

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ « ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ & ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

*ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ*

**Μοριακή και Βιοχημική Διερεύνηση  
της  
Ανθεκτικότητας του μύκητα *Fusarium graminearum*  
στα Βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα**

ΣΕΒΑΣΤΟΣ Α. ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Φωτεινή Φλουρή

**ΑΘΗΝΑ 2014**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Μοριακή και Βιοχημική Διερεύνηση  
της  
Ανθεκτικότητας του μύκητα *Fusarium graminearum*  
στα Βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα**

Σεβαστός Α. Απόστολος

Τριμελής Εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπουσα: κα Φλουρή Φ., Λέκτορας Γ.Π.Α.

Μέλη: κ. Λάμπρου Ν., Αναπληρωτής Καθηγητής, Γ.Π.Α.

κ. Καραογλανίδης Γ., Επίκουρος Καθηγητής, Γ.Π.Α.



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

*Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας σε συνεργασία του εργαστηρίου Ευζυμικής Τεχνολογίας του τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γ.Π.Α. στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Επιστήμες και Συγχρονα Συστήματα Φυτικής Παραγωγής» κατά τη περίοδο 2012-2013. Η ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας συγχρηματοδοτήθηκε μέσω του Έργου «Υποτροφίες ΙΚΥ» από πόρους του ΕΠ «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) του ΕΣΠΑ, 2007-2013».*

*Καταρχάς θέλω να εκφράσω την βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια κα Φωτεινή Φλουρή. Οφείλω να εκφράσω ένα βαθύτατο ευχαριστώ για την αμέριστη υποστήριξη και άφογη συνεργασία που μου προσέφερε και γενικά για την διαρκή και σχολαστική παρακολούθηση της προόδου της ερευνητικής μου εργασίας.*

*Η ολοκλήρωση της ερευνητικής μου μελέτης θα ήταν αδύνατη χωρίς την επιστημονική και υλική υποστήριξη του Αναπληρωτή καθηγητή κ. Νικόλαου Λάμπρου του εργαστηρίου της Ευζυμικής Τεχνολογίας. Τον ευχαριστώ εγκαρδίως για την άφογη του συνεργασία και την δυνατότητα που μου έδωσε να εντυφλώ για πρώτη μου φορά στο αντικείμενο της ευζυμικής ανάλυσης και της *in silico* μοντελοποίησης.*

*Επίσης, μεγάλη ήταν και η συμβολή του Επίκουρου καθηγητή κ. Γεώργιου Καραογλανίδη του Α.Π.Θ., τον οποίο ευχαριστώ βαθύτατα για το πολύτιμο του χρόνο που μου διάθεσε στην επίσκεψη που είχα στην έδρα του στο εργαστήριο της Φυτοπαθολογίας αλλά και για τις πολύτιμες του υποδείξεις και συμβουλές που μου προσέφερε κατά την πορεία της ερευνητικής μου μελέτης.*

*Δεν θα μπορούσα βέβαια να παραλείψω να εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου τον κ. Αναστάσιο Μαλανδράκη για την πολύτιμη του συνεργασία, την καθοδήγηση, την μετάδοση γνώσεων στο κομμάτι των μοριακών αναλύσεων αλλά και γενικότερα για την διαρκή προθυμία και βοήθεια του που δεν δίστασε ποτέ να μου δώσει στα πλαίσια μιας φιλικής πάντοτε συνεργασίας.*

*Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη Ε.Τ.Ε.Π., Γεωργία Παζιότου του εργαστηρίου της Γεωργικής Φαρμακολογίας και Νάντια Ασπρακά για την πολύτιμη συμβολή τους στο αντικείμενο των χημικών αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του LC/MS.*

*Χρωστάω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στις διδάκτορες του εργαστηρίου της Ευζυμικής Τεχνολογίας, Εύη Χρονοπούλου και Μαριάννα Χατζηκωνσταντίνου του*

*εργαστηρίου της Ευζυμικής Τεχνολογίας για την συνεργασία τους στην εκτέλεση των πειραμάτων της ευζυμικής ανάλυσης και στην εκπαίδευση μου με τον λογισμικό PyMoL.*

*Δεν θα ήθελα βέβαια να παραλείψω να ευχαριστήσω τη Διεύθυνση του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών για την υποτροφία που μου χορήγησε με σκοπό την εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας.*

*Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου, που μου προσέφερε ηθική και υλική συμπαράσταση σε όλη τη διαδρομή των σπουδών μου, μέχρι σήμερα.*

*Αθήνα, Ιανουάριος, 2014*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	11
-----------------------	----

### ΜΕΡΟΣ Ι: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

<b>1. Ο μύκητας <i>F. graminearum</i> και μέτρα διαχείρισης του στα σιτηρά</b> .....	15
<b>2. Τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα</b> .....	21
2.1. Γενικά .....	21
2.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες .....	21
2.3. Βιοχημική δράση .....	24
2.4. Συμπεριφορά στα φυτά και το έδαφος .....	26
2.5. Μεταβολισμός .....	27
<b>3. Η ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα</b> .....	29
3.1. Γενικά στοιχεία περί του προβλήματος της ανθεκτικότητας στα . μυκητοκτόνα .....	29
3.2. Μηχανισμοί ανάπτυξης ανθεκτικότητας .....	36
3.2.1. Γενικά .....	36
3.2.2. Αλλαγή στη θέση δράσης.....	36
3.2.3. Υπερέκφραση του βιοχημικού στόχου.....	41
3.2.4. Λειτουργία εναλλακτικών συστημάτων .....	42
3.2.5. Αποτοξικοποίηση.....	44
3.2.6. Μειωμένη μετατροπή του μη τοξικού μορίου.....	47
3.2.7. Μειωμένη είσοδος-αυξημένη απέκκριση.....	48

3.3. Η σημασία μελέτης του μηχανισμού ανάπτυξης ανθεκτικότητας των μυκητοκτόνων .....	52
<b>4. Η ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα .....</b>	<b>54</b>
<b>5. Σκοπός της εργασίας .....</b>	<b>60</b>

## **ΜΕΡΟΣ ΙΙ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

<b>1. Βιολογικό υλικό .....</b>	<b>65</b>
<b>2. Θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας .....</b>	<b>65</b>
<b>3. Καλλιέργεια, διατήρηση και ανανέωση των στελεχών του μύκητα <i>F.</i> <i>graminearum</i> .....</b>	<b>66</b>
<b>4. Χημικές ουσίες .....</b>	<b>66</b>
<b>5. Επίδραση του carbendazim στη μορφολογία των κυττάρων .....</b>	<b>68</b>
<b>6. Αποτελεσματικότητα καταπολέμησης των ανθεκτικών στελεχών με βενζιμιδαζολικά <i>in vivo</i> .....</b>	<b>70</b>
<b>7. Μοριακός χαρακτηρισμός της <math>\beta_1</math> και <math>\beta_2</math>-τουμπουλίνης</b>	
7.1. Απομόνωση ολικού γονιδιακού DNA και RNA .....	71
7.2. Σύνθεση μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA (cDNA) .....	73
7.3. Σχεδιασμός εκκινητών .....	75
7.4. Αντιδράσεις και συνθήκες PCR .....	76
7.5. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτική αγαρόζη .....	77
7.6. Καθαρισμός προϊόντων .....	78
7.7. Αλληλούχιση προϊόντων PCR .....	79
<b>8. Ομόλογη μοντελοποίηση της <math>\beta_2</math>-τουμπουλίνης .....</b>	<b>79</b>



## 9. Μελέτη του μηχανισμού υπερέκφρασης των γονιδίων $\beta_1$ και $\beta_2$ -

### τουμπουλίνης

10.1.	Σχεδιασμός εκκινητών .....	80
10.2.	Προετοιμασία δειγμάτων.....	80
10.3.	Αντιδράσεις και συνθήκες RT-PCR .....	81
10.4.	Υπολογισμός της σχετικής έκφρασης του γονιδίου της $\beta_1$ και $\beta_2$ - τουμπουλίνης στα δείγματα cDNA .....	82

## 11. Διερεύνηση του μηχανισμού αποτοξικοποίησης

10.1.	<i>In vitro</i> αποτοξικοποίηση με τη χρήση συνεργιστών.....	82
10.2.	Εκτίμησης ενεργότητας των ενζύμων αποτοξικοποίησης	
10.2.1.	Λύση των κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος ( <i>cell free extract</i> ) .....	83
10.2.2.	Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης .....	84
10.2.3.	Εκτίμηση της ενεργότητας της μεταφοράς της γλουταθειόνης.....	86
10.2.4.	Ενεργότητα του ενζύμου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης .....	88
10.2.5.	Έλεγχος δράσης των βενζιμιδαζολικών ως αναστολείς του ενζύμου GST .....	90

## 11. Διερεύνηση της κινητικής εισόδου-απέκκρισης ..... 91

## ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.	Επίδραση του carbendazim στη μορφολογία των κυττάρων .....	95
2.	Αποτελεσματικότητα καταπολέμησης των ανθεκτικών στελεχών με βενζιμιδαζολικά <i>in vivo</i> .....	97
3.	Μοριακός χαρακτηρισμός των γονιδίων $\beta_1$ και $\beta_2$ -τουμπουλίνης	

	10
3.1. Εισαγωγή .....	103
3.2. Διαγνωστική PCR .....	103
3.3. Αλληλούχιση του γονιδίου της β <sub>1</sub> και β <sub>2</sub> -τουμπουλίνης .....	104
3.4. Μοριακή μοντελοποίηση της θέσης πρόσδεσης του μυκητοκτόνου .....	112
<b>4. Έκφραση των γονιδίων β<sub>2</sub> και β<sub>1</sub>-τουμπουλίνης .....</b>	<b>116</b>
<b>5. Διερεύνηση του μηχανισμού της αποτοξικοποίησης</b>	
5.1. Εισαγωγή .....	118
5.2. Μυκοτοξική δράση βενζιμιδαζολικών παρουσία συνεργιστών.....	120
5.3. Εκτίμησης ενεργότητας των ενζύμων αποτοξικοποίησης	
5.3.1. <i>Ενεργότητα του ενζύμου της τρानσφεράσης της γλουταθειόνης .....</i>	<i>126</i>
5.3.2. <i>Ενεργότητα του ενζύμου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.....</i>	<i>130</i>
5.3.3. <i>Έλεγχος δράσης των βενζιμιδαζολικών ως αναστολείς</i> <i>του ενζύμου GST .....</i>	<i>131</i>
<b>6. Διερεύνηση της κινητικής εισόδου-απέκκρισης</b>	
6.1. Εισαγωγή .....	134
6.2. Πειράματα κινητικής απορρόφησης του carbendazim.....	135
<b>ΜΕΡΟΣ IV: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>141</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>155</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα εργασία, μετρίου και υψηλού επιπέδου ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά στελέχη του μυκοτοξικογόνου και φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium graminearum* Schwabe που είχαν σε προηγούμενη μελέτη αποκτηθεί μέσω μεταλλαξιγέννεσης και κατόπιν χαρακτηρίσθαι φυτοπαθολογικά (Sevastos και συνεργάτες, 2013), διερευνήθηκαν ως προς τον υπεύθυνο μηχανισμό ανθεκτικότητας των στελεχών αυτών στα βενζιμιδαζολικά.

Πειράματα εκτίμησης της έκφρασης ανθεκτικότητας *in vivo* έδειξαν ότι τα ανθεκτικά στελέχη εξέφραζαν την ανθεκτικότητα τους σε σπάδικες καλαμποκιού που είχαν προηγουμένως εμβαπτιστεί σε τοξικές συγκεντρώσεις carbendazim (MBC) πράγμα το οποίο σημαίνει ότι ο κίνδυνος για εμφάνιση και επικράτηση τέτοιων ανθεκτικών στελεχών στον αγρό είναι εφικτός.

Μοριακές μελέτες αλληλούχισης του γονιδίου που κωδικοποιεί το βιοχημικό στόχο των βενζιμιδαζολικών και με τη χρήση της τεχνικής Allele Specific Polymerase Chain Reaction, απεκάλυψαν την ύπαρξη δύο διαφορετικών μεταλλαγών στο γονίδιο της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης των μετρίου επιπέδου ανθεκτικότητας στελεχών. Η πρώτη μεταλλαγή που ανιχνεύτηκε ήταν η H6N, όπου υπήρξε αντικατάσταση της ιστιδίνης στη θέση 6 με ασπαραγίνη. Η δεύτερη μεταλλαγή αφορούσε την F200Y, όπου υπήρξε αντικατάσταση της φαινυλανίνης στη θέση 200 με τυροσίνη. Καμία μεταλλαγή δεν ανιχνεύτηκε στα υψηλής ανθεκτικότητας στελέχη. Αλληλούχιση του ομόλογου γονιδίου της  $\beta_1$ -τουμπουλίνης έδειξε ότι η ανθεκτικότητα των στελεχών δεν φαίνεται να οφείλεται σε σημειακές μεταλλαγές του γονιδίου αυτού.

