συνέχεια το 6MSA μετατρέπεται σε m-κρεσόλη μέσω της αποκαρβοξυλάσης του 6MSA (Murphy et al., 1974). Ακολουθεί υδροξυλίωση και ο σχηματισμός της γεντισυλαλκοόλης και από αυτή, μέσω οξείδωσης, της γεντισυλαλδεΐδης. Μέχρι το στάδιο αυτό, τα προϊόντα των αντιδράσεων είναι δομικά όμοια με το 6MSA και η βιοσυνθετική ακολουθία είναι γνωστή (Puel et al., 2010).



Εικόνα 12: Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της πατουλίνης. Πηγή Sanzani et al., 2012

Από το στάδιο αυτό, μέχρι και το στάδιο της δημιουργίας του διπλού δακτυλίου του μορίου της πατουλίνης, οι ενδιάμεσες αντιδράσεις και τα προϊόντα τους δεν είναι απόλυτα γνωστά. Δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη αν η μετατροπή γίνεται μέσω κάποιας οξυγενάσης. Μετά το σχηματισμό της γεντισυλαλδεΐδης ακολουθεί εποξείδωση προς ισοεποξυδόν (Puel et al., 2010). Ταυτόχρονα, όμως, έχει απομονωθεί το ένζυμο που καταλύει την εποξείδωση της γεντισυλαλκοόλης σε φυλλοστίνη (Priest & Light, 1989). Δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα ποιιά από τις 2 αυτές αντιδράσεις ακολουθείται ή αν γίνονται και οι 2.

Από το σημείο του σχηματισμού του διπλού δακτυλίου, η ακολουθία των αντιδράσεων για το σχηματισμό της πατουλίνης είναι απόλυτα γνωστή, όπως

φαίνεται και στην εικόνα 10. Από τη φυλλοσίνη σχηματίζεται η νεοπατουλίνη, στη συνέχεια ασκλαδιόλη και τελικά πατουλίνη (Puel, Galtier, & Oswald, 2010).

Τοξικές Επιδράσεις:

Σε πειράματα οξείας τοξικότητας που έγιναν με τρωκτικά, βρέθηκε πως η δόση θανάτωσης του μισού πληθυσμού (LD₅₀) ήταν μεταξύ 9-55 mg/kg σωματικού βάρους (Speijers, 2004). Τα πουλερικά φαίνεται πως είναι ανθεκτικότερα, με LD₅₀ 170 mg/kg σωματικού βάρους. Και στις δύο περιπτώσεις οι τιμές αναφέρονται σε στοματική χορήγηση πατουλίνης. Σε υποδόριες χορηγήσεις η πατουλίνη είναι 3-6 φορές πιο τοξική (Puel, Galtier, & Oswald, 2010). Σε όλες τις περιπτώσεις, τα κύρια συμπτώματα ήταν κοινά και περιελάμβαναν έντονο εκνευρισμό, σπασμούς, δύσπνοια, πνευμονική συμφόρηση, οίδημα, έλκος, υπεραιμία και διάταση του γαστρο-εντερικού σωλήνα (Speijers, 2004; Puel, Galtier, & Oswald, 2010).

Υποξείες δόσεις πατουλίνης προκαλούν απώλεια σωματικού βάρους, γαστρικές ανωμαλίες και μεταβολές στη λειτουργία των νεφρών και το ενδοκρινικό σύστημα, ενώ συνεχόμενες χορηγήσεις οδηγούν σε νευροτοξικότητα και σε παρεμπόδιση αρκετών ενζύμων στα έντερα και στον εγκέφαλο, με σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Επίσης προκαλεί μεταβολές στο θυρεοειδή αδένα, με εισχώρηση λεμφοειδών κυττάρων και διόγκωση του ενδιάμεσου ιστού, ενώ στα κύτταρα των γεννητικών αδένων παρατηρείται οίδημα, ίνωση, τοπική υπερπλασία των κυττάρων Leydig και αποδιοργάνωση του επιθηλίου των σπερμοσωληνίσκων (Puel et al., 2010). Αντίθετα, χορήγηση πατουλίνης 5-500 mg/kg σωματικού βάρους σε πρωτεύοντα δεν έχει εμφανείς επιδράσεις. Χορήγηση πατουλίνης από 5mg/kg σωματικού βάρους για δύο συνεχείς εβδομάδες οδηγεί σε άρνηση τροφής κατά τις τελευταίες μόνο μέρες (Puel et al., 2010).

Έχουν γίνει αρκετές εργασίες πάνω στην γονοτοξική δράση της πατουλίνης. Σε βακτήρια διαπιστώθηκε πως δεν έχει μεταλλαξιγόνο δράση και δεν προκαλεί γονοτοξικότητα. Αντίθετα, εργασίες με κύτταρα τρωκτικών και ανθρώπινα λεμφοκύτταρα έδειξαν μεταλλαξιγόνο ικανότητα. Στις περιπτώσεις αυτές η πατουλίνη προκάλεσε σχάσεις στις χρωματίδες και τα χρωματοσώματα, καθώς και ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων. Έχει ακόμα αποδειχτεί πως προκαλεί οξείδωση του DNA των νεφρικών κυττάρων εμβρύων. Είναι πιθανό οι τοξικές αυτές επιδράσεις να οφείλονται στην αντίδραση της πατουλίνης με σουλφυδρλικές ομάδες (Puel et al., 2010).

Η τοξικότητα της πατουλίνης στα έμβρυα εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το είδος του εμβρύου και την ποσότητα πατουλίνης στην οποία εκτίθεται το έμβρυο. Υποδόρια χορήγηση ποσότητας πατουλίνης 1,5 mg/kg σωματικού βάρους σε ποντίκια και αρουραίους δεν έχει καμία επίδραση στο έμβρυο, ενώ 2 mg/kg

σωματικού βάρους προκαλούν σημαντική αύξηση στις αποβολές. Αντίθετα, με στοματική χορήγηση οι νεοσσοί παρουσιάζουν εγκεφαλικές, πνευμονικές και δερματικές αιμορραγίες, ενώ αύξηση της δόσης αυξάνει τα περιστατικά.

Χορήγηση πατουλίνης στον αερόσακο ωών προκαλεί τοξικότητες οι οποίες σχετίζονται με την ηλικία του εμβρύου, ενώ ποσότητα 1-2 $\mu\text{g}/\text{αυγό}$ προκαλεί τερατογενέσεις και έντονη μείωση της διαμέτρου της λεκίθου. Τα έμβρυα των τρωκτικών δεν επιβιώνουν περισσότερο από 40 ώρες όταν τους χορηγείται ορός με συγκέντρωση πατουλίνης άνω των 60 μM . Στις περιπτώσεις αυτές διαπιστώνεται έλλειψη πρωτεϊνών και DNA, καθώς και μείωση του μήκους του κεφαλουραίου και του αριθμού των σωματιών. Τέλος, η πατουλίνη προκαλεί σημαντική αύξηση του ποσοστού των εμβρύων με ανωμαλίες, μεταξύ των οποίων καθυστέρηση της αύξησης, υποπλασία του μεσεγκεφάλου και του τελεγκεφάλου και υπερπλασία της κάτω γνάθου (Puel et al., 2010).

Έχουν γίνει αρκετές εργασίες με τρωκτικά και έχει αποδειχτεί πως η πατουλίνη παρεμποδίζει σημαντικές λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι προκαλείται παρεμπόδιση της πρωτεϊνοσύνθεσης, μεταβολή των μεμβρανικών λειτουργιών, σημαντική μείωση στην παραγωγή O_2^- και στο συνδυασμό λυσοσωμάτων και φαγοσωμάτων, ελάττωση της φαγοκυττάρωσης και μείωση της λειτουργικότητας των λυτικών ενζύμων. Σε μακροφάγα κύτταρα, T-κύτταρα και μονοκύτταρα αιμοκύτταρα ανθρώπου εμφανίζονται σημαντικές μειώσεις στην παραγωγή και την έκκριση πολλών ενζύμων. Έχουν γίνει λεπτομερείς ιατρικές εξετάσεις σε ποντίκια στα οποία είχε χορηγηθεί πατουλίνη, με σκοπό να εντοπιστούν τα όρια της ανθρώπινης έκθεσης στην πατουλίνη. Στα πειράματα αυτά, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην παραγωγή λευκοκυττάρων και λεμφοκυττάρων στο αίμα. Αντίθετα βρέθηκαν αυξημένος αριθμός κυττάρων στο σπλήνα, αυξημένα κυττοτοξικά T-λεμφοκύτταρα και αλλαγές στα ποσοστά των λεμφοκυττάρων ανοσοσφαιρίνης στο σπλήνα. Παρά τις πολλαπλές μεταβολές που αναφέρονται, η πατουλίνη δε φαίνεται να επηρέασε την αποτελεσματικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος των πειραματόζων (Puel, Galtier, & Oswald, 2010).

Επιδράσεις στο Μεταβολισμό:

Η πατουλίνη αντιδρά με τις τελικές σουλφυδρυλικές ομάδες πρωτεϊνών και είναι τόξική τόσο για φυτικά, όσο για ζωικά κύτταρα (Barkai-Golan, 2008; Speijers, 2004). Έχει αποδειχτεί πως παρεμποδίζει τη λειτουργία πολλών ενζύμων, όπως η ΑΤΡάση, η αλκαλική φωσφατάση, η αλδολάση και η εξοκινάση. Επίσης, ενεργοποιεί την γλυκογονική φωσφορυλάση στο ήπαρ και αυξάνει την περιεκτικότητα του αίματος σε γλυκόζη κατά 60% (Speijers, 2004).

Η επίδραση της πατουλίνης στην λειτουργία των πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης γλυκογόνου στο ήπαρ, τους νεφρούς και τους εντερικούς ιστούς. Η μείωση του γλυκογόνου στο ήπαρ οδηγεί σε δυσανεξία στη γλυκόζη, πιθανώς λόγω ανεπάρκειας ινσουλίνης. Αντίθετα, η πατουλίνη φαίνεται πως ενεργοποιεί τη γλυκονογένεση, αυξάνοντας τη λειτουργία ενζύμων όπως η 6-φωσφατάση της γλυκόζης και η 1,6-διφωσάση της φρουκτόζης (Speijers, 2004).

Κιτρινίνη

Η κιτρινίνη απομονώθηκε πρώτη φορά το 1931 από το μύκητα *Penicillium citrinum* ως αντιβιοτικό, αλλά δεν χρησιμοποιήθηκε ποτέ γιατί βρέθηκε πως προκαλεί τοξικότητες στα σπονδυλωτά. Από τότε έχουν βρεθεί πολλά είδη μυκήτων που παράγουν κιτρινίνη, τόσο του γένους *Penicillium* (όπως το *Penicillium citrinum*), όσο και του γένους *Aspergillus* (όπως το *Aspergillus terreus*), τα περισσότερα από τα οποία παράγουν κιτρινίνη σε συνδυασμό με άλλες μυκοτοξίνες. Το είδος *Penicillium expansum* δεν είναι ο μύκητας με τη μεγαλύτερη παραγωγή κιτρινίνης, είναι όμως μέσα στους βασικότερους παραγωγούς για τα εύκρατα κλίματα (Frank, 1992; Sankawa, et al., 1983).

Η μυκοτοξίνη αυτή, δεν παράγεται πάντα από τα είδη παραγωγούς της. Υπάρχουν διάφορες συνθήκες που πρέπει να πληρούνται για να αρχίσει η παραγωγή της, οι οποίες διαφέρουν ακόμα και από είδος σε είδος. Σημαντικό ρόλο παίζουν οι συνθήκες του περιβάλλοντος. Ο μύκητας επιβιώνει σε πλήθος περιβαλλοντικών συνθηκών, χωρίς να είναι απαραίτητο πως έχει την ικανότητα να παράξει κιτρινίνη στις συνθήκες αυτές. Στο μύκητα *Penicillium viridicatum*, για παράδειγμα, αν και ο μύκητας αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε υγρασία 85%, η κιτρινίνη αρχίζει να παράγεται σε σχετική υγρασία από 90%. Σημαντικό ρόλο παίζει, επίσης, και η ύπαρξη άλλων ειδών μύκητα στο άμεσο περιβάλλον. Για παράδειγμα το *P. citrinum* δεν παράγει κιτρινίνη παρουσία του *Aspergillus niger* ή του *Trichoderma viridae*, ενώ παράγει κανονικές ποσότητες παρουσία άλλων ειδών μυκήτων (Frank, 1992).

Υπάρχουν πολλά δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν πως η κιτρινίνη είναι ασταθές μόριο και συχνά καταστρέφεται από τον ίδιο το μύκητα και παράγονται αντί αυτής διυδροκιτρινίνη και ωχρατοξίνη Α (Barkai-Golan, 2008). Έχει βρεθεί, ακόμη, πως η κιτρινίνη είναι ευαίσθητη σε υψηλές θερμοκρασίες παρουσία νερού, όχι όμως και σε ξηρή θέρμανση. Η αποτελεσματικότητά της μειώνεται σημαντικά στους 100°C, ενώ η αποδόμησή της ξεκινά από τους 60-70°C (Frank, 1992). Επίσης, αν και η παρουσία κιτρινίνης σε μήλα είναι πολύ πιθανή, η παρουσία της σε χυμούς μήλου είναι απίθανη, αφού φαίνεται πως είναι ασταθής κατά την μεταποίηση. Για

τους λόγους αυτούς η διεθνής κοινότητα δεν έχει θεσπίσει ακόμα ανώτατα επιτρεπτά όρια (Scott, 2004).

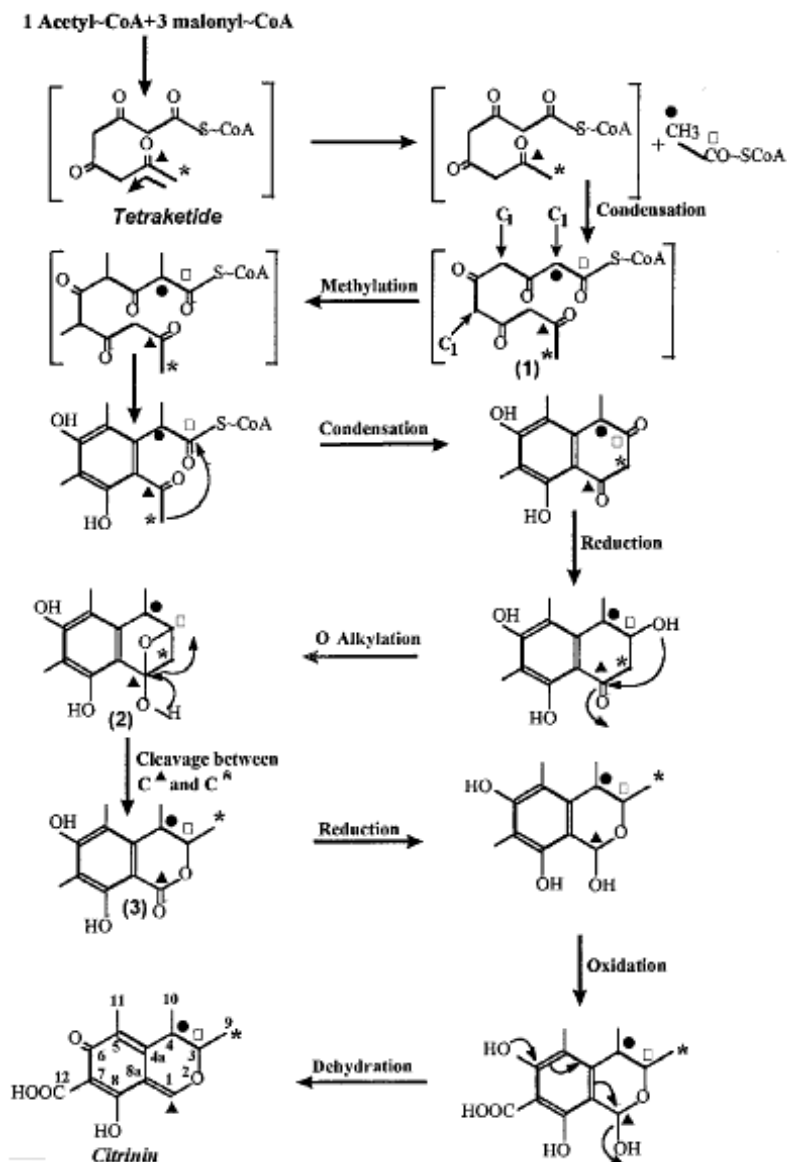
Σε πειράματα με ποντίκια, η κιτρινίνη φαίνεται να αποβάλλεται κατά 74% με τα ούρα και 4% με τα κόπρανα, εντός των πρώτων 24 ωρών από τη χορήγηση. Ο χρόνος ημιζωής της κιτρινίνης στους οργανισμούς είναι περίπου 2 ώρες, ενώ το υπόλοιπο αποβάλλεται σταδιακά μέσα στις επόμενες 40 ώρες. Από τη συνολική χορηγούμενη δόση, το 15,4% μεταβολίζεται σε διυδροκιτρινόνη και αποβάλλεται, ενώ μόλις το 42,5% βρέθηκε αμετάβλητο στα ούρα και το πλάσμα. Τέλος, η κιτρινίνη φαίνεται να περνά από τη μητέρα στο έμβρυο, σε αντίθεση με τους μεταβολίτες της, οι οποίοι αν και είναι πιο πολωμένοι, δεν μεταφέρονται (Frank, 1992).

Η βιοσύνθεση της κιτρινίνης:

Η βιοσύνθεση της κιτρινίνης (Εικ. 11) ξεκινά με το σχηματισμό ενός τετρακετιδίου που προέρχεται από ένα μόριο ακέτυλο συνενζύμου Α και τρία μόρια μηλότυλο συνενζύμου Α, μέσω μίας διαδικασίας συμπύκνωσης. Στη συνέχεια με την προσθήκη ενός ακόμα μορίου ακέτυλο συνενζύμου Α σχηματίζεται το ενδιάμεσο μόριο 1. Στη συνέχεια ένα ακόμα μόριο μηλότυλο συνενζύμου Α συμπυκνώνεται στο τετρακετίδιο, με ταυτόχρονη αποκαρβοξυλίωση. Ακολουθούν, αντιδράσεις αλκυλίωσης και διάσπασης του δεσμού μεταξύ των C-1 και C-9 ανθράκων, όπως γίνεται και για την παραγωγή διάφορων άλλων δευτερογενών μεταβολιτών (Hajjaj et al., 1999).

Η διαδικασία αυτή αφορά το είδος *Monascus ruber* και δεν έχει επιβεβαιωθεί σε άλλα είδη.

Με μοριακές μεθόδους έχει αποδειχτεί πως η κιτρινίνη παράγεται από πολυκετιδική σύνθεση. Έχει αποδειχτεί, ακόμη, πως στη ρύθμιση της παραγωγής της κιτρινίνης σημαντικό ρόλο παίζει και μία πρωτεΐνη που προσδέεται σε διπυρηνικό DNA και αποτελεί παράγοντα μεταγραφής. Τέλος, φαίνεται πως το σύμπλεγμα των γονιδίων για την παραγωγή της κιτρινίνης πιθανό να είναι παρόν και σε άλλα είδη των γενών *Penicillium*, *Aspergillus* και *Monascus*, αλλά να έχει επέλθει κάποια διαγραφή λόγω κάποιας χρωμοσωμικής θραύσης (Chen et al., 2008).



Εικόνα 13: Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της κιτρινίνης. Τα ενδιάμεσα προϊόντα είναι αριθμημένα. Φαίνεται η ενίσχυση με C-1, C-3, C-9 και C-4 ως τρίγωνο, τετράγωνο, αστέρι και κύκλος αντίστοιχα. Πηγή Hajjaj et al., 1999

Τοξικές επιδράσεις:

Η κιτρινίνη έχει αποδειχτεί πως συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια και επιδρά στην αναπνευστική αλυσίδα, χωρίς να έχει διευκρινιστεί πλήρως ο τρόπος δράσης της. Η δράση της εξαρτάται κυρίως από το pH, δεν επιδρά στην περατότητα των μεμβρανών, επιδρά όμως στην βιοσύνθεση του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών (Frank, 1992).

Η κιτρινίνη θεωρείται ισχυρώς νεφροτοξική (Barkai-Golan, 2008), αν και οι αναφορές στη βιβλιογραφία είναι αντιφατικές. Όλα τα πειραματόζωα επιδεικνύουν ομοιότητες στις τοξικότητες, τη θέση δράσης της κιτρινίνης στους νεφρούς και στη

δεκτικότητα των διαφόρων τύπων κυττάρων σε αυτή. Σε δόσεις μεταξύ 20-50 mg/kg σωματικού βάρους παρατηρείται ζημιά στους νεφρικούς μικροσωληνίσκους σε όλα τα ζώα. Στην ίδια συγκέντρωση παρατηρείται έντονη παραγωγή χυμοτοπίων στα επιθηλιακά κύτταρα των μικροσωληνίσκων μέσα στις πρώτες 24 ώρες και νεκρώσεις μετά από 48 ώρες. Ταυτόχρονα, αυξάνεται η ουρική απέκκριση και μειώνεται η οσμωτική ικανότητα των κυττάρων (Frank, 1992). Στις ίδιες δόσεις, εντός των 2 πρώτων ημερών παρατηρείται αύξηση του βάρους των νεφρών, σε ποντίκια, ινδικά χοιρίδια και κουνέλια, με ταυτόχρονη μείωση DNA και πρωτεϊνών και RNA. Αντίθετα, σε νεαρά κοτόπουλα, συγκέντρωση άνω των 3,9 mg/kg σωματικού βάρους προκαλεί αύξηση της πρόσληψης νερού και ούρησης, χωρίς ιστολογικές μεταβολές, ακόμα και μετά από απ' ευθείας χορήγηση κιτρινίνης στους νεφρούς. Η μόνη αλλαγή στη συμπεριφορά των ζώων ήταν η αύξηση της ούρησης (Frank, 1992). Αν και τα αποτελέσματα είναι αναστρέψιμα, έχουν γίνει αναφορές για τοξικότητες και σε ανθρώπους, στους οποίους βρέθηκαν έντονα επηρεασμένοι οι νεφροί (Barkai-Golan, 2008).

Η κιτρινίνη φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση σε βακτηριακά κύτταρα, όπως και σε ηπατικά κύτταρα ανθρώπων και τρωκτικών. Στα ηπατικά κύτταρα εμφανίζονται χρωμοσωματικές εκτροπές μετά από ενεργοποίηση των μικροσωματίων, χωρίς να παρατηρούνται ανταλλαγές μεταξύ αδελφών χρωματίδων. Παρατηρούνται, όμως, θραύσεις στον ένα κλώνο ή και στους δύο κλώνους του DNA των κυττάρων, καθώς και σημειακές μεταλλαγές (Frank, 1992).

Για την κιτρινίνη δεν έχει αναφερθεί καμία καρκινογόνος δράση, εκτός από καλοήγη αδενώματα στους νεφρούς (Barkai-Golan, 2008).

Σε πειράματα εμβρυοτοξικότητας, απεδείχθη πως η κιτρινίνη μπορεί να έχει επίδραση τόσο στο έμβρυο όσο και στη μητέρα. Συγκεκριμένα, στα έμβρυα παρατηρούνται μεγεθύνσεις στους νεφρούς, εσωτερική υδροκεφαλία και λυκόστομα, ενώ στις μητέρες παρατηρήθηκε 50% θνησιμότητα και αύξηση των εμβρυακών απορροφήσεων (Frank, 1992).

Αν και είχαν αρχικά διατυπωθεί κάποιοι φόβοι για επιδράσεις της κιτρινίνης στο ανοσοποιητικό σύστημα, δεν έχουν επιβεβαιωθεί (Barkai-Golan, 2008; Frank, 1992).

Συνδιασμοί με άλλες τοξίνες:

Οι συνδυασμοί της κιτρινίνης με άλλες τοξίνες έχουν ίσως το μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Ερευνητές έχουν παρατηρήσει συνεργιστική δράση της κιτρινίνης με την ωχρατοξίνη Α σε ποντίκια και αυγά, όχι όμως και σε κοτόπουλα. Συνεργιστική δράση με την ωχρατοξίνη Α έχει παρατηρηθεί και στα έντομα *Heliothis zea* και *Spodoptera frugiperda* (Frank, 1992).

Οι ουσίες N-νιτροσοδιμεθυλαμίνη και N-(3,5-διχλωρομεθύλ)ηλεκτριμίδη είναι καρκινογόνες τοξίνες που εμφανίζονται με μικρή συχνότητα σε φυράματα. Έρευνες έχουν δείξει πως η κιτρινίνη αυξάνει σημαντικά την καρκινογόνο δράση των ουσιών αυτών. Συνεργιστικά δρα η κιτρινίνη και με το πενικιλικό οξύ, αλλά σε σημαντικά υψηλές ποσότητες των δύο μυκοτοξινών (Frank, 1992).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η συνεχής απώλεια της αποτελεσματικότητας των γεωργικών φαρμάκων, που παρατηρείται σε παγκόσμια κλίμακα, λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών των οργανισμών στόχων είναι ίσως το σημαντικότερο πρόβλημα της φυτοπροστασίας. Το πρόβλημα αυτό εντείνεται από την απόσυρση παλαιότερων δραστικών ουσιών, λόγω έλλειψης υποστήριξης από τις εταιρίες και των νέων Κοινοτικών νομοθεσιών.

Η μελέτη και εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης και επικράτησης στον αγρό στελεχών του παθογόνου ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα αποτελεί βασικό στοιχείο της διαχείρισης της ανθεκτικότητας και συμβάλει στην έγκαιρη διαμόρφωση κατάλληλων στρατηγικών για την αντιμετώπισή της. Η διερεύνηση των παραμέτρων που επηρεάζουν τον κίνδυνο αυτό, καθώς και των μηχανισμών που τις διέπουν, είναι το πρώτο βήμα προς την κατεύθυνση αυτή.

Οι νέοι παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDHIs) αποτελούν μία σημαντική κατηγορία μυκητοκτόνων με εξειδικευμένη δράση και ευρύ φάσμα δράσης. Οι παράγοντες αυτοί, όπως και η αποτελεσματικότητα των νέων SDHIs ενάντια σε σημαντικά παθογόνα (είδη των γενών *Botrytis*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Monilinia*, *Venturia*, *Rhizoctonia*, *Puccinia*, *Ustilago*, *Tilletia*, *Pyrenophora*) τους καθιστούν πολύτιμους για την παγκόσμια γεωργία. Όμως η εξειδικευμένη δράση των μυκητοκτόνων αυτών συνεπάγεται υψηλό κίνδυνο εμφάνισης στελεχών των μυκήτων με μειωμένη ευαισθησία στην γεωργική πράξη. Για τους λόγους αυτούς, το ενδιαφέρον για την διατήρηση της αποτελεσματικότητάς τους είναι αυξημένο.

Ένα σημαντικό παθογόνο είναι το *Penicillium expansum*, το οποίο προκαλεί προσυλλεκτικές και μετασυλλεκτικές σήψεις σε φρούτα, ιδιαίτερα σε μήλα και ροδάκινα. Οι SDHIs δεν έχουν πάρει ακόμα έγκριση κυκλοφορίας για το είδος αυτό ακόμα. Παρόλα αυτά το *P. expansum* έρχεται σε επαφή με τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα αυτά, αφού συνυπάρχει στον αγρό και τους αποθηκευτικούς με άλλα είδη μυκήτων, για τα οποία χρησιμοποιούνται οι SDHIs.

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των SDHIs στο μύκητα *Penicillium expansum* και η διερεύνηση του κινδύνου εμφάνισης και επικράτησης στελεχών ανθεκτικών στους SDHIs και συγκεκριμένα στο boscalid. Προς την κατεύθυνση αυτή μελετήθηκαν η αποτελεσματικότητα του boscalid στο *P. expansum*, η συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων ανθεκτικότητας και οι παράμετροι προσαρμοστικότητας και επιβίωσης των ανθεκτικών στελεχών, μεταξύ των οποίων ο ρυθμός γραμμικής αύξησης και το ξηρό βάρος του μυκηλίου τους, η ικανότητά τους για την παραγωγή και τη βλάστηση κονιδίων, η παθογόνος ικανότητα και δύναμη τους και η ικανότητά παραγωγής μυκοτοξινών των ανθεκτικών στελεχών.

Ένας δεύτερος στόχος ήταν ο προσδιορισμός της επίδρασης των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στο boscalid στην ευαισθησία των στελεχών σε άλλα μυκητοκτόνα της ίδιας, αλλά και διαφορετικών χημικών ομάδων.

Τέλος, ένας σημαντικός στόχος ήταν η διερεύνηση του βιοχημικού μηχανισμού της ανθεκτικότητας, μέσω της αναγνώρισης σημειακών μεταλλαγών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

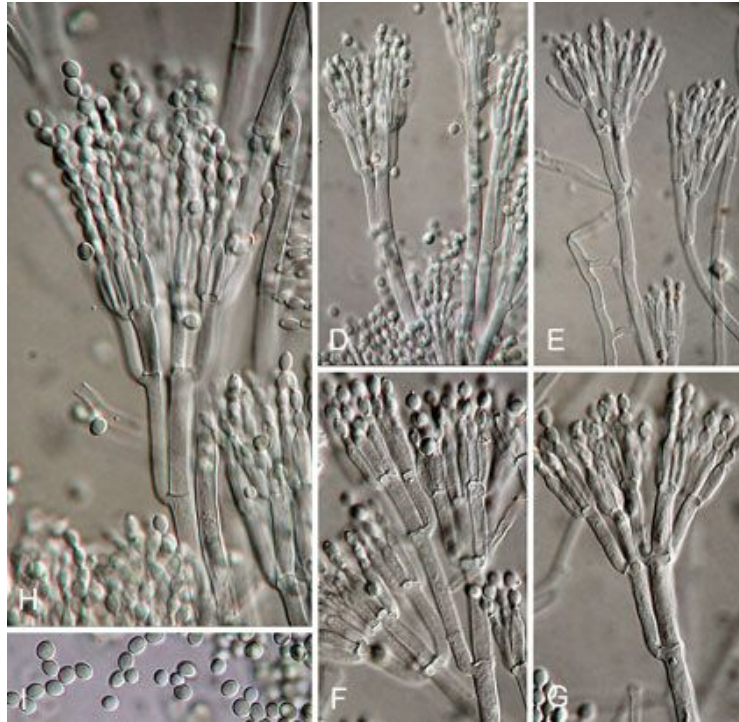
3.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο άγρια στελέχη του μύκητα *Penicillium expansum*, το RD₁ και το DSM. Το RD₁ ήταν στέλεχος που απομονώθηκε από μόλυνση σε μήλο ποικιλίας Red Delicious. Το DSM ήταν στέλεχος από τράπεζα γενετικού υλικού, με κωδική ονομασία DSM-1282.