Μελέτες εκτίμησης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων της  $\beta_1$  και  $\beta_2$  τουμπουλίνης μέσω της τεχνικής Real Time-Polymerase Chain Reaction, απεκάλυψαν ότι αμφότερες οι δύο  $\beta$ -τουμπουλίνες των ανθεκτικών στελεχών εκφράζονταν σε υψηλότερα επίπεδα από ότι στο άγριο στέλεχος, όταν η καλλιέργεια των στελεχών γινόταν σε υλικό απουσία MBC. Αντιθέτως, παρουσία MBC φάνηκε να οδηγεί σε μείωση των επιπέδων έκφρασης των  $\beta$ -τουμπουλινών στα περισσότερα από τα ανθεκτικά στελέχη σε σχέση με τα επίπεδα που μάρτυρα. Παρ' όλα αυτά δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των δύο γονιδίων και των παρατηρούμενων ανθεκτικών φαινοτύπων

Ακολούθησε διερεύνηση άλλων βιοχημικών μηχανισμών ανθεκτικότητας όπως η αποτοξικοποίηση και η μειωμένη είσοδος-αυξημένη απέκκριση. Όσο αναφορά της

μελέτες αποτοξικοποίησης αρχικά αξιολογήθηκε η επίδραση των συνεργιστών s,s,s-tributyl phosphorotrithioate, piperonyl butoxide και diethyl malate στην μυκητοτοξικότητα των βενζιμιδαζολικών και φάνηκε ότι μόνο στη περίπτωση του συνεργιστή diethyl malate υπήρξε σημαντική μυκητοτοξική δράση στα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη με τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. Στη συνέχεια η μελέτη της αποτοξικοποίησης προσεγγίστηκε πιο ειδικά μέσω ενζυμικών αναλύσεων της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSPO) από εκχυλίσματα κυττάρων των στελεχών που είχαν αναπτυχθεί προηγουμένως σε διάφορες συγκεντρώσεις του MBC. Παρατηρήθηκε ότι όλα τα στελέχη παρουσίαζαν υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου της GST σε σχέση με το μάρτυρα αν και δεν φάνηκαν να υπάρχουν σημαντικές διαφορές που να δικαιολογούν τον μηχανισμό της ανθεκτικότητας στα υψηλής ανθεκτικότητας στελέχη. Ενζυμικές αναλύσεις της GSPO, δεν έδειξαν ότι η δραστηριότητα του ενζύμου αυτού ευθύνεται για τον μηχανισμό ανθεκτικότητας σε κανένα από τα ανθεκτικά στελέχη.

Αξιολόγηση του μηχανισμού της κινητικής εισόδου-απέκκρισης των βενζιμιδαζολικών μέσω της χρήσης της UV- φασματοφωτομετρίας έδειξε πως η συγκέντρωση του MBC στο υλικό ανάπτυξης των υψηλής ανθεκτικότητας στελεχών μειούταν σημαντικά σε σύγκριση με το ευαίσθητο στέλεχος, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι υπεύθυνος μηχανισμός ανθεκτικότητας των στελεχών αυτών δεν μπορεί να είναι η αυξημένη απέκκριση.

Από τα αποτελέσματα των μελετών αυτών, προκύπτει πως η ανθεκτικότητα στα μετρία ανθεκτικότητας στελέχη του μύκητα *F. graminearum* οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ύπαρξη μεταλλαγών στο γονίδιο της β<sub>2</sub>-τουμπουλίνης ενώ στα υπόλοιπα της υψηλής ανθεκτικότητας στελέχη ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας παραμένει άγνωστος και δεν φαίνεται να οφείλεται σε αλλαγή στη θέση δράσης, σε υπερέκφραση του βιοχημικού στόχου, σε αποτοξικοποίηση και σε αυξημένη απέκκριση.

Λέξεις κλειδιά: βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, ανθεκτικότητα, carbendazim, σημειακές μεταλλαγές, β-τουμπουλίνη, αποτοξικοποίηση, έκφραση γονιδίου, είσοδος-απέκκριση.

**ΜΕΡΟΣ Ι**  
***ΕΙΣΑΓΩΓΗ***

---



## 1. Ο μύκητας *Fusarium graminearum* και μέτρα διαχείρισης του στα σιτηρά

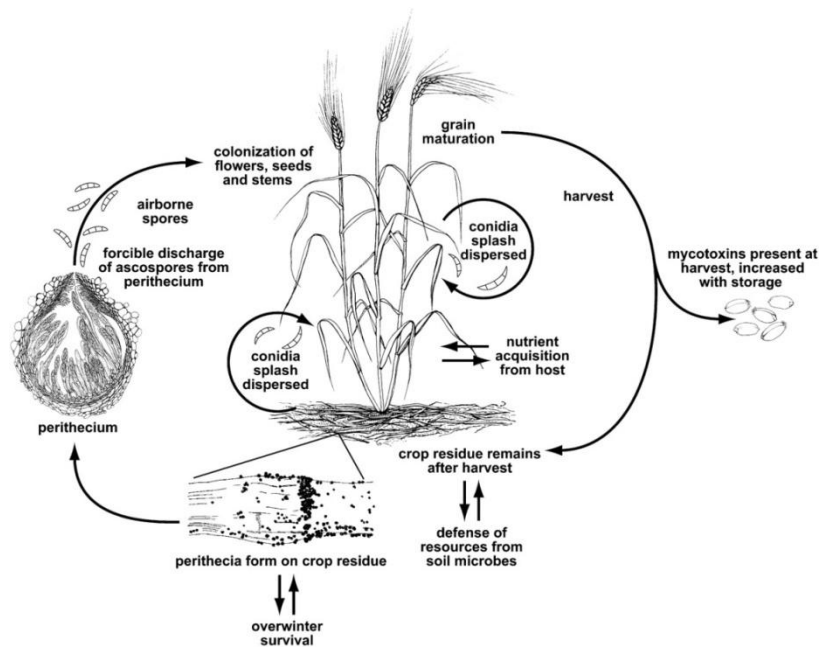
Ο μύκητας *F. graminearum* (τέλεια μορφή *Gibberella zeae*) ανήκει στην κλάση *Hymenoascomycetes* και στη τάξη *Hypocreales*. Ο μύκητας είναι απλοειδής, ομόθαλλος και συχνά παρουσιάζει έντονο παρασεξουαλισμό. Ο μύκητας παράγει μακροκονίδια διαστάσεων 25-50 x 3-4 μm που μπορεί να εμφανίζουν 3-5 septa και σπανιότερα χλαμυδοσπόρια (10-12 μm). Η ανάπτυξη του μύκητα ευνοείται σε δροσερές και υγρές συνθήκες (Sutton 1982; Viger et al. 1997; Gotz et al, 2008, Manninger 1979; Bottalico & Perrone, 2002; Brennan et al., 2003). Στα σιτηρά προσβάλλει όλα σχεδόν τα υπέργεια και υπόγεια φυτικά μέρη σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του φυτού (σπόρο, έξοδο φυταρίων, άνθηση).

Κύρια πηγή μολυσμάτων είναι τα υπολείμματα της καλλιέργειας στα οποία ο μύκητας διαχειμάζει κυρίως με την μορφή περιθηκίων (τέλεια μορφή) ή με μυκηλιακές υφές αλλά μπορεί και με χλαμυδοσπόρια αν επικρατήσουν αντίξοες συνθήκες. Από τα περιθήκια, με την επικράτηση κατάλληλων συνθηκών θερμοκρασίας (12-22°C), υγρασίας (<80 %) και με την βοήθεια του αέρα ελευθερώνονται τα ασκοσπόρια και μολύνουν τα διάφορα εναέρια φυτικά τμήματα (Εικόνα 1.1). Η απελευθέρωση των ασκοσπορίων γίνεται κατά τις νυχτερινές ώρες και η μεταφορά τους μπορεί να φτάσει σε μεγάλες αποστάσεις (Maldonado-Ramirez et al., 2005). Ο σχηματισμός των ασκών πραγματοποιείται αν επικρατήσουν για μία περίοδο περίπου 3 εβδομάδων χαμηλές εντάσεις ακτινοβολίας (μικρή φωτοπερίοδος). Μετά την εγκατάσταση του παθογόνου, τα παραγόμενα κονίδια με την επικράτηση ευνοϊκών θερμοκρασιών (16-36 °C) και με τη συμβολή ανεμόβροχου προκαλούν κύριες και δευτερεύουσες μολύνσεις (Sutton 1982, Horberg, 2002, Paul et al., 2004). Τα κονίδια αφού έρθουν σε επαφή με τους φυτικούς ιστούς, ενεργοποιούν μηχανισμούς παθογένειας (MAP κινάσες) και παράγουν λυτικά ένζυμα για να διευκολυνθεί η είσοδος του μύκητα στους φυτικούς ιστούς (Wanyoike et al., 2002; Purdy, 1978; Olutiola, 1978; Jencznionka and Shaefer, 2005).

Εκτός από τα υπολείμματα της καλλιέργειας ο μύκητας μπορεί να επιβιώσει στο εσωτερικό του σπόρου και στη συνέχεια να μεταδίδεται με την έκπτυξη της κοτύλης στο αναπτυσσόμενο φυτάριο (Kabeere et al., 1997; Sutton 1982). Τα συμπτώματα που συχνά παρατηρούνται είναι μειωμένη βλαστική ικανότητα των σπόρων, σήψεις εμβρύων,

καθυστέρηση της έκπτυξης έως και πλήρης παρεμπόδιση του μεσοκοτυλίου καθώς επίσης σήψεις και τήξεις λαιμών και ριζών (Chelkowski, 1989).

Σε μεταγενέστερα στάδια, οι κύριες μολύνσεις εμφανίζονται κατά την περίοδο άνθησης όταν επικρατήσουν συνθήκες υψηλής υγρασίας και θερμοκρασίας (Miller, 1994). Στη περίπτωση του ανοιξιάτικου κριθαριού η προσβολή παρατηρείται κυρίως μετά την άνθηση, λόγω της ιδιόμορφης άνθησης του (McMullen, 2008). Η ασθένεια εκδηλώνεται με συμπτώματα λευκών αποχρώσεων από την κορυφή της ανθοταξίας τα οποία επεκτείνονται προς τους υποκείμενους ιστούς ( Reid & Hamilton, 1996; Shea Miller et al., 2007). Τελικά τα προσβαλλόμενα σημεία λαμβάνουν κόκκινες αποχρώσεις λόγω των σποροδόχειων και κονιδίων του μύκητα αλλά και των συντιθέμενων χρωστικών του ( π.χ. αuroφουσαρίνη).



**Εικόνα 1.1.** Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα *F. graminearum*

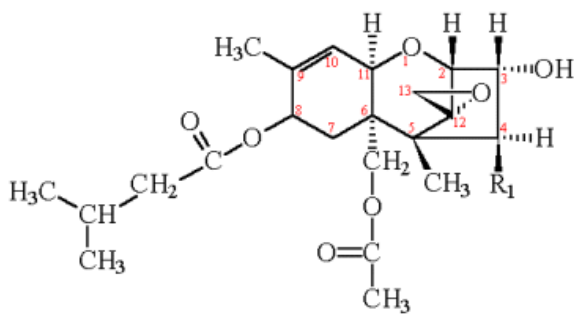
Οι μολύνσεις που προκαλεί ο μύκητας στα σιτηρά συνοδεύονται συχνά και από την παρουσία διαφόρων μυκοτοξινών με διασυστηματικές ιδιότητες πράγμα που σημαίνει ότι οι τοξίνες μπορούν να διαχέονται και σε σημεία πέραν της μόλυνσεως (Young & Miller 1985; Sutton, 1982; Baliko & Funnel, 1976). Μετά το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου μπορεί να σχηματιστεί πάνω στα προσβαλλόμενα μέρη η τέλεια μορφή με την οποία



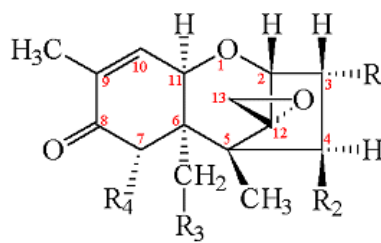
διαχειμάζει έως και δύο έτη (Pereyra et al.,2004). Συνήθως η τέλεια μορφή σχηματίζεται νωρίς την επόμενη καλλιεργητική περίοδο (Khonga & Sutton,1988).

Οι μυκοτοξίνες του μύκητα *Fusarium graminearum*

Ο *F. graminearum* μπορεί να παράξει τουλάχιστον 13 διαφορετικές μυκοτοξίνες. Οι κύριες ομάδες μυκοτοξινών που παράγονται από το είδος αυτό είναι οι τριχοθικές και τα διάφορα παράγωγα της ζεαραλονόνης. Αναλόγως με τη χημική τους δομή οι τριχοθικές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις τύπους, με πιο σημαντικές τις τριχοθικές τύπου Α και Β (Εικ.1.2, 1.3.) (D' Mello, 1994).