Το είδος *Penicillium expansum* είναι κοσμοπολίτικο είδος και προκαλεί ζημιές σε πολλά αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα παγκοσμίως. Είναι ένα γνωστό και αρκετά μελετημένο είδος. Το είδος *Penicillium expansum* ανήκει στους Αδηλομύκητες, στην κλάση των Υφομυκήτων, στην τάξη Moniliales, στην οικογένεια Moniliaceae, στο γένος *Penicillium*, στο υπογένος *Penicillium* και στη σειρά *expansa* (Pitt, 1979; Τζάμος, 2004). Αν και δεν έχει βρεθεί η τέλεια μορφή του είδους, το *Penicillium expansum* αναφέρεται και στους Ασκομύκητες, στην κλάση Eurotiomycetes, στην υποκλάση Eurotiomycetidae, στην τάξη Eurotiales, στην οικογένεια Trichocomaceae και στο γένος *Penicillium* (Samson, et al., 2011; MicrobeWiki, 2010; WikiProject-Fungi, 2011).

Το μυκήλιο είναι απλό, συνήθως βελουτοειδές, ενώ μερικές απομονώσεις παρουσιάζουν πιο αραιό μυκήλιο, κυρίως στην περιφέρεια. Η περιφέρεια είναι συνήθως ακανόνιστη και συνήθως κάτω από την επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος. Το χρώμα του μυκηλίου είναι λευκό έως υαλώδες και η καρποφορία είναι ανάλογη της θρεπτικότητας του υποστρώματος. Σε πλούσια υποστρώματα (PDA, MEA, χυμοί φρούτων, κ.α.) η καρποφορία είναι έντονη και πολύ πυκνή, δημιουργώντας ένα είδος κρούστας, ενώ σε φτωχά υποστρώματα (CDA, minimal medium, κ.α.) η καρποφορία είναι πιο αραιή και αργή. Ο χρωματισμός των κονιδίων είναι ωχρο-πράσινος. Σε κάποιες εμφανίζεται υδατοδιαλυτή χρωστική, με χρωματισμό καφέ-πορτοκαλί, κοντά σε αυτόν της καραμέλας (Pitt, 1979).

Οι κονιδιοφόροι σχηματίζονται από επιφανειακές ή υπο-επιφανειακές υφές, μεμονωμένοι, σε δεσμίδες ή σε εμφανή κορέμια. Το στέλεχος είναι συνήθως 200-500 x 3,0-4,0 μm, με ομαλά τοιχώματα, με κονιδιοφόρους τελικούς, συνήθως με τρία σημεία διακλάδωσης και σπανιότερα με τέσσερα. Οι κλάδοι παρουσιάζονται κατά κανόνα μεμονωμένοι, με μέγεθος 15-25 x 3,0-4,0 μm. Τα metulae αναπτύσσονται σε σπείρες των 3-6, μεγέθους 12-15 x 3,0-4,0 μm. Τα φιαλίδια εμφανίζονται ομαδικά και συμπτυγμένα, 5-8 ανά σπείρα, σε σχήμα αμπούλας έως κυλινδροειδή, με κοντή collula και μέγεθος 8-11 x 2,5-3,2 μm. Τα κονίδια είναι ελλειπτικά, έχουν μέγεθος 3,0-3,5 x 2,5-3,0 μm, ομαλά τοιχώματα και εμφανίζονται σε μεγάλες, πυκνές και ακανόνιστες αλυσίδες (Pitt, 1979).



Εικόνα 14: Τυπική μορφή καρποφορίας και κονίδια του είδους *Penicillium expansum* Link. Πηγή www.mycobank.org

Τα πλέον χρήσιμα χαρακτηριστικά για τη διάκριση του *P. expansum* από άλλα είδη είναι ο γενικός χρωματισμός της καρποφορίας του, η ομαλότητα των τοιχωμάτων των στελεχών και των κλάδων, το λευκό μυκήλιο και ο χρωματισμός των χρωστικών του, όταν και όπου αυτές παράγονται (Pitt, 1979).

3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Για την καλλιέργεια των στελεχών του μύκητα *Penicillium expansum* και ανάλογα με τη φύση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υποστρώματα:

1. *Potato Dextrose Agar (PDA)*

- Φρέσκια πατάτα 200 g
- Δεξτρόζη 10 g
- Άγαρ 20 g
- Απεσταγμένο νερό 1000 ml

2. *Minimal Medium (MM)*

- α-D-γλυκόζη 10 g
- K_2HPO_4 1,5 g
- KH_2PO_4 2 g
- $(NH_4)_2SO_4$ 1 g
- $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 0,5 g
- Εκχύλισμα Yeast 2 g
- Άγαρ 15 g
- Απεσταγμένο νερό 1000 ml

3. *Yeast Extract Sucrose agar (YES)*

- Σουκρόζη 150 g
- Εκχύλισμα Yeast 20 g
- Άγαρ 20 g
- Απεσταγμένο νερό 1000 ml

4. *Potato Dextrose broth (PDb)*

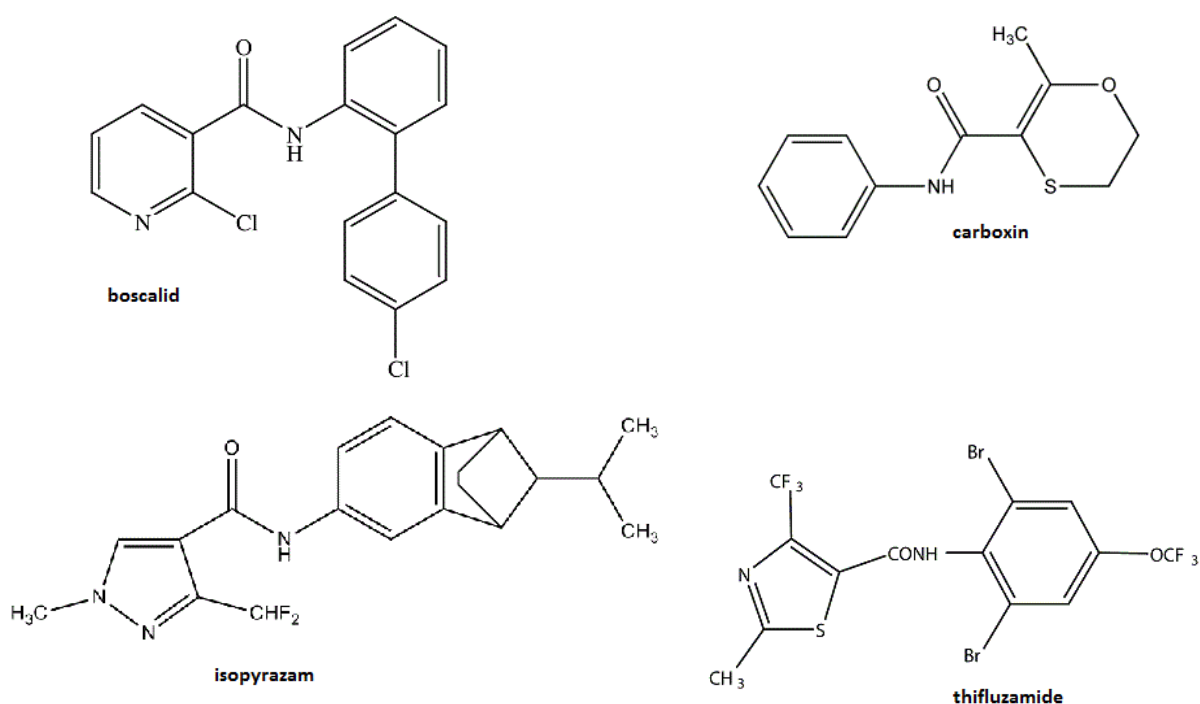
Το υπόστρωμα αυτό ήταν έτοιμο από την εταιρία Sigma- Aldrich. Η παρασκευή του και τα θρεπτικά του στοιχεία αναφέρονται τόσο στη συσκευασία όσο και στην ιστοσελίδα της εταιρίας.

Η αποστείρωση των υλικών γινόταν σε κλίβανο υγρής θερμότητας (autoclave) στους 121°C για 20 λεπτά.

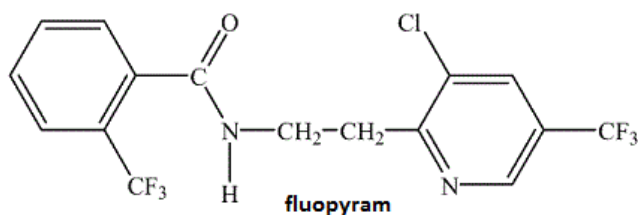
3.3. ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ

Οι παρεμποδιστές που χρησιμοποιήθηκαν, η καθαρότητά τους και η προέλευσή τους με βάση τη χημική τους ομάδα ήταν:

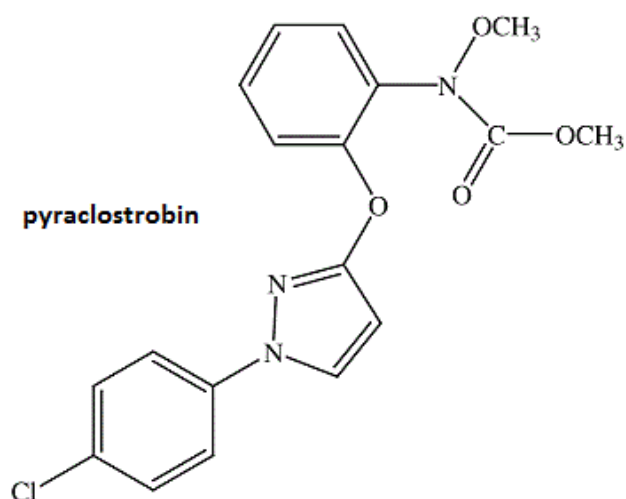
Καρβοξαμικά: boscalid απολύτου καθαρότητας και carboxin απολύτου καθαρότητας από την BASF crop protection, Limburgerhof, Germany, isopyrazam απολύτου καθαρότητας με ευγενική χορηγία του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας της Γεωπονικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και thifluzamide απολύτου καθαρότητας από την Dow Agro Sciences LLC, Indianapolis, U.S.A. με συντακτικούς τύπους:



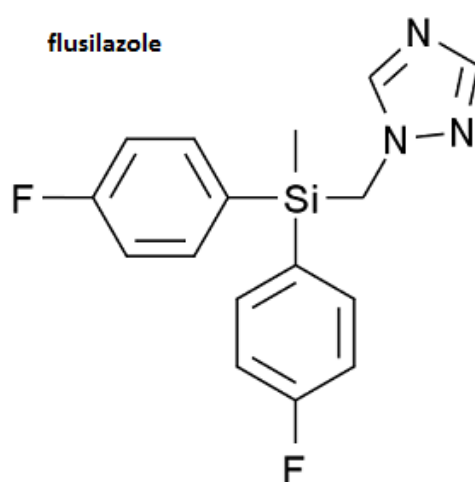
Βενζαμίδια: fluopyram απολύτου καθαρότητας με ευγενική χορηγία του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας της Γεωπονικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Ο συντακτικός του τύπος είναι:



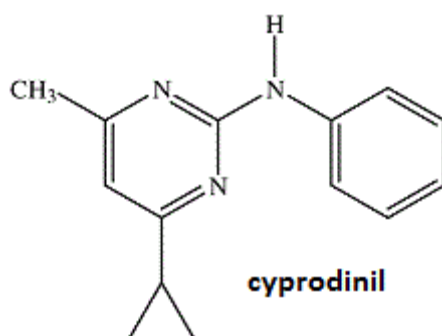
Στρομπιλουρίνες: pyraclostrobin απολύτου καθαρότητας της BASF crop protection, Limburgerhof, Germany, με συντακτικό τύπο:



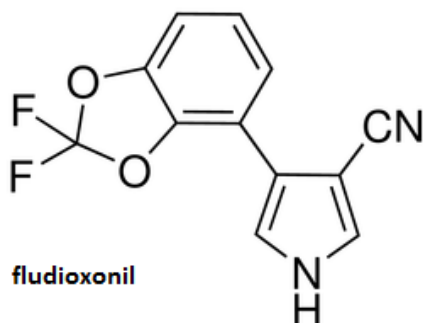
Τριαζολικά: flusilazole καθαρότητας 98,7% της DuPont, Geneva, Switzerland. Ο συντακτικός τύπος του μυκητοκτόνου είναι:



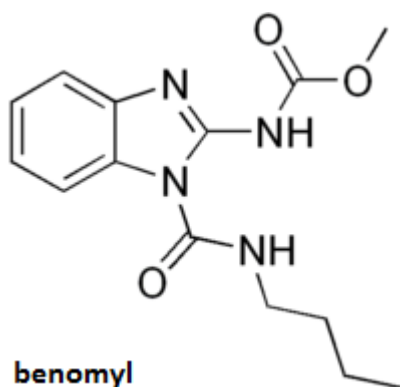
Ανιλινοπυριμιδίνες: cyprodinil της εταιρίας Syngenta Crop Protection, Basle, Switzerland, απολύτου καθαρότητας, με συντακτικό τύπο:



Φαινολοπυρρολικά: fludioxonil απολύτου καθαρότητας, της εταιρίας Syngenta Crop Protection, Basle, Switzerland, με συντακτικό τύπο:



Βενζιμιδαζολικά: benomyl απολύτου καθαρότητας, της εταιρίας DuPont, Geneva, Switzerland. Ο συντακτικός τύπος του μυκητοκτόνου είναι:



3.4. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΟ BOSCALID ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Penicillium expansum*

Η αρχή των μεθόδων που εφαρμόστηκαν, στηρίζεται στην πρόκληση γενετικών αλλαγών (μεταλλάξεων) σε κύτταρα του αρχικού άγριου πληθυσμού του υπό μελέτη οργανισμού και στη συνέχεια εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών επιλογής για την εμφάνιση και απομόνωση των επιθυμητών γονοτύπων. Ως μέσο για την πρόκληση των μεταλλαγών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ακτινοβόλησης με υπεριώδη ακτινοβολία (ultra violet light, UV). Για την επιλογή των ανθεκτικών στελεχών χρησιμοποιήθηκε το SDHI μυκητοκτόνο boscalid σε συγκέντρωση 5 µg/ml.

Συγκεκριμένα, μετά από 7 ημέρες επώασης του μύκητα *Penicillium expansum* σε θρεπτικό μέσο PDA, παρελήφθησαν κονίδια από 5 δίσκους των 10 mm σε 5 ml απιονισμένου νερού, έτσι ώστε να δημιουργηθεί αιώρημα κονιδίων με πυκνότητα της τάξης του 10^8 κονίδια/ml. Το αιώρημα ακτινοβολήθηκε για 10 λεπτά με ήπια και συνεχή ανατάραξη με λυχνία τύπου TUV Phillips των 15 Watt με εκπομπή γραμμικού φάσματος ακτινοβολίας στα 253,7 nm. Μετά την ακτινοβόληση το αιώρημα αφέθηκε στο σκοτάδι για 30 λεπτά, ώστε να σταθεροποιηθούν οι μεταλλαγές που προκλήθηκαν και να αποφευχθούν οι επανορθώσεις των βλαβών από το ορατό φως.

Με το ακτινοβολημένο αιώρημα κονιδίων εμβολιάστηκαν τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Minimal Medium με κατάλληλη συγκέντρωση του προς μελέτη παρεμποδιστή, όπως αναφέρεται ανωτέρω. Κάθε τρυβλίο εμβολιάστηκε με 200 ml από το αιώρημα των κονιδίων, οπότε κάθε τρυβλίο περιείχε 2×10^7 κονίδια. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 22°C και ανά τακτά χρονικά διαστήματα (κάθε 1 έως 2 ημέρες) οι αποικίες που αναπτύσσονταν μεταφέρονταν σε τρυβλία με το ίδιο υπόστρωμα και την ίδια συγκέντρωση του παρεμποδιστή. Μετά την ανάπτυξη έγινε πιο λεπτομερής έλεγχος της ευαισθησίας τους.

Η εκτίμηση του ποσοστού θνησιμότητας των κονιδίων από τη μεταλλαξιγένεση έγινε με βάση τον αριθμό των αποικιών που αναπτύσσονταν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα MM, τα οποία είχαν εμβολιαστεί με κατάλληλες συγκεντρώσεις του αιωρήματος πριν και μετά την ακτινοβόληση. Λαμβάνοντας υπόψη το ποσοστό θνησιμότητας, που ήταν κοντά στο 99% για το DSM και 95% για το RD₁, εκτιμήθηκε πως ο αριθμός των ζωντανών κονιδίων ήταν 2×10^5 για το DSM και 10^6 για το RD₁ ανά τρυβλίο επιλογής.

3.5. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΟ BOSCALID ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Penicillium expansum*

3.5.1. Μελέτη του Επιπέδου Ανθεκτικότητας

Για τον προσδιορισμό του επιπέδου ανθεκτικότητας των στελεχών του μύκητα *Penicillium expansum* στο boscalid χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που στηρίζεται στη μέτρηση της γραμμικής αύξησης της διαμέτρου της αποικίας.

Κατά τη μέθοδο αυτή, τα στελέχη του μύκητα αναπτύσσονταν μετά από εμβολιασμό σε τρυβλία Petri (90 mm) με υλικό ανάπτυξης MM, είτε απουσία είτε σε διάφορες συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου. Ο εμβολιασμός και η προσθήκη του μυκητοκτόνου στο υλικό ανάπτυξης πραγματοποιούνταν υπό ασηπτικές συνθήκες, ενώ ο συνολικός όγκος του οργανικού διαλύτη στο μυκητοκτόνο δεν υπερέβαινε το 1% (v/v) του όγκου του θρεπτικού υλικού.

Ο εμβολιασμός των τρυβλίων γινόταν με μόλυσμα διαμέτρου 2 mm, προερχόμενο από βλαστημένα κονίδια των αντίστοιχων στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα MM και επώαση για 24 ώρες στους 22°C. Τα εμβολιασμένα τρυβλία επωάζονταν στους 22°C σε συνθήκες σκότους και οι μετρήσεις της γραμμικής αύξησης της διαμέτρου της αποικίας κάθε στελέχους γινόταν την 5^η ημέρα.

Ο προσδιορισμός του επιπέδου ανθεκτικότητας κάθε στελέχους στο boscalid έγινε με χρήση της καμπύλης μυκητοτοξικότητας (dose-response curve). Η καμπύλη προκύπτει από τη γραφική παράσταση σε οριζόντιο σύστημα αξόνων της εκατοστιαίας μεταβολής της γραμμικής αύξησης της αποικίας του κάθε στελέχους, μετά από επώαση σε υλικό με διαφορετικές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου, σε σχέση με την ανάπτυξη απουσία μυκητοκτόνου (μάρτυρας-control). Χρησιμοποιήθηκαν 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις για τον προσδιορισμό της καμπύλης μυκητοτοξικότητας. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση παρεμπόδισης της ανάπτυξης κατά 50% (EC₅₀) και η ελάχιστη συγκέντρωση πλήρους παρεμπόδισης της ανάπτυξης (MIC), όπου αυτό ήταν δυνατό. Ακολούθως, υπολογίστηκε ο παράγοντας ανθεκτικότητας σύμφωνα με τον τύπο:

$$Rf = \frac{EC50 \text{ του μεταλλαγμένου}}{EC50 \text{ w. t.}}$$

Για κάθε στέλεχος πραγματοποιούνταν 3 επαναλήψεις.

Όταν τα προς μελέτη στελέχη είναι ανθεκτικά, ο παράγοντας ανθεκτικότητας έχει τιμή μεγαλύτερη της μονάδας και αυξάνει ανάλογα με το βαθμό ανθεκτικότητας του στελέχους. Όταν όμως τα στελέχη εμφανίζουν την ίδια ή μεγαλύτερη ευαισθησία από το άγριο στέλεχος, τότε ο παράγοντας ανθεκτικότητας έχει τιμή ίση ή μικρότερη από τη μονάδα αντίστοιχα.

3.5.2. *Μελέτη του Ρυθμού Αύξησης*

Για τη μέτρηση του ημερήσιου ρυθμού αύξησης των στελεχών του μύκητα *Penicillium expansum* στο boscalid χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που στηρίζεται στη μέτρηση της γραμμικής αύξησης της διαμέτρου της αποικίας. Τα στελέχη του μύκητα αναπτύσσονταν μετά από εμβολιασμό σε τρυβλία Petri (90 mm) με υλικό ανάπτυξης MM. Ο εμβολιασμός των τρυβλίων γινόταν με μόλυσμα διαμέτρου 2 mm, προερχόμενο από βλαστημένα κονίδια των αντίστοιχων στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα MM και επώαση για 24 ώρες στους 22°C. Τα εμβολιασμένα τρυβλία επωάζονταν στους 22°C σε συνθήκες σκότους και οι μετρήσεις της γραμμικής αύξησης της διαμέτρου της αποικίας κάθε στελέχους λαμβάνονταν ημερησίως για διάστημα 7 ημερών. Η καμπύλη του ρυθμού αύξησης των στελεχών προέκυψε από τους μέσους όρους των μετρήσεων κάθε χρονικής στιγμής συναρτήση του χρόνου έναρξης της επώασης.

3.5.3. *Μελέτη της Ικανότητας Παραγωγής και Βλάστησης των Κονιδίων*

Για τη μέτρηση της παραγωγής κονιδίων χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA, στα οποία απλώθηκε αιώρημα κονιδίων του κάθε στελέχους πυκνότητας 10^8 κονίδια/ml και αφέθηκαν να επωαστούν για 7 ημέρες στους 22°C, απουσία φωτός. Μετά το πέρας των ημερών αυτών από κάθε τρυβλίο αφαιρούνταν 5 δίσκοι διαμέτρου 10 mm, οι οποίοι τοποθετούνταν σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 ml απιονισμένου νερού. Μετά από ισχυρή ανάδευση, μικρή ποσότητα του αιωρήματος (10 μl) χρησιμοποιούταν για τον προσδιορισμό της παραγωγής κονιδίων με τη βοήθεια αιματοκυττομέτρου τύπου Neubauer. Για κάθε στέλεχος έγιναν 2 μετρήσεις.

Για τη μελέτη της ικανότητας βλάστησης των κονιδίων κάθε στελέχους, ακολουθήθηκε η μέθοδος που στηρίζεται στην εκατοστιαία απόδοση των βλαστημένων και αβλάστητων κονιδίων για κάθε στέλεχος. Κατά τη μέθοδο αυτή, σε 1 τρυβλίο Petri (90 mm) με θρεπτικό μέσο PDA σημειώθηκαν 6 κυκλικές περιοχές διαμέτρου 10 mm η καθεμία. Σε 2 από αυτές τοποθετήθηκαν 10 μl αιωρήματος κονιδίων του κάθε στελέχους, συγκέντρωσης 10^3 , 10^2 και 10 και το τρυβλίο αφέθηκε να επωαστεί για 8,5 ώρες. Κάθε μισή ώρα λαμβάνονταν μετρήσεις με χρήση μικροσκοπίου. Στην τελική μέτρηση υπήρξε ποσοστό βλάστησης στα άγρια στελέχη 65-80%.

3.5.4. *Μελέτη της Ευαισθησίας στην Ωσμωτική Πίεση*

Για τη μελέτη της ευαισθησίας των στελεχών του μύκητα *Penicillium expansum* στην ωσμωτική πίεση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που στηρίζεται στη μέτρηση της γραμμικής αύξησης της διαμέτρου της αποικίας.

Για κάθε στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν 2 τρυβλία Petri (90 mm) με θρεπτικό μέσο PDA, στο οποίο είχε προστεθεί 2,5% (w/v) άλας (NaCl) και 2 τρυβλία με ίδιο θρεπτικό μέσο, στο οποίο είχε προστεθεί 5% (w/v) NaCl. Σε κάθε ένα από τα τρυβλία έγινε εμβολιασμός με μόλυσμα διαμέτρου 2 mm, υπό ασηπτικές συνθήκες. Μετά τον εμβολιασμό τα τρυβλία αφέθηκαν να επωαστούν για 5 ημέρες στους 22°C, απουσία φωτός, μετά το πέρας των οποίων λήφθηκαν οι μετρήσεις για κάθε στέλεχος.

3.5.5. *Μέτρηση του Ξηρού Βάρους του Μυκηλίου*

Για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους κάθε στελέχους, τα στελέχη του μύκητα *Penicillium expansum* αναπτύσσονταν μετά από εμβολιασμό σε τρυβλία Petri (90 mm) με υλικό ανάπτυξης MM. Ο εμβολιασμός των τρυβλίων γινόταν με μόλυσμα διαμέτρου 2 mm, προερχόμενο από βλαστημένα κονίδια των αντίστοιχων στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα MM και επώαση για 24 ώρες στους 22°C. Τα τρυβλία αφέθηκαν για επώαση για 10 μέρες στους 22°C. Στη συνέχεια από κάθε τρυβλίο αφαιρούνταν 10 δίσκοι των 10 mm με ειδικό διακορευτή, τοποθετούνταν σε ζυγισμένα κομμάτια διηθητικού χαρτιού και αφήνονταν για μία μέρα στους 85°C και 0% υγρασία. Η μέτρηση του ξηρού βάρους του μυκηλίου γινόταν με ζυγό ακριβείας και υπολογιζόταν σε g/cm².

3.5.6. *Μελέτη της Παθογόνου Ικανότητας των Στελεχών του Μύκητα P. expansum*

Για τη διερεύνηση της παθογόνου ικανότητας και της παθογόνου δύναμης κάθε στελέχους έγιναν τεχνητές προσβολές σε αποστειρωμένα μήλα ποικιλίας Red Delicious. Ως μόλυσμα χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι διαμέτρου 10 mm πλήρως ανεπτυγμένου μυκηλίου για κάθε στέλεχος. Για κάθε στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν 5 μήλα, σε 3 από τα οποία έγιναν 4 μολύνσεις, ενώ στα υπόλοιπα έγιναν μόνο 2.

Η αποστείρωση των μήλων έγινε με υδατικό διάλυμα χλωρίου 1%. Σε κάθε μήλο οι πληγές έγιναν υπό ασηπτικές συνθήκες με νυστέρι. Σε κάθε πληγή τοποθετήθηκε και στερεώθηκε το μόλυσμα. Στη συνέχεια τα μήλα τοποθετήθηκαν σε ειδικά δοχεία με αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί, το οποίο είχε νοτιστεί με

απιονισμένο νερό και αφέθηκαν να επωαστούν για 10 μέρες σε συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία 25°C).

Για την διερεύνηση της παθογόνου ικανότητας η μέτρηση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ανάπτυξη ασθενείας σε κάθε πληγή που δημιουργήθηκε.

Για τον υπολογισμό παθογόνου δύναμης υπολογίστηκε με 2 μεθόδους. Η πρώτη μέθοδος αφορούσε τη γραμμική αύξηση του μεγέθους της σήψης που προκαλούταν σε κάθε πληγή. Η δεύτερη μέτρηση αφορούσε τη βαθμολόγηση της σήψης, που παρουσιάζοταν σε κάθε πληγή, σύμφωνα με την κλίμακα που παρουσιάζεται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Κλίμακα Βαθμονόμησης των μολύνσεων που έγιναν σε μήλα ποικιλίας Red Delicious από στελέχη του μύκητα *Penicillium expansum*.

Κλίμακα Βαθμονόμησης Μολύνσεων	
0	Καθόλου σήψη
0,5	Σήψη μόνο στο σημείο αρχικής μόλυνσης
1	Μόλυνση σε επιφάνεια $\leq 20\%$ του μήλου
2	Μόλυνση σε επιφάνεια $21\% \leq$ και $\leq 50\%$ του μήλου
4	Μόλυνση σε επιφάνεια $50\% \leq$ του μήλου

3.5.7. Μελέτη Της Ύπαρξης Διασταυρωτής Ανθεκτικότητας

Για την εκτίμηση του επιπέδου ανθεκτικότητας των στελεχών του μύκητα *Penicillium expansum* σε μυκητοκτόνα διαφόρων χημικών ομάδων ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.5.1. για κάθε παρεμποδιστή που αναφέρεται στο κεφάλαιο 3.3..

Για τη μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στο boscalid σε άλλους SDHIs χρησιμοποιήθηκε η έννοια της *διασταυρωτής ανθεκτικότητας* (cross resistance). Σύμφωνα με την έννοια αυτή, όταν ένα στέλεχος λόγω μεταλλαγής σε ένα γόνο εμφανίζεται να είναι ανθεκτικό σε κάποιο παρεμποδιστή, τότε ανάλογα με την ευαισθησία του στελέχους αυτού σε άλλο παρεμποδιστή, υπάρχουν τρεις περιπτώσεις. Αν το στέλεχος είναι λιγότερο ευαίσθητο από το άγριο, τότε υπάρχει διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ των δύο παρεμποδιστών. Αν το στέλεχος είναι περισσότερο ευαίσθητο από το άγριο, τότε οι παρεμποδιστές συνδέονται αρνητικά μεταξύ τους (Αρνητική Διασταυρωτή Ανθεκτικότητα). Αν η ευαισθησία του στελέχους και του αγρίου είναι παρόμοια, τότε υπάρχει έλλειψη διασταυρωτής ανθεκτικότητας.

3.6. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας παραγωγής πατουλίνης και κιτρινίνης από τα άγρια και τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη έγιναν μετρήσεις τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές, τόσο *in vitro* (σε τρυβλία διαμέτρου 90 mm με θρεπτικό υπόστρωμα YES), όσο και *in vivo* (μόλυνση μήλων ποικιλίας Red Delicious).

***in vitro* Μελέτη της παραγωγής Μυκοτοξινών**

Για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών απλώθηκε αιώρημα κονιδίων πυκνότητας 10^8 κονίδια/ml σε τρυβλία Petri (90 mm) με θρεπτικό υπόστρωμα YES και αφέθηκαν να επωαστούν για 10 μέρες στους 22°C. Στη συνέχεια, από κάθε τρυβλίο αφαιρέθηκαν 10 δίσκοι διαμέτρου 10 mm και προστέθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 ml μεθανόλης (CH₃OH - Methanol). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφέθηκαν να επωαστούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight) σε περιστροφικό επωαστήρα ZHWY-211B της ZHICHENG, υπό στις 150 στροφές ανά λεπτό (150 rpm). Η συνολική ποσότητα του εκχυλίσματος φυγοκεντρήθηκε στις 7.000 rpm για 10 λεπτά ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα. Στη συνέχεια έγινε εξάτμιση του κάθε εκχυλίσματος μέχρι ξηρού, με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα στους 50°C και επαναιώρηση των υπολειμμάτων με 3 ml μεθανόλης. Τέλος έγινε καθαρισμός του κάθε εκχυλίσματος με χρήση φίλτρων σύριγγας τύπου Teflon με μεμβράνη πολυβίνυλο-διφθοριδίου (PVDF), διαμέτρου 17 mm και άνοιγμα πόρων 0,2 μm. Μέχρι τον προσδιορισμό τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη στους -20°C.

Οι μυκηλιακοί δίσκοι τοποθετήθηκαν σε φούρνο σε θερμοκρασία 85°C overnight για τον προσδιορισμό του ξηρού τους βάρους.

***in vivo* Μελέτη της παραγωγής Μυκοτοξινών**

Για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών που παράγονται από τα στελέχη σε φυσικές συνθήκες έγινε τεχνητή προσβολή μήλων ποικιλίας Red Delicious με δύο πληγές σε κάθε καρπό. Η αποστείρωση των μήλων έγινε με υδατικό διάλυμα χλωρίου 1%. Σε κάθε μήλο οι πληγές έγιναν υπό ασηπτικές συνθήκες με νυστέρι. Σε κάθε πληγή τοποθετήθηκε και στερεώθηκε το μόλυσμα (δίσκοι διαμέτρου 10 mm πλήρως ανεπτυγμένου μυκηλίου). Στη συνέχεια τα μήλα τοποθετήθηκαν σε ειδικά δοχεία με αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί, το οποίο είχε νοτιστεί με απιονισμένο νερό και αφέθηκαν να επωαστούν για 10 μέρες σε συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία 25°C).

Μετά το πέρας της επώασης οι προσβεβλημένες περιοχές αφαιρέθηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή Ultra Turrax T25 Basic με 100 ml μίγματος μεθανόλης/νερού (60/40 v/v). Το ομογενοποιημένο προϊόν διηθήθηκε, για την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων, και έγινε διαχωρισμός υγρής φάσης με 50 ml χλωροφορμίου, το οποίο και συλλέχθηκε. Η οργανική φάση του χλωροφορμίου εξατμίστηκε με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα στους 50°C και έγινε επαναίωση των υπολειμμάτων με 5 ml μεθανόλης. Τέλος έγινε καθαρισμός του κάθε εκχυλίσματος με χρήση φίλτρων σύριγγας τύπου Teflon με μεμβράνη πολυβίνυλο-διφθοριδίου (PVDF), διαμέτρου 17 mm και άνοιγμα πόρων 0,2 μm. Μέχρι τον προσδιορισμό τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη στους -20°C.

Κατά την απομόνωση των προσβεβλημένων περιοχών το κάθε δείγμα ζυγιζόταν, ώστε να βρεθεί το συνολικό βάρος από το οποίο προήλθαν οι μετρηθείσες ποσότητες των τοξινών.

Ποιοτικός και Ποσοτικός Προσδιορισμός των Μυκοτοξινών

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των μυκοτοξινών που παράγονται από το κάθε στέλεχος έγινε με τη μέθοδο της Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδος (Thin Layer Chromatography- TLC).

Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου διαστάσεων 20 x 10 cm, με επίστρωση λεπτής στιβάδας στατικής φάσης διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) με μέγεθος σωματιδίων 0,2 mm, της εταιρίας Machenergy-Nagel. Στις πλάκες τοποθετήθηκαν 10 μl από το κάθε δείγμα, καθώς και από πρότυπα διαλύματα των μυκοτοξινών (πατουλίνη και κιτρινίνη), συγκέντρωσης 10 μg/ml. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετήθηκε σε ειδικό δοχείο με σύστημα διαλυτών τολουένιο/οξικός αιθυλεστέρας/ μυρμηκικό οξύ (50/40/10 v/v) για τον διαχωρισμό των τοξινών.

Για την οπτική παρατήρηση της πατουλίνης απαιτήθηκε ο ψεκασμός των πλακών με υδατικό διάλυμα 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine hydrochloride (MBTH) 1% και η τοποθέτηση των πλακών σε φούρνο θερμοκρασίας 100°C για περίπου 30 λεπτά.

Οι οπτικές παρατηρήσεις έγιναν με τη βοήθεια λάμπας υπεριώδους φωτός (UV) μήκους κύματος 254 nm.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ικανότητας παραγωγής μυκοτοξινών από τα στελέχη του μύκητα *Penicillium expansum* έγινε με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography- HPLC).

Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Shimadzu LC-20AD, με αυτόματο δειγματολήπτη SIL-20A, αυτόματο απαερωτή DGU-20A₅ και φούρνο CTO-20A. Χρησιμοποιήθηκε φθορισμομετρικός ανιχνευτής RF-10A_{XL} και ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector) SPD-M20A της Shimadzu. Η ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του προγράμματος LCsolution, v. 1.0.0.1. της Shimadzu.

Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της πατουλίνης χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής Diode Array με μήκος κύματος λ 275 nm. Χρησιμοποιήθηκε ισοκρατικό σύστημα με σύσταση νερό/ακετονιτρίλιο (90/10 v/v). Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ορίστηκε στα 0,7 ml το λεπτό και η θερμοκρασία της στήλης ήταν σταθερή στους 40°C. Η διάρκεια της κάθε ανάλυσης ήταν 20 λεπτά.

Η ποσοτικοποίηση της κιτρινίνης έγινε μέσω του φθορισμομετρικού ανιχνευτή. Το μήκος κύματος διέγερσης (λ_{ex}) ορίστηκε στα 330 nm και το μήκος κύματος εκπομπής (λ_{em}) στα 500 nm. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ισοκρατικό, σύστασης νερό οξιμισμένο με φωσφορικό οξύ 0,08M/ μεθανόλη σε αναλογία (20/80 v/v). Ο ρυθμός ροής του συστήματος ορίστηκε στα 0,5 ml το λεπτό και η θερμοκρασία της στήλης ήταν σταθερή στους 40°C. Η κάθε ανάλυση διήρκεσε 15 λεπτά.

3.7. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Penicillium expansum*

3.7.1. Απομόνωση DNA από Στελέχη του Μύκητα Penicillium expansum

Για την απομόνωση του DNA από τα w.t. και τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη χρησιμοποιήθηκαν αποικίες που αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα PDb για 3 μέρες, στους 22°C, απουσία μυκητοκτόνου. Το μυκήλιο συλλέχθηκε με φιλτράρισμα σε διηθητικό χαρτί, αφέθηκε να στεγνώσει και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε σωλήνα erpendorf όγκου 1,5 ml. Στο πώμα κάθε σωλήνα δημιουργήθηκε οπή με αποστειρωμένη βελόνα και οι σωλήνες μεταφέρθηκαν σε καταψύκτη με θερμοκρασία -18°C. Αφού το μυκήλιο έφτασε στο σημείο πήξης του, ο σωλήνας μεταφέρθηκε στη λυοφιλοποίηση και στη συνέχεια αλέστηκε με αποστειρωμένα μικρογουδιά και τα θραύσματα αποθηκεύτηκαν στους -18°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Το DNA απομονώθηκε με χρήση του Puregene Core Kit A της Qiagen GmbH, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή.

Σε αποστειρωμένα erpendorf του 1,5 ml προστέθηκαν 10-20 mg λυοφιλοποιημένου μυκηλίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 600 μl διαλύματος λύσεως των κυττάρων και 3 μl πρωτεϊνάσης K. Έγινε καλή ανάδευση σε αναδευτήρα vortex και επώαση στους 55°C για 1 ώρα με ήπια ανακίνηση ανά 10 λεπτά. Κατόπιν προσθήκη 3 μl διαλύματος RNάσης A, ήπια ανακίνηση και επώαση για 15 λεπτά στους 37°C. Ακολούθησε προσθήκη 200 μl διαλύματος καθίζησης των πρωτεϊνών και γρήγορη ανάδευση για 20 δευτερόλεπτα σε αναδευτήρα vortex, ακολουθούμενη από επώαση στους 0°C για 10-15 λεπτά. Με το πέρας της επώασης έγινε φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 3 λεπτά και μεταφορά του υπερκειμένου σε αποστειρωμένα erpendorf των 1,5 ml στα οποία είχαν προστεθεί 600 μl ισοπροπανόλη και ήπια ανακίνηση για 1-2 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε πάλι φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 1 λεπτό και προσεκτική απομάκρυνση και απόρριψη του υπερκειμένου, ενώ ακολούθησε προσθήκη 600 μl αιθανόλης 70% και ήπια ανάδευση. Ακολούθως έγινε τρίτη φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 1 λεπτό και προσεκτική απομάκρυνση και απόρριψη του υπερκειμένου. Ακολούθησε στέγνωμα του πέλετ με εξάτμιση σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη 100 μl DNA hydration solution και ήπια ανάδευση. Τέλος έγινε επώαση για 1 ώρα στους 65°C και για ένα βράδυ (overnight) σε θερμοκρασία δωματίου. Η διατήρηση των πέλετ μέχρι τη χρήση έγινε στους -20°C

3.7.2. Ενίσχυση Τμήματος του Γονιδίου που Κωδικοποιεί την Β Υπομονάδα του Συμπλόκου II και Αλληλούχιση

Για την απόκτηση τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί την Β υπομονάδα του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας στο μύκητα *P. expansum* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (polymerase Chain Reaction- PCR). Συγκεκριμένα, επειδή στο συγκεκριμένο μύκητα δεν είναι γνωστή η αλληλουχία του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκφυλισμένων εκκινητών (Degenerate Primers DGP-F1 και DGP-R1), ο σχεδιασμός των οποίων στηρίχθηκε στις αλληλουχίες αμινοξέων CAMNI και ILNCSRTC, που είναι απόλυτα συντηρημένες μεταξύ των διαφόρων γενών μυκήτων (Avenot et al., 2011). Για την PCR χρησιμοποιήθηκε Platinum *Taq* DNA πολυμεράση, η οποία θερμάνθηκε στους 95°C για 3 λεπτά, και ακολούθησαν 40 κύκλοι ενίσχυσης με τη θερμοκρασία να ρυθμίζεται στους 94°C για 15 δευτερόλεπτα, 41°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 30 δευτερόλεπτα και τελική φάση επέκτασης στους 72°C για 10 λεπτά.

Πίνακας 5: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της σιδήρο-θειό πρωτεΐνης του μύκητα *Penicillium expansum*.

Εκκινητές	Αλληλουχία Εκκινητών (5'-3')	Αναμενόμενο μέγεθος (bp)
DGP-F1	TGYGCNATGAAYATCGA	456
DGP-R1	GCAKGTCCCTYGAGCARTTSAGA	

Τα προϊόντα της PCR διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% σε 1 x Tris-acetate-EDTA (TAE) και οπτικοποιήθηκαν μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Τα προϊόντα καθαρίστηκαν απευθείας από την πηκτή και ακολούθησε η αλληλούχισή τους στο Εργαστήριο Ανοσολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Για την αλληλούχιση επιλέχθηκαν 7 στελέχη του μύκητα *P. expansum*, εκ των οποίων τα 2 στελέχη (RD₁/w.t. και DSM/w.t.) ήταν τα αρχικά, ευαίσθητα στο boscalid, στελέχη και τα υπόλοιπα ανθεκτικά.

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που προέκυψαν από την αλληλούχιση σαρώθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Blast-X 2.2.26+ (Basic Local Alignment Search Tool), το οποίο χρησιμοποιεί κατάλληλο αλγόριθμο για την μετάφραση του γονιδίου και την αναζήτηση και σύγκριση ομόλογων αλληλουχιών αμινοξέων, καταχωρημένων στις βάσεις δεδομένων. Η στοίχιση των αποτελεσμάτων για τη σύγκρισή τους έγινε με το πρόγραμμα Clustal-W 2.1.

Με τις ως πάνω εργασίες απομονώθηκαν, ενισχύθηκαν και αλληλουχήθηκαν 547 βάσεις για κάθε στέλεχος.

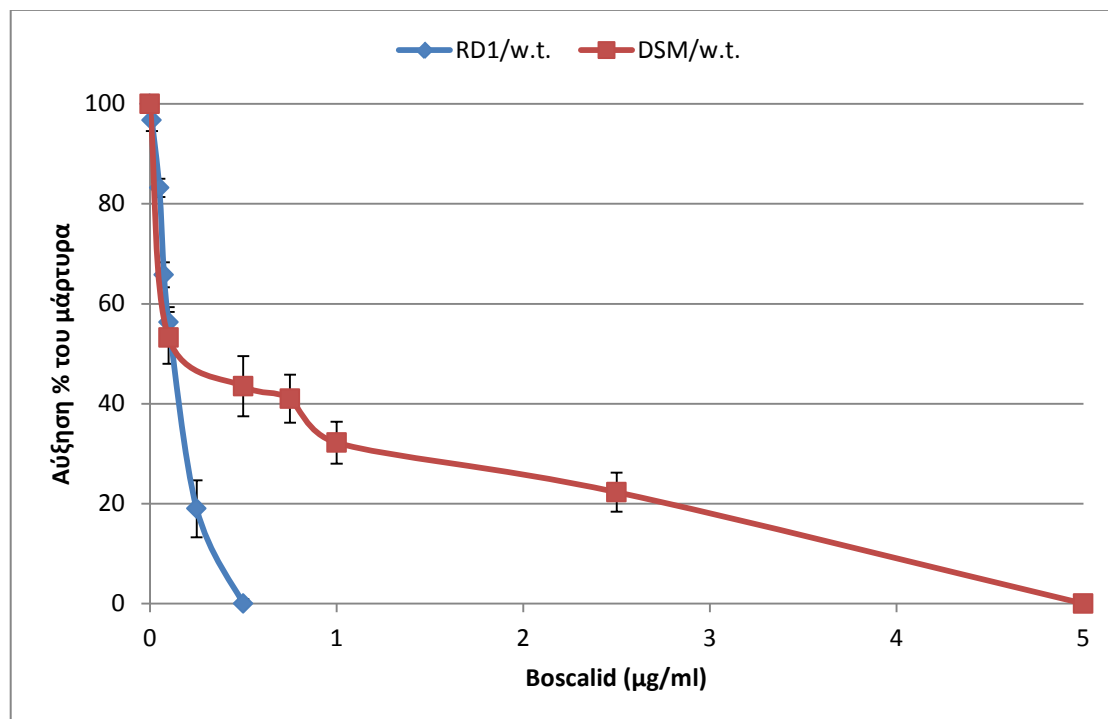
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΓΡΙΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΟΥΣ SDHIs ΚΑΙ ΑΛΛΟΥΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ

Αρχικά μελετήθηκε η ευαισθησία των αγρίων στελεχών του μύκητα *P. expansum* στους SDHIs και σε αντιπροσωπευτικά μυκητοκτόνα άλλων χημικών ομάδων. Η μελέτη αυτή έγινε με την εκτίμηση της επίδρασης των μυκητοκτόνων στη γραμμική αύξηση της διαμέτρου της αποικίας.

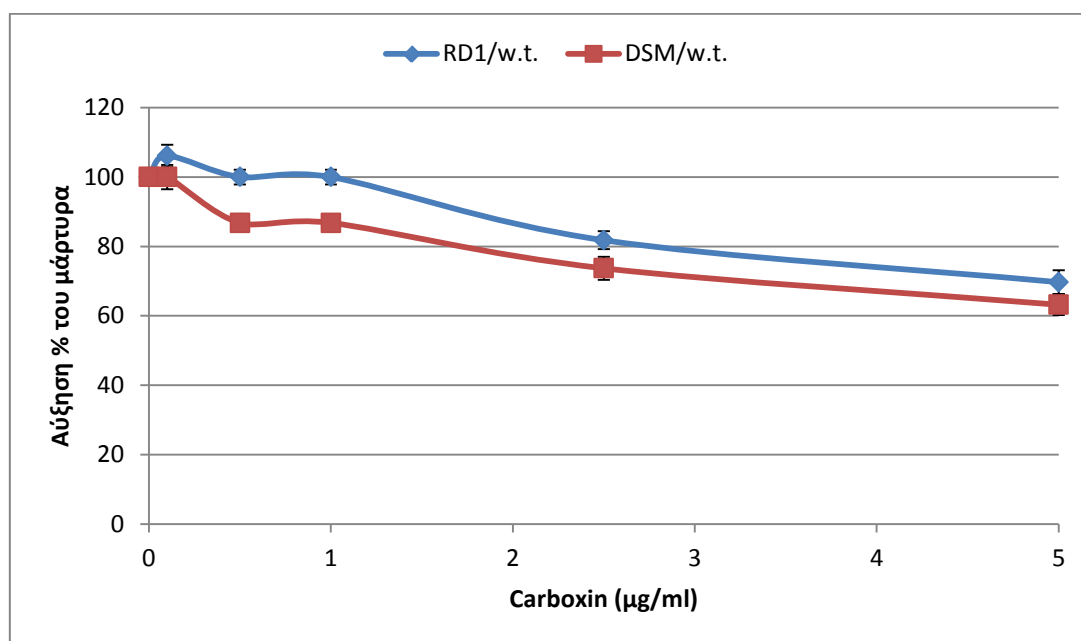
4.1.1. Ευαισθησία των Αγρίων Στελεχών στους SDHIs

Η ευαισθησία των στελεχών σε διάφορες συγκεντρώσεις του boscalid περιγράφεται από την ακόλουθη καμπύλη μυκητοτοξικότητας (Σχήμα 1). Στο στέλεχος RD₁ το boscalid φάνηκε να είναι πολύ αποτελεσματικό, αφού οι τιμές που προκάλεσαν 50 και 90% παρεμπόδιση (EC₅₀, EC₉₀) ήταν αντίστοιχα 0,12 και 0,3 μg/ml. Αντίθετα, η ευαισθησία του στελεχούς DSM ήταν χαμηλότερη κατά πολύ. Για το συγκεκριμένο στέλεχος οι αντίστοιχες τιμές EC₅₀ και EC₉₀ ήταν 0,15 και 4,1 μg/ml.

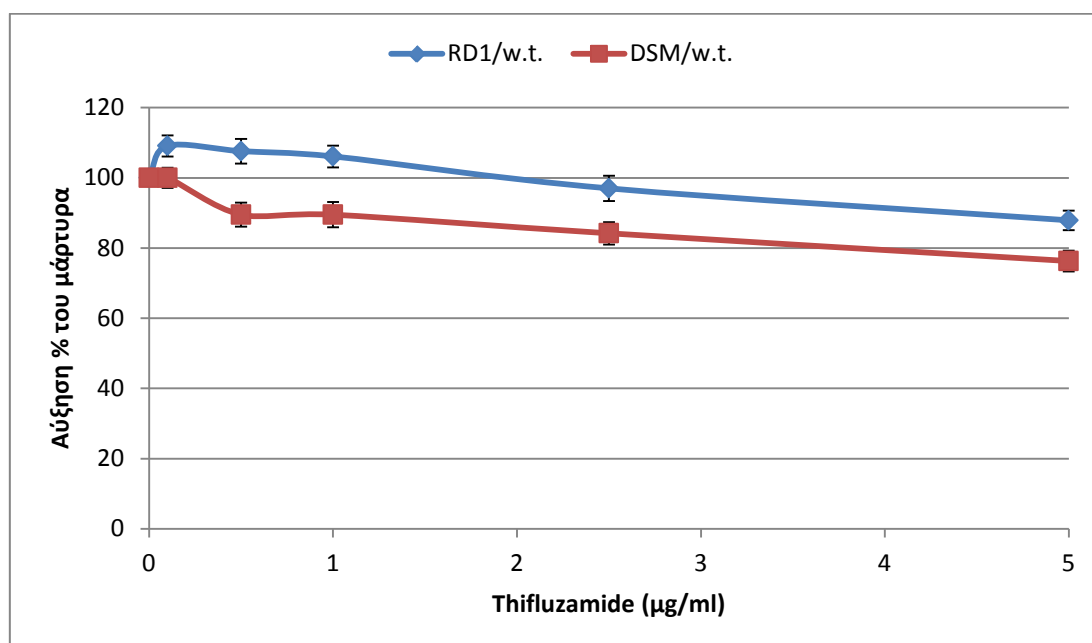


Σχήμα 1: Ευαισθησία των αγρίων στελεχών RD₁ και DSM του μύκητα *Penicillium expansum* στο boscalid σε υλικό ανάπτυξης MM μετά από 5 μέρες επώασης στους 22°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

Τόσο το carboxin όσο και το thifluzamide απεδείχθησαν αναποτελεσματικά για την αντιμετώπιση των αγρίων στελεχών του *P. expansum*, όπως φαίνεται και από τα Σχήματα 2 και 3. Δεν εντοπίστηκαν τιμές EC_{50} και EC_{90} για τα άγρια στελέχη στα μυκητοκτόνα αυτά. Τα δύο στελέχη παρουσίασαν την ίδια περίπου εικόνα, με πολύ μικρές διαφοροποιήσεις.

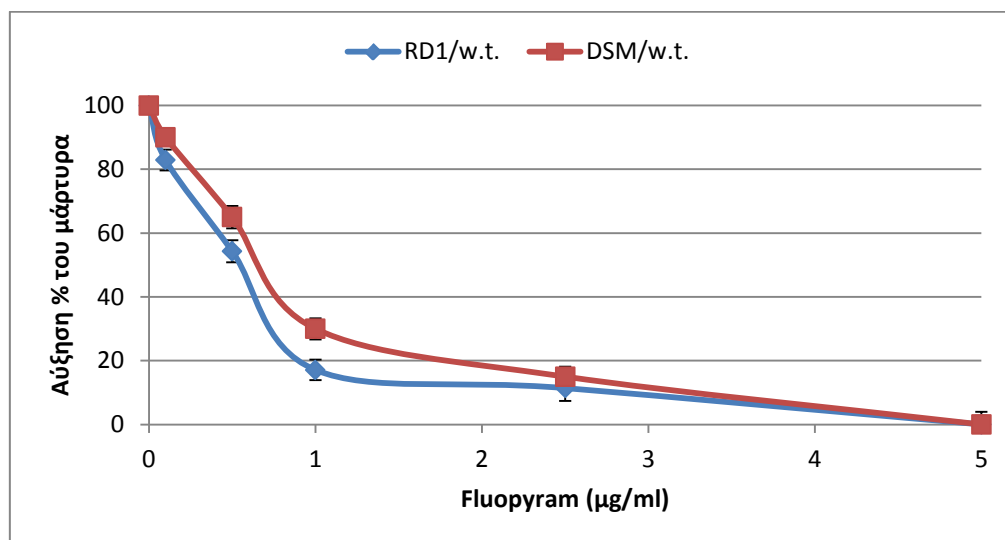


Σχήμα 2: Ευαισθησία των αγρίων στελεχών RD₁ και DSM του μύκητα *P. expansum* στο carboxin, σε υλικό ανάπτυξης MM, μετά από 5 μέρες επώασης στους 22°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

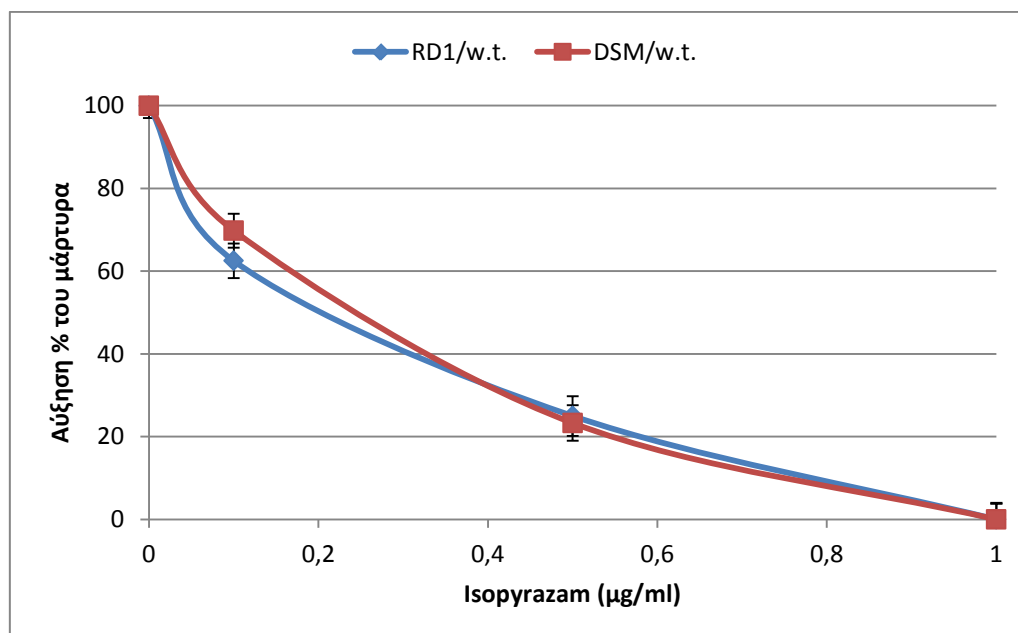


Σχήμα 3: Ευαισθησία των αγρίων στελεχών RD₁ και DSM του μύκητα *P. expansum* στο thifluzamide, σε υλικό MM, μετά από 5 μέρες επώασης στους 22°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

Στο fluopyram τα δύο άγρια στελέχη δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές στην ευαισθησία τους. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4 οι καμπύλες μυκητοτοξικότητας που εμφανίζουν είναι πολύ κοντά. Αυτό σημαίνει πως για το μεν στέλεχος RD₁ το fluopyram είναι λιγότερο αποτελεσματικό από το boscalid, ενώ για το στέλεχος DSM φαίνεται να έχει την ίδια αποτελεσματικότητα με το boscalid.



Σχήμα 4: Ευαισθησία των αγρίων στελεχών RD₁ και DSM του μύκητα *P. expansum* στο fluopyram, σε υλικό MM, μετά από 5 μέρες επώασης στους 22°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.



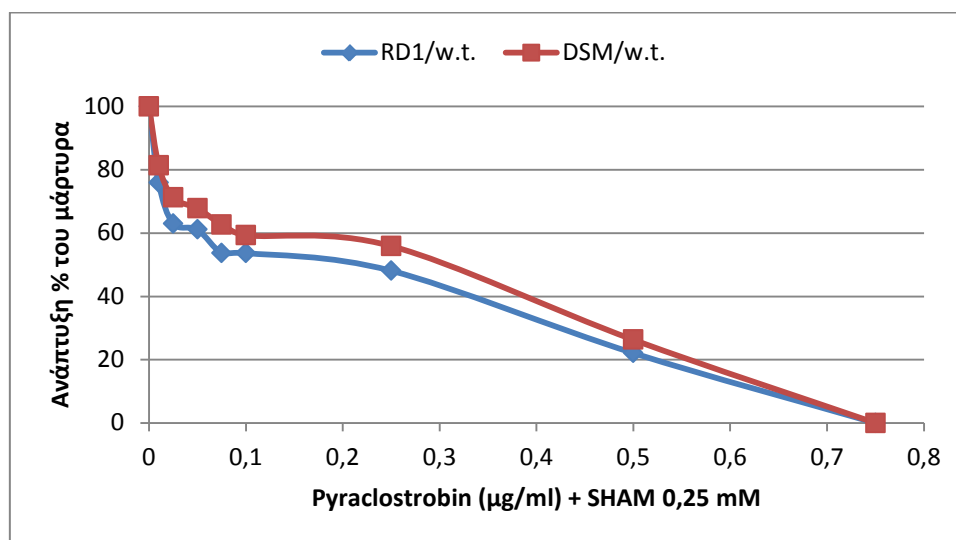
Σχήμα 2: Ευαισθησία των αγρίων στελεχών RD₁ και DSM του μύκητα *P. expansum* στο isopyrazam, σε υλικό MM, μετά από 5 μέρες επώασης στους 22°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

Στο isorygazam, τα δύο άγρια στελέχη παρουσίασαν ακριβώς την ίδια εικόνα, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 15. Τα δύο άγρια στελέχη παρουσίασαν πλήρη παρεμπόδιση στο 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, το οποίο υποδηλώνει αυξημένη ευαισθησία του στελέχους DSM στο isorygazam σε σχέση με το boscalid. Αντίθετα το στέλεχος RD₁ φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικό στο isorygazam σε σχέση με το boscalid.

4.1.2. Ευαισθησία των Αγρίων Στελεχών σε Παρεμποδιστές Άλλων Χημικών Ομάδων

Το pyraclostrobin δρα στο σύστημα III της αναπνευστικής αλυσίδας. Για να αποτραπεί μία πιθανή λανθασμένη μέτρηση λόγω ανάπτυξης εναλλακτικής αναπνευστικής οδού, χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με SHAM. Πειράματα τοξικότητας του SHAM υπέδειξαν ως ιδανική συγκέντρωσή του τα 0,25 mM.

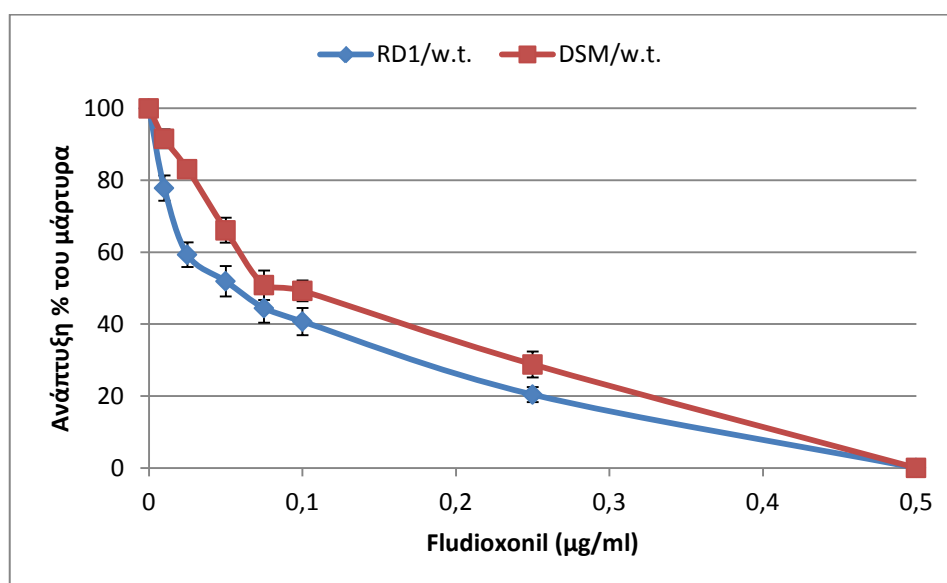
Στο Σχήμα 6 φαίνεται πως μεταξύ των δύο άγριων στελεχών δεν υπάρχει ιδιαίτερη διαφοροποίηση. Σε σχέση με το boscalid, φαίνεται πως το pyraclostrobin είναι πιο αποτελεσματικό στο στέλεχος DSM, ενώ στο στέλεχος RD₁ φαίνεται να έχει την ίδια αποτελεσματικότητα.