Εικόνα 1.2. Οι τριχοθικές Α τύπου



Εικόνα 1.3. Οι τριχοθικές Β τύπου

Ο *F. graminearum* παράγει κυρίως τριχοθικές τύπου Β όπως δεοξινιβαλενόλη (DON) και τα ακετυλιωμένα παράγωγα της 15-acetyl και 3-ακέτυλο-δεοξινιβαλενόλη, νιβαλενόλη (NIV), fusarenon-X (D' Mello, 1997). Η ζεαραλενόνη αποτελεί μια ακόμη μυκοτοξίνη που παράγεται από το είδος *F. graminearum*. Συνήθως αυξάνεται η παραγωγή της κατά τα τελικά στάδια καλλιέργειας των σιτηρών και μπορεί να συνεχίζεται η παραγωγή και μετά την αποθήκευση (Caldwell and Tuite, 1970).

Τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει έντονο ενδιαφέρον για τις τριχοθικές που παράγονται από το γένος *Fusarium* λόγω της μεγάλης τοξικής σημασίας τους στα θηλαστικά (Bohm, 2000a, b; Placinta et al., 2003). Οι τοξικές επιδράσεις των τριχοθικών στους χοίρους αφορούν προβλήματα όπως εμετοί (vomitoxin-εμμετοξίνη), απώλεια βάρους, γαστρεντερικές διαταραχές, διάρροιες, άρνηση τροφής, καταστολή του ανοσοποιητικού

συστήματος και παρεμπόδιση της σύνθεσης πρωτεϊνών (Prelusky et al., 1994). Παρόμοια συμπτώματα έχουν βρεθεί και σε μηρυκαστικά, πουλερικά, υδρόβια είδη και κατοικίδια (Díaz, 2005). Στα βοοειδή και τα πρόβατα συνήθως εκδηλώνονται με άρνηση τροφής και μείωση της γαλακτοπαραγωγής (Trenholm et al., 1984). Χαρακτηρίζονται από γρήγορη μετακίνηση εντός των ιστών αλλά λόγω του σχετικά υδρόφιλου χαρακτήρα τους δεν συσσωρεύονται στους λιπώδεις ιστούς ούτε μεταφέρονται στο γάλα και στα αυγά (Riley and Pestka, 2005).

Η ζεαραλενόνη χαρακτηρίζεται από οιστρογόνο δράση στα θηλαστικά, με συμπτώματα την καθυστέρηση ή την διακοπή του οίστρου, τη θανάτωση των εμβρύων ενώ στα αρσενικά μπορεί να παρατηρηθούν προβλήματα στην σπερματογένεση κ.α. (D’Mello et al., 1999). Πολλές φορές ο μεταβολισμός της ΖΕΑ μπορεί να οδηγήσει σε παράγωγα έως και 3-4 φορές πιο επικίνδυνα από τοξικολογικής απόψεως (Richardson et al., 1985).

#### *Μέτρα αντιμετώπισης της φουζαρίωσης των στάχων (Fusarium Head Blight)*

Η αντιμετώπιση της ασθένειας μπορεί να γίνει με προληπτικά αλλά και θεραπευτικά μέτρα. Ωστόσο, για να υπάρξει αποτελεσματική αντιμετώπιση της ασθένειας απαιτούνται η μελέτη και η κατανόηση των παραμέτρων εκείνων που ευνοούν την ανάπτυξη του μύκητα. Κατά τον Teich, 1989 η καταπολέμηση της ασθένειας μπορεί να γίνει με :

- Καταστροφή και απομάκρυνση ζιζανίων στα οποία ενδέχεται να διατηρείται ο μύκητας
- Καταστροφή και απομάκρυνση των υπολειμμάτων της προηγούμενης καλλιέργειας.
- Ο σπόρος που θα επιλεγεί θα πρέπει να είναι απαλλαγμένος από μολύσματα του μύκητα και να επιλέγονται σπόροι χωρίς διαρρηγμένο το εξωτερικό περίβλημα.
- Εναλλαγή των καλλιεργειών και αποφυγή διαδοχής σιταριού μετά από αραβόσιτο.
- Αραιότερη σπορά ώστε να εξασφαλίζονται καλύτερες συνθήκες αερισμού.
- Η συγκομιδή να επιλέγεται σε ένα στάδιο υγρασίας των σπόρων μικρότερο του 18% και η αποθήκευση τους να πραγματοποιείται σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας και θερμοκρασίας.
- Μελέτη των μετεωρολογικών δεδομένων ιδίως κατά το στάδιο της άνθησης
- Καταπολέμηση εντόμων ως ενδιάμεσων φορέων της ασθένειας

- Προτιμάται το άζωτο να δίνεται υπό μορφή ουρίας και όχι νιτρικών. Αυτό γίνεται επειδή η ουρία έχει δείχθει ότι αυξάνει τον πληθυσμό των ακτινομυκήτων που ανταγωνίζονται τα Φουζάρια και ακόμα εμποδίζει την δημιουργία χλαμυδοσπορίων του στο έδαφος (Loffler et al, 1986).
- Βιοτεχνολογικές μέθοδοι (ποικιλίες με γόνους ανθεκτικότητας)
- Ανθεκτικές ποικιλίες μέσω της κλασσικής βελτίωσης
- Χρήση ανταγωνιστικών μικροοργανισμών (Boergel et al 2009, Kohn et al, 1999)
- Μυκητοκτόνα

Όπως και σε πολλές άλλες μυκητολογικές ασθένειες των φυτών, η χρήση μυκητοκτόνων έχει συμβάλει αρκετά στην αντιμετώπιση της ασθένειας στον αγρό (Mesterhazy, 2003). Υπάρχουν μυκητοκτόνα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν προληπτικά εφαρμόζοντας τα στον σπόρο των σιτηρών. Πέρα όμως από αυτό η χρήση μυκητοκτόνων με ψεκασμούς φυλλώματος κατά το στάδιο της άνθησης έχει δείξει ότι αποτελεί ένα αποτελεσματικό μέσο για την αντιμετώπιση του παθογόνου αλλά και τη μείωση παραγωγής των μυκοτοξινών του. Η χρήση όμως αυτών των μυκητοκτόνων περιορίζεται στο σιτάρι και το κριθάρι, ενώ μέχρι τώρα δεν υπάρχουν εγκεκριμένα μυκητοκτόνα για την αντιμετώπιση της ασθένειας του μύκητα στον αραβόσιτο (Bayer Cropscience, 2010). Οι κύριες ομάδες μυκητοκτόνων με εξειδικευμένη δράση που παρέχουν αποτελεσματική αντιμετώπιση του μύκητα είναι τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης των στερολών (SBIs- Sterol Biosynthesis Inhibitors) και λιγότερο οι στρομπιλουρίνες. Η ομάδα των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης των στερολών και συγκεκριμένα η υποομάδα των τριαζολικών αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη ομάδα μυκητοκτόνων για την αντιμετώπιση της ασθένειας (Πίνακας 1.1). Μία άλλη υποομάδα με μικρότερη αποτελεσματικότητα είναι οι στρομπιλουρίνες οι οποίες όταν εφαρμόζονται συνδυαστικά με τα τριαζολικά μπορεί να δώσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα άρχισαν να εφαρμόζονται στην πράξη για την αντιμετώπιση των ασθενειών του μύκητα από την δεκαετία του '80 και κατά σειρά αποτελεσματικότητας είναι το carbendazim, το benomyl, το thiophanate-methyl και το thiabendazole (Wilcoxson, 1996).

### ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1:

Τα μυκητοκτόνα που έχουν βρει εφαρμογή μέχρι τώρα για την καταπολέμηση της ασθένειας του *Fusarium graminearum* στα σιτηρά (Edwards et al., 2001).

Δραστική ουσία	Χημική ομάδα
flusilazole 125 g/L,carbendazim 250 g/L	Τριαζολικά, βενζιμιδαζολικά
cyproconazole 120 g/L and carbendazim 300 g/L	Τριαζολικά, βενζιμιδαζολικά
cyproconazole 40 g/L and chlorothalonil 375 g/L	Τριαζολικά, άλλη
cyproconazole 160 g/L and carbendazim 300 g/L	Τριαζολικά, βενζιμιδαζολικά
azoxystrobin 250 g/L	Στρομπιλουρίνες
propiconazole 125 g/L, fenpropimorph 375 g/L	Τριαζολικά, μορφολινικά
tebuconazole 125 g/L and tridemorph 165 g/L	Τριαζολικά, μορφολινικά
carbendazim 6%, maneb 50%	βενζιμιδαζολικά, διθειοκαρβαμιδικά
triadimenol 250 g/L	τριαζολικά
triadimefon 350 g/kg	μορφολινικά
benomyl 500 g/L	βενζιμιδαζολικά
metconazole 60 g/L	τριαζολικά
fenpropimorph 25%, carbendazim 6.5%, chlorothalonil 27%	μορφολινικά, βενζιμιδαζολικά, άλλη
mancozeb 80%	διθειοκαρβαμιδικά
epoxiconazole 125 g/L, carbendazim 125 g/L	τριαζολικά, βενζιμιδαζολικά
tebuconazole 167 g/L, spiroxamine 250 g/L, triadimenol 43 g/L	τριαζολικά, σπυροκεταλαμίνες, τριαζολικά
tebuconazole 125 g/L and triadimephon 100 g/L	τριαζολικά, μορφολινικά
tebuconazole 125 g/L and triadimephon 100 g/L	τριαζολικά, μορφολινικά
tebuconazole 250 g/L	τριαζολικά
tebuconazole 250 g/L	τριαζολικά
bromuconazole 200 g/L	τριαζολικά
bromuconazole 133 g/L and tridemorph 233 g/L	τριαζολικά, μορφολινικά
tebuconazole 250 g/L	τριαζολικά
flutriafol 117.5 g/L, carbendazim 250 g/L	τριαζολικά, βενζιμιδαζολικά
flutriafol 94 g/L, carbendazim 200 g/L	τριαζολικά, βενζιμιδαζολικά
flutriafol 47 g/L and chlorothalonil 300 g/L	τριαζολικά, άλλη
spiroxamin	σπυροκεταλαμίνες
triazbutyl	άλλη
kresoxym-methyl 125 g/L, epoxiconazole 125 g/L	μεθοξυμινοοξικά, τριαζολικά
carbendazim 250 g/L	βενζιμιδαζολικά
spiroxamine	σπυροκεταλαμίνες
tebuconazole 167 g/L and carbendazim 133 g/L	τριαζολικά, βενζιμιδαζολικά
fenpropimorph 375 g/L, prochloraz 225 g/L	μορφολινικά, μιδαζολικά
tebuconazole 250 g/L and triadimenol 125 g/L	τριαζολικά, τριαζολικά
propiconazole 125 g/L, fenpropimorph 500 g/L	τριαζολικά, μορφολινικά
thiabendazole	βενζιμιδαζολικά
epoxiconazole 125 g/L	τριαζολικά
epoxiconazole 84 g/L and fenpropimorph 250 g/L	τριαζολικά, μορφολινικά
epoxiconazole and fenpropimorph	τριαζολικά, μορφολινικά
hexaconazole 167 g/L, carbendazim 100 g/L	τριαζολικά, βενζιμιδαζολικά
fenbuconazole 37.5 g/L, carbendazim 100 g/L	τριαζολικά, βενζιμιδαζολικά
flusilazole 250 g/L, carbendazim 125 g/L	τριαζολικά, βενζιμιδαζολικά
propiconazole 62.5 g/L and chlorothalonil 250 g/L	τριαζολικά, άλλη
fenpropimorph 300 g/L, propiconazole 125 g/L	μορφολινικά, τριαζολικά
prochloraz 45%	μιδαζολικά
prochloraz 450 g/L	μιδαζολικά
prochloraz 300 g/L, carbendazim 80 g/L	μιδαζολικά, βενζιμιδαζολικά
cyproconazole 53.4 g/L, thiophanate-methyl 300 g/L	τριαζολικά, βενζιμιδαζολικά
epoxiconazole 125 g/L and tridemorph 375 g/L	τριαζολικά, μορφολινικά
propiconazole 125 g/L	τριαζολικά
propiconazole 250 g/L	τριαζολικά
tebuconazole 167 g/L and carbendazim 133 g/L	τριαζολικά, βενζιμιδαζολικά

## 2. Τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα

### 2.1. Γενικά

Η ανακάλυψη μυκητοξικών ενώσεων, όχι μόνο με προστατευτική αλλά και θεραπευτική δράση, αποτέλεσε ένα δύσκολο εγχείρημα για πολλούς ερευνητές τη δεκαετία του 60. Με την εισαγωγή των βενζιμιδαζολικών ενώσεων ξεκίνησε μία νέα περίοδος για τη χρήση των μυκητοκτόνων στη γεωργική πράξη. Η επιτυχία που γνώρισε αυτή η ομάδα των ενώσεων βασίστηκε στην αποτελεσματική, πολύ καλή διασυστηματική και αρκετά εκλεκτική βιολογική δράση εναντίον πλήθους φυτοπαθογόνων των γενών *Fusarium*, *Septoria*, *Monilia*, *Erysiphe*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Pseudocercospora*, *Venturia*, *Taphrina* κ.α. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Επίσης τεράστια εφαρμογή έχουν βρει ορισμένες από ενώσεις της ομάδας αυτής για την αντιμετώπιση διαφόρων ζωοпараσιτών ενώ τα τελευταία χρόνια γίνεται λόγος και για τις αντιβακτηριδιακές και αντικαρκινικές τους ιδιότητες (Delp, 1995; Podunavac-Kuzmanovic et al, 2007).

### 2.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η βασική τους δομή αποτελείται από ένα ετεροκυκλικό βενζιμιδαζολικό δακτύλιο ενίοτε μόνο- και άλλοτε δι-υποκατεστημένος (Πίνακας 1.2.). Η ύπαρξη του βενζιμιδαζολικού δακτυλίου προσδίδει σε όλα τα βενζιμιδαζολικά χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες και στο υπέρυθρο στις περιοχές 240-290 nm και 1650-1500  $\text{cm}^{-1}$ , αντίστοιχα. Συμμετρικές βενζιμιδαζόλες που διατηρούν ελεύθερο το υδρογόνο τους σε κάποιο από τα άτομα N της ιμιδαζόλης παρουσιάζουν συγκεκριμένη ταυτομορφή, ενώ αντίθετα οι ασύμμετρες βενζιμιδαζόλες μπορεί να συνυπάρχουν με διάφορες ταυτομορφές εντός του διαλύματος. Στη περίπτωση των μυκητοκτόνων όλες οι βενζιμιδαζολικές ενώσεις ανήκουν στη πρώτη κατηγορία. Τα βενζιμιδαζολικά συμπεριφέρονται κατά κανόνα ως ασθενείς βάσεις και έχουν την ικανότητα να αντιδρούν με τα οξέα και να σχηματίζουν περισσότερο υδατοδιαλυτά άλατα. Ο βασικός τους χαρακτήρας προέρχεται από την ιδιότητα των ατόμων N της ιμιδαζόλης του μορίου τους να δέχεται ένα πρωτόνιο.

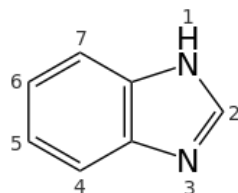
Το είδος των υποκαταστατών που υπάρχουν και οι διάφορες θέσεις που αυτοί δομούν το βενζιμιδαζολικό δακτύλιο επηρεάζουν τις χημικές και τις βιολογικές του ιδιότητες. Κατά κανόνα υποκαταστάτες οι οποίοι δρουν ως δότες ηλεκτρονίων αυξάνουν την βασική τους αντίδραση, ενώ το αντίθετο ισχύει για ηλεκτρονιόφιλους υποκαταστάτες (Preston et al, 1981). Όσον αφορά στη θέση των υποκαταστών τα πιο επιτυχή παραδείγματα στη γεωργία είναι οι ενώσεις που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη υποκαταστών στη θέση C-2 του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Αρωματικοί υποκαταστάτες στη θέση αυτή μειώνουν τη αποτελεσματικότητα των ενώσεων αυτών οδηγώντας παράλληλα σε επέκταση της βιοχημικής τους δράσης πέραν της αντιμυκητικής. Από την άλλη μεριά ο βενζιμιδαζολικός δακτύλιος προσδίδει στις ενώσεις μια ιδανική ισορροπία υδρόφιλων-υδρόφοβων ιδιοτήτων προκειμένου να μπορούν αφενός μεν να διέρχονται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, αφετέρου δε να αλληλεπιδρούν με τις θέσεις πρόσδεσης εντός του κυττάρου του παθογόνου (Matolcsy et al, 1988; Cohen, 1996).

Η πρώτη βενζιμιδαζολική ένωση που εισήχθηκε στη γεωργική πράξη στα τέλη δεκαετία του 60 ήταν το **benomyl** [methyl (1-butylcabamoyl)benzimidazole-2-yl-carbamate] (Delp και Klopping, 1968). Το benomyl αποτελεί ένα είδος πρόδρομης τοξικής ένωσης (pro-fungicide) που σε υδατικά διαλύματα υδρολύεται ταχέως σε **carbendazim** (methyl-N-benzimidazol-2-yl-carbamate) το οποίο αποτελεί και την υπεύθυνη τοξική μορφή του benomyl (Clemons και Sisler, 1969), γεγονός που οδήγησε αργότερα την χρησιμοποίηση του τελευταίου ως αυτούσιο στην γεωργική πράξη.

Το carbendazim είναι αμφολύτης (με βασικό pKa στο 4.48 και όξινο pKa στο 10.8). Παρουσιάζει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (6.11 µg/mL), σε υψηλό pH αποδομείται ελαφρώς ενώ σε όξινο pH δημιουργεί σταθερά υδατοδιαλυτά άλατα (Matolcsy et al, 1988). Τυποποίηση του carbendazim υπό μορφή αλάτων H<sub>2</sub>PHO<sub>4</sub> και HCl του προσδίδουν αρκετά καλές διασυστηματικές ιδιότητες χρήσιμες στην αντιμετώπιση ασθενειών των αγγείων του ξύλου (Smalley, 1977).

## ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2

Χημική δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων



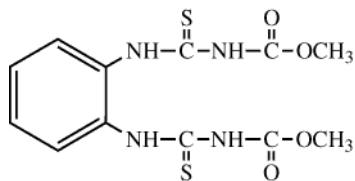
ένωση	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	pKa	LogP	δράση σε
carbendazim	H	COOMe	4.08, 10.8	1.48	μύκητες, ακάρεα
benomyl	CONHC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	COOMe	-	1.37	μύκητες, ακάρεα
thiophanate- methyl*			7.28	1.4	μύκητες
thiabendazole	H		2.5, 10.8	2.3	μύκητες, ακάρεα, ζωοπαράσιτ α
fuberidazole	H		4.6	2.67	μύκητες
cypendazole	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CN	COOMe	-	1.96	μύκητες

\*Η δομή της ένωσης δίνεται στην **Εικόνα 1.4**, pKa: σταθερά ιονισμού, LogP λογάριθμος του συντελεστή διαχωρισμού οκτανόλης:νερό, R: είδος υποκαταστάτη

Το **thiabendazole** [2-(4-thiazolyl)-1H-benzimidazole] είναι γνωστό ήδη από το 1961 για τη βιοδραστικότητα του εναντίον νηματωδών σκωλήκων των ζώων (Brown et al, 1961) αλλά γρήγορα αναγνωρίστηκε και για τις μυκητοτοξικές και μυκοστατικές του ιδιότητες με αποτέλεσμα την εισαγωγή του στη γεωργία για την αντιμετώπιση μεγάλου αριθμού σημαντικών φυτοπαθογόνων (Staron και Allard, 1964). Οι κύριες φυσικοχημικές του ιδιότητες δίνονται στο *Πίνακα 1.2*.

Τα παράγωγα του θειοφανικού οξέος (thiophanate acid) αποτελούν πολύ καλές αρωματικές ενώσεις που εμφανίστηκαν στη γεωργία σχεδόν παράλληλα με τα υπόλοιπα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. Ο λόγος για την ένταξη τους στην ομάδα των βενζιμιδαζολικών ενώσεων βασίστηκε στο γεγονός ότι τα μεταβολικά τους προϊόντα, που είναι και τα κατεξοχήν υπεύθυνα τοξικά μόρια, αποτελούν βενζιμιδαζολικές

ενώσεις. Από το σύνολο αυτών των ενώσεων η ποιο αποτελεσματική είναι η ένωση **thiophanate-methyl** [1,2-bis(3-methoxycarbonyl-1-thioureido)benzene] (Matolcsy και συνεργάτες, 1988). Το pH του διαλύματος παίζει καθοριστικό ρόλο στην μυκητοτοξικότητα της ένωσης αυτής. Σε αλκαλικό διάλυμα διασπάται σχετικά γρήγορα και δίνει carbendazim και την ένωση ethyl benzimidazol-2-yl-carbamate (EBC). Η μυκητοτοξικότητα της ένωσης ευθύνεται κατά κύριο λόγο στη παραγωγή του carbendazim ενώ κάποια μικρή τοξική δράση υποστηρίζεται ότι ασκεί και η ένωση EBC (Kaars Sijpesteijn, 1977).



**Εικόνα.1.4**

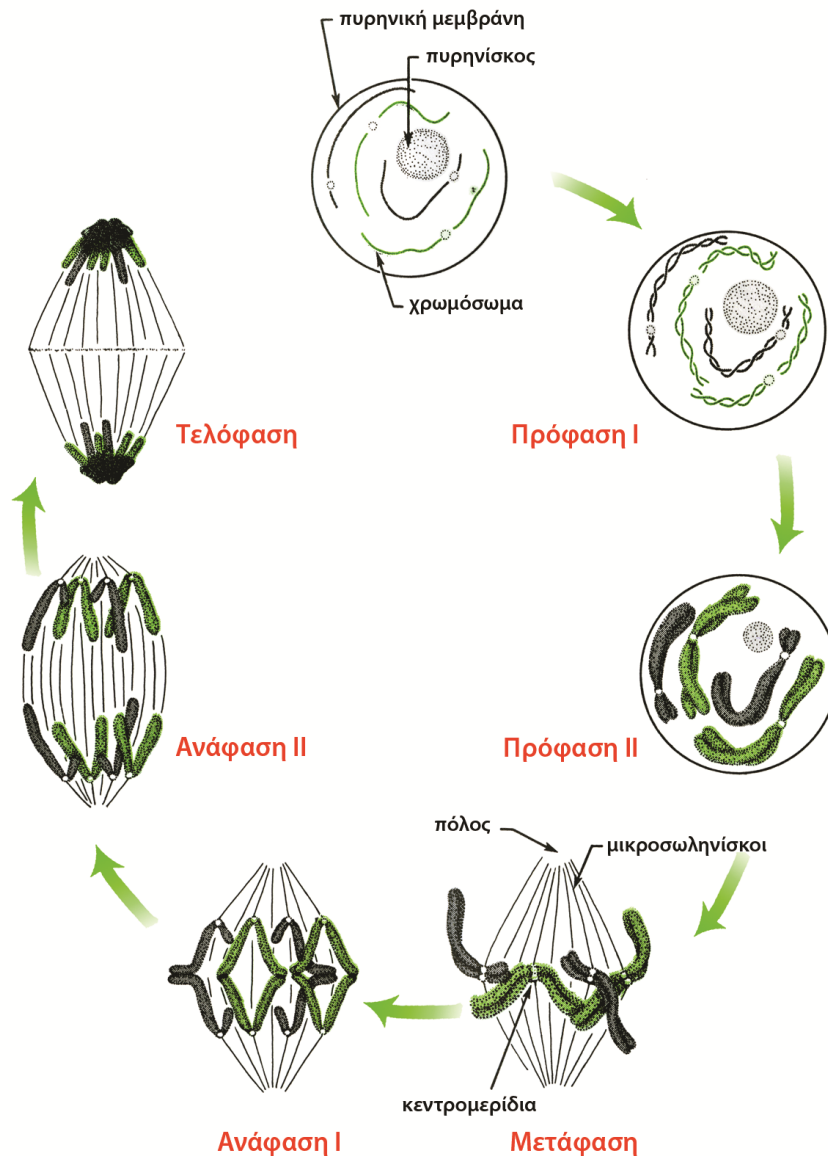
Μικρότερη εφαρμογή έχουν βρει διάφορα άλλα ανάλογα της βενζιμιδαζόλης όπως είναι το **fuberidazole** [2-(2-furyl) benzimidazole] και το **cypendazole** [methyl 1-(5-cyanopentyl-carbamoyl) benzimidazol-2-yl-carbamate], οι φυσικοχημικές ιδιότητες των οποίων αναφέρονται στο *Πίνακα 1.2*.

### 2.3. Βιοχημική δράση

Οι πρώτες έρευνες γύρω από την βιοχημική δράση των βενζιμιδαζολικών ξεκίνησαν το 1975 από τον Davidse ο οποίος έδειξε ότι υπήρχε μία ανάλογη αντιμυτωτική δράση *in vitro* με το άλλοτε αντιμυκυτωτικό την κολχικίνη. Έτσι βρέθηκε ότι ο κύριος μηχανισμός δράσης των βενζιμιδαζολικών αφορά τη παρεμπόδιση του πολυμερισμού της τουμπουλίνης και συγκεκριμένα μέσω της πρόσδεσης τους στην β υπομονάδα της πρωτεΐνης αυτής (Winder et al. 2001; Heath, 1978). Στη μίτωση των ευκαρυωτικών κυττάρων, κατά τα στάδια της μετάφασης-ανάφασης δημιουργείται ένα σύστημα ινιδίων τα οποία έχουν ως σκοπό τον ομαλό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Εικόνα 1.5). Βασική μονάδα των ινιδίων αυτών είναι οι σφαιρικές πρωτεΐνες τύπου α και β οι οποίες με την βοήθεια ενέργειας ATP, της τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP)



και των ιόντων μαγνησίου πολυμερίζονται σε μία μορφή σωληνοειδούς έλικας (Winder et al 2001, Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Η πρόσδεση των βενζιμιδαζολικών στη β-τουμπουλίνη χαρακτηρίζεται από μεγάλη συγγένεια για του ανώτερους μύκητες (*Botrytis sp.*, *Fusarium sp.*, *Monilia sp.*, κ.α.), καθόλου για του κατώτερους μύκητες (Chromista) και ελάχιστη για τα ζώα (Davidse ,1975).