Σχήμα 6: Ευαισθησία των αγρίων στελεχών RD₁ και DSM του μύκητα *P. expansum* στο pyraclostrobin, με προσθήκη 0,25 mM SHAM, σε υλικό MM, μετά από 5 μέρες επώασης στους 22°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

Το fludioxonil ανήκει στα φαινυλοπυρρολικά μυκητοκτόνα, τα οποία δρουν στις κυτταρικές μεμβράνες, κατά πάσα πιθανότητα σε πρωτεϊνικές κινάσες όπως οι PK-III και c-AMP-PKA, που συμμετέχουν στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης της γλυκερόλης και του ωσμωτικού δυναμικού του κυττάρου (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

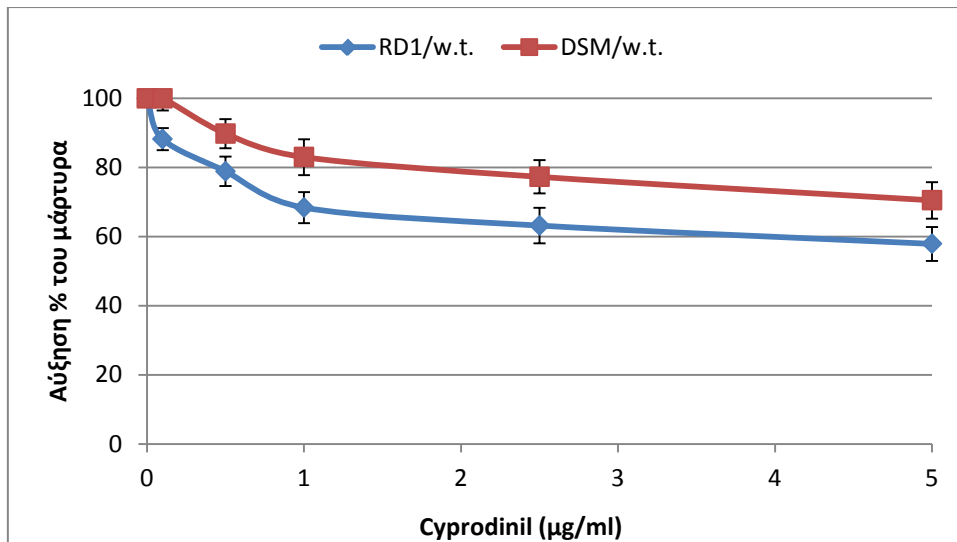
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 7, τα δύο άγρια στελέχη δεν διαφοροποιούνται μεταξύ τους ιδιαίτερα. Είναι εμφανές πως το fludioxonil είναι πολύ αποτελεσματικό και στα δύο στελέχη, παρουσιάζοντας τιμές EC_{50} 0,05 και 0,075 $\mu\text{g/ml}$ για τα στελέχη RD₁ και DSM αντίστοιχα, ενώ πλήρη παρεμπόδιση (MIC) παρουσιάστηκε στο 0,5 $\mu\text{g/ml}$ και για τα δύο στελέχη. Σε σύγκριση με την αποτελεσματικότητα του boscalid στα δύο αυτά στελέχη, φαίνεται πως για το στέλεχος RD₁ δεν υπάρχει διαφοροποίηση, ενώ το στέλεχος DSM φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητο στο fludioxonil.



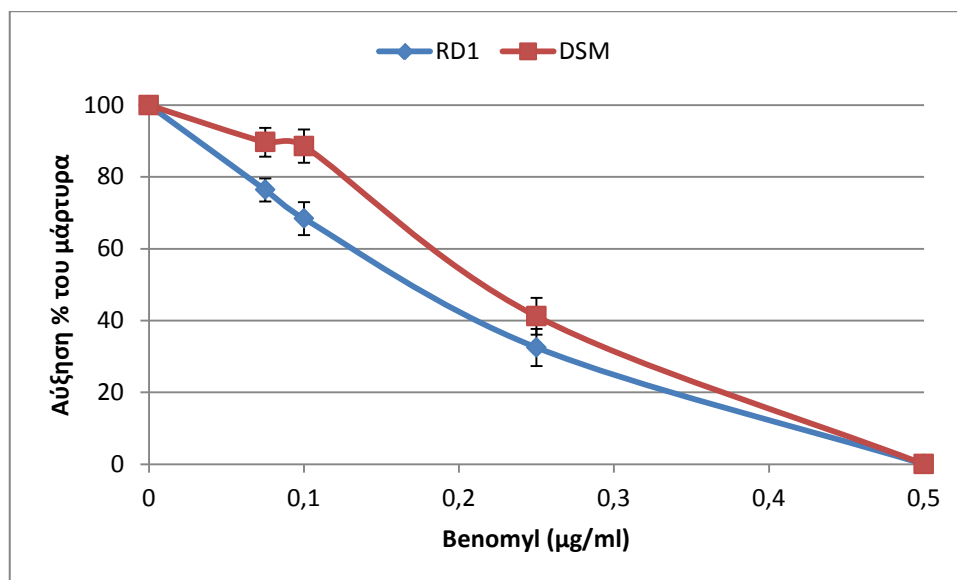
Σχήμα 7: Ευαισθησία των αγρίων στελεχών RD₁ και DSM του μύκητα *P. expansum* στο fludioxonil, σε υλικό MM, μετά από 5 μέρες επώασης στους 22°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

Το cyprodinil ανήκει στα ανιλνοπυριμιδινικά μυκητοκτόνα. Η δράση της ομάδας αυτής στηρίζεται στην αναστολή της βιοσύνθεσης της μεθειονίνης, με συνέπεια την αναστολή βλάστησης των σπορίων, την αναστολή ανάπτυξης του μυκηλίου και του σχηματισμού της πλάκας συγκράτησης κατά την προσβολή (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).

Για τα άγρια στελέχη του μύκητα *Penicillium expansum* το cyprodinil δεν ήταν πολύ αποτελεσματικό, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 8. Το στέλεχος DSM ήταν πιο ανθεκτικό από το RD₁. Η ακριβής τιμή EC_{50} για τα άγρια στελέχη ήταν στα 12 και 84 $\mu\text{g/ml}$ για το RD₁ και DSM αντίστοιχα, βάση των εξισώσεων των γραμμών τάσης που περιγράφουν τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Το boscalid απεδείχθη πολύ πιο αποτελεσματικό.



Σχήμα 8: Ευαισθησία των αγρίων στελεχών RD₁ και DSM του μύκητα *P. expansum* στο cyprodinil, σε υλικό MM, μετά από 5 μέρες επώασης στους 22°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.



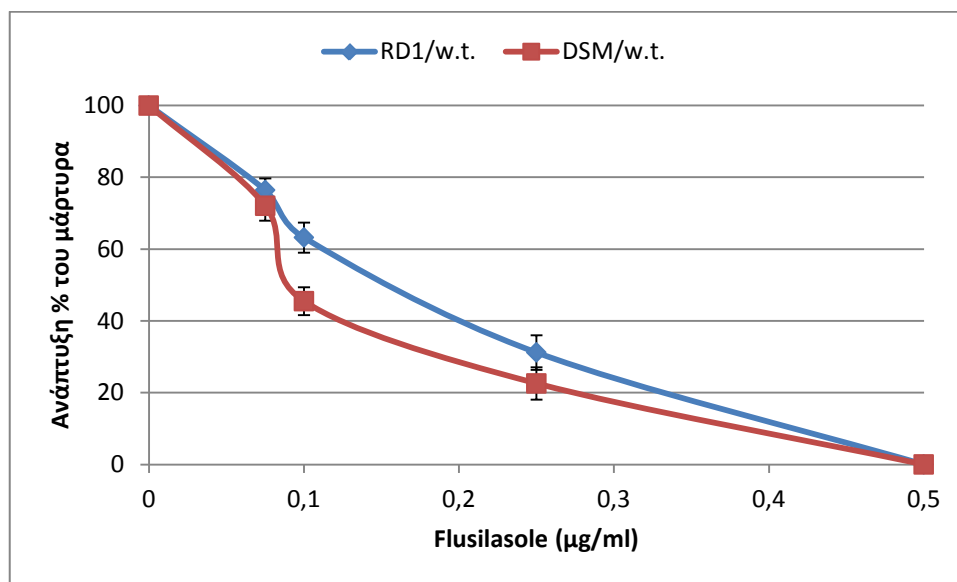
Σχήμα 9: Ευαισθησία των αγρίων στελεχών RD₁ και DSM του μύκητα *P. expansum* στο benomyl, σε υλικό MM, μετά από 5 μέρες επώασης στους 22°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

Το Benomyl ανήκει στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. Η συγκεκριμένη ομάδα φαρμάκων δρα στην μιτωτική διαίρεση παρεμποδίζοντας το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007).

Το benomyl απεδείχθη το ίδιο αποτελεσματικό και για τα 2 άγρια στελέχη του μύκητα *Penicillium expansum*. Για το στέλεχος DSM απεδείχθη πολύ πιο αποτελεσματικό από το boscalid, ενώ για το στέλεχος RD₁ εμφάνισε την ίδια αποτελεσματικότητα με το boscalid

Το flusilasole ανήκει στα Τριαζολικά μυκητοκτόνα, τα οποία παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση των στερολών των κυτταρικών μεμβρανών των μυκήτων.

Το flusilasole εμφάνισε την ίδια αποτελεσματικότητα και για τα δύο άγρια στελέχη. Όπως και στο benomyl, σε σχέση με το boscalid, το flusilasole απεδείχθη πιο αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση του DSM στελέχους, ενώ για το στέλεχος RD₁ οι δύο δραστικές παρουσίασαν την ίδια αποτελεσματικότητα



Σχήμα 10: Ευαισθησία των αγρίων στελεχών RD₁ και DSM του μύκητα *P. expansum* στο flusilasole, σε υλικό MM, μετά από 5 μέρες επώασης στους 22οC. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

4.1.3. Σύνοψη Αποτελεσμάτων Ευαισθησίας των Αγριων Στελεχών σε Παρεμποδιστές

Στον πίνακα 6, εμφανίζονται συγκεντρωμένες οι τιμές EC₅₀ και MIC για τα δύο άγρια στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή στους παρεμποδιστές που δοκιμάστηκαν.

Πίνακας 6: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα EC₅₀ και MIC των δύο αγρίων στελεχών του μύκητα *P. expansum* σε διάφορους παρεμποδιστές.

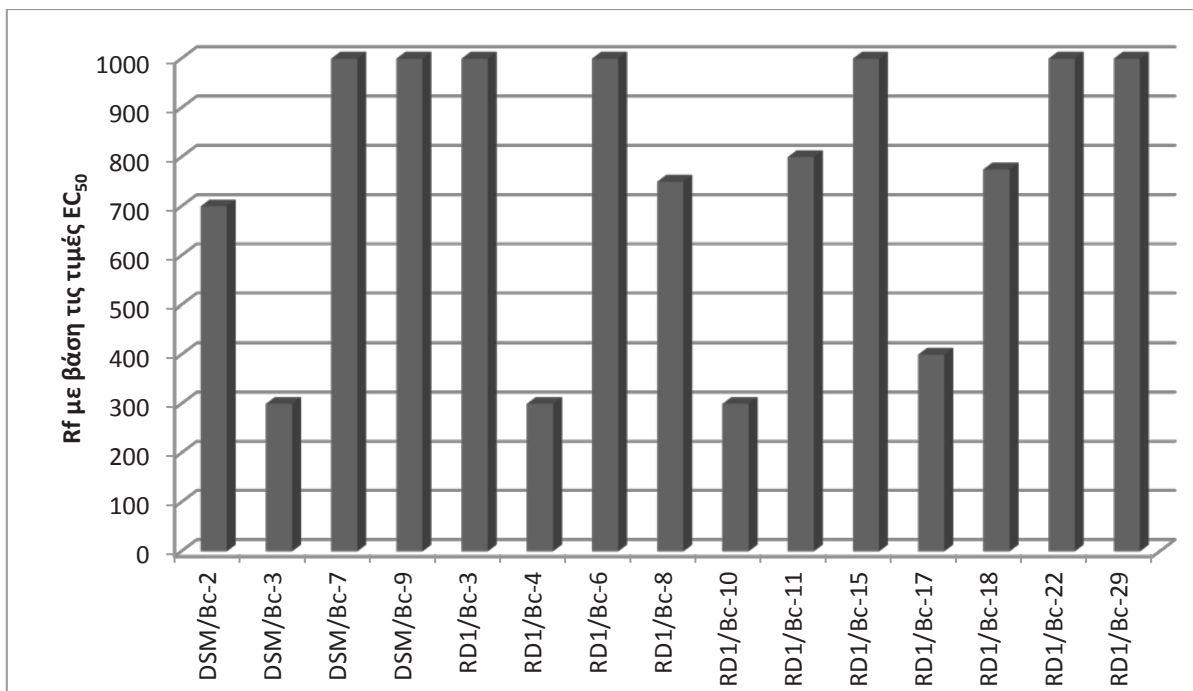
Μυκητοκτόνο	EC ₅₀ (μg/ml)		MIC (μg/ml)	
	RD ₁	DSM	RD ₁	DSM
boscalid	0,12	0,15	0,5	5
carboxin	-	-	-	-
thiﬂuzamide	-	-	-	-
fluopyram	0,55	0,7	5	5
isopyrazam	0,25	0,25	1	1
pyraclostrobin	0,15	0,3	0,75	0,75
fludioxonil	0,05	0,075	0,5	0,5
benomyl	0,17	0,23	0,5	0,5
cyprodinil	-	-	-	-
flusilasole	0,25	0,09	0,5	0,5

4.2. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΟ Boscalid ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *P. expansum*

Στελέχη του μύκητα *P. expansum* απομονώθηκαν με συχνότητα 10^{-6} μετά από μεταλλαγή με UV ακτινοβολία και επιλογή σε θρεπτικό υπόστρωμα Minimal Medium (MM) με boscalid συγκέντρωσης 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Συνολικά απομονώθηκαν 12 ανθεκτικά στελέχη για το DSM και 34 ανθεκτικά στελέχη για το RD₁. Από το σύνολο των στελεχών που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν 4 αντιπροσωπευτικά ανθεκτικά στελέχη που προέκυψαν από το DSM άγριο και 11 στελέχη από το RD₁ άγριο.

4.3. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΟ bodcalid

Όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν παρουσίαζαν υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας με παράγοντα ανθεκτικότητας (Rf με τιμές EC₅₀) από 300 έως και πάνω από 1000. Ο παράγοντας ανθεκτικότητας για το κάθε στέλεχος υπολογίστηκε με βάση το αντίστοιχο w.t. στέλεχος από το οποίο προέκυψε. Στο Σχήμα 11 φαίνονται οι παράγοντες ανθεκτικότητας των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή.



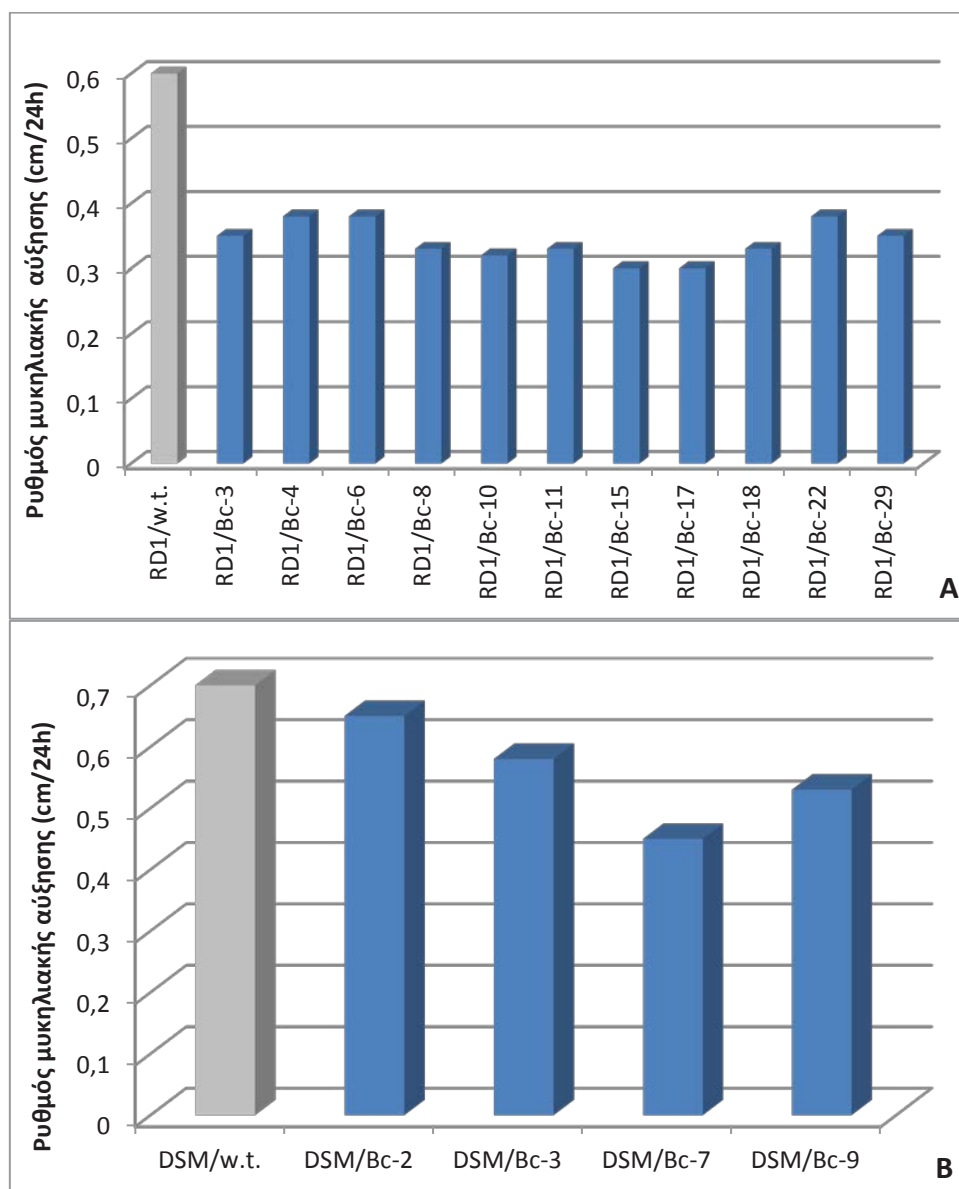
Σχήμα 11: Επίπεδο ανθεκτικότητας των ανθεκτικών στο boscalid στελεχών του *Penicillium expansum* με βάση τις τιμές EC₅₀.

4.4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ

Penicillium expansum

4.4.1. Ρυθμός Αύξησης

Η μελέτη του ρυθμού αύξησης των ανθεκτικών στο boscalid στελεχών έγινε με μέτρηση της γραμμικής αύξησης του μυκηλίου σε υλικό MM απουσία μυκητοκτόνου. Ο ρυθμός αύξησης των αγρίων και των ανθεκτικών στο boscalid στελεχών, φαίνεται στο Σχήμα 12.



Σχήμα 12: Μέσος ρυθμός μυκηλιακής αύξησης των Α) RD₁ και Β) DSM στελεχών του μύκητα *Penicillium expansum*, μετά από 7 ημερήσιες μετρήσεις. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

Όπως είναι εμφανές, οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας στο boscalid φαίνεται να έχουν επηρεάσει σε σημαντικό βαθμό τα στελέχη RD₁. Τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη παρουσιάζουν μείωση του ημερήσιου ρυθμού αύξησης κατά 37-50%. Αντίθετα, τα στελέχη DSM δε φαίνεται να επηρεάστηκαν σε τόσο μεγάλο βαθμό. Ο ημερήσιος ρυθμός αύξησης μειώθηκε κατά 7,1 με 35,7% σε σχέση με το άγριο στέλεχος.

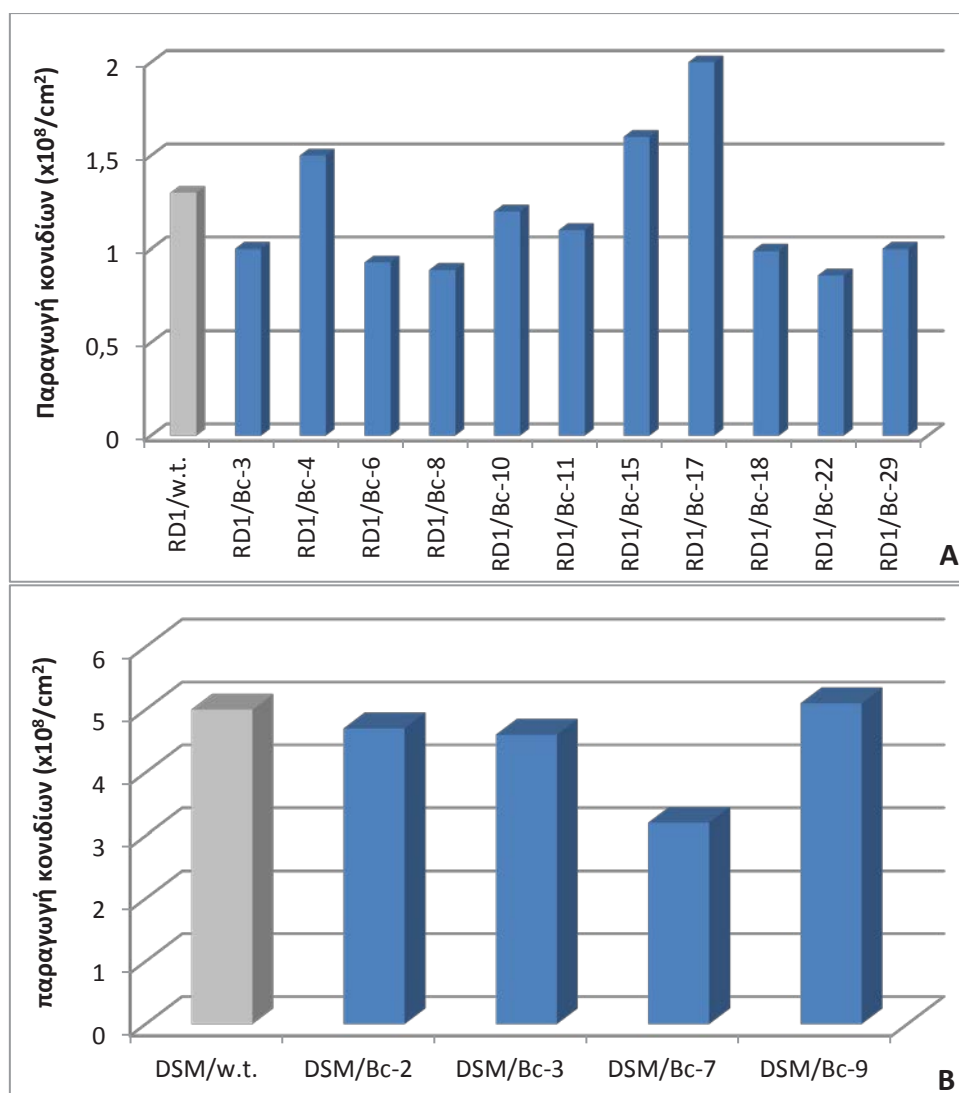
Άλλος ένας παράγοντας προσαρμοστικότητας είναι το ξηρό βάρος του μυκηλίου που αναπτύσσει το κάθε στέλεχος. Η μέτρηση και σύγκριση των ξηρών βαρών των στελεχών του μύκητα *P. expansum* έγινε *in vitro*. Στον πίνακα 7 φαίνεται το ξηρό βάρος κάθε στελέχους ανά cm². Τα περισσότερα στελέχη παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στο ξηρό βάρος σε σχέση με τα άγρια στελέχη. Εξαιρέσεις αποτελούν τα στελέχη RD₁/Bc-3, RD₁/Bc-6 και RD₁/Bc-15 τα οποία δεν παρουσιάζουν σημαντική μεταβολή σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Στον αντίποδα, τα στελέχη RD₁/Bc-10, RD₁/Bc-18 και DSM/Bc-2 παρουσιάζουν αύξηση του ξηρού βάρους ανά cm² πάνω από 100%.

Πίνακας 6: Ξηρό βάρος σε γραμμάρια μυκηλίου ανά cm² των στελεχών του μύκητα *Penicillium expansum*, μετά από επώαση 10 ημερών στους 22°C και ξήρανση για μία μέρα στους 85°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

Στέλεχος	Ξηρό Βάρος (g)
RD ₁ /w.t.	0,561
RD ₁ /Bc-3	0,672
RD ₁ /Bc-4	0,963
RD ₁ /Bc-6	0,459
RD ₁ /Bc-8	0,963
RD ₁ /Bc-10	1,163
RD ₁ /Bc-11	0,839
RD ₁ /Bc-15	0,583
RD ₁ /Bc-17	0,807
RD ₁ /Bc-18	1,123
RD ₁ /Bc-22	0,969
RD ₁ /Bc-29	0,939
DSM/w.t.	0,506
DSM/Bc-2	1,793
DSM/Bc-3	0,703
DSM/Bc-7	0,753
DSM/Bc-9	0,779

4.4.2. Παραγωγή και Βλάστηση Κονιδίων

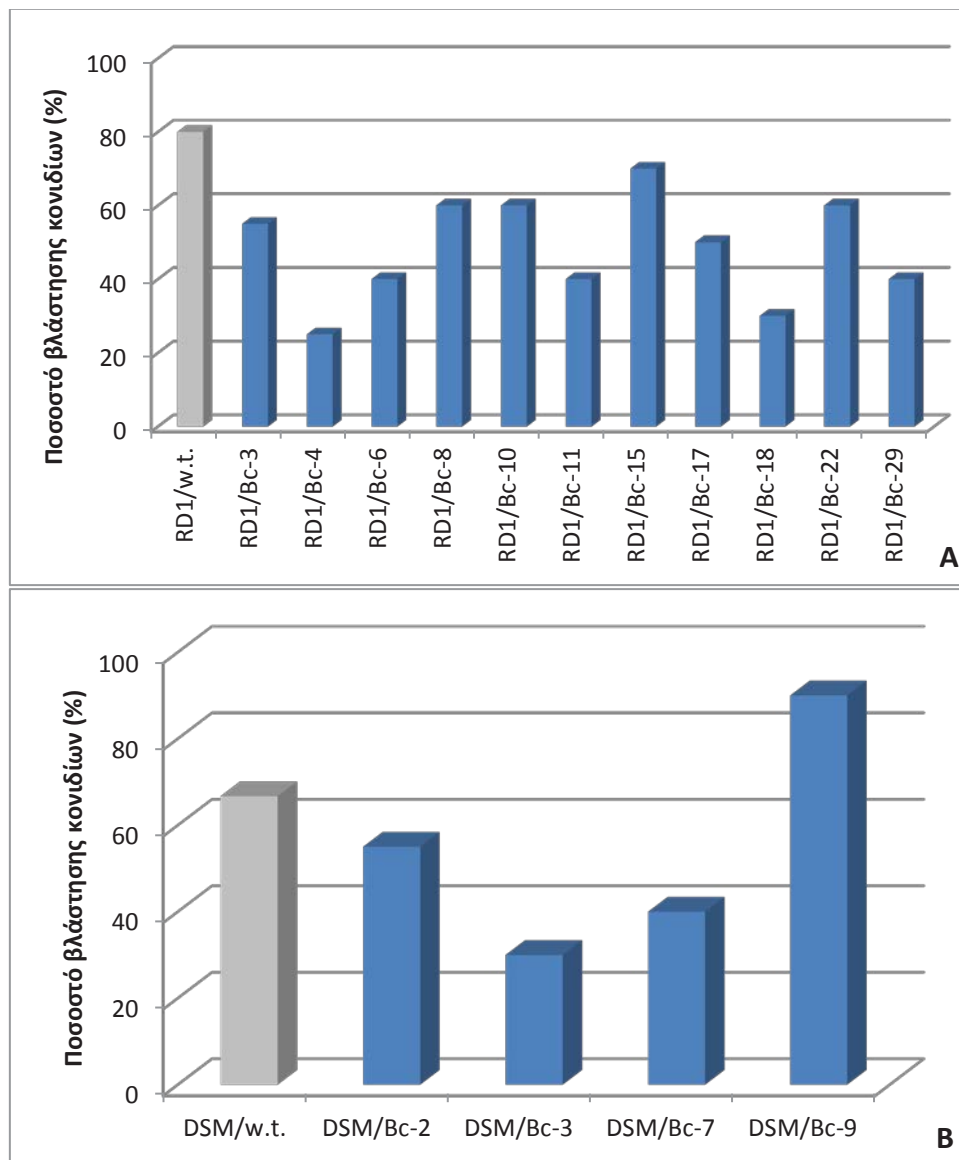
Η επίδραση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στο boscalid στην παραγωγή κονιδίων από τα στελέχη του μύκητα *Penicillium expansum* εκτιμήθηκε *in vitro*. Σε κάποια στελέχη παρατηρήθηκε μείωση της παραγωγής κονιδίων μέχρι και 32,5% (Σχήμα 13) για τα RD₁ στελέχη (RD₁/Bc-22) και μέχρι 36% για τα DSM στελέχη (DSM/Bc-7). Υπήρξαν όμως και στελέχη τα οποία παρουσίασαν αυξημένη παραγωγή κονιδίων, έως και 53,8% σε σχέση με το άγριο στέλεχος (RD₁/Bc-17).



Σχήμα 13: Ικανότητα παραγωγής κονιδίων των στελεχών του μύκητα *P. expansum* σε PDA, μετά από 7 ημέρες επώαση στους 22°C. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

Σημαντική παράμετρος για την επιδημιολογία της ασθένειας είναι και το ποσοστό βλάστησης των κονιδίων. Η επίδραση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στο boscalid στην ικανότητα βλάστησης των κονιδίων από τα στελέχη του μύκητα *P. expansum* εκτιμήθηκε *in vitro*. Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 14, για τα περισσότερα στελέχη RD₁ υπήρξε σημαντική μείωση στην ικανότητα βλάστησης των κονιδίων, ενώ μόνο για το στέλεχος RD₁/Bc-15 η μείωση δεν ήταν στατιστικώς

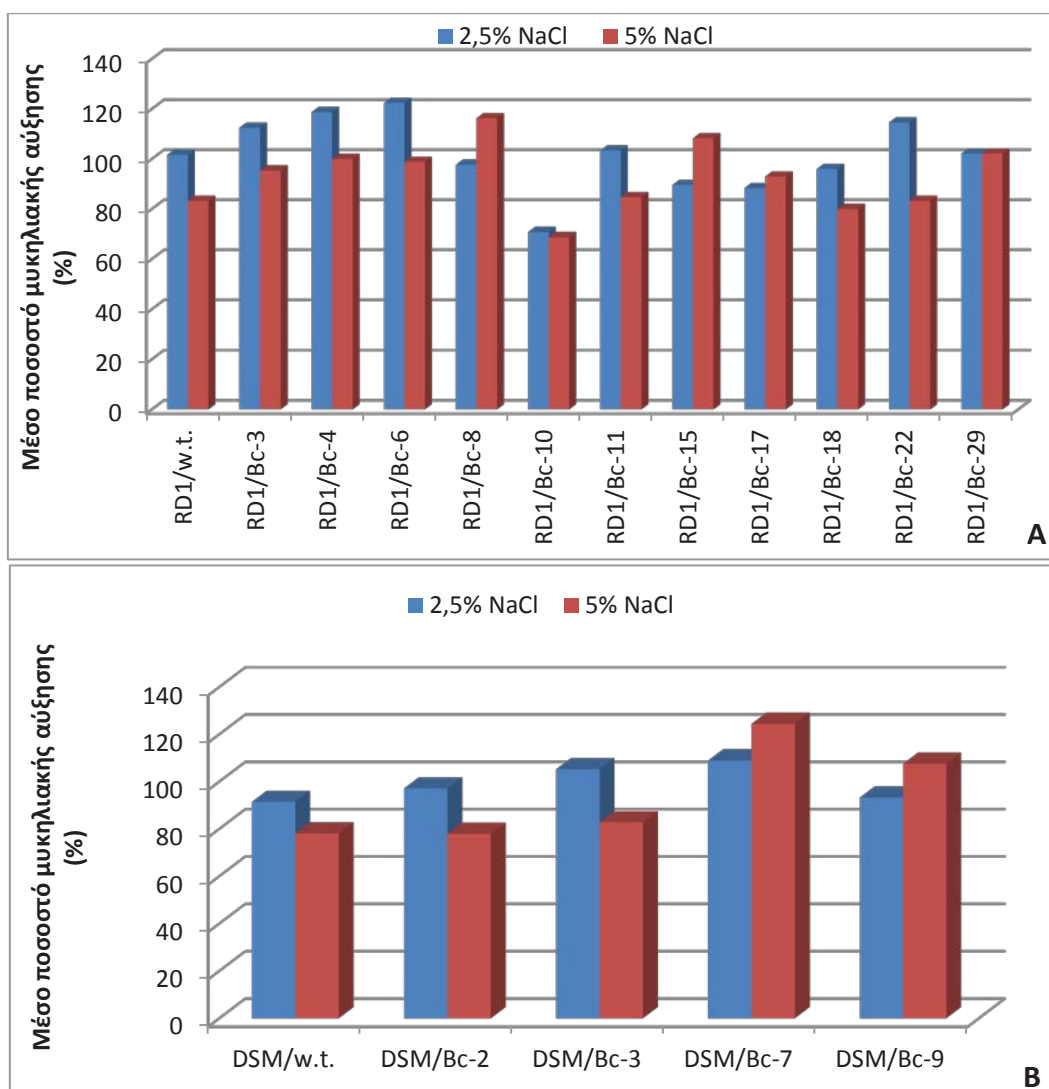
σημαντική. Για τα μισά στελέχη DSM η μείωση ήταν σημαντική (DSM/Bc-3 και DSM/Bc-7), για το DSM/Bc-2 δεν ήταν στατιστικώς σημαντική, ενώ το στέλεχος DSM/Bc-9 παρουσίασε σημαντική αύξηση στην ικανότητα βλάστησης κονιδίων.