**Εικόνα 1.5** . Στάδια μιτωτικής διαίρεσης του πυρήνα (Ζιώγας και Μαρκόγλου,2007).

Σχετικά με την αποσαφήνιση του σημείου πρόσδεσης των βενζιμιδαζολικών στη β-τουμπουλίνη μεγάλο ρόλο έχει παίξει η μοριακή διερεύνηση του μηχανισμού της ανθεκτικότητας στις ενώσεις αυτές. Μέχρι τώρα όλες σχεδόν οι μεταλλαγές στη β-τουμπουλίνη που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε περισσότερους από 16 μύκητες στα βενζιμιδαζολικά διαμορφώνονται σε μια συστάδα (δες *Εικόνα 1.6.*) που βρίσκεται “βυθισμένη” στο κέντρο της β-τουμπουλίνης (Qiu et al, 2010), πράγμα το οποίο δεν φαίνεται να είναι τυχαίο. Πιθανώς σε αυτή τη περιοχή να εντοπίζεται η θέση πρόσδεσης των βενζιμιδαζολικών και συγκεκριμένα στη κοιλότητα που σχηματίζεται από τα αμινοξέα Phe167, Glu198 και Phe200, με τα οποία συνδέονται οι περισσότερες περιπτώσεις μεταλλαγών ανθεκτικότητας στον αγρό.

#### 2.4. Συμπεριφορά στα φυτά και το έδαφος

Η μετακίνηση των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων εντός των φυτών γίνεται κυρίως μέσω του διαπνευστικού-ανοδικού ρεύματος (αποπλάστης). Όργανα του φυτού με χαμηλή διαπνευστική ικανότητα όπως για παράδειγμα τα φρούτα, τείνουν να συσσωρεύουν ελάχιστες ποσότητες βενζιμιδαζολικών (Delp, 1995). Το αποτέλεσμα της ανοδικής αυτής μετακίνησης είναι να συγκεντρώνονται συχνά στη περιφέρεια και στις άκρες του ελάσματος των φύλλων (Peterson και Edgington, 1971). Ο ρυθμός της αποπλαστικής μετακίνησης εντός των φυτών διαφέρει μεταξύ των διαφόρων βενζιμιδαζολικών ενώσεων. Σε σχέση με τις υπόλοιπες βενζιμιδαζόλες, το thiabendazole παρουσιάζει βραδεία μετακίνηση προς τα ανώτερα φυτικά στρώματα, η οποία εντοπίζεται μέχρι τη περιοχή του λαιμού, λόγω του ότι έχει τη τάση να προσδένεται στα αγγεία του ξύλου (Erwin, 1973; Wang et al, 1971).

Τα βενζιμιδαζολικά συγκρατούνται ισχυρώς από την εφυμενίδα των φύλλων ενώ η διάσπαση τους είναι αργή πράγμα που τους επιτρέπει να διατηρούν για μεγάλο χρονικό διάστημα την υπολειμματική τους δράση (Delp, 1995). Μετά την επικάλυψη και προσρόφηση στην επιφάνεια του φύλλου, ένα μέρος από αυτά μετακινείται μέσω περιορισμένης διάχυσης στη περιοχή του ελάσματος του φύλλου. Σε μικρότερο βαθμό μπορεί να υφίσταται παραπέρα μετακίνηση στο συμπλάστη όπου υπάρχει πλευρική διάχυση από φύλλο σε φύλλο, και μεταφορά μέσω του καθοδικού ρεύματος στους υποκείμενους ιστούς (λαιμός και ρίζες), αλλά οι συγκεντρώσεις είναι τέτοιες οι οποίες

δεν πρέπει να θεωρηθούν σημαντικές για το θεραπευτικό αποτέλεσμα (Soley et al, 1973).

Όταν εφαρμοστούν αρκετά μεγάλες δόσεις βενζιμιδαζολικών είναι δυνατόν να παρουσιαστούν τοξικά συμπτώματα υπό μορφή κλωρώσεων ή νέκρωσης φύλλων. Αντίθετα, υποτοξικές συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε ευεργετικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα έχει παρατηρηθεί ότι στη περίπτωση που τα βενζιμιδαζολικά εφαρμόζονται στις προτεινόμενες δόσεις συχνά τα φυτά παρουσιάζουν αύξηση του βάρους τους, μεγαλύτερη βλαστική ικανότητα των σπόρων, αύξηση της εντάσεως της χλωροφύλλης, προστασία από το ατμοσφαιρικό όζον, εξυγίανση των συμπτωμάτων τους από ιούς (masking effects), και βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών στα καλλωπιστικά είδη (Spencer, 1977; Delp, 1995).

Η υπολειματική δράση των βενζιμιδαζολικών στο έδαφος επηρεάζεται σημαντικά από τη σύσταση του. Εδάφη όξινα, με μεγάλη περιεκτικότητα σε κολλοειδή και οργανική ουσία συγκρατούν μεγάλες ποσότητες των βενζιμιδαζολικών λόγω της ιδιότητας των τελευταίων να ιονίζονται κάτω από αυτές τις συνθήκες και να προσροφούνται ισχυρά από τα ηλεκτρικά φορτία που απαντώνται στα εδαφικά αυτά κλάσματα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εκπλύνονται ελάχιστα προς τα κατώτερα εδαφικά στρώματα αυξάνοντας έτσι την διάρκεια δράσης τους ενάντια στα εδαφογενή φυτοπαθογόνα, μειώνοντας από την άλλη το ποσό βιοδιαθεσιμότητας τους για τα φυτά (Kaufman, 1977).

## 2.5. Μεταβολισμός

Εντατικές μελέτες έχουν γίνει μέχρι τώρα για την τύχη των βενζιμιδαζολικών ενώσεων εντός των φυτών. Γενικά τα βενζιμιδαζολικά είναι αρκετά σταθερά σε όξινα διαλύματα. Εξαίρεση αποτελεί το benomyl το οποίο σε όξινο pH μετατρέπεται ταχέως σε carbendazim. Ο ρυθμός της μετατροπής αυτής εξαρτάται από το είδος του φυτού και τον τρόπο εφαρμογής του. Εντός του φυτού η πλήρης μετατροπή του μπορεί να συμβεί σε διάστημα 5 ημερών έως και τεσσάρων εβδομάδων, ενώ στη φυλλική επιφάνεια παραμένει σταθερό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Von και Sijpestejin, 1977; Woodcock, 1977). Στους χυμούς των φυτών, η πραγματοποίηση της αντίδρασης αυτής γίνεται φυσικά μέσω υδρόλυσης (Woodcock, 1977). Η μετατροπή της ένωσης thiophanate-methyl σε carbendazim, όπως και στη περίπτωση με το

benomyl, πραγματοποιείται με αργούς ρυθμούς όταν εφαρμόζεται στην φυλλική επιφάνεια ενώ αντιθέτως όταν απορροφάται από τις ρίζες μετατρέπεται εντός περίπου μόλις μίας εβδομάδας σε carbendazim (Kaars Sijpestejin και συνεργάτες, 1977). Σε αντίθεση με το benomyl, η πραγματοποίηση της αντίδρασης αυτής επιτυγχάνεται σε αλκαλικό pH και ο ρυθμός της αυξάνεται με τα εκκρίματα των ριζών (Von και Sijpestejin, 1977; Matta και Abbatista Gentile, 1971). Η μετατροπή των ενώσεων benomyl και thiophanate-methyl σε carbendazim έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί και από τα ίδια τα κύτταρα των μυκήτων (Helweg, 1972; Siegel, 1975; Yasuda, 1973; Von και Sijpestejin, 1971). Παρόμοιες μεταβολικές πορείες ακολουθούνται και στα ζώα (Paulson, 1977).

Η περαιτέρω βιομετατροπή του carbendazim εντός των φυτών γίνεται μέσω της δημιουργίας συζεύξεων (conjugations) με αποτοξικοποιητικά ένζυμα (*Παράγραφος 3.2.5.*). Η μετατροπή αυτή επέρχεται με αργό σχετικά ρυθμό, με τον βενζιμιδαζολικό δακτύλιο να παραμένει αρκετά σταθερός στη διάσπαση και σε μικρότερα ποσοστά, μπορεί να ανιχνευτούν και διάφοροι ασύζευκτοι μεταβολίτες όπως η 2-αμινοβενζιμιδαζόλη (Kaars Sijpestejin και συνεργάτες, 1977). Στους μύκητες το κυριότερο μεταβολικό παράγωγο είναι η 5-υδρόξυ-βενζιμιδαζόλη (Davidse, 1976). Στα ζώα το carbendazim παρουσιάζει γρήγορη μεταβολική πορεία κυρίως μέσω υδροξυλιώσεων και εν συνεχεία συζεύξεων (Von και Sijpestejin, 1977). Η κύρια μεταβολική πορεία του thiabendazole περιλαμβάνει υδροξυλιώσεις και περαιτέρω συζεύξεις στη θέση του ατόμου C-5. Λόγω μικρού πρακτικού και οικονομικού ενδιαφέροντος για τις ενώσεις fuberidazole, και cyprodazole δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για τον μεταβολισμό τους εντός φυτών, ζώων και μικροοργανισμών. Ωστόσο από μελέτες φαρμακοκινητικής σε ζώα, φαίνεται ότι το fuberidazole μεταβολίζεται πλήρως μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα κυρίως μέσω υδροξυλιώσεων ενώ παρατηρείται ότι επέρχεται και διάνοιξη του φουρανικού του δακτυλίου (Matolcsy και συνεργάτες, 1988).

### 3. Η ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα

#### 3.1. Γενικά στοιχεία περί του προβλήματος της ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα

Ως ανθεκτικότητα ορίζεται η σταθερή και κληρονομούμενη στους απογόνους προσαρμογή ενός μικροοργανισμού στη παρουσία μιας αντιμικροβιακής ένωσης που έχει ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση της ευαισθησίας του πληθυσμού του παθογόνου στον συγκεκριμένο παρεμποδιστή (Ζιώγας, 2000).

Η χρήση των οργανικών και ανόργανων προστατευτικών μυκητοκτόνων μέχρι τη δεκαετία του 60 σπανίως οδήγησε σε απώλειες της αποτελεσματικότητας τους καθώς ο μη εκλεκτικός τρόπος με τον οποίο αυτές οι ενώσεις δρουν υποκυτταρικά δύσκολα μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Πράγματι, πολλά από τα μυκητοκτόνα αυτά όπως τα διθειοκαρβαμιδικά μπορούν να έχουν στόχο δράσης σε περισσότερο από 20 ένζυμα μέσα στο ίδιο κύτταρο (Owens, 1969). Για αυτό το λόγο άλλωστε χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα σε συνδυασμό με τα διασυστηματικά μυκητοκτόνα για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών των φυτών. Παρά τα πλεονεκτήματά τους τα προστατευτικά μυκητοκτόνα δεν αποτελούν μέσο θεραπείας των φυτών από παθογόνα που έχουν ήδη εισέλθει εντός του φυτού. Η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από την έγκαιρη εφαρμογή και την επιμελή κάλυψη της ευπρόσβλητης επιφάνειας (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Μπροστά στις αδυναμίες αυτές, η έλευση των πρώτων διασυστηματικών μυκητοκτόνων ενώσεων τέλη δεκαετίας του 60 σηματοδότησε την αρχή της περιόδου για την αποτελεσματική αντιμετώπιση πολλών σοβαρών ασθενειών των φυτών.

Στις προσπάθειες εύρεσης νέων ενώσεων με εξειδικευμένη και διασυστηματική δράση εναντίων φυτοπαθογόνων μυκήτων, οι φαρμακοβιομηχανίες είχαν μεταξύ άλλων προβλημάτων να αντιμετωπίσουν και το πρόβλημα της ανθεκτικότητας. Πράγματι, οι πρώτες περιπτώσεις εμφάνισης ανθεκτικότητας είχαν παρουσιαστεί κατά τα πρώτα κιόλας στάδια ανάπτυξης των διασυστηματικών μυκητοκτόνων όπως για παράδειγμα με την ένωση 6-azauracil και τα αντιβιοτικά κασουγκαμικίνη, κυκλοεξιμίδιο και αντιμυκίνη (Dekker, 1982). Μία σχεδόν δεκαετία πριν την εισαγωγή των πρώτων διασυστηματικών ενώσεων, ο αμερικάνος φυτοπαθολόγος James G. Horsfall λαμβάνοντας υπόψη του τις μέχρι τότε περιπτώσεις ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα και στα αντιβιοτικά, εξέφρασε πρώτος την πεποίθηση ότι η μη εμφάνιση ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα δεν θα έπρεπε να αποτελέσει αιτία εφησυχασμού. Πράγματι, 12 χρόνια μετά, το 1969, καταγράφηκε για

πρώτη φορά η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο ωίδιο των κολοκυνθοειδών (*Sphaerotheca fuliginea*) στο διασυστηματικό μυκητοκτόνο benomyl. Έκτοτε, τα περιστατικά ανθεκτικότητας που ακολούθησαν, αυξήθηκαν δραματικά και, μέχρι σήμερα πλέον, εκτιμάται ότι σχεδόν σε όλα τα μυκητοκτόνα με εξειδικευμένο μηχανισμό δράσης, έχει εμφανιστεί το πρόβλημα της ανθεκτικότητας (White και συνεργάτες, 1998). Ομάδες «πρώτης γενιάς» τέτοιων οργανικών ενώσεων είναι τα βενζιμιδαζολικά, τα καρβοξιμιδικά, τα 2-αμινοπυριμιδινικά, τα δικαρβοξιμιδικά και τα φαινυλαμίδια.

Προς το παρόν η χρήση μυκητοκτόνων ενώσεων αποτελεί αναντίρρητα τον αποτελεσματικότερο, οικονομικότερο και ίσως ασφαλέστερο τρόπο αντιμετώπισης πολλών σοβαρών ασθενειών των φυτών. Στόχος λοιπόν δεν θα πρέπει να είναι η μείωση του χημικού οπλοστασίου στα χέρια του παραγωγού αλλά η διατήρηση της αποτελεσματικότητας των μυκητοκτόνων ενώσεων μέσω κατάλληλων στρατηγικών αποφυγής ανάπτυξης ανθεκτικότητας.

Οι απαιτήσεις για αύξηση της ποσότητας και διασφάλιση της ποιότητας της παραγωγής των αγροτικών προϊόντων κάτω από τους ρυθμούς της εντατικής γεωργίας οδηγεί σε ανάγκη για αναζήτηση αποτελεσματικότερων, ασφαλέστερων και οικονομικά συμφερούσων μυκητοκτόνων ενώσεων. Άρα θα αναμένεται και αυξημένος κίνδυνος για ανάπτυξη προβλημάτων ανθεκτικότητας, δημιουργώντας έτσι την ανάγκη για συνεχείς προσπάθειες κατανόησης του φαινομένου αυτού με σκοπό τον έλεγχο και την διαχείριση του.

### **Κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας στον αγρό**

*Δημιουργία ανθεκτικών στελεχών.* Η πορεία ανάπτυξης των ανθεκτικών στελεχών στον αγρό αρχίζει με τη δημιουργία μεταλλαγών ανθεκτικότητας. Όπως όλες οι ιδιότητες των μυκήτων, έτσι και η ευαισθησία τους στα μυκητοκτόνα μπορεί να μεταβληθεί με κάποια μεταλλαγή. Αν με μία ή περισσότερες μεταλλαγές μειωθεί η ευαισθησία σε ένα μυκητοκτόνο, θα προκύψει ένα ανθεκτικό στέλεχος του μύκητα, που θα επιλέγεται συνεχώς μέσω της εφαρμογής του μυκητοκτόνου (πίεση επιλογής) έως ότου επικρατήσει, οπότε θα έχουμε αποτυχία στην καταπολέμηση (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Οι μεταλλαγές που συμβαίνουν στο γενετικό υλικό του μύκητα καλούνται γονιδιακές (ή σημειακές) μεταλλαγές (specific point mutations), και μπορεί να εδράζονται σε εξωχρωματικούς ή

χρωμοσωματικούς γόνους (γενομικό DNA). Στους μύκητες οι εξωχρωμοσωματικοί γόνοι εντοπίζονται στο μιτοχονδιακό DNA και σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν δείξει ότι μπορεί να ευθύνονται για ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα όπως με την περίπτωση των στρουμπλουρίνων. Οι περισσότερες μελέτες για αυτή τη περίπτωση έχουν γίνει στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* όπου σε κάποιες περιπτώσεις φαίνεται πως η ανθεκτικότητα σε ενώσεις που δρουν στο μηχανισμό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (μιτοχονδριακή αναπνοή) συνδέεται με μεταλλαγές σε γονίδια του μιτοχονδιακού DNA (Georgopoulos, 1977). Αντιθέτως, στα βακτήρια ο κύριος τρόπος εμφάνισης της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά γίνεται με εξωχρωμοσωματικούς γόνους που εντοπίζονται στα πλασμίδια, τα οποία αποτελούν κυκλικά μόρια DNA που βρίσκονται εντός του κυτταροπλάσματος (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Οι γόνοι αυτοί έχουν την δυνατότητα να μεταβιβάζονται στους απογόνους κατά τρόπο μη-Μενδελιακό και να μεταφέρονται και σε διαφορετικά γένη βακτηρίων, πράγμα που δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στην αντιμετώπιση ασθενειών λόγω μειωμένης αποτελεσματικότητας των αντιβιοτικών (Chabbert et al, 1969).

Η δημιουργία των ανθεκτικών στελεχών μπορεί να οφείλεται είτε σε ενδογενείς, είτε σε εξωγενείς παράγοντες- άλλοτε φυσικούς (υπεριώδης ακτινοβολία) και άλλοτε χημικούς.

Αναφορικά με τους ενδογενείς παράγοντες, τυχαίες μεταλλάξεις σε ορισμένους μύκητες μπορούν να συμβούν με μία χαμηλή συχνότητα  $10^{-6}$  (MacNeill και Schooley, 1973). Είναι γεγονός, ότι και στο εργαστήριο της Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γ.Π.Α., όπως πιθανώς και σε άλλα, ανθεκτικά στελέχη μυκήτων σε διάφορα μυκητοκτόνα έχουν αποκτηθεί μετά από φυσική απομόνωση κονιδίων άγριων στελεχών τα οποία επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό PDA που περιείχε το συγκεκριμένο μυκητοκτόνο. Τέτοιες τυχαίες μεταλλάξεις μπορεί να προκύπτουν από μειωτικά ή πολύ σπάνια μιτωτικά λάθη κατά την ανταλλαγή χρωματοσωματικών τμημάτων, μεταξύ μη αδελφών χρωματίδων των ομόλογων χρωματοσωμάτων, διαδικασίας γνωστής και ως «crossing-over» (Λουκάς, 2000). Ίσως αυτό το γεγονός να εξηγεί το γιατί απομονώσεις στελεχών αγρού από περιοχές χωρίς προηγούμενο ιστορικό επεμβάσεων να έχουν εμφανίσει ανθεκτικότητα για ορισμένα μυκητοκτόνα.

Η δεύτερη περίπτωση είναι οι διάφορες μεταλλαγές να προκύπτουν από εξωγενείς φυσικούς παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) (Georgopoulos, 1977). Μία τρίτη πηγή μεταλλαγών είναι αυτές που μπορούν να προκληθούν από διάφορους χημικούς

παράγοντες όπως για παράδειγμα από το ίδιο το μυκητοκτόνο στο οποίο παρουσιάζεται ανθεκτικότητα. Η ικανότητα ορισμένων μυκητοκτόνων, να προκαλούν γενετικές αλλαγές ενέχει σοβαρά προβλήματα στο φυσικό περιβάλλον και επομένως η γενετική τους δράση μπορεί να συνδεθεί με τη πιθανότητα πρόκλησης ανθεκτικότητας (Georgoroulos, 1977).

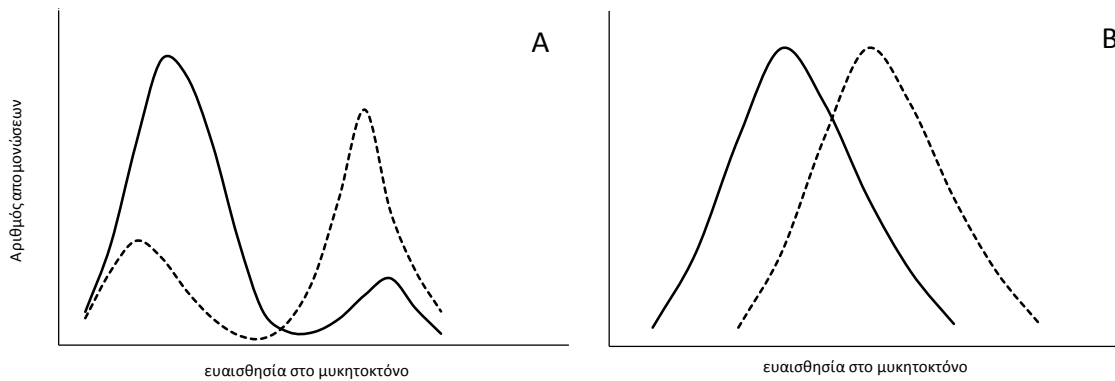
*Επιλογή και επικράτηση των ανθεκτικών στελεχών.* Είναι γενικά αποδεκτό ότι στελέχη ανθεκτικά σε ένα μυκητοκτόνο προϋπάρχουν στον αγρό πριν από τη πρώτη εφαρμογή του. Στην αρχή της εφαρμογής, η συχνότητα αυτών των στελεχών είναι πολύ μικρή πιθανώς λόγω μειωμένης προσαρμοστικότητας σε σχέση με τα ευαίσθητα στελέχη (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992; Skylakakis, 1987). Η συχνότητα όμως των ανθεκτικών στελεχών μπορεί να αυξηθεί σε ένα πληθυσμό μέσω της πίεσης επιλογής, δηλαδή του μυκητοκτόνου που εφαρμόζεται.

Το μοτίβο της μετακίνησης του πληθυσμού προς τη περιοχή της χαμηλής ευαισθησίας δηλαδή κατά πόσο απότομη ή μη είναι η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας, εξαρτάται από το τύπο **γενετικού ελέγχου** της ανθεκτικότητας (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Ο γενετικός έλεγχος της ανθεκτικότητας των παθογόνων στα μυκητοκτόνα μπορεί να είναι είτε ολιγογονικός ή πολυγονικός.

Στη περίπτωση του **ολιγογονικού ελέγχου** της ή αλλιώς των **μείζονων γόνων** ανθεκτικότητας, ο αρχικός πληθυσμός του μύκητα απαρτίζεται από δύο κύριους υποπληθυσμούς οι οποίοι διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους δημιουργώντας με αυτό το τρόπο μια ασυνεχούς τύπου κατανομή (Εικόνα 1.10.A). Με την εφαρμογή του μυκητοκτόνου αναμένεται η απότομη αύξηση της συχνότητας του ανθεκτικού υποπληθυσμού- η οποία μπορεί να παραμείνει για αρκετό διάστημα σταθερή, ενώ υπάρχει αντίστοιχη μείωση του ευαίσθητου υποπληθυσμού. Περιπτώσεις αντιπροσωπευτικές για τέτοιου τύπου επιλογή είναι όλες εκείνες που αφορούν μυκητοκτόνα με εξειδικευμένη δράση (εκτός των SBIs).

Στη περίπτωση του **πολυγονικού ελέγχου** υπάρχει σταδιακή μετάβαση της ευαισθησίας του πληθυσμού από υψηλότερα προς χαμηλότερα επίπεδα ευαισθησίας. Δηλαδή, στις περιπτώσεις αυτές, παρουσιάζεται μια κανονική κατανομή του πληθυσμού (συνεχής κατανομή) μέσα στην οποία υπάρχουν αρκετοί υποπληθυσμοί οι οποίοι συγκεντρώνονται γύρω από διάφορες τιμές ευαισθησίας λόγω συμβολής και διαφορετικών ανθεκτικών γονοτύπων (Εικόνα 1. 10. B).





**Εικόνα 1.6.** Ανάπτυξη ολιγονικής (A) και πολυγονικής (B) ανθεκτικότητας ενός πληθυσμού που βρίσκεται υπό συνεχή πίεση του μυκητοκτόνου. Η γραμμοσκιασμένη περιοχή αντιστοιχεί στη μετακίνηση του αρχικού πληθυσμού (επανασχεδίαση από Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Τέτοιες περιπτώσεις πολυγονικού χαρακτήρα ανθεκτικότητας έχουν εμφανιστεί με την ομάδα των SBIs (Sterol Biosynthesis Inhibitors-παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών), σε διάφορα προστατευτικά μυκητοκτόνα της ομάδας των οργανικών υδραργυρούχων (Old, 1968) και οργανοκασσιτερούχων (Gianopolitis, 1978), στο μυκητοκτόνο ethyrimol (2-αμινοπυριμιδίνες) (Skylakakis, 1987) και στο αντιβιοτικό κυκλοεξαμίδιο (Van Tuyl, 1977).