Σχήμα 14: Ποσοστό βλάστησης κονιδίων των στελεχών του μύκητα *P. expansum* σε PDA, μετά από 8,5 ώρες επώαση στους 22οC. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

4.4.3. Επίδραση των Μεταλλαγών Ανθεκτικότητας στην Αντοχή στην Ωσμωτική Πίεση

Η επίδραση στην αντοχή των στελεχών στο ωσμωτικό στρες είναι μία παράμετρος προσαρμοστικότητας που επηρεάζει την ικανότητα επιβίωσης των στελεχών σε συνθήκες υψηλού ωσμωτικού δυναμικού, όπως ο χυμός και η σάρκα φρούτων που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Η επίδραση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στο boscalid στην ικανότητα ανάπτυξης των στελεχών του μύκητα *P. expansum* σε συνθήκες υψηλού ωσμωτικού δυναμικού εκτιμήθηκε *in vitro* με προσθήκη ποσοστού άλατος (NaCl) στο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα περισσότερα στελέχη δεν φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά ή επηρεάζονται θετικά από την ύπαρξη NaCl στο θρεπτικό υπόστρωμα (Σχήμα 15). Μόνο το στέλεχος RD₁/Bc-10 παρουσίασε μικρή ευαισθησία στο υψηλό ωσμωτικό δυναμικό.



Σχήμα 15: Ποσοστό μυκηλιακής αύξησης των στελεχών του μύκητα *P. expansum* σε θρεπτικό υπόστρωμα MM, παρουσία 2,5% και 5% NaCl, μετά από 5 ημέρες επάωση στους 22°C. Τα ποσοστά αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

4.4.4. Φυτοπαθογόνος Ικανότητα

Η παθογόνος ικανότητα ελέγχθηκε σε σχέση με αυτή των αγρίων στελεχών, πραγματοποιώντας τεχνητές μολύνσεις σε μήλα της ποικιλίας Red Delicious. Για τη συνολική εκτίμηση της φυτοπαθογόνου ικανότητας των στελεχών έγιναν τρεις διαφορετικές μετρήσεις. Στον πίνακα 8 εμφανίζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων της παθογόνου ικανότητας και του ποσού ασθeneίας που προκαλεί το κάθε στέλεχος.

Παθογόνος ικανότητα

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 8, τα στελέχη δεν παρουσίασαν διακυμάνσεις. Όλα τα στελέχη διατήρησαν πλήρως την ικανότητά τους να προκαλούν ασθeneία.

Παθογόνος Δύναμη

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 8, τα στελέχη DSM προκαλούν μεγαλύτερο ποσό ασθeneίας από τα στελέχη RD₁. Τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη RD₁ φαίνονται να προκαλούν μεγαλύτερο ποσό ασθeneίας από το άγριο στέλεχος, με εξαίρεση το στέλεχος RD₁/Bc-22, το οποίο υστερεί ελαφρώς. Τα στελέχη DSM φαίνεται πως προκαλούν ποσό ασθeneίας λίγο μεγαλύτερο αυτού του αγρίου στελέχους, με εξαίρεση το στέλεχος DSM/Bc-7 που υστερεί.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα μετρήσεων παθογόνου ικανότητας και δύναμης που προκαλούν τα στελέχη του μύκητα *P. expansum* σε μήλα της ποικιλίας Red Delicious. Οι τιμές των αποτελεσμάτων της παθογόνου δύναμης αποτελούν το μέσο όρο από δεκαέξι επαναλήψεις.

Παθογόνος Ικανότητα και Δύναμη			
Στέλεχος	Παθογόνος Ικανότητα	Παθογόνος Δύναμη	
		Σήψη (cm)	Βαθμός
RD ₁ /w.t.	16/16	4,1	3
RD ₁ /Bc-3	16/16	4,6	4
RD ₁ /Bc-8	16/16	4,3	3
RD ₁ /Bc-10	16/16	4,5	3,5
RD ₁ /Bc-15	16/16	4,6	3,5
RD ₁ /Bc-17	16/16	4,9	4
RD ₁ /Bc-22	16/16	3,9	2
DSM/w.t.	16/16	5,2	4
DSM/Bc-2	16/16	5,5	4
DSM/Bc-7	16/16	5	4
DSM/Bc-9	16/16	5,3	4



Εικόνα 15: Σύγκριση ανάπτυξης και προκληθείσας σήψης μεταξύ αγρίου και ανθεκτικού στο boscalid στελεχών RD₁ (επάνω), DSM (μέση) και μεταξύ των δύο αγρίων στελεχών (κάτω) του μύκητα *P. expansum* μετά από τεχνητή μόλυνση μήλου και επώαση για 10 μέρες σε συνθήκες περιβάλλοντος.

Τα αποτελέσματα τόσο της παθογόνου ικανότητας όσο και του ποσού ασθενείας που προκαλούν τα στελέχη του μύκητα *P. expansum*, υποδεικνύουν πως οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας δεν προκαλούν σημαντική μείωση στην ικανότητα του μύκητα να προκαλεί ασθένεια. Αντίθετα, είναι πιθανό να αυξηθεί ελαφρώς η ένταση της ασθενείας που προκαλείται.

4.4.5. Διασταυρωτή Ανθεκτικότητα

Κατά το χαρακτηρισμό των ανθεκτικών στο boscalid στελεχών του μύκητα *P. expansum* έγιναν πειράματα διερεύνησης πιθανών σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας του boscalid με άλλα μυκητοκτόνα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μυκητοκτόνα της ομάδας των SDHIs, αλλά και μυκητοκτόνα από διαφορετικές χημικές ομάδες, με διάφορους μηχανισμούς δράσης. Για το σκοπό αυτό έγιναν πειράματα μυκητοτοξικότητας, όπως αυτά αναφέρονται και περιγράφονται στο κεφάλαιο 3.4.

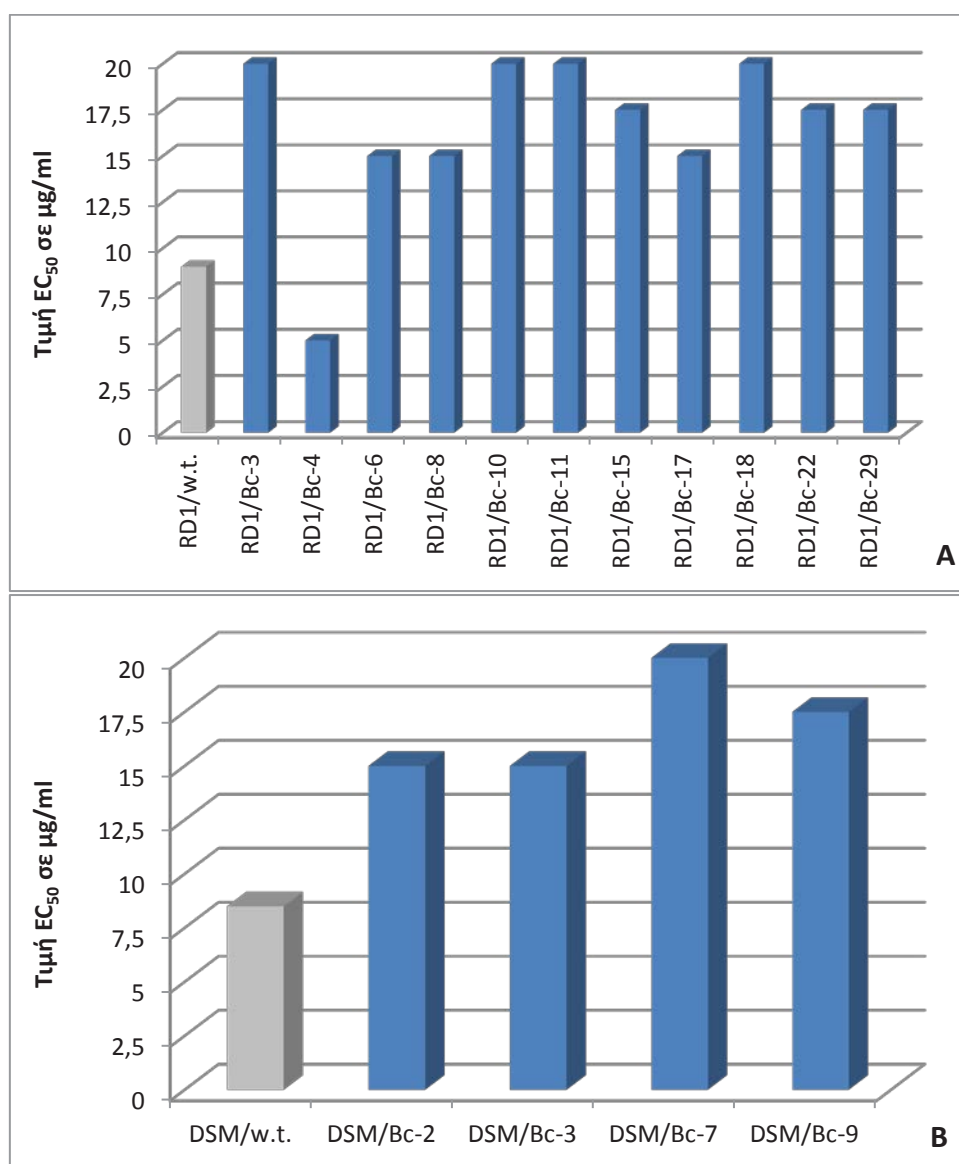
Για τα είδη των γενών *Penicillium* και *Aspergillus*, δεν γίνονται ειδικοί χειρισμοί στην γεωργική πράξη. Η αντιμετώπισή τους γίνεται ταυτόχρονα με την αντιμετώπιση του μύκητα *Botrytis cinerea* τόσο προσυλλεκτικά όσο και μετασυλλεκτικά. Για το λόγο αυτό, τα μυκητοκτόνα άλλων ομάδων που χρησιμοποιήθηκαν έγινε προσπάθεια να ανήκουν κατά το δυνατό στα μόρια τα οποία χρησιμοποιούνται στην πράξη για τις προσβολές αυτές. Τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά ήταν το flusilasole από DMIs, το fludioxonil από φαινυλοπυρρολικά, το cyprodinil από ανιλοπυριμιδίνες και το benomyl από βενζιμιδαζολικά.

Πίνακας 8: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα πειραμάτων διασταυρωτής ανθεκτικότητας.

Μυκητοκτόνο	EC ₅₀ αγρίων (µg/ml)		EC ₅₀ ανθεκτικών στο boscalid (µg/ml)														
	RD1	DSM	RD1 -3	RD1 -4	RD1 -6	RD1 -8	RD1 -10	RD1 -11	RD1 -15	RD1 -17	RD1 -18	RD1 -22	RD1 -29	DSM -2	DSM -3	DSM -7	DSM -9
carboxin	9	8,5	20	5	15	15	20	20	17,5	15	20	17,5	17,5	15	15	20	17,5
thiifluzamide	15	12,5	18,5	15	17,5	12,5	15	17,5	15	15	15	17,5	15	17,5	15	18,5	17,5
fluopyram	0,55	0,7	0,18	6	5,7	0,15	0,15	0,14	0,15	0,15	0,13	0,13	0,13	6	0,75	0,7	0,7
isopyrazam	0,25	0,25	10	10	8,5	10	7,5	8	10	10	8,5	8,5	10	7,5	7,5	8,5	8,5
pyraclostrobin	0,15	0,3	0,05	0,05	0,05	0,04	0,03	0,08	0,04	0,03	0,03	0,04	0,04	0,2	0,08	0,07	0,05
fludioxonil	0,05	0,08	0,08	0,08	0,1	0,15	0,1	0,05	0,1	0,1	0,07	0,1	0,08	0,07	0,1	0,15	0,1
benomyl	0,17	0,23	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
cyprodinil	12	84	3	4	5	4	4,5	4	4	3,75	2,5	5	4	3,75	4	3,75	5
flusilasole	0,15	0,09	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,1	0,1	0,1	0,1

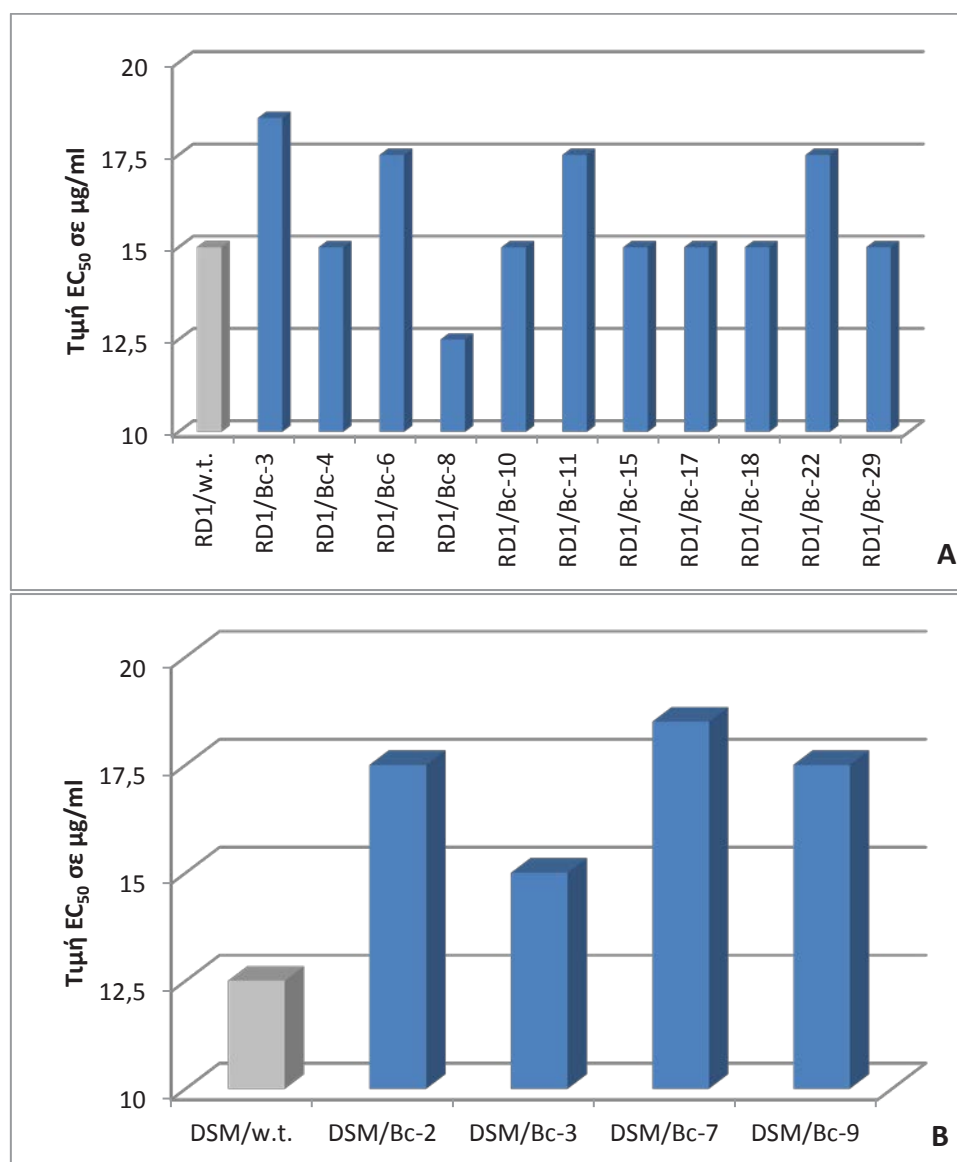
Μυκητοκτόνα με Δράση Στην Αναπνευστική Αλυσίδα

Στο Σχήμα 16, φαίνεται πως τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη είχαν αυξημένη αντοχή στο carboxin, με τιμή EC_{50} που ξεπερνά αυτή των αγρίων. Όλα σχεδόν τα στελέχη παρουσίασαν Rf μεταξύ 1,5 και 2,5 με βάση την EC_{50} , αν και οι τιμές αυτές δεν είναι επαρκείς για το χαρακτηρισμό του φαινομένου ως σχέση διασταυρωτής ανθεκτικότητας. Εξάιρεση αποτελεί το στέλεχος RD₁/Bc-4, το οποίο παρουσίασε αυξημένη ευαισθησία σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Εμφανίζει Rf=0,56, το οποίο υποδηλώνει σχέση αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας.



Σχήμα 36: Σύγκριση των τιμών EC_{50} των στελεχών του μύκητα *P. expansum* στο carboxin, μετά από 5 μέρες επώαση στους 22°C.

Στο Σχήμα 17 φαίνεται η αντίστοιχη σύγκριση τιμών EC_{50} για το thifluzamide. Όπως γίνεται φανερό, τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή και στο thifluzamide, χωρίς όμως να μπορεί να χαρακτηριστεί ως σχέση διασταυρωτής ανθεκτικότητας ($Rf < 1,5$). Το στέλεχος RD₁/Bc-8 φαίνεται να έχει ελαφρώς μειωμένη τιμή EC_{50} και παρουσιάζει $Rf = 0,83$.



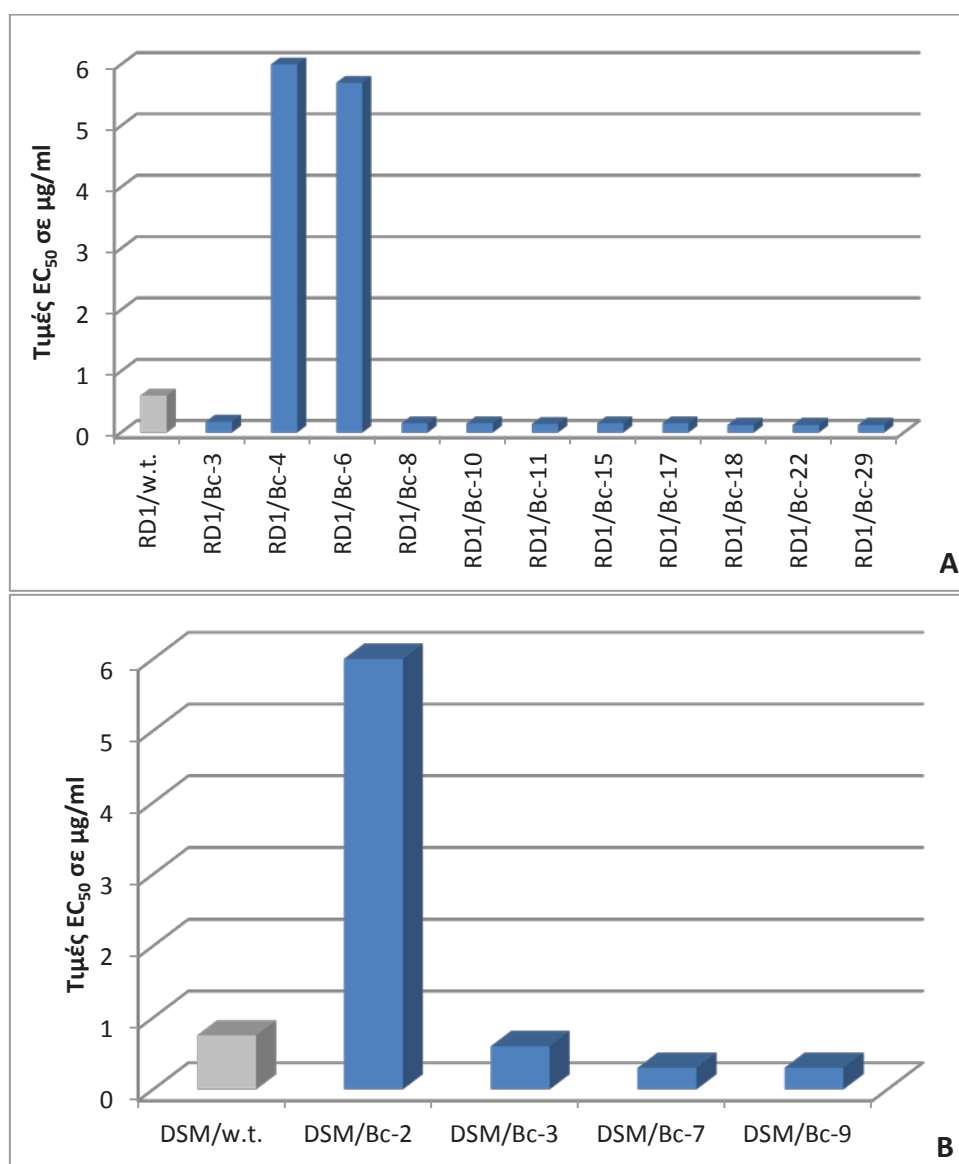
Σχήμα 17: Σύγκριση των τιμών EC_{50} των στελεχών του μύκητα *P. expansum* στο thifluzamide, μετά από 5 μέρες επώαση στους 22°C.

Στο fluogram, τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη παρουσίασαν ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις σε σχέση με τα αποτελέσματα των αγρίων στελεχών.

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 18, σε όλα τα RD₁ στελέχη παρουσιάστηκε κάποια σχέση διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ boscalid και fluogram. Συγκεκριμένα, τα στελέχη RD₁/Bc-4 και RD₁/Bc-6 εμφάνισαν θετική σχέση διασταυρωτής ανθεκτικότητας, με Rf 10 και 9,5 αντίστοιχα. Αντίθετα, όλα τα

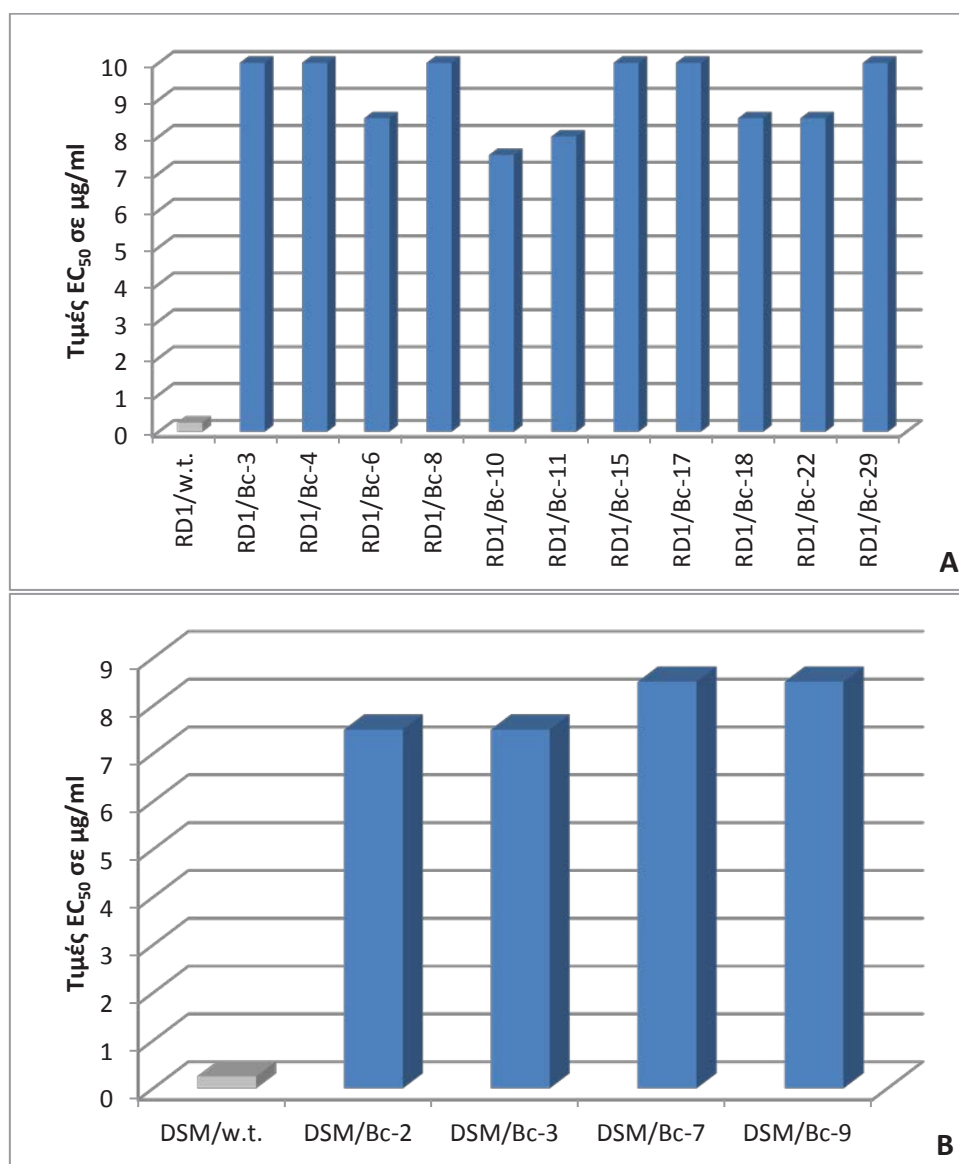
υπόλοιπα στελέχη παρουσίασαν αρνητική σχέση διασταυρωτής ανθεκτικότητας, με Rf κάτω από 0,5. Στο στέλεχος RD₁/Bc-2 παρουσιάστηκε πιο έντονα το φαινόμενο αυτό, με Rf 0,29.

Σε ότι αφορά τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη DSM, η ευαισθησία των περισσότερων στελεχών ήταν μεγαλύτερη από αυτή του αγρίου στελέχους, με Rf 0,4 για τα στελέχη DSM/Bc-7 και DSM/Bc-9 και 0,8 για το στέλεχος DSM/Bc-3. Εξαιρεση ήταν το στέλεχος DSM/Bc-2, στο οποίο παρουσιάστηκε αυξημένη ανθεκτικότητα στο fluoqram, με Rf=8.



Σχήμα 18: Σύγκριση των τιμών EC₅₀ στελεχών του μύκητα *P. expansum* στο fluoqram, μετά από 5 μέρες επώαση στους 22°C.

Στα πειράματα που έγιναν με το isorygazam, όλα ανεξαιρέτως τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη παρουσίασαν πολύ αυξημένη ανθεκτικότητα, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 19. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει μία γενικευμένη θετική σχέση διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ του boscalid και του isorygazam. Το φαινόμενο της θετικής σχέσης διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των δύο αυτών μορίων δε φαίνεται να έχει παρατηρηθεί στο παρελθόν.

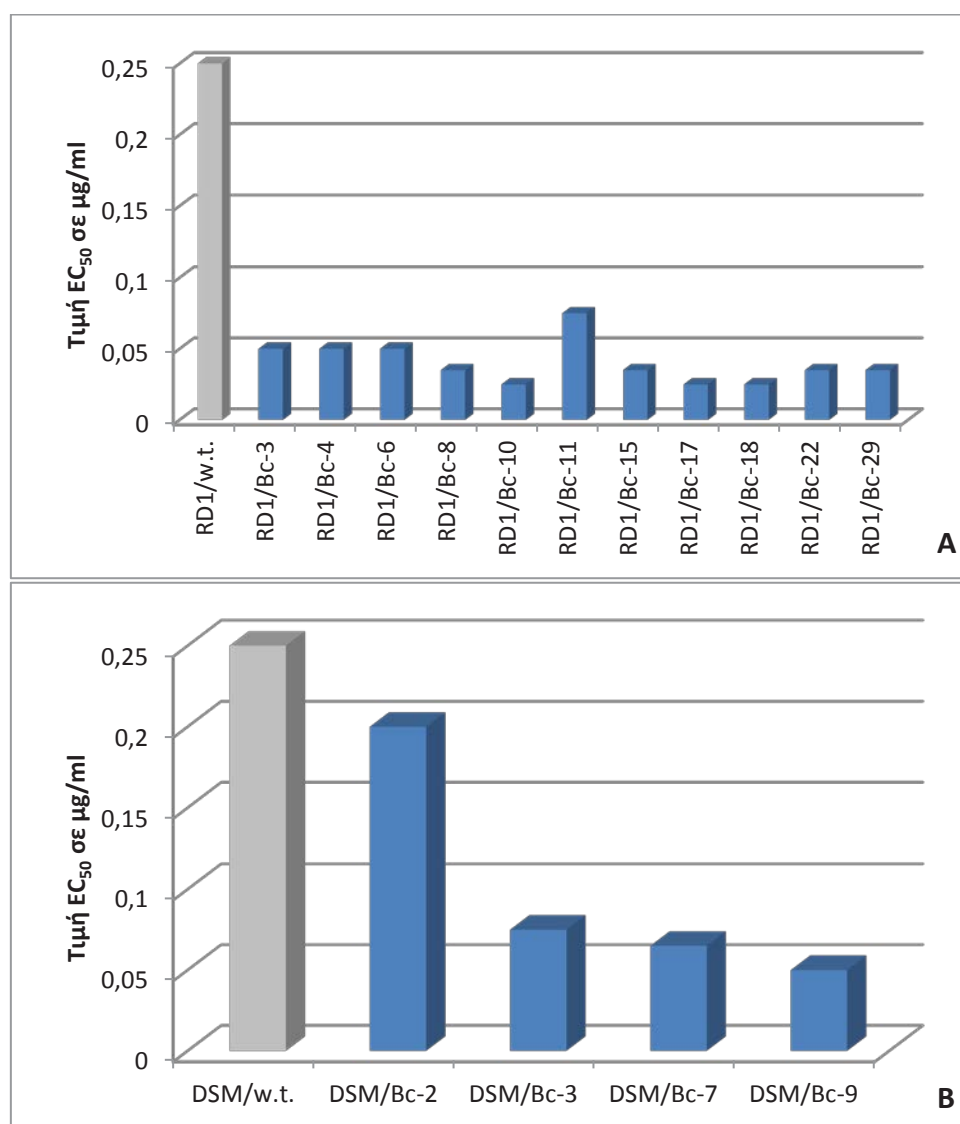


Σχήμα 19: Σύγκριση των τιμών EC₅₀ των στελεχών του μύκητα *P. expansum* στο isorygazam, μετά από 5 μέρες επώαση στους 22°C.