*Παράγοντες που καθορίζουν τον κίνδυνο ανθεκτικότητας.* Το μέγεθος του προβλήματος της ανθεκτικότητας, επηρεάζεται όχι μόνο από τον γενετικό έλεγχο ανθεκτικότητας αλλά και την **προσαρμοστικότητα** των ανθεκτικών στελεχών στον αγρό (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Με τον όρο προσαρμοστικότητα (fitness) νοείται η ικανότητα ενός ατόμου ή πληθυσμού να επιβιώνει και να αναπαράγεται κάτω από τις δεδομένες περιβαλλοντικές συνθήκες (Pringle και Taylor, 2002). Αυτό το επιτυγχάνει με μία σειρά βιολογικών παραμέτρων όπως η παραγωγή και η βλάστηση των κονιδίων του, η μυκηλιακή ανάπτυξη και η παθογόνος και μυκητοξικογόνος ικανότητα του. Η εμφάνιση *in vitro*, μεταλλαγμένων στελεχών με ανθεκτικότητα σε ένα μυκητοκτόνο δεν σημαίνει ότι απαραίτητως θα υπάρξει και ανθεκτικότητα στη πράξη. Αυτό θα συμβεί μόνο όταν ένα μεγάλο τμήμα του

πληθυσμού έχει ανθεκτικότητα, πράγμα που εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών (Dekker, 1995). Για παράδειγμα, πολλές φορές, μηχανισμοί ανθεκτικότητας που συνδέονται με την παραγωγή ενέργειας έχουν αρνητικές επιδράσεις στη προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών, όπως συμβαίνει με την ομάδα των SBIs στις περιπτώσεις εκείνες που ο υπεύθυνος μηχανισμός της ανθεκτικότητας είναι η ενεργός απέκκριση του μυκητοκτόνου από τα κύτταρα του παθογόνου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της παθογόνου ικανότητας αυτών λόγω αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων των στελεχών αυτών για την επιβίωση τους στις παρούσες συνθήκες (De Waard and Van Nistelrooy, 1982). Ένα δεύτερο παράδειγμα είναι με μερικές περιπτώσεις ανθεκτικότητας στις στρουμπιλουρίνες (παρεμποδιστές της αναπνοής), η οποία οφείλεται σε ενεργοποίηση εναλλακτικών συστημάτων του βιοχημικού μονοπατιού της αναπνοής. Στελέχη στις περιπτώσεις αυτές φαίνεται ότι μπορούν να παραμείνουν ανθεκτικά μέσω ενεργοποίησης της εναλλακτικής αναπνοής αλλά το οξειδωτικό stress και συνάμα οι αυξημένες απαιτήσεις σε ATP που επιδέχονται οδηγούν σε μειωμένη προσαρμοστικότητα τους (Malandrakis et al, 2006).

Τέλος, αρνητικές επιδράσεις μπορούν να προκύψουν μέσω πλειοτροπικών επιδράσεων των γόνων ανθεκτικότητας στη προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών όπως για παράδειγμα με τους SBIs (Hitchcock et al, 1986) και στα πολυένια (Weete, 1989), όπου υπάρχει αντικατάσταση της εργοστερόλης (βιοχημικός στόχος των ενώσεων αυτών) με πρόδρομες στερόλες. Αυτό οδηγεί σε ανθεκτικά στελέχη τα οποία παρουσιάζουν μικρότερη παθογόνο ικανότητα πιθανώς λόγω της αδυναμίας τους να προκαλέσουν ασθένεια με τις στερόλες αυτές. Στελέχη εργαστηρίου που είναι ανθεκτικά σε διάφορα μυκητοκτόνα των ομάδων των φαινυλοπυρρολικών, ανιλνοπυριμιδινών και δικαρβοξιμιδικών παρουσιάζουν ευαισθησία στο ωσμωτικό δυναμικό, οδηγώντας έτσι παράλληλα σε μειωμένη φυτοπαθογόνο προσαρμοστικότητα σε σχέση με τα άγρια στελέχη (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Άλλοι παράγοντες, που καθορίζουν τη σοβαρότητα του προβλήματος της ανθεκτικότητας είναι το **είδος του παθογόνου**, το **σεξουαλικό του στάδιο** και ο **τύπος της ασθένειας** που προκαλεί. Παθογόνα που έχουν την δυνατότητα να δημιουργούν πολυκυκλικές ασθένειες (δηλαδή ασθένειες που συμπίπτουν με πολλούς κύκλους ασθνεσιών σε μία καλλιεργητική περίοδο), όπως τα ωίδια, οι περονόσποροι και οι σκωριάσεις, που παράγουν άφθονα κονίδια, προσβάλλοντας κυρίως τα εναέρια μέρη των φυτών είναι πιο

επιρρεπή για ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992; Wolfe και Barrett, 1986).

Το **σεξουαλικό στάδιο** του μύκητα μπορεί να παίξει καθοριστικό ρόλο στο ρυθμό με τον οποίο θα εξελιχτεί η ανθεκτικότητα στον αγρό. Στους μύκητες που βρίσκονται στην απλοειδή τους φάση υπάρχει άμεση έκφραση των γόνων ανθεκτικότητας ανεξαρτήτου εάν είναι κυρίαρχοι ή υπολειπόμενοι. Φυσικά, ο κυρίαρχος γόνος θα έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στον ανθεκτικό φαινότυπο (φαινόμενο επίστασης) (Wolfe και Barrett, 1986; Georgopoulos, 1987). Αντιθέτως στα διπλοειδή κύτταρα του μύκητα οι γόνοι ανθεκτικότητας μπορεί να βρίσκονται είτε ως κυρίαρχοι, ημι-υπολειπόμενοι, ή υπολειπόμενοι και μόνο στην περίπτωση που είναι κυρίαρχος μπορεί να εμφανίζεται άμεσα ο ανθεκτικός φαινότυπος (Dekker, 1977; Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Εκτός των ενυπάρχοντων παραγόντων που προαναφέρθηκαν, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας εξαρτάται επιπλέον από παράγοντες που έχουν σχέση με την εφαρμογή του μυκητοκτόνου όπως η **πίεση επιλογής** (selection pressure), που προσδιορίζεται από τις δόσεις που χρησιμοποιούνται, τη συχνότητα και την έκταση εφαρμογής του μυκητοκτόνου, οι **περιβαλλοντικές συνθήκες** και οι διάφοροι **καλλιεργητικοί χειρισμοί** (Ζιώγας, 2000, Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Μέσα από όλη την πείρα και την γνώση, που έχει αποκτηθεί σε βάθος χρόνου σε πεδίο αγρού αλλά και εργαστηρίου, τα μυκητοκτόνα μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με την συχνότητα εμφάνισης προβλημάτων ανθεκτικότητας στον αγρό: **α) υψηλού κινδύνου, β) μέτριου κινδύνου, γ) χαμηλού κινδύνου**. Στην πρώτη κατηγορία υπάγονται τα βενζιμιδαζολικά, τα φαινυλαμίδια, οι πολυοξίνες και τα καρβοξαμιδικά. Στην δεύτερη κατηγορία υπάγονται τα SBIs, οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες και τα δικαρβοξαμιδικά. Η τελευταία κατηγορία περιλαμβάνει κυρίως μη εξειδικευμένης δράσης ή αλλιώς προστατευτικά μυκητοκτόνα όπως αυτά που προαναφέρθηκαν στην πρώτη παράγραφο.

## 3.2. Μηχανισμοί ανάπτυξης ανθεκτικότητας

### 3.2.1. Γενικά

Αποτελεί πλέον κοινή παραδοχή ότι η μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας από τα γονίδια πραγματοποιείται μέσω της μεταγραφής του DNA σε RNA και κατόπιν μετάφρασης του στις αντίστοιχες πρωτεΐνες. Επομένως η έκφραση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας θα πρέπει να εντοπίζεται σε κάποια ποιοτική ή ποσοτική μεταβολή του ενζύμου- ή μιας πρωτεΐνης-στόχου. Ο μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας ενός οργανισμού σε μια τοξική ένωση, στην πραγματικότητα είναι λίγο έως αρκετά συνδεδεμένος με την πορεία φαρμακολογικής δράσης της ένωσης αυτής σε υποκυτταρικό επίπεδο.

Μπορούν επομένως να διακριθούν δύο κύριες κατηγορίες μηχανισμών ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα: α) εκείνοι οι μηχανισμοί που αφορούν την φαρμακοδυναμική φάση, δηλαδή την αλληλεπίδραση του μυκητοκτόνου με την θέση δράσης και εδώ υπάγονται: 1) **ο μηχανισμός αλλαγής στη θέση δράσης**, 2) **της υπερέκφρασης του μορίου θέσης δράσης** και 3) **η λειτουργία εναλλακτικών συστημάτων** και, β) αυτοί που εμπλέκονται στην φαρμακοκινητική πορεία-τύχη του μυκητοκτόνου εντός του κυττάρου και εδώ μπορούν να υπαχθούν: 1) **ο μηχανισμός μειωμένης εισόδου ή/και αυξημένης απέκκρισης του μυκητοκτόνου**, 2) **ο μηχανισμός της αποτοξικοποίησης** και 3) **ο μηχανισμός αδυναμίας συνθέσεως της τοξικής μορφής εντός του κυττάρου** (Ζιώγας, 2000).

### 3.2.2. Αλλαγή στη θέση δράσης

Ο πιο συνήθης τρόπος για ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε ένα μυκητοκτόνο, καθώς και σε οποιοδήποτε άλλο τοξικό παράγοντα, και ίσως ο πιο αποτελεσματικός, είναι η αλλαγή στη θέση δράσης (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Αυτός ο μηχανισμός βασίζεται στο γεγονός ότι εάν κάποιο γονίδιο το οποίο ελέγχει το βιοχημικό στόχο δράσης του μυκητοκτόνου, έχει μεταλλαχθεί, τότε θα προκύψει μία αλλαγή σε κάποιο από τα αμινοξέα του βιοχημικού-στόχου που προσδένεται το μυκητοκτόνο (binding site), η πρωτεΐνη δεν θα παρεμποδίζεται και το μυκητοκτόνο θα έχει χάσει πια την αποτελεσματικότητά του (Dekker, 1977). Έτσι, διάφορα επίπεδα ανθεκτικότητας

μπορούν να προκύψουν με διάφορες αλλαγές αμινοξέων στο(α) σημείο(α) πρόσδεσης του μυκητοκτόνου. Βασικό όμως στοιχείο είναι ότι όποιες αλλαγές και αν προκύψουν, θα πρέπει η πρωτεΐνη να παραμείνει λειτουργική και μετά τη(-ις) μεταλλαγή(-ες) έτσι ώστε να μην υπάρξουν σοβαρές επιπτώσεις στη φυσιολογία του ανθεκτικού οργανισμού.

Εξετάζοντας τα μέχρι τώρα δεδομένα ανθεκτικότητας στα περισσότερα εξειδικευμένης δράσης μυκητοκτόνα (site-specific inhibitors) φαίνεται ότι τα υψηλά αλλά και σταθερά επίπεδα ανθεκτικότητας που προκύπτουν σε σύντομο χρονικό διάστημα στον αγρό ή στο εργαστήριο οφείλονται κυρίως σε αυτόν το μηχανισμό ανθεκτικότητας. Αντιθέτως, είναι πρακτικά αδύνατον να προκύψει αυτός με τα προστατευτικά μυκητοκτόνα. Αυτό έγκειται στο γεγονός ότι τα μυκητοκτόνα αυτά δρουν σε πολλά σημεία εντός κυττάρου (multi-site inhibitors) και επομένως η πιθανότητα του να συμβούν όλες αυτές οι απαραίτητες μεταλλαγές γονιδίων είναι πάρα πολύ μικρή. Αλλά ακόμη και εάν προκύψουν, η πιθανότητα επιβίωσης του παθογόνου είναι μικρή, λόγω της μειωμένης προσαρμοστικότητας του (Dekker, 1977; 1995; Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

**Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης.** Η μελέτη της ανθεκτικότητας σε πολλές ενώσεις και κυρίως στην υποομάδα των DMIs έδειξε ότι περισσότεροι από έναν βιοχημικοί μηχανισμοί μπορεί να ευθύνονται για την απώλεια της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα αυτά όπως αυτοί της αυξημένης απέκκρισης, της μειωμένης εισόδου του μυκητοκτόνου εντός των κυττάρων του παθογόνου, της αποτοξικοποίησης, της επιβίωσης με κατώτερες στερόλες και της αλλαγής στη θέση δράσης (De Waard, 2006). Σε ορισμένες περιπτώσεις ο υπεύθυνος μηχανισμός για ανθεκτικότητα στους DMIs έχει εξηγηθεί με την αλλαγή στη θέση δράσης στους μύκητες *Candida albicans* (Vanden Bossche et al, 1990), *Nectria haematococcoa var. curcubitae* (Demopoulos και Ziogas, 1994), *Uncinula necator* (Delye και συνεργάτες, 1997), *Erysiphe graminis f.sp. hordei* (Delye et al, 1998), *Penicillium italicum* (Joseph-Horne και Hollomon, 1997), *Ustilago maydis* (Butters et al, 2000) και στο *A. fumigatus* (Howard et al, 2009). Η κύρια μεταλλαγή που έχει βρεθεί να συσχετίζεται με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας είναι η Y136F, στην οποία υπάρχει υποκατάσταση της φαινυλαλαίνης με τη τυροσίνη στη θέση 136 της αμινοξικής αλληλουχίας του *CYP51* γονιδίου το οποίο είναι υπεύθυνο για την έκφραση της απομεθυλάσης του άνθρακα 14 (14a-demethylase) (Delye et al, 1998). Σχετικά

πρόσφατα έχουμε περιπτώσεις ανάπτυξης ανθεκτικότητας και σε άλλες ενώσεις που παρεμποδίζουν μεταγενέστερα στάδια της απομεθυλίωσης του C-14 (στα οποία δρουν οι DMIs) κατά την βιοσυνθετική πορεία της εργοστερόλης. Συγκεκριμένα με την ένωση fenhexamid, μεταλλαγμένα στελέχη με διάφορες μεταλλαγές στο κωδικόνιο 412 του γονιδίου της 3- αναγωγάσης (το οποίο είναι υπεύθυνο για την μεθυλίωση του C-4) εμφάνισαν από μέτρια έως υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας (> 350) (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007; Fillinger et al, 2008). Μαζί με αυτή έχουν εμφανιστεί και διάφορες άλλες μεταλλαγές σε διάφορες θέσεις αμινοξέων αλλά δεν έχει επιβεβαιωθεί ακόμη αν συνδέονται πράγματι με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην παραπάνω ένωση (Billard , et al 2012). Ωστόσο ο κίνδυνος ανάπτυξη προβλημάτων ανθεκτικότητας στην ένωση αυτή δεν φαίνεται να είναι σημαντικός διότι τα ανθεκτικά στελέχη δείχνουν να υπολείπονται σε παθογόνο ικανότητα από ότι τα ευαίσθητα στελέχη (Ziogas et al, 2003).