Αξίζει να σημειωθεί πως οι τιμές των EC₅₀ που αναγράφονται ως 10 µg/ml είναι ενδεικτικές και πολύ πιθανό να αναφέρονται σε τιμές άνω των 10 µg/ml, αφού στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ως ανώτατη συγκέντρωση δραστικής ουσίας τα 10 µg/ml και δεν εμφανίστηκε 50% παρεμπόδιση στο ρυθμό ανάπτυξης των στελεχών

αυτών. Τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο isorgrazam με Rf από 30 (RD₁/Bc-10, DSM/Bc-2, DSM/Bc-3) μέχρι και πάνω από 40 (RD₁/Bc-3, RD₁/Bc-4, RD₁/Bc-8, RD₁/Bc-15, RD₁/Bc-17, RD₁/Bc-29).

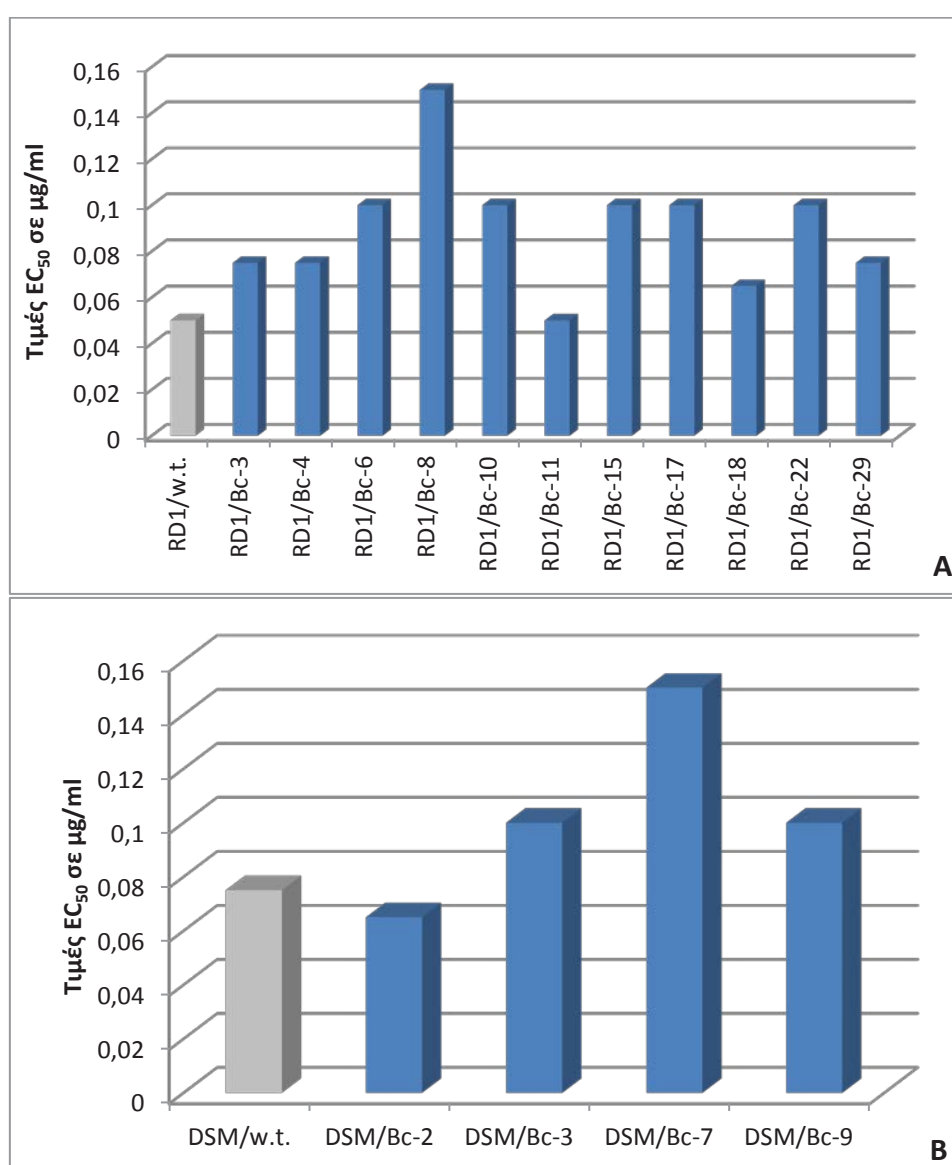
Στο σχήμα 20 φαίνεται η μεγάλη αρνητική σχέση διασταυρωτής ανθεκτικότητας στο pyraclostrobin που εμφανίστηκε με την μεταλλαγή ανθεκτικότητας στο boscalid. Ο μεγαλύτερος συντελεστής Rf που παρουσιάζουν τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη είναι 0,8 (DSM/Bc-2). Αντίθετα τα περισσότερα στελέχη παρουσιάζουν πολύ μικρούς συντελεστές, οι οποίοι φτάνουν μέχρι και το 0,1 (RD₁/Bc-10, RD₁/Bc-17, RD₁/Bc-18).



Σχήμα 204: Σύγκριση των τιμών EC₅₀ των στελεχών του μύκητα *P. expansum* στο pyraclostrobin, με προσθήκη 0,25 mM SHAM, μετά από 5 μέρες επώαση στους 22°C.

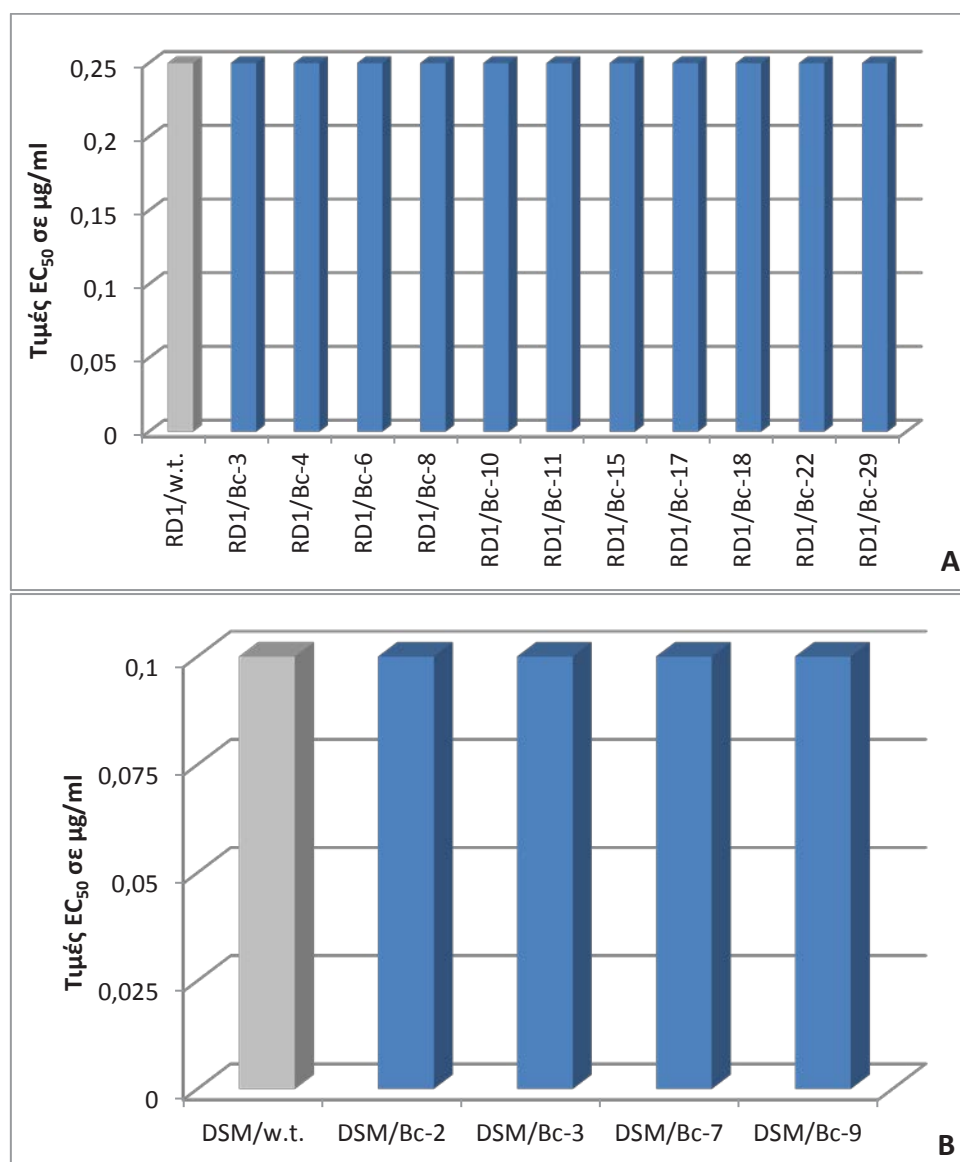
Μυκητοκτόνα με Δράση σε Άλλα Υποκυτταρικά Συστήματα

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 21, στο φαινολοπυρρολικό μυκητοκτόνο fludioxonil τα περισσότερα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη παρουσίασαν τιμές EC_{50} ελαφρώς διαφοροποιημένες σε σχέση με του αντίστοιχου αγρίου. Το στέλεχος RD₁/Bc-11 παρουσιάζει τιμές ίδιες με του αγρίου και το DSM/Bc-2 ελαφρώς χαμηλότερη. Τα περισσότερα όμως παρουσιάζουν ελαφρώς αυξημένη ανθεκτικότητα, σύμφωνα με την τιμή EC_{50} που εμφανίζουν. Η Rf σε σχέση με την EC_{50} για τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη φτάνει μέχρι και το 3. Αντίθετα, μία διερεύνηση της τιμής MIC των στελεχών φανερώνει ομοιότητα σε όλα σχεδόν τα στελέχη, με MIC στα 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Εξάιρεση αποτελεί μόνο το στέλεχος RD₁/Bc-8, το οποίο εμφανίζει MIC στα 0,75 $\mu\text{g/ml}$.



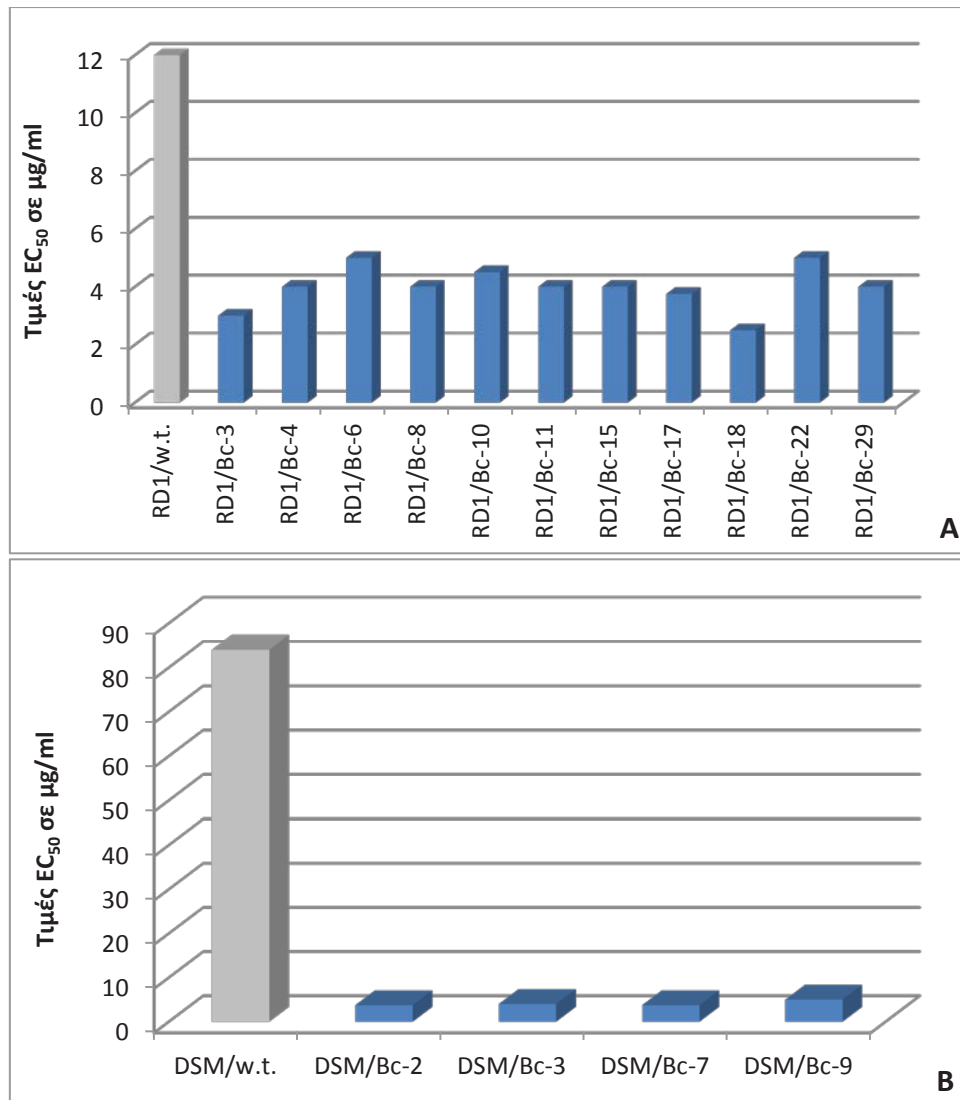
Σχήμα 21: Σύγκριση των τιμών EC_{50} των στελεχών του μύκητα *P. expansum* στο μυκητοκτόνο fludioxonil, μετά από 5 μέρες επώαση στους 22°C.

Στο Σχήμα 22 φαίνονται οι τιμές EC_{50} όλων των στελεχών στο τριαζολικό μυκητοκτόνο flusilazole. Όπως είναι εμφανές τα στελέχη δεν παρουσίασαν αποκλίσεις από τις τιμές των αντίστοιχων αγρίων στελεχών. Όλα τα στελέχη RD₁ είχαν EC_{50} στα 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και MIC στα 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Αντίστοιχα, όλα τα στελέχη DSM είχαν EC_{50} στα 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και MIC στα 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



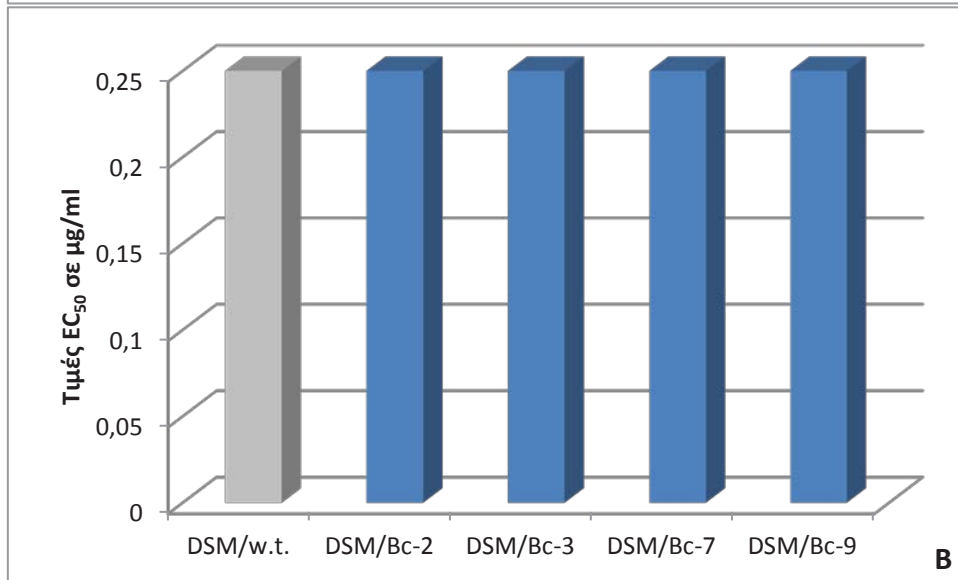
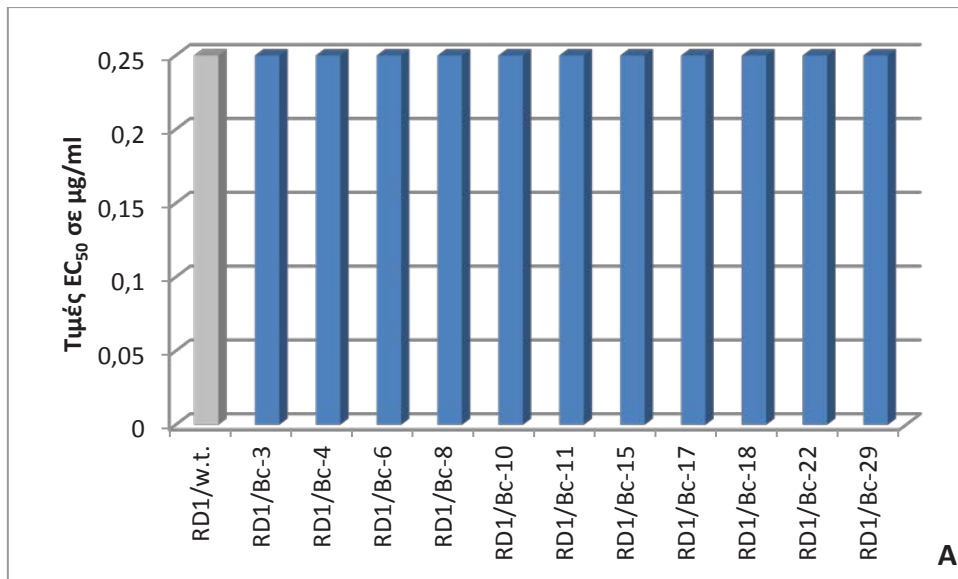
Σχήμα 22: Σύγκριση των τιμών EC_{50} των στελεχών του μύκητα *P. expansum* στο flusilazole, μετά από 5 μέρες επώαση στους 22°C.

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 23, τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη επέδειξαν πολύ μεγάλη ευαισθησία στο ανιλνοπυριμιδινικό μυκητοκτόνο cyprodinil. Η αρνητική σχέση διασταυρωτής ανθεκτικότητας που εμφανίστηκε έχει παράγοντα ανθεκτικότητας Rf από 0,41 μέχρι 0,045 αναλόγως το στέλεχος.



Σχήμα 23: Σύγκριση των τιμών EC₅₀ των στελεχών του μύκητα *P. expansum* στο cyprodinil, μετά από 5 μέρες επώαση στους 22°C.

Το benomyl αποδείχθη πολύ αποτελεσματικό εναντίων όλων των στελεχών του *Penicillium expansum*, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 24. Στο σχήμα εμφανίζονται οι τιμές EC₅₀ όλων των στελεχών μαζί, αφού δεν παρατηρήθηκαν καθόλου μεταβολές μεταξύ RD₁ και DSM στελεχών. Για όλα τα στελέχη η EC₅₀ ήταν στα 0,25 µg/ml και η MIC στα 0,5 µg/ml.



Σχήμα 245: Σύγκριση των τιμών EC_{50} των στελεχών του μύκητα *P. expansum* στο βενομυλ, μετά από 5 μέρες επώαση στους 22°C .

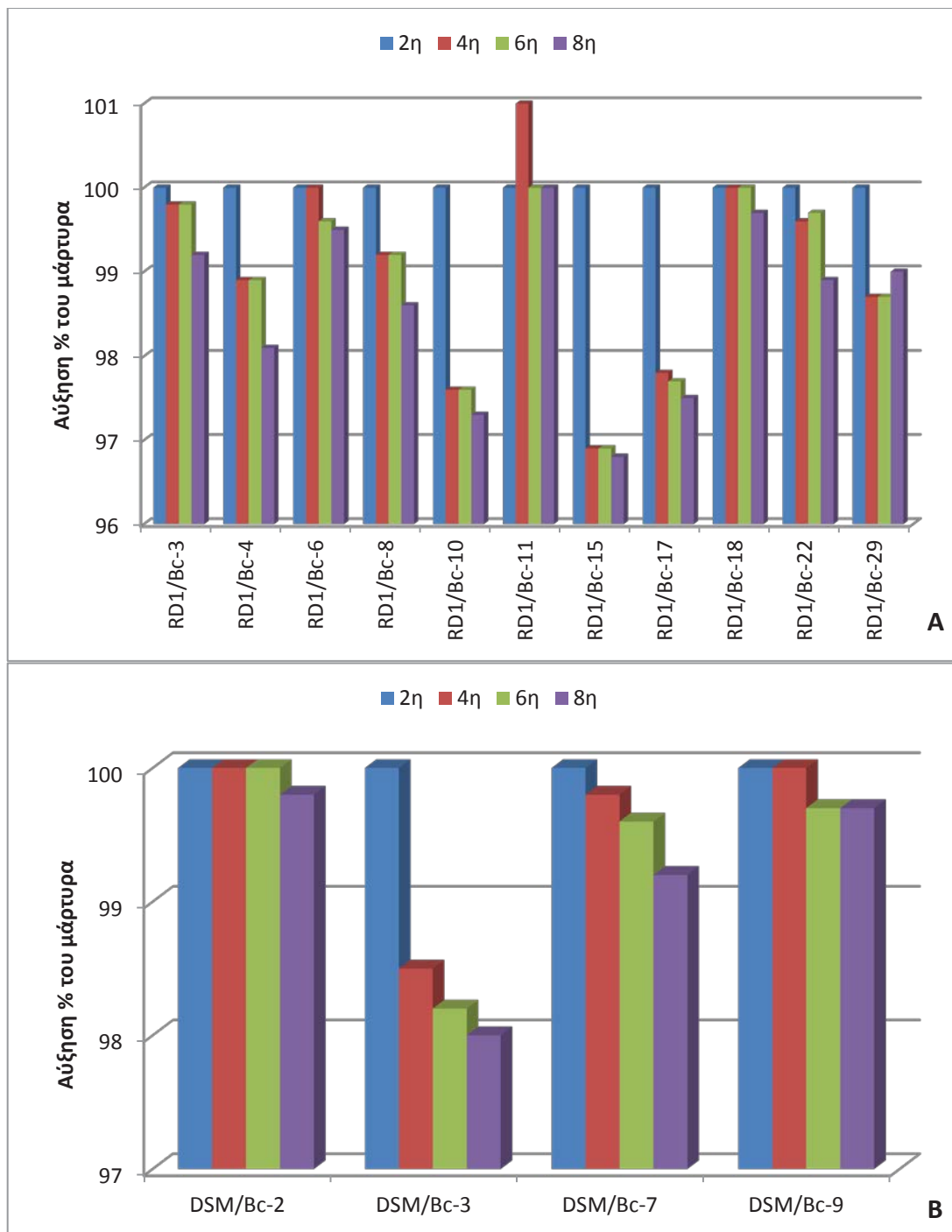
4.5. ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η ικανότητα διατήρησης του επιπέδου ανθεκτικότητας των στελεχών του μύκητα *Penicillium expansum* σε συνθήκες έλλειψης παράγοντα επιλογής μελετήθηκε με *in vitro* πειράματα μυκητοτοξικότητας. Στα πειράματα αυτά μετρήθηκε η ευαισθησία των στελεχών σε συγκέντρωση boscalid 5 µg/ml, μετά από διαδοχικές μεταφορές των στελεχών σε υλικό απουσία του παρεμποδιστή. Μετά από κάθε μία από τις μεταφορές αυτές έγινε μεταφορά και επώαση σε υλικό που περιείχε 5 µg/ml boscalid. Συνολικά έγιναν 8 τέτοιες μεταφορές. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μυκητοτοξικότητας φαίνονται στο Σχήμα 25.

Οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας στο boscalid φαίνεται πως είναι σταθερές σε όλα τα στελέχη. Η μέγιστη μείωση που παρουσιάστηκε στη γραμμική αύξηση των στελεχών σε υλικό MM παρουσία 5 µg/ml, ήταν 3,2%.

Από τις 5 και πάνω μεταφορές σε υλικό απουσία του παρεμποδιστή, παρατηρήθηκε καθυστέρηση περίπου 20-24 ωρών στην παραγωγή των κωνιδίων κατά την επαναφορά και επώασή των στελεχών σε υλικό με boscalid. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα στελέχη RD₁/Bc-15, RD₁/Bc-17 και DSM/Bc-9, τα οποία παρουσίασαν καθυστέρηση στην παραγωγή κωνιδίων κατά 5-10 ώρες.

Όλα τα στελέχη ανέκαμψαν στην αρχική ταχύτητα παραγωγής κωνιδίων μετά από 2 διαδοχικές μεταφορές τους σε υλικό MM παρουσία τουλάχιστον 5 µg/ml boscalid.



Σχήμα 6: Μυκηλιακή αύξηση των στελεχών του μύκητα *P. expansum*, σε υλικό MM με 5 μg/ml boscalid, μετά από διαδοχικές μεταφορές σε υλικό απουσία παρεμποδιστή. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

4.6. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΑΠΟ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *P. expansum*

Για την διερεύνηση της παραγωγής μυκοτοξινών από τα στελέχη του μύκητα *Penicillium expansum* έγιναν πειράματα *in vitro* και *in vivo*, όπως αυτά αναφέρονται και περιγράφονται στο κεφάλαιο 3.6..

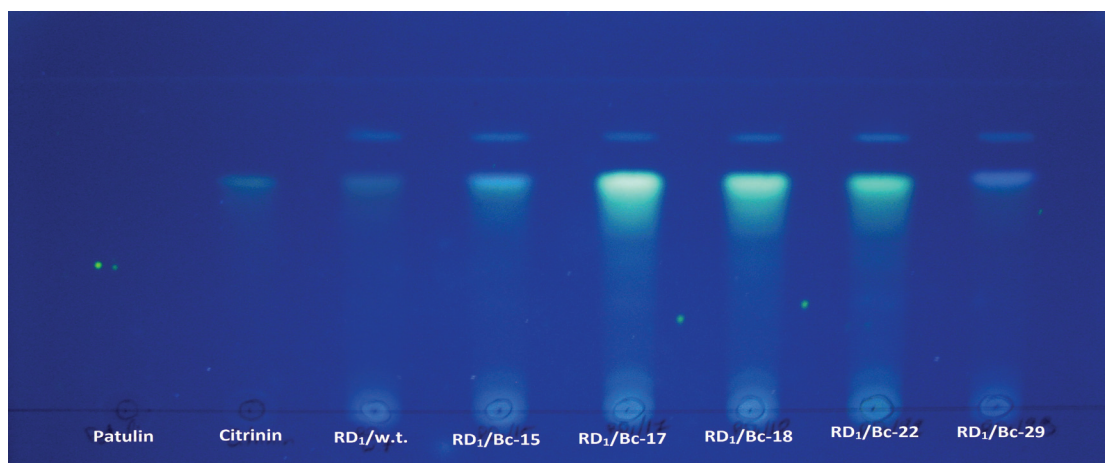
4.6.1. Παραγωγή Μυκοτοξινών *in vitro*

Η *in vitro* παραγωγή των μυκοτοξινών διερευνήθηκε μέσω καλλιέργειας των στελεχών σε θρεπτικό υπόστρωμα YES για 10 ημέρες, εκχέλιση και συμπύκνωση. Η διερεύνηση έγινε με ποιοτική μέθοδο TLC και ποσοτική μέθοδο HPLC.

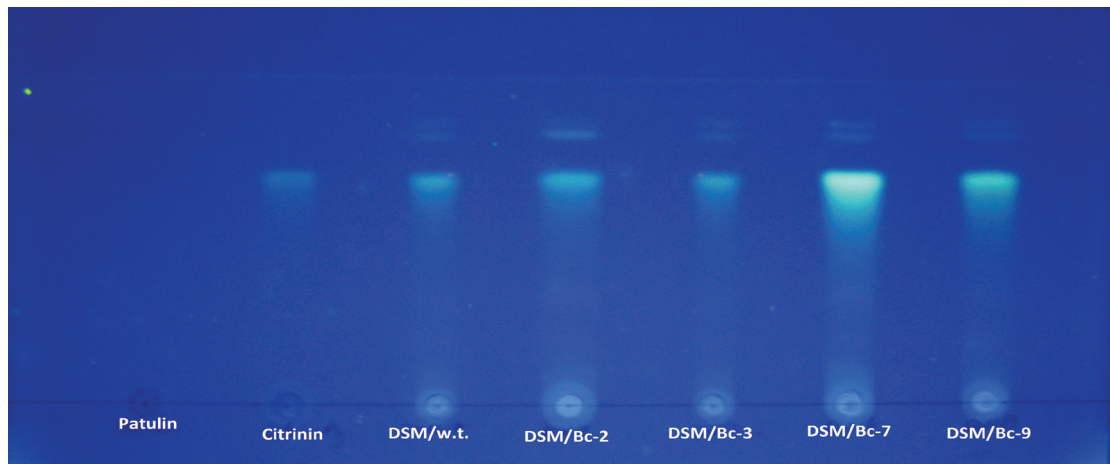
Ποιοτική ανάλυση

Όπως φαίνεται και από τις εικόνες 16 και 17, τα στελέχη DSM και RD₁ φαίνεται πως παρήγαγαν ικανές ποσότητες κιτρινίνης. Τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη δε, φαίνεται πως παρήγαγαν ποσότητες κατά πολύ υψηλότερες αυτών των αγρίων στελεχών. Η R_f της κιτρινίνης σε όλες τις δοκιμές ήταν 0,77.

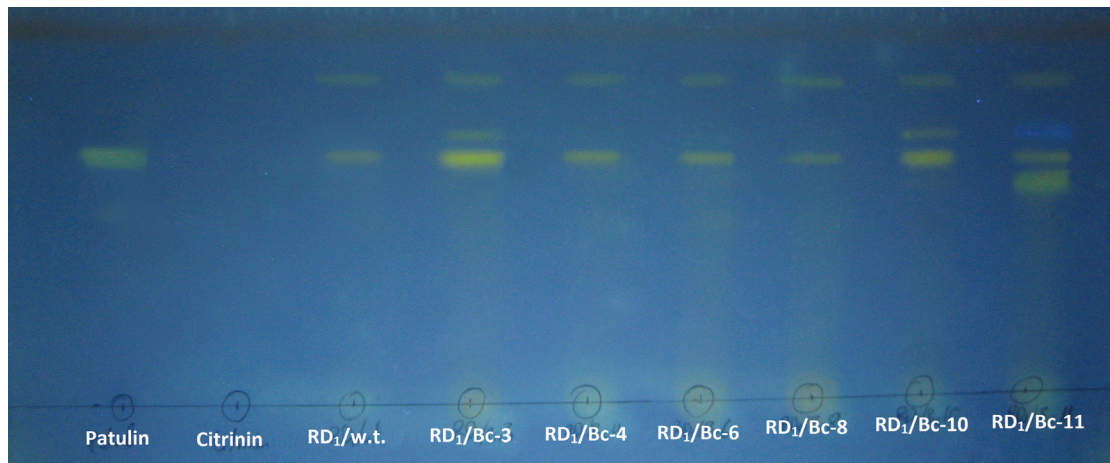
Σε ότι αφορά την πατουλίνη, είναι χαρακτηριστικό πως τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη RD₁ φαίνονται να παράγουν αρκετά ικανές ποσότητες, ενώ το άγριο στέλεχος δε φαίνεται να παράγει καθόλου πατουλίνη (εικόνες 18). Αντίθετα στα στελέχη DSM, η εικόνα που παρουσιάστηκε ήταν το άγριο στέλεχος να παράγει πατουλίνη σε εμφανή ποσότητα, ενώ τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη δε φαίνονται να παράγουν καθόλου πατουλίνη, όπως φαίνεται και στην εικόνα 20. Η R_f της ανάλυσης για την πατουλίνη ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 0,67.



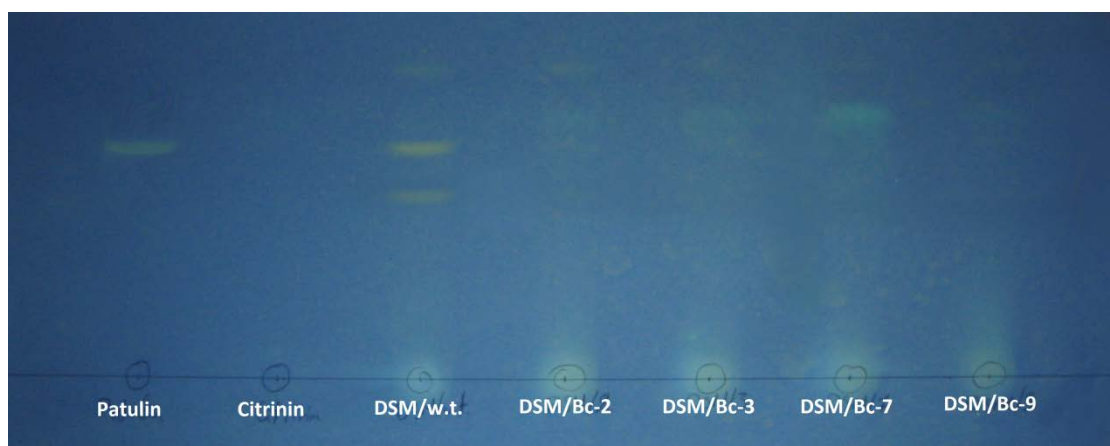
Εικόνα 16: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) της παραγωγής κιτρινίνης *in vitro* από τα DSM στελέχη του μύκητα *P. expansum*, μετά από 10 μέρες επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα YES στους 22°C.



Εικόνα 17: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) της παραγωγής κιτρίνης *in vitro* από τα στελέχη RD₁/Bc-15 έως 22 του μύκητα *P. expansum*, μετά από 10 μέρες επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα YES στους 22°C.



Εικόνα 18: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) της παραγωγής πατουλίνης *in vitro* από τα στελέχη RD₁/Bc-3 έως 11 του μύκητα *P. expansum*, μετά από 10 μέρες επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα YES στους 22°C.



Εικόνα 19: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) της παραγωγής πατουλίνης *in vitro* από τα DSM στελέχη του μύκητα *P. expansum*, μετά από 10 μέρες επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα YES στους 22°C.

Ποσοτική ανάλυση

Στον πίνακα 9 φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των αναλύσεων με HPLC που έγιναν στα στελέχη του μύκητα *P. expansum* σε $\mu\text{g/g}$ υποστρώματος.

Φαίνεται πως τα αποτελέσματα που εμφανίστηκαν στον ποιοτικό έλεγχο επαληθεύτηκαν και στον ποσοτικό. Τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη RD₁ παρήγαγαν πατουλίνη σε ικανές ποσότητες ενώ το άγριο στέλεχος δεν παρήγαγε καθόλου. Ιδιαίτερα υψηλή παραγωγή πατουλίνης εμφάνισαν τα στελέχη RD₁/Bc-3, RD₁/Bc-11 και RD₁/Bc-15, ενώ το στέλεχος RD₁/Bc-22 ήταν το μόνο στέλεχος που δεν παρήγαγε καθόλου πατουλίνη.

Πίνακας 9: *In vitro* παραγωγή μυκοτοξινών από τα στελέχη του μύκητα *Penicillium expansum* μετά από 10 μέρες επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα YES στους 22°C. Τα αποτελέσματα δίδονται σε $\mu\text{g/g}$ θρεπτικού υποστρώματος. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ <i>in vitro</i>		
Στέλεχος	Πατουλίνη ($\mu\text{g/g}$)	Κιτρινίνη ($\mu\text{g/g}$)
RD1/w.t.	20,00	7,04
RD1/Bc-3	1.387,64	504,69
RD1/Bc-4	31,50	385,06
RD1/Bc-6	16,46	538,67
RD1/Bc-8	633,44	291,19
RD1/Bc-10	798,59	216,40
RD1/Bc-11	1.893,15	288,91
RD1/Bc-15	1.438,82	412,48
RD1/Bc-17	217,04	2.327,56
RD1/Bc-18	58,00	2.471,04
RD1/Bc-22	0,00	273,84
RD1/Bc-29	579,52	180,03
DSM/w.t.	79,99	12,70
DSM/Bc-2	0,00	174,24
DSM/Bc-3	0,00	139,52
DSM/Bc-7	0,00	4.644,21
DSM/Bc-9	0,00	153,99

Η παραγωγή της κιτρινίνης ήταν για όλα τα στελέχη RD₁/Bc πολύ υψηλότερη αυτής του αγρίου στελέχους. Το αποτέλεσμα αυτό αναμενόταν, σύμφωνα με τον ποιοτικό έλεγχο. Ιδιαίτερα υψηλή παραγωγικότητα επέδειξαν τα στελέχη RD₁/Bc-17 και RD₁/Bc-18, στα οποία η παραγωγή κιτρινίνης ήταν πάνω από 300 φορές υψηλότερη αυτής του αγρίου στελέχους.

Αντίθετα, τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη DSM δεν παρήγαγαν καθόλου πατουλίνη, ενώ το άγριο στέλεχος παρήγαγε. Τα αποτελέσματα και στα στελέχη DSM επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα που φάνηκαν με τον ποιοτικό έλεγχο.

Η παραγωγή της κιτρινίνης στα στελέχη DSM ήταν πολύ υψηλότερη αυτής του αγρίου στελέχους, όπως αναμενόταν. Και πάλι φάνηκε συμφωνία των αποτελεσμάτων του ποιοτικού ελέγχου και του ποσοτικού ελέγχου. Ιδιαίτερα υψηλή παραγωγή κιτρινίνης παρουσίασε το στέλεχος DSM/Bc-7, του οποίου η παραγωγή ήταν πάνω από 600 φορές υψηλότερη αυτής του αγρίου στελέχους.

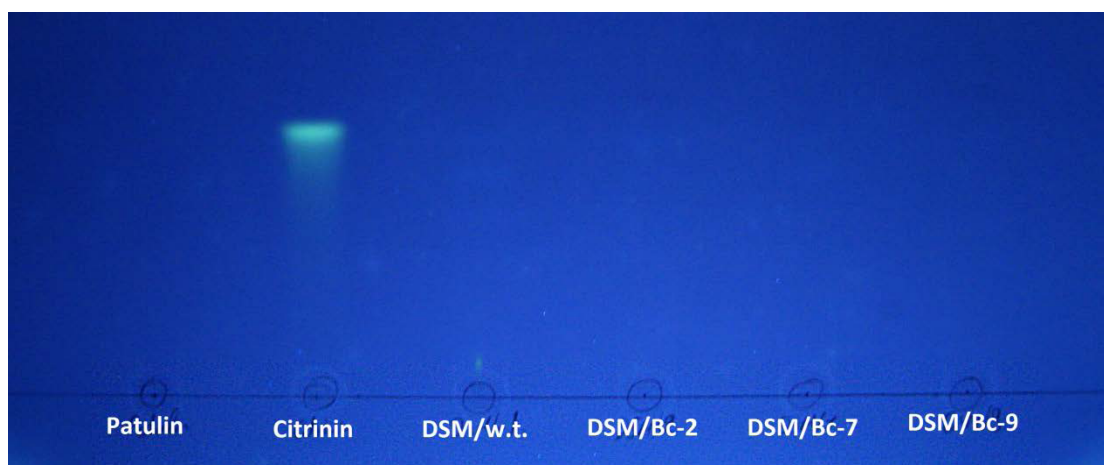
4.6.2. Παραγωγή Μυκοτοξινών *in vivo*

Όπως και για την *in vitro* παραγωγή μυκοτοξινών, έτσι και για την *in vivo*, η ανάλυση των προσβεβλημένων με στελέχη του μύκητα *Penicillium expansum* μήλων έγινε τόσο ποιοτικά με TLC, όσο και ποσοτικά με HPLC. Οι *in vivo* αναλύσεις έγιναν με επιλεγμένα στελέχη μόνο.

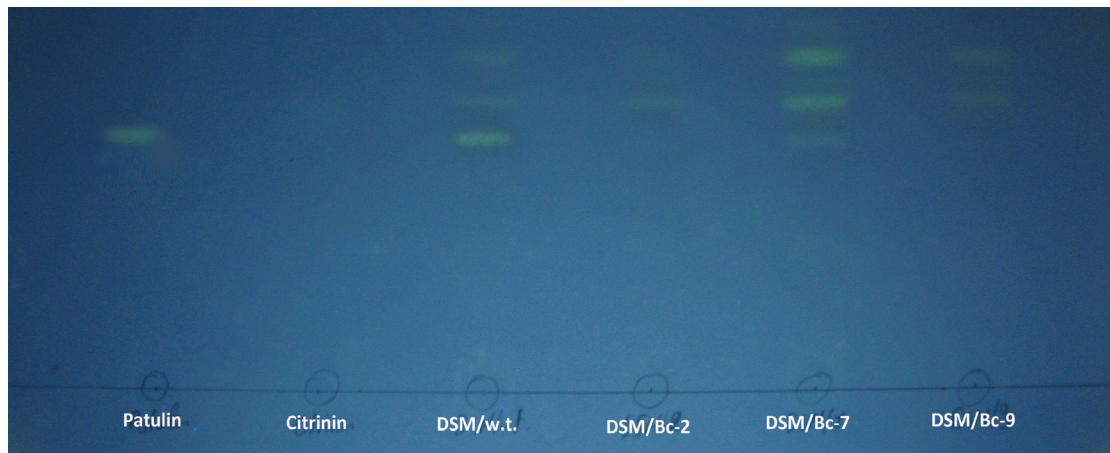
Ποιοτική ανάλυση

Οι εικόνα 20 δείχνει τα αποτελέσματα της ποιοτικής ανάλυσης κιτρινίνης των στελεχών του μύκητα *P. expansum*. Όπως γίνεται φανερό, κανένα από τα στελέχη δε φαίνεται να παρήγαγε κιτρινίνη. Η Rf της κιτρινίνης ήταν 0,76.

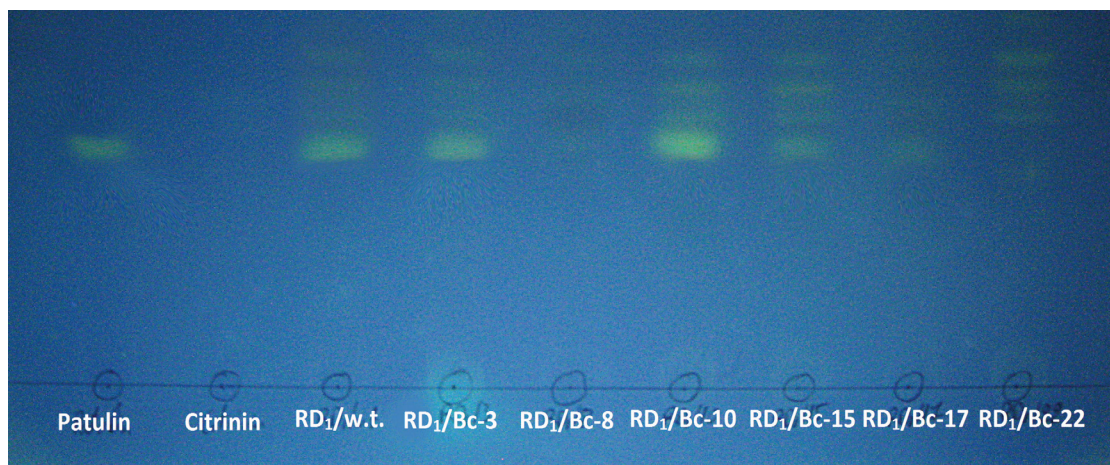
Οι εικόνες 21 και 22 φανερώνουν την παραγωγή πατουλίνης των στελεχών. Όπως φαίνεται από τις εικόνες, τα στελέχη DSM, ανθεκτικά στο boscalid και άγριο, δεν παρήγαγαν πατουλίνη. Τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη RD₁, όμως, φαίνεται να παρήγαγαν ικανές ποσότητες, με το στέλεχος RD₁/Bc-3 να εμφανίζει την εντονότερη παραγωγή πατουλίνης. Το άγριο στέλεχος, αντίθετα φαίνεται να μην παρήγαγε πατουλίνη. Η Rf της πατουλίνης ήταν 0,66.



Εικόνα 20: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) της παραγωγής κιτρινίνης *in vivo* από τα DSM στελέχη του μύκητα *P. expansum*, μετά από 10 μέρες επώασης σε μήλα ποικιλίας Red Delicious.



Εικόνα 21: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) της παραγωγής πατουλίνης *in vivo* από τα DSM στελέχη του μύκητα *P. expansum*, μετά από 10 μέρες επώασης σε μήλα ποικιλίας Red Delicious.



Εικόνα 22: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) της παραγωγής πατουλίνης *in vivo* από τα RD₁ στελέχη του μύκητα *P. expansum*, μετά από 10 μέρες επώασης σε μήλα ποικιλίας Red Delicious.

Ποσοτική ανάλυση

Στον πίνακα 10 φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης του εκχυλίσματος των μήλων ποικιλίας Red Delicious, μετά από τεχνητή προσβολή με στελέχη του μύκητα *P. expansum*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε μg/g σάρκας μήλου.

Στην ποσοτική ανάλυση των μήλων γίνεται εμφανής η αδυναμία της ποιοτικής ανάλυσης να εντοπίσει μικρές συγκεντρώσεις των τοξινών. Όπως φαίνεται στον πίνακα, τα περισσότερα στελέχη παρήγαγαν κιτρινίνη, αλλά σε πολύ μικρή ποσότητα στις 10 μέρες επώασης. Τα στελέχη RD₁/Bc-22 και DSM/Bc-9 είναι τα μόνα που δεν παρήγαγαν καθόλου κιτρινίνη.

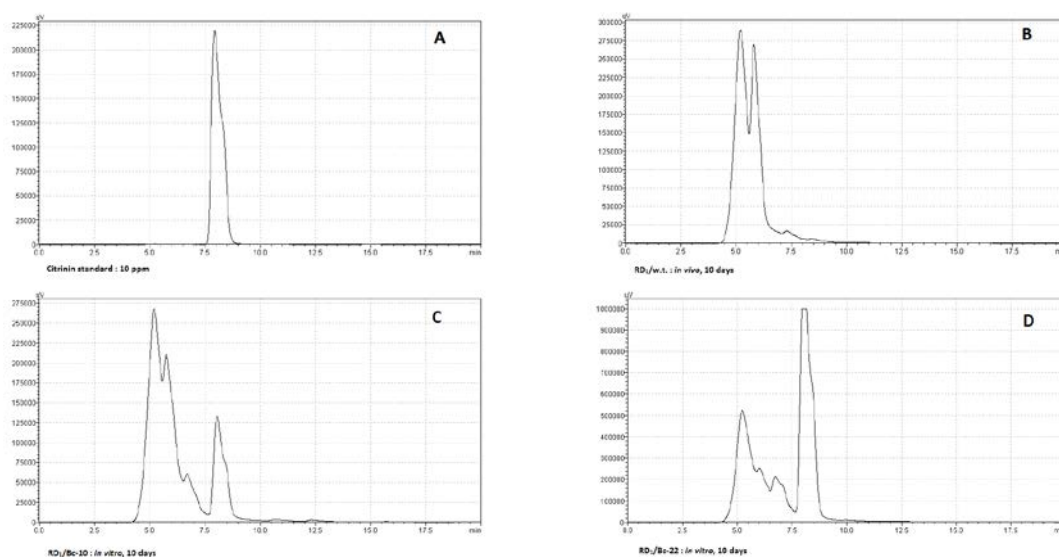
Σε ότι αφορά την παραγωγή πατουλίνης, τα αποτελέσματα ήταν εφάμιλλα των *in vitro* μετρήσεων. Τα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη RD₁ φαίνεται πως παρήγαγαν μεγάλες ποσότητες πατουλίνης στις 10 μέρες επώασης, με το στέλεχος RD₁/Bc-3 να παράγει και *in vivo* ποσότητες σχεδόν 400 φορές μεγαλύτερες του

αγρίου στελέχους, όπως αναμενόταν βάση των αποτελεσμάτων του ποιοτικού ελέγχου.

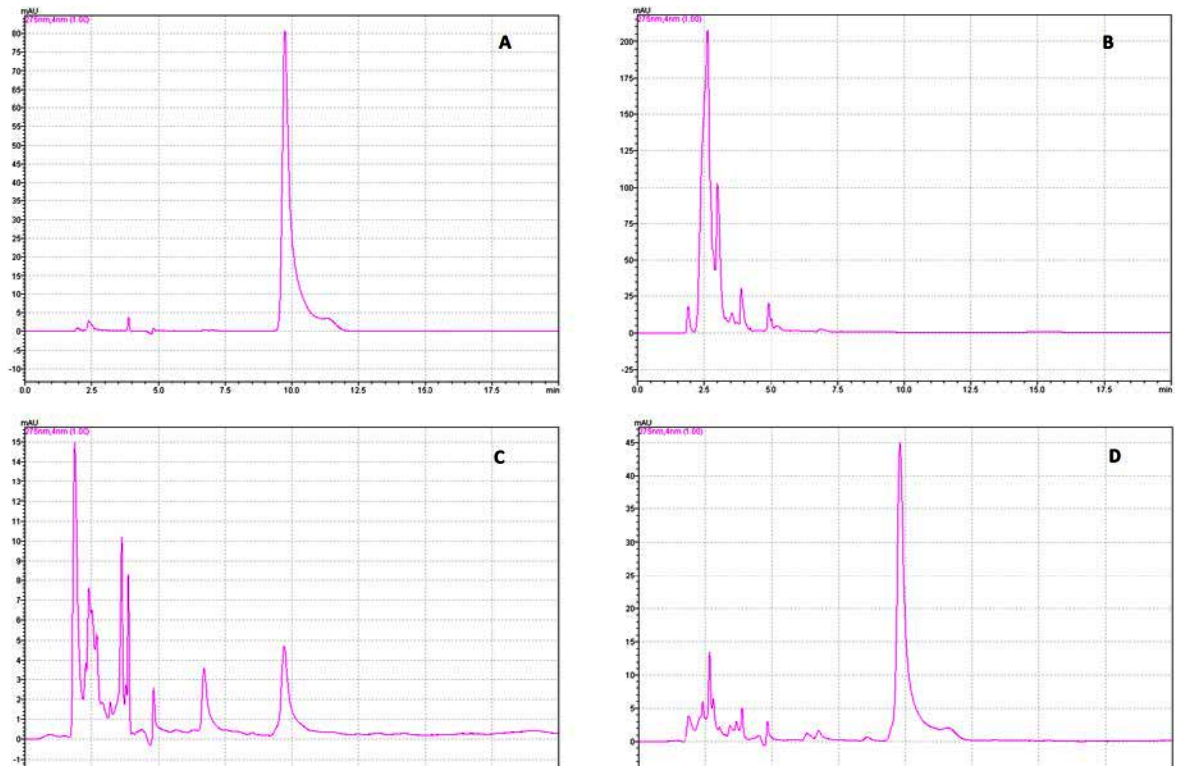
Πίνακας 10: *In vivo* παραγωγή μυκοτοξινών από τα στελέχη του μύκητα *P. expansum* μετά από τεχνητή μόλυνση μήλων ποικιλίας Red Delicious και επώαση για 10 μέρες σε συνθήκες περιβάλλοντος. Τα αποτελέσματα δίδονται σε $\mu\text{g/g}$ σάρκας μήλου. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο επαναλήψεων.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ <i>in vivo</i>		
Στέλεχος	Πατουλίνη ($\mu\text{g/g}$)	Κιτρινίνη ($\mu\text{g/g}$)
RD1/w.t.	48,70	0,28
RD1/Bc-3	186,34	0,32
RD1/Bc-8	66,29	0,05
RD1/Bc-10	93,79	0,14
RD1/Bc-15	33,57	0,34
RD1/Bc-17	14,88	0,08
RD1/Bc-22	45,47	0,00
DSM/w.t.	45,38	0,27
DSM/Bc-2	0,00	0,03
DSM/Bc-7	1,99	0,17
DSM/Bc-9	0,00	0,00

Τα στελέχη DSM εμφάνισαν διαφορετική εικόνα. Μόνο το άγριο και το στέλεχος DSM/Bc-7 παρήγαγαν πατουλίνη, αλλά σε πολύ μικρότερες ποσότητες από τα RD₁. Το άγριο στέλεχος παρήγαγε παρόμοιες ποσότητες με το RD₁/w.t. και το στέλεχος DSM/Bc-7 παρήγαγε ποσότητες σχεδόν 6 φορές υψηλότερες από το άγριο στέλεχος DSM.



Εικόνα 23: Ενδεικτικά χρωματογραφήματα HPLC της παραγωγής κιτρινίνης από στελέχη του μύκητα *P. expansum*. A: πρότυπο διάλυμα κιτρινίνης 10 $\mu\text{g/ml}$ B: στέλεχος με μηδενική παραγωγή κιτρινίνης C: στέλεχος με μέτρια παραγωγή κιτρινίνης και D: στέλεχος με υψηλή παραγωγή κιτρινίνης.



Εικόνα 24: Ενδεικτικά χρωματογραφήματα HPLC της παραγωγής πατουλίνης από στελέχη του μύκητα *P. expansum*. A: πρότυπο διάλυμα πατουλίνης 10 μg/ml B: στέλεχος με μηδενική παραγωγή πατουλίνης C: στέλεχος με μέτρια παραγωγή πατουλίνης και D: στέλεχος με υψηλή παραγωγή πατουλίνης.

4.7. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η απομόνωση του τμήματος της υπομονάδας Β της αναπνευστικής αλυσίδας και η αλληλούχισή της έγινε με την τεχνική που αναφέρεται και περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.7.2.. Η σύγκριση των αλληλουχιών των νουκλεοτιδίων και των αμινοξέων για τα στελέχη του μύκητα *Penicillium expansum* έγινε με το πρόγραμμα Clustal-W 2.1, ενώ η μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (547 bp) σε αμινοξική αλυσίδα έγινε με χρήση του προγράμματος Blast-X 2.2.26+. Οι ακολουθίες αμινοξέων που προέκυψαν μεταφράζοντας τη νουκλεοτιδική αλληλουχία κάθε ανθεκτικού στο Boscalid στελέχους συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες των αγρίων στελεχών. Ο έλεγχος έγινε για τα άγρια στελέχη και τα στελέχη RD₁/Bc-4, RD₁/Bc-8, DSM/Bc-3, DSM/Bc-7 και DSM/Bc-9.

<i>P. chrysogenum</i>	MASLRTTSRLFAASRPMFRPVVFARTYAIV-----
<i>P. expansum</i>	-----
<i>A. alternata</i>	MASIRAFTRLATQRTAVRPAVFSRGFASVNDVHARDPISKTAEKIAPDASRSPPIPE SKTS
<i>B. fuceliana</i>	MAALRTGARSARAIFAASRPAFRITQMRIMASVDSSVPESPITVS-----PSRPVESASKTS 55
<i>P. chrysogenum</i>	---EPTPSEQPKMKTFKVYRWNPDPQSEKPMQSYDDLNLKTFMMLDALIRIKNE LDPT
<i>P. expansum</i>	-----
<i>A. alternata</i>	TIQEPESKDAKTKTFHLYRWNPDEPTSKPRMSYTLDLNLKTFMMLDALIRIKNEVDPT
<i>B. fuceliana</i>	TVKEPAADSESLIKTFNLYRWNPDEPTSKPRMSYTLDLNLKTFMMLDALIRIKNEVDPT 115
<i>P. chrysogenum</i>	LI FRRSCREGICGSCAMNIDGVNLA CLCRIPDTDKTESRIYPLPHTYVVKDLVPDMTHF
<i>P. expansum</i>	-----CIGRIPTDKSESRIYPLPHTYVVKDLVPDMTHF
<i>A. alternata</i>	LI FRRSCREGICGSCAMNIDGVNLA CLCRIPDTDKTESRIYPLPHMYVVKDLVPDMTLF
<i>B. fuceliana</i>	LI FRRSCREGICGSCAMNIDGVNLA CLCRIPRDAKHETKIYPLPHTYVVKDIPDLTQF 175
	*: *** *: : *:***** *****:***:*
<i>P. chrysogenum</i>	YKQYKS IKPYLQRTDTPTE DGLFRQS PEDRKKLDGLYECILCACCS TSCP SYWVNSE EYL
<i>P. expansum</i>	YKQYKS IKPYLQRTDTPTE DGLFRQS PEDRKKLDGLYECILCACCS TSCP SYWVNSE EYL
<i>A. alternata</i>	YKQYRSVKPYLQRTTAAPDGRFREFRQS KEDRKKLDGLYECILCACCS TSCP SYWVNQE EYL
<i>B. fuceliana</i>	YKQYKS IKPYLQHTDPAPEGKEYLQS KEDRKKLDGLYECILCACCS TSCP SYWVNSE EYL 235
	*****:*****: : : * *: * *****:*****:*****:*****
<i>P. chrysogenum</i>	GPAVLLQSFRLADSRDEKTAERKAALN SMSVYRCHITILNCTRCPKGLNPGRAIAEIK
<i>P. expansum</i>	GPAVLLQSFRLADSRDEKTAERKAALN SMSVYRCHITILNCTRCPKGLNPGRAIAEIK
<i>A. alternata</i>	GPAVLLQSYRNLADSRDEKKAERQDAIANN SMSLYRCHITILNCSRTPKGLNPAIAIAEIK
<i>B. fuceliana</i>	GPAVLLQSYRNLADSRDQKKEERKAALN SMSLYRCHITILNCSRTPKGLNPGIAIAEIK 295
	*****:*****:*****:*****:*****:*****
<i>P. chrysogenum</i>	KMLAV-
<i>P. expansum</i>	-----
<i>A. alternata</i>	KSMAFT
<i>B. fuceliana</i>	KEMAF- 300

Εικόνα 25: Στοιχισμός αμινοξέων του τμήματος της υπομονάδας Β του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας στελεχών του μύκητα *P. expansum*, με χρήση του προγράμματος Clustal-W. Οι θέσεις με ταύτιση αμινοξέων σημειώνονται με αστερίσκο. Η αρίθμηση έγινε με βάση το SdhB γονίδιο του *B. fuceliana* (AAW52509.1). Η θέση στην οποία ανιχνεύθηκαν οι μεταλλάξεις στην εργασία αυτή σημειώνεται με μαύρο βέλος.

Η σύγκριση των αλληλουχιών αποκάλυψε συνολικά 2 διαφορετικές υποκαταστάσεις αμινοξέων στο κωδικόνιο 272. Συγκεκριμένα, τα στελέχη RD₁/Bc-8, DSM/Bc-7 και DSM/Bc-9 παρουσίασαν αντικατάσταση της ιστιδίνης (CAC) από τυροσίνη (TAC) και το στέλεχος DSM/Bc-3 εμφάνισε αντικατάσταση της ιστιδίνης από αργινίνη (CGC). Το στέλεχος RD₁/Bc-4 δεν παρουσίασε καμία υποκατάσταση στη θέση 272, όμως παρουσίασε πολύ υψηλή ανθεκτικότητα στο boscalid. Είναι πολύ πιθανό να υπάρχει μεταλλαγή ανθεκτικότητας στην υπομονάδα D ή C.

Η αντικατάσταση της ιστιδίνης στη θέση 272, έχει αναφερθεί να προσδίδει διαφόρων τύπων σχέσεις διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ boscalid και fluopyram. Ο πίνακας 11 παρουσιάζει τις υποκαταστάσεις που εντοπίστηκαν στην εργασία αυτή και τους παράγοντες ανθεκτικότητας (Rf) των boscalid και fluopyram για τα στελέχη που ελέγχθηκαν.

Πίνακας 11: Υποκαταστάσεις αμινοξέων των στελεχών του μύκητα *P. expansum* στη θέση 272, όπως αυτές εντοπίστηκαν στην αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί τη Β υπομονάδα του συστήματος II της αναπνευστικής αλυσίδας, και οι παράγοντες ανθεκτικότητας των boscalid και fluopyram που υπολογίστηκαν για κάθε στέλεχος.

Στέλεχος	Αμινοξύ θέσης 272	Boscalid (Rf)	Fluopyram (Rf)
RD₁/w.t.	His (CAC)	1	1
RD₁/Bc-4	His (CAC)	300	10
RD₁/Bc-8	Tyr (TAC)	750	0,25
DSM/w.t.	His (CAC)	1	1
DSM/Bc-3	Arg (CGC)	300	0,8
DSM/Bc-7	Tyr (TAC)	1000	0,4
DSM/Bc-9	Tyr (TAC)	1000	0,4

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η απώλεια της αποτελεσματικότητας των φυτοφαρμάκων λόγω επικράτησης ανθεκτικών στελεχών των οργανισμών στόχων αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην παγκόσμια φυτοπροστασία, ενώ παράλληλα μειώνεται ο αριθμός τους λόγω της απώλειας υποστήριξης από τις εταιρείες που οδηγεί στην απόσυρσή τους (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2007). Η μελέτη του κινδύνου εμφάνισης στελεχών των φυτοπαθογόνων μυκήτων ανθεκτικών στα νέα μυκητοκτόνα αποτελεί βασικό στοιχείο για τη διαμόρφωση κατάλληλων στρατηγικών φυτοπροστασίας.

Η εισαγωγή των νέων παρεμποδιστών του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας από το 2005, έχει αποτελέσει μία ικανή εναλλακτική λύση για την αντιμετώπιση προβλημάτων ανθεκτικότητας (Avenot & Michailides, 2007). Μυκητοκτόνα όπως το boscalid έχουν πάρει έγκριση κυκλοφορίας είτε ως αυτόνομα προϊόντα είτε σε συνδυασμό με μυκητοκτόνα άλλων χημικών ομάδων για την αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών των φυτών. Γρήγορα, όμως, διατυπώθηκαν αναφορές για μειωμένη αποτελεσματικότητά του στον αγρό (Avenot & Michailides, 2007; Xiao & Boal, 2008; Avenot et al., 2008; Miyamoto et al., 2009; Bardas et al., 2010; Miyamoto et al., 2010; Kim & Xiao, 2010; De Miccolis-Angelini et al., 2010; Veloukas et al., 2011), γεγονός το οποίο κατέστησε τη διερεύνηση των μηχανισμών που την επιφέρουν ουσιώδους σημασίας, με ενδιαφέρον τόσο επιστημονικό, όσο και πρακτικό.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η ευαισθησία του μύκητα *Penicillium expansum* σε μυκητοκτόνα της ομάδος των SDHIs καθώς και ο κίνδυνος εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στα μυκητοκτόνα αυτά. Στελέχη του μύκητα *P. expansum* ανθεκτικά στο boscalid απομονώθηκαν σε συχνότητα 10^6 μετά από μεταλλαξιγένεση με υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και επιλογή σε υλικό που περιείχε boscalid. Μελέτη του επιπέδου ανθεκτικότητας έδειξαν πως όλα τα στελέχη είχαν υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας ($R_f \geq 300$). Υψηλού επιπέδου ανθεκτικά στελέχη έχουν αναφερθεί επίσης για το μύκητα *Alternaria alternata* (Avenot & Michailides, 2007), καθώς και για το μύκητα *Botrytis cinerea* τόσο σε στελέχη που προήλθαν από τεχνητή μεταλλαξιγένεση (De Miccolis-Angelini et al., 2010), όσο και σε στελέχη που απομονώθηκαν από αγροτικά προϊόντα (Kim & Xiao, 2010; Bardas et al., 2010; Veloukas et al., 2011). Οι Miyamoto et al. (2009, 2010) ανέφεραν ανθεκτικά στο boscalid στελέχη και για τους μύκητες *Podosphaera xanthii* και *Corynespora cassiicola* μετά από απομονώσεις από θερμοκήπια, ενώ οι Avenot et al. (2011) ανέφεραν στελέχη του μύκητα *Didymella bryoniae* με υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στο boscalid.

Μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγών ανθεκτικότητας σε παραμέτρους φυτοπαθολογικής προσαρμοστικότητας (fitness parameters) έδειξε πως ο ρυθμός αύξησης του μυκηλίου των ανθεκτικών στο boscalid στελεχών κατά κανόνα επηρεάζεται αρνητικά από τις μεταλλαγές. Αντίθετα, η ικανότητα παραγωγής και

βλάβησης κονιδίων, η μολυσματικότητα (virulence) και η παθογόνος ικανότητα (severity) δεν φάνηκε να επηρεάζονται.

Πειράματα διασταυρωτής ανθεκτικότητας με μυκητοκτόνα της ομάδας των SDHIs, καθώς και με μυκητοκτόνα από άλλες χημικές ομάδες έδειξαν πως οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας στο boscalid μπορούν να επηρεάσουν την ευαισθησία του μύκητα *P. expansum* και σε άλλα μυκητοκτόνα. Μελέτη της ευαισθησίας των ανθεκτικών στο boscalid στελεχών σε νέους SDHIs έδειξε πως τα περισσότερα μεταλλαγμένα στελέχη είχαν αυξημένη ευαισθησία στο fluopyram (Rf: 0,23-0,29). Αυξημένη ευαισθησία στο fluopyram έχει αναφερθεί και σε ανθεκτικά στο boscalid στελέχη του μύκητα *Botrytis cinerea* (Leroux et al. 2010) αλλά και του μύκητα *Didymella bryoniae* (Avenot et al., 2011). Αντίθετα, ορισμένα από τα μεταλλαγμένα στελέχη ανέπτυξαν ανθεκτικότητα και στο fluopyram (Rf=8-10). Παρόμοια μείωση της ευαισθησίας στο fluopyram σε ανθεκτικά στο boscalid στελέχη έχουν αναφερθεί και στο μύκητα *Botrytis cinerea* (Καραογλανίδης, προσωπική επικοινωνία). Υπάρχουν πολλές αναφορές για μεταλλαγές ανθεκτικότητας στο boscalid που δεν επηρεάζουν την ευαισθησία των στελεχών στο fluopyram στους μυκητες *Corynespora cassiicola* και *Podosphaera xanthii* (Ishii et al., 2011), το μύκητα *Didymella bryoniae* (Avenot et al., 2010), το μύκητα *Alternaria alternata* (Avenot & Michailides, 2010) και το μύκητα *Botrytis cinerea* (Καραογλανίδης, προσωπική επικοινωνία), οι οποίες έρχονται σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα ευρύματα της παρούσας εργασίας.

Η μελέτη της ευαισθησίας των στελεχών του μύκητα *P. expansum* στο isopyrazam έδειξε θετική σχέση διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ boscalid και isopyrazam με Rf από 30 έως και πάνω από 40. Φαίνεται πως οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας για το boscalid προκαλούν σημαντική μείωση στην ευαισθησία των στελεχών και στο isopyrazam, όπως επιβεβαιώνεται και από στοιχεία του μύκητα *Botrytis cinerea* (Καραογλανίδης, προσωπική επικοινωνία), ενώ το ίδιο φαινόμενο εμφανίζεται και με το penhiopyrad (Avenot et al., 2011).

Μελέτη της ευαισθησίας των ανθεκτικών στο boscalid στελεχών του μύκητα *P. expansum* σε μυκητοκτόνα με διαφορετικό μηχανισμό δράσης έδειξε πως οι μεταλλαγές για την ανθεκτικότητα στο boscalid δεν επηρεάζουν σημαντικά την ευαισθησία των στελεχών στα τριαζολικά, φαινυλοπυρρολικά και βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. Αντίθετα, η ευαισθησία τους στις στρομπιλουρίνες (pyraclostrobin) φάνηκε να αυξάνεται σημαντικά (Rf: 0,1-0,3) Αυξημένη ευαισθησία στους Qo παρμποδιστές σε ανθεκτικά στο boscalid στελέχη έχει αναφερθεί και για το μύκητα *Botrytis cinerea* (Zhang et al., 2007), ενώ αντίθετα, έχουν γίνει αναφορές και για πολλαπλή ανθεκτικότητα μεταξύ των δύο μυκητοκτόνων στον ίδιο μύκητα (Bardas et al., 2010).

Σημαντική αύξηση της ευαισθησίας εμφανίστηκε και στην ανιλνοπυρριμιδίνη cyprodinil (Rf: 0,4-0,04). Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Bardas, et. al (2010), οι οποίοι παρατήρησαν πολλαπλή ανθεκτικότητα σε boscalid και cyprodinil σε στελέχη του μύκητα *Botrytis cinerea*. Δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για την πλήρη κατανόηση του φαινομένου αυτού, ενώ και ο μηχανισμός δράσης του cyprodinil δεν είναι πλήρως γνωστός. Βιοχημικά, η μεθειονίνη παράγεται από ασπαρτικό οξύ, μέσω εννέα αντιδράσεων. Σε μία αντίδραση μόνο χρησιμοποιείται ηλεκτρικό οξύ, κατά τη μετατροπή της Ο-σουσίλυλο-ομοσερίνης σε κυσταθειονίνη (Nelson & Cox, 2008). Είναι πιθανό τα δύο συστήματα να εμπλέκονται στο στάδιο αυτό, όμως δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί κάποια σχέση μεταξύ τους ακόμα.

Μελέτη της επίδρασης των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στην ικανότητα παραγωγής μυκοτοξινών *in vitro* και *in vivo* έδειξαν οι μεταλλαγές μπορούν να επηρεάσουν θετικά ή αρνητικά την ικανότητα παραγωγής πατουλίνης. Συγκεκριμένα, τα μισά περίπου στελέχη παρουσίασαν σημαντική αύξηση της παραγωγής πατουλίνης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, ενώ τα υπόλοιπα παρουσίασαν μείωση έως και παύση της παραγωγής πατουλίνης. Αντίθετα, φαίνεται πως οι μεταλλαγές για ανθεκτικότητα στο boscalid αυξάνουν σημαντικά την ικανότητα παραγωγής κιτρινίνης σε όλα τα στελέχη. Η *in vivo* παραγωγή κιτρινίνης ήταν σε όλα τα στελέχη ελάχιστη. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται από αναφορές πως η παραγωγή της κιτρινίνης *in vivo* ξεκινά στις 30 μέρες (Andersen et al., 2004).

Το υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας στο boscalid και οι σχέσεις διασταυρωτής ανθεκτικότητας με που παρουσιάστηκαν με άλλα μυκητοκτόνα της ομάδας των SDHIs, καθώς και η απουσία σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας με μυκητοκτόνα άλλων ομάδων, με εξαιρέσεις το pyraclostrobin και το cyprodinil, φανερώνει πως ο βιοχημικός μηχανισμός ανθεκτικότητας πιθανότατα να οφείλεται σε μεταλλαγή του γονιδίου που κωδικοποιεί τη θέση δράσης.

Προκαταρκτική διερεύνηση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας έγινε με απομόνωση του γονιδίου της Β υπομονάδας (*SdhB*) του συμπλόκου II από τα άγρια και αντιπροσωπευτικά μεταλλαγμένα στελέχη του μύκητα *P. expansum* και σύγκριση των αλληλουχιών τους. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης έδειξαν μεταλλαγή στη θέση 272, από ιστιδίνη (H) σε αργινίνη (R) ή τυροσίνη (Y). Η θέση *SdhB* -272 θεωρείται πως είναι πολύ κοντά τόσο στο σημείο πρόσδεσης του συνενζύμου Q όσο και στο σημείο δράσης των SDHIs στο σύμπλοκο II, χωρίς να υπάρχει εμφανής επίδραση στη δράση του συμπλόκου (Avenot & Michailides, 2010).

Συγκεκριμένα, η H272Y μεταλλαγή βρέθηκε σε στελέχη τα οποία εμφάνισαν σχέση αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ boscalid και fluopyram σε όλα τα στελέχη (RD₁/Bc-8, DSM/Bc-7 και DSM/Bc-9). Η μεταλλαγή H272Y έχει

επισημανθεί και βιβλιογραφικά ως μεταλλαγή η οποία εκτός από ανθεκτικότητα στο boscalid προσδίδει και αυξημένη ευαισθησία στο fluopyram (Avenot & Michailides, 2010; Leroux et al. 2010; Avenot et al., 2011) ή δεν επηρεάζει καθόλου την ευαισθησία των στελεχών στο fluopyram (Καραογλανίδης, προσωπική επικοινωνία). Η H272R μεταλλαγή δεν είχε σημαντική επίδραση στην ευαισθησία του στελέχους στο οποίο βρέθηκε (DSM/Bc-3) στο fluopyram. Η H272R μεταλλαγή αναφέρεται πως δεν επηρεάζει σημαντικά την ευαισθησία των στελεχών στο fluopyram (Avenot & Michailides, 2010; Avenot et al., 2011; Καραογλανίδης, προσωπική επικοινωνία).

Στο στέλεχος RD₁/Bc-4 δεν βρέθηκε μεταλλαγή στην υπομονάδα B, αν και παρουσιάζει υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στο boscalid, ενώ η ευαισθησία του στο fluopyram είναι πολύ μειωμένη. Έχει αναφερθεί πως μεταλλαγές στις υπομονάδες C και D είναι ικανές να προκαλέσουν υψηλή ανθεκτικότητα στο boscalid στο μύκητα *A. alternata* (Avenot et al., 2009), αλλά και στους μύκητες *Botrytis cinerea* (Leroux et al., 2010) και *Corynespora cassiicola* (Miyamoto et al., 2010). Στο στέλεχος αυτό παρουσιάζεται θετική διασταυρωτή ανθεκτικότητα με το fluopyram, χαρακτηριστικό το οποίο έχει αναφερθεί και στο παρελθόν για μεταλλαγές ανθεκτικότητας τόσο στη B υπομονάδα (Καραογλανίδης, προσωπική επικοινωνία) όσο και στις υπομονάδες C και D (Avenot et al., 2011), αλλά με μικρότερη ένταση.

Το υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας, η ύπαρξη διασταυρωτής ανθεκτικότητας με άλλα μυκητοκτόνα της ομάδας των SDHIs η απουσία πλειοτροπικών επιδράσεων στην προσαρμοστικότητα των στελεχών και η σταθερότητα της ανθεκτικότητας, φανερώνουν πως ο κίνδυνος εμφάνισης και επικράτησης ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *P. expansum* στον αγρό είναι υψηλός. Επιπλέον, η αυξημένη παραγωγή μυκοτοξινών που παρουσιάζουν πολλά από τα μεταλλαγμένα στελέχη φανεώνει υψηλό κίνδυνο αυξημένης παρουσίας μυκοτοξινών στα γεωργικά προϊόντα και τα παράγωγά τους.

Για την πρόληψη ή την αντιμετώπιση του προβλήματος κρίνεται απαραίτητη η έγκαιρη εφαρμογή κατάλληλων στρατηγικών διαχείρισης της ανθεκτικότητας, όπως η εναλλαγή με μυκητοκτόνα με δράση σε διαφορετικό βιοχημικό σύστημα, η χρήση προστατευτικών μυκητοκτόνων και κατάλληλα καλλιεργητικά μέτρα. Επιπλέον, η ανάπτυξη ασφαλών και αξιόπιστων μοριακών μεθόδων για τη διερεύνηση του προβλήματος της ανθεκτικότητας στον αγρό κρίνεται σημαντική. Στην παρούσα εργασία έγινε μία πρώτη προσπάθεια απομόνωσης και χαρακτηρισμού τμήματος του γονιδίου *SdhB* του μύκητα *P. expansum*. Απαιτείται όμως περισσότερη προσπάθεια για την απομόνωση ολόκληρου του γονιδίου *SdhB*, καθώς και την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό και των άλλων υπομονάδων (CκαιD).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology* (5th ed.): Elsevier.
- Amiri, A., & Bompeix, G. (2005). Diversity and population dynamics of *Penicillium spp.* on apples in pre- and postharvest environments: consequences for decay development. *Plant Pathology*(54), 74-81.
- Amiri, A., & Brannen, P. (2010). Reduced Sensitivity in *Monilinia fructicola* Field Isolates from South Carolina and Georgia to Respiration Inhibitor Fungicides. *Plant Disease*, 94(6), 737-743.
- Andersen, B., Smedsgaard, J., & Frisvad, J. C. (2004). *Penicillium expansum*: Consistent Production of Patulin, Chaetoglobosins, and Other Secondary Metabolites in Culture and Their Natural Occurrence in Fruit Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(52). 2421-2428.
- Avenot, H., & Michailides, T. (2010). Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*(29). 643e651.
- Avenot, H., & Michailides, T. J. (2007). Resistance to Boscalid Fungicide in *Alternaria alternata* Isolates from Pistachio in California. *Plant Disease*, 91(10): 1345-1350.
- Avenot, H., Morgan, D. P., & Michailides, T. J. (2008). Resistance to pyraclostrobin, boscalid and multiple resistance to Pristine (pyraclostrobin + boscalid) fungicide in *Alternaria alternata* causing alternaria late blight of pistachios in California. *Plant Pathology*, 54:135-140.
- Avenot, H., Sellam, A., & Michailides, T. (2009). Characterization of mutations in the membrane-anchored subunits AaSDHC and AaSDHD of succinate dehydrogenase from *Alternaria alternata* isolates conferring field resistance to the fungicide boscalid. *Plant Pathology*(58). 1134-1143.
- Avenot, H., Sellam, A., Karaoglanidis, G., & Michailides, T. (2008). Characterization of Mutations in the Iron-Sulphur Subunit of Succinate Dehydrogenase Correlating with Boscalid Resistance in *Alternaria alternata* from California Pistachio. *Phytopathology*, 98(6). 736-742.
- Avenot, H., Thomas, A., Gitaitis, R., Langston, D., & Stevenson, K. (2010). Molecular characterization of resistance to boscalid and penthiopyrad in *Didymella bryoniae* isolates collected from Georgia watermelon fields . *Phytopathology* , 100(6: S9).

- Avenot, H., Thomas, A., Gitaitis, R., Langston, D., & Stevenson, K. (2011). Molecular characterization of boscalid- and penthiopyrad-resistant isolates of *Didymella bryoniae* and assessment of their sensitivity to fluopyram. *Pest Management Science*, 68(4). 645-651.
- Bardas, G. A., Veloukas, T., Koutita, O., & Karaoglanidis, G. S. (2010). Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, Qols and fungicides of other chemical groups. *Pest Management Science*, 66:967-973.
- Barkai-Golan, R. (2008). *Penicillium* Mycotoxins. In *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, R. Barkai-Golan, & N. Paster, (pp. 153-183). Academic Press.
- Battilani, P., Barbano, C., & Logrieco, A. (2008). Risk Assessment and Safety Evaluation of Mycotoxins in Fruits. In *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, R. Barkai-Golan, & N. Paster, (pp. 1-26). Academic Press.
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2012). *Biochemistry* (7th Edition εκδ.). New York: Freeman and Company.
- Borkovich, K., & Ebbole, D. (2010). *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*. Washington, DC: ASM Press.
- Brera, C., DeSantis, B., Debegnach, F., & Miraglia, M. (2008). Mycotoxins. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (pp. 364-420). Elsevier B.V.
- Chang, P.-K., Ehrlich, K., & Fujii, I. (2009). Cyclopiazonic Acid Biosynthesis of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Toxins*, pp. 74-99.
- Chen, Y.-P., Tseng, C.-P., Chien, I.-L., Wang, W.-Y., Liaw, L.-L., & Yuan, G.-F. (2008). Exploring the Distribution of Citrinin Biosynthesis Related Genes among *Monascus* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24). 11767-11772.
- Chu, F., & Bhatnagar, D. (2003). Mycotoxins. In *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*, D. Arora, P. Bridge, & D. Bhatnagar. Marcel Dekker, Inc.
- Cole, R., Dorner, J., Cox, R., Hill, R., Cluter, H., & Wells, J. (1981). Isolation of Citreoviridin from *Penicillium charlesii* Cultures and Molded Pecan Fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(4). 677-681.
- De Miccolis-Angelini, R., Habib, W., Rotolo, C., Pollastro, S., & Faretra, F. (2010). Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid. *European Journal of Plant Pathology*, 128:185-199.
- Denniston, K., Topping, J., & Caret, R. (2008). *General, Organic and Biochemistry* (6th εκδ.). New York: McGraw-Hill Companies, Inc.

- Diaz, D., Whitlow, L., & Hagler, W. (2011). Mycotoxins in Feed. *Feedstuffs*. 78-89.
- D'Mello, J. (1997). *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*. New York: CRC Press.
- FDA. (2001). *Patulin in Apple Juice, Apple Juice Concentrates and Apple Juice Products*. U.S. Food and Drug Administration:
<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/NaturalToxins/ucm212520.htm>
- FRAC. (2010). *FRAC LIST OF PLANT PATHOGENIC ORGANISMS RESISTANT TO DISEASE CONTROL AGENTS*. FRAC- Fungicide Resistance Action Committee:
<http://www.frac.info/frac/index.htm>
- Frank, H. (1992). Citrinin. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 31(3). 164-177.
- Frisvad, J., Smedsgaard, J., Larsen, T., & Samson, R. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies In Mycology*(49). 201-241.
- Gause, E., Buck, M., & Douglas, M. (1981). Binding of Citreoviridin to the β Subunit of the Yeast F1-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(2). 557-559.
- Georghiou, G. (1986). The Magnitude of the Resistance Problem. In *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management* (pp. 14-44). Washington, D.C.: National Academy Press.
- Hajjaj, H., Klaébé, A., Loret, M., Goma, G., Blanc, P., & François, J. (1999). Biosynthetic Pathway of Citrinin in the Filamentous Fungus *Monascus ruber* as Revealed by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1). 311-314.
- Hu, M., Luo, C., Grabke, A., & Schnabel, G. (2011). Selection of a Suitable Medium to Determine Sensitivity of *Monilinia fructicola* Mycelium to SDHI Fungicides. *Journal of Phytopathology*. 1-5.
- Ishii, H. (2004). Fungicide resistance: a factor limiting integrated disease control. ed Guo Yu-yuan.
- Ishii, H., Miyamoto, T., Ushio, S., & Kakishima, M. (2011). Lack of cross-resistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-resistant isolates of *Corynespora cassicola* and *Podosphaera xanthii*. *Pest Management Science*.
- Ito, Y., Maraguchi, H., Seshime, Y., Oita, S., & Yanagi, S. O. (2004). Flutolanil and carboxin resistance in *Coprinus cinereus* conferred by a mutation in the cytochrome b 560 subunit of succinate dehydrogenase complex (Complex II). *Molecular Genetics and Genomics*, 272(3): 328-335.

- Jacksov, L., & Al-Taher, F. (2008). Factors Affecting Mycotoxin Production in Fruits. In *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, R. Barkai-Golan, & N. Paster, (pp. 75-104). Academic Press.
- Karaoglanidis, G., Markoglou, A., Bardas, G., Doukas, E., Konstantinou, S., & Kalampokis, J. (2011). 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*, 145(1). 195-204.
- Keon, J. P., White, G., & Hargreaves, J. A. (1991). Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Current Genetics*, 19(6): 475-481.
- Khoury, A., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*(2). 461-493.
- Kim, Y., & Xiao, C. (2010, May). Resistance to Pyraclostrobin and Boscalid in Populations of *Botrytis cinerea* from Stored Apples in Washington State. *Plant Disease*, 94(5). 604-612.
- Klappach, K. (2008). *SDHI Fungicides*. FRAC- Fungicide Resistance Action Committee: http://www.frac.info/frac/work/work_sdhi.htm
- Klappach, K., Gold, R., Stammler, G., Lachaise, H., Mehl, A., Steiger, D., και συν. (2011). *SDHI Fungicides*. FRAC: <http://www.frac.info/frac/index.htm>
- Kuiper-Goodman, T. (2004). Risk assessment and risk management of mycotoxins in food. In *Mycotoxins in food: Detection and control*, N. Magan, & M. Olsen, (pp. 5-31). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Leroux, P., & Berthier, G. (1988). Resistance to carboxin and fenfuram in *Ustilago nuda* (Jens.) Rostr., the causal agent of barley loose smut. *Crop Protection*, 7(1): 16-19.
- Leroux, P., Ggredt, M., Leroch, M., & Walker, A. (2010). Exploring Mechanisms of Resistance to Respiratory Inhibitors in Field Strains of *Botrytis cinerea*, the Causal Agent of Gray Mold. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19): 6615-6630.
- Lima, G., Castoria, R., DeCurtis, F., Raiola, A., Ritieni, A., & DeCicco, V. (2011). Integrated control of blue mould using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples. *Postharvest Biology and Technology*, 60. 164–172.

- Linnett, P., Mitchell, A., Osselton, M., Mulheirn, L., & Beechey, R. (1978). Citreoviridin, a Specific Inhibitor of the Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *Biochemical Journal*, 170. 503-510.
- Lu, Y., Sutton, T., & Ypema, H. (2003). Sensitivity of *Alternaria mali* from North Carolina apple orchards to pyraclostrobin and boscalid. *Phytopathology*, 93(S54).
- Ma, Z., & Michailides, T. J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24: 853–863.
- Macmillan. (2001). *Plant Sciences*. New York: Macmillan Reference USA.
- MicrobeWiki. (2010). *Penicillium*. MicrobeWiki-Kenyon College: <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Penicillium>
- Miyamoto, T., Ishii, H., & Tomita, Y. (2010). Occurrence of boscalid resistance in cucumber powdery mildew in Japan and molecular characterization of the iron–sulfur protein of succinate dehydrogenase of the causal fungus. *Journal of General Plant Pathology*(76). 261-267.
- Miyamoto, T., Ishii, H., Seko, T., Kobori, S., & Tomita, Y. (2009). Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. *Plant Pathology*, 58: 1144-1151.
- Miyamoto, T., Ishii, H., Stammler, G., Kock, A., Ogawara, T., Tomita, Y., και συν. (2010). Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid. *Plant Pathology*, 59: 873-881.
- Morrissey, R., & Vesonder, R. (1986). Teratogenic potential of the mycotoxin, citreoviridin, in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 24(12). 1315-1320.
- Murphy, G., Vogel, G., Krippahl, G., & Lynen, F. (1974). Patulin Biosynthesis : The Role of Mixed-Function Oxidases in the Hydroxylation of m-Cresol. *European Journal of Biochemistry*(49). 443-455.
- Nelson, D., & Cox, M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry* (5th Ed.). Madison: Freeman and Company.
- Newcombe, G., & Thomas, P. L. (1991). Incidence of Carboxin Resistance in *Ustilago nuda*. *Phytopathology*, 81(3): 247-250.
- Nishie, K., Cole, R., & Dorner, J. (1988). Toxicity of citreoviridin. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 59(1). 31-52.
- Pitt, J. (1979). *The Genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press.

- Pitt, J. (2002). Biology and Ecology of Toxigenic *Penicillium* Species. In *Mycotoxins and Food Safety*, J. DeVries, M. Trucksess, & L. Jackson (Edit.), (pp. 29-41). Washington D.C.: Kluwer Academic.
- Pitt, J., & Hocking, A. (2009). *Fungi and Food Spoilage* (3rd Ed.). New York: Springer.
- Plimmer, J., Gammon, D., & Ragsdale, N. (2003). *Encyclopedia of Agrochemicals* (Vol. II). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Prescott, L. M. (2002). *Microbiology*. The McGraw–Hill Companies.
- Priest, J., & Light, R. (1989). Patulin Biosynthesis: Epoxidation of Toluquinol and Gentisyl Alcohol by Particulate Preparations from *Penicillium patulum*. *Biochemistry*, 28(23). 9192-9200.
- Prusky, J., McEvoy, J., Saftner, R., Conway, W., & Jones, R. (2004). Relationship Between Host Acidification and Virulence of *Penicillium* spp. on Apple and Citrus Fruit. *Phytopathology*, 91(1). 44-51.
- Puel, O., Galtier, P., & Oswald, I. (2010). Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins*(2). 613-631.
- Qin, G., Tian, S., Chan, Z., & Li, B. (2007). Crucial Role of Antioxidant Proteins and Hydrolytic Enzymes in Pathogenicity of *Penicillium expansum*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(3). 425-438.
- Russel, & E., P. (1995). Fungicide resistance: occurrence and management. *Journal of Agricultural Science*, 124: 317-323.
- Samson, R., Seifert, K., Kuijpers, A., Houbraken, J., & Frisvad, J. (2004). Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Studies In Mycology*(49). 175-200.
- Samson, R., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spierenburg, H., Seifert, K., Peterson, S., et al. (2011). Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*(70). 159-183.
- Sankawa, U., Ebizuka, Y., Noguchi, H., Isakawa, Y., Kitaghawa, S., Yamamoto, Y., και ου. (1983). Biosynthesis of citrinin in *Aspergillus terreus*. *Tetrahedron*, 39(21), pp. 3583-3591.
- Sanzani, S., Reverberi, M., Punelli, M., Ippolito, A., & Fanelli, C. (2012). Study on the role of patulin on pathogenicity and virulence of *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3). 323-331.
- Scott, P. (2004). Other Mycotoxins. In *Mycotoxins in Food: Detection and Control*, N. Magan, & M. Olsen (pp. 406-440). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.

- Serey, R., Torres, R., & Latorre, B. (2007). Pre- and post-infection activity of new fungicides against *Botrytis cinerea* and other fungi causing decay of table grapes. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 34(3), 215-224.
- Skinner, W., Bailey, A., Renwick, A., Keon, J., Gurr, S., & Hargreaves, J. (1998). A single amino-acid substitution in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase determines resistance to carboxin in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics*, 34(5): 393-398.
- Speijers, G. (2004). Patulin. In *Mycotoxins in food: Detection and Control*, N. Magan, & M. Olsen. 339-352: Woodhead Publishing Ltd.
- Stammler, G., Strobel, D., Semar, M., & Klappach, K. (2006). Diagnostics of fungicide resistance and relevance of laboratory data for the field. *Aspects of Applied Biology*, 78: 29-36.
- Stevenson, I., Langston, D., & Sanders, F. (2008). Baseline sensitivity and evidence of resistance to boscalid in *Didymella bryoniae*. *Phytopathology*, 98(6): S151.
- Sylos, C., & Rodriguez-Amaya, D. (1999). Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 16(2). 71-74.
- Varga, J., Kocsube, S., Peteri, Z., & Samson, R. (2009). An Overview of Ochratoxin Research. In *Applied Mycology*, M. Rai, & P. Bridge, (pp. 38-55). Reading: CAB International.
- Veloukas, T., Leroch, M., Hahn, M., & Karaoglanidis, G. (2011). Detection and Molecular Characterization of Boscalid-Resistant *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry. *Plant Disease*, 95(10). 1302-1307.
- Vieta, I., Savarino, A., Papa, G., Vidotto, V., Cantamessa, C., & Pugliese, A. (1996). In vitro inhibitory activity of citreoviridin against HIV-1 and an HIV-associated opportunist: *Candida albicans*. *Journal of chemotherapy*, 8(5). 351-357.
- Visagie, C. (2008). *Biodiversity in the genus Penicillium from Coastal Fynbos soil*. MSc at Stellenbosch University.
- Visconti, A., & Perone, G. (2008). The EU MycoGlobe Project: Global Integration of Mycotoxin and Toxigenic Fungal Research for Enhanced Food Safety. In *Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*, J. Leslie, R. Bandyopadhyay, & A. Visconti, (pp. 3-9). Cromwell Press, CAB International.
- Vleggaar, R. (1986). Biosynthetic studies on some polyene mycotoxins. *Pure and Applied Chemistry*, 58(2). 239-256.
- Webster, J. (1970). *Introduction to Fungi*. Cambridge: University Press.

- White, G. A., & Georgopoulos, S. G. (1986). Thiophene carboxamide fungicides: Structure-activity relationships with the succinate dehydrogenase complex from wild-type and carboxin-resistant mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 25(2): 188-204.
- WikiProject-Fungi. (2011). *Penicillium*. Wikipedia the free encyclopedia: <http://en.wikipedia.org/wiki/Penicillium>
- Xiao, C., & Boal, R. (2009, February). Preharvest Application of a Boscalid and Pyraclostrobin Mixture to Control Postharvest Gray Mold and Blue Mold in Apples. *Plant Disease*, 93(2). 185-189.
- Zhang, C., Yuan, S., Sun, H., Qi, Z., Zhou, M., & Zhu, G. (2007). Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid. *Plant Pathology*(56). 646–653.
- Γεωργόπουλος, Σ., & Ζιώγας, Β. (1992). *Αρχές και Μέθοδοι Καταπολέμησης των Ασθενιών των Φυτών*. Αθήνα.
- Ζιώγας, Β., & Μαρκόγλου, Α. (2007). *Γεωργική Φαρμακολογία*. Αθήνα.
- Παναγόπουλος, Χ. (1997). *Ασθένειες Καρποφόρων Δέντρων και Αμπέλου*. Εκδόσεις Σταμούλη.
- Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, Ε. (2008). *Γεωργικά Φάρμακα*. Ηράκλειο Κρήτης: Μέθεξις.
- Τζάμος, Ε. (2004). *Φυτοπαθολογία*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη.