**Καρβοξαμιδικά.** Οι πρώτες περιπτώσεις ανθεκτικότητας που εμφανίστηκαν με την ομάδα αυτή των μυκητοκτόνων ήταν από εργαστηριακά στελέχη σε μύκητες μοντέλα και υποστηρίχτηκε ότι ο υπεύθυνος μηχανισμός της ανθεκτικότητας στις ενώσεις αυτές ήταν η αλλαγή στη θέση δράσης (Georgopoulos, 1977). Η ανθεκτικότητα στην ομάδα αυτή σύμφωνα με τις διάφορες μελέτες που έχουν γίνει μέχρι τώρα σε διάφορα παθογόνα αγρού και εργαστηρίου οφείλεται σε σημειακές μεταλλαγές που προκύπτουν στα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες SDHB, SDHC ή SDHD της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDH, Succinate Dehydrogenase). Η περιοχή που προκύπτει από τις τρεις αυτές υπομονάδες σχηματίζει μια κοιλότητα στην οποία προσδένονται η ουμπικινόνη (Q) και τα καρβοξαμιδικά μυκητοκτόνα (Glattli et al, 2010). Στην υπομονάδα SDHB έχουν βρεθεί οι μεταλλαγές H225L/T/F, H228N, H229L, H239L, H249Y/ L/ N, H252L, H267Y, H272Y/R, H277Y/R, H278Y, P225T, P225L, P225F, N130I, στην SDHC οι N80, H134R, S73P, T90I και στην SDHD οι μεταλλαγές D89G, D123E, D133R, S89P, D132R, D124E, H132R (Avenot και Michaelides, 2010; Leroux et al, 2010; Velukas et al, 2011). Φαινότυποι με τέτοιες μεταλλαγές μπορεί να εμφανίζουν αρκετά υψηλούς παράγοντες ανθεκτικότητας (RF > 1000) (Avenot et al, 2008).

**Qo παρεμποδιστές.** Χρειάστηκαν μόλις 4 χρόνια εφαρμογής των παρεμποδιστών αυτών μέχρι να προκύψουν τα πρώτα προβλήματα ανθεκτικότητας όπως με τα

παθογόνα *Erysiphe graminis f.sp. tritici* (Sierotzki και συνεργάτες, 2000), *Venturia inaequalis* (Steinfeld et al, 2001) και *Mycosphaerella fijiensis* (Sierotzki et al, 2000) ενώ μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί περισσότερα από 27 είδη παθογόνων που έχουν ανάπτυξη ανθεκτικότητα στην ομάδα αυτή των μυκητοκτόνων (<http://www.frac.info/frac/index.htm>). Στις περισσότερες περιπτώσεις η ανθεκτικότητα έχει συνδεθεί με την παρουσία σημειακών μεταλλαγών στο γονίδιο του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος b (*cyt b* gene) οι οποίες δεν επηρεάζουν την προσαρμοστικότητα των στελεχών (Ma και Michailides, 2005). Μια τέτοια μεταλλαγή που εμφανίζεται πιο συχνά είναι η G143A (στην οποία υπάρχει αντικατάσταση της γλυκίνης σε αλανίνη στο γονίδιο που εκφράζει τη πρωτεΐνη του *cyt b*) η οποία οδηγεί σε υψηλούς παράγοντες ανθεκτικότητας (> 100) (Fische και Meunier, 2005). Μια ακόμα μεταλλαγή η οποία έχει δείξει αρκετά υψηλούς παράγοντες ανθεκτικότητας (> 1000) είναι και η G143S (γλουταμίνη σε σερίνη) αν και δεν έχουν υπάρξει έντονα προβλήματα ανθεκτικότητας στον αγρό καθώς στελέχη με αυτή τη μεταλλαγή παρουσιάζουν χαμηλή προσαρμοστικότητα σε σχέση με τα ευαίσθητα στελέχη (Avila-Adame και Koller, 2003; Malandrakis, 2006). Μικρότερης σημασίας είναι οι μεταλλαγές F129L (αντικατάσταση της φαινυλαλαίνης σε τυροσίνη) και G137R (γλουταμίνη σε αργινίνη) οι οποίες οδηγούν σε μετρίου έως αρκετά χαμηλούς παράγοντες ανθεκτικότητας (Sierotzki et al, 2007; Pasche et al, 2005). Υποστηρίζεται ότι οι θέσεις των αμινοξέων αυτών οριοθετούν μια κοιλότητα στη πρωτεΐνη στην οποία πραγματοποιείται η πρόσδεση των διαφόρων Qo παρεμποδιστών (Gisi et al, 2002). Παρόλα αυτά η ικανότητα διαφόρων παθογόνων να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα με αυτές τις μεταλλαγές εξαρτάται από την παρουσία εσονίων (introns), δηλαδή μικρών παρεμβαλλόμενων μη κωδικεύουσων περιοχών DNA, τα οποία μπορεί να εδράζονται σε διάφορα σημεία πλησίον των κωδικονίων αυτών. Προκειμένου να μετατραπεί ολόκληρο το τμήμα DNA σε λειτουργικό θα πρέπει να προηγηθεί ένα στάδιο της επεξεργασίας του RNA ώστε να απομακρυνθούν τα εσόνια. Συγκεκριμένα για στους μύκητες *P. teres*, *Alternaria solani*, *Puccinia sp.*, *Rhynchosporium secalis*, *Saccharomyces cerevisiae* και σε μερικά στελέχη του μύκητα *B. cinerea* κοντά στη περιοχή του αμινοξέος 143 υπάρχει ένα εσόνιο, που όπως υποστηρίζεται, η ανθεκτικότητα σε αυτόν τον μύκητα με αυτή τη μεταλλαγή δεν μπορεί να προκύψει πιθανώς λόγω της έλλειψης ικανότητας για αναγνώριση της περιοχής του εσονίου κατά το στάδιο της επεξεργασίας του mRNA πράγμα το οποίο οδηγεί σε έκφραση μιας μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Αντιθέτως η μεταλλαγή αυτή μπορεί να υπάρξει σε

μύκητες όπως *P. tritici-repentis*, *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella fijiensis*, *M. graminicola*, *Plasmopara beticola*, *Alternaria alternata*, *Mycrodochium nivale* και *M. majus* λόγω έλλειψης εσοπίων στη ίδια περιοχή του γονιδίου (Sierotzki et al, 2007; Vallieres et al, 2011; Deising et al, 2008; Madigan et al, 2005; Walker et al, 2009).

**Δικαρβοξαμιδικά.** Μία ακόμη ομάδα μυκητοκτόνων που έχει εμφανίσει σε κάποιο βαθμό ανθεκτικότητα είναι αυτή που περιλαμβάνει τα δικαρβοξαμιδικά, τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες και τα φαινυλοπυρρολικά. Ως τόσο δεν έχουν αναφερθεί μεγάλα προβλήματα σε άλλα παθογόνα πέραν του *B. cinerea* και κυρίως με την ομάδα των δικαρβοξαμιδικών (Leroux et al, 2002). Ο μηχανισμός δράσης τους αν και δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως μέχρι τώρα, πρέπει να είναι κοινός και για τις τρεις υποομάδες. Αυτή η άποψη προήλθε από τη διαπίστωση ότι μετά από τη δημιουργία με μετάλλαξη ανθεκτικών στελεχών από ένα ευαίσθητο μύκητα σε ένα μέλος της ομάδας, συνεπάγονταν πάντα ανθεκτικότητα σε όλα τα μέλη. Πρόσφατες μελέτες σχετικά με τα φαινυλοπυρρολικά έδειξαν ότι η δράση τους σχετίζεται με πρωτεϊνικές κινάσες οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης της γλυκερόλης και κατ'επέκταση του οσμωτικού δυναμικού του κυττάρου (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Συγκεκριμένα, από μοριακές μελέτες (Ochiai et al, 2001; Oshima et al, 2002; Ma et al, 2007) σε ανθεκτικά και στις τρεις ομάδες ενώσεων στελέχη εντοπίστηκαν σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο της ιστονικής κινάσης (histidine kinase gene). Το γονίδιο αυτό είναι πολυμορφικό και μπορεί να συνδέεται με διαφόρους φαινότυπους όπως την ευαισθησία στην όσμωση (Gustin et al, 1998), την παθογόνο δράση και τη μεταφορά μεταβολικών προϊόντων π.χ. μυκοτοξίνες (Markoglou et al, 2008). Ανάλογα με τη θέση των σημειακών μεταλλαγών μπορούν να διακριθούν δύο κατηγορίες ανθεκτικών στελεχών: στελέχη τύπου I τα οποία παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας και έχουν μέτρια ευαισθησία στο οσμωτικό στρες και στελέχη τύπου II τα οποία είναι μετρίου επιπέδου ανθεκτικά και παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στο οσμωτικό στρες (Ochiai et al, 2001). Μελέτες που έχουν γίνει μέχρι τώρα στο εργαστήριο έχουν δείξει ότι αν και είναι εύκολο να προκύψουν στελέχη ανθεκτικά σε αυτές τις ενώσεις σε υψηλή συχνότητα, ωστόσο λόγω της μειωμένης φυτοπαθογόνου προσαρμοστικότητας τους έναντι των ευαίσθητων στελεχών δεν δημιουργούν ιδιαίτερα προβλήματα στον αγρό (Ziogas et al, 2005).

**Άλλες ομάδες.** Ο υπεύθυνος μηχανισμός για ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην ομάδα των ανιλνοπυριμιδίνων μας είναι ακόμη άγνωστος. Αν και υπάρχουν ερευνητικές



εργασίες στις οποίες έχουν εντοπιστεί μεταλλαγές στο γονίδιο που εκφράζει τη β-λυάση της κυσταθειόνης, η άμεση σύνδεση τους με την ανθεκτικότητα δεν έχει επιβεβαιωθεί ακόμη καθώς υπάρχουν και περιπτώσεις στις οποίες οι αλληλουχίες των διαφόρων στελεχών, ευαίσθητων και ανθεκτικών στις ανιλινοπυριμιδίνες, ήταν μεταξύ τους ταυτόσημες (Leroux et al, 2002). Η αλλαγή στη θέση δράσης έχει αναγνωρισθεί ως μηχανισμός ανθεκτικότητας και σε διάφορες παλιές ομάδες εξειδικευμένων παρεμποδιστών όπως τα φαινυλαμιδία (παρεμποδιστές βιοσύνθεσης νουκλειϊκών οξέων) και τα αντιβιοτικά κασουλγαμικίνη, κυκλοεξιμίδιο και πιθανώς τη γκριζεοφουλβίνη (παρεμποδιστές πρωτεινολύνθεσης) (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992, Georgopoulos, 1987; Davidse, 1987; Georgopoulos, 1977).

### 3.2.3. Υπερέκφραση του βιοχημικού στόχου

Είναι σαφές ότι για να υπάρξει η επιθυμητή τοξική δράση ενός φαρμάκου σε ένα κύτταρο θα πρέπει η αναλογία των μορίων του παρεμποδιστή με τα μόρια των δεσμευτών του (βιοχημικοί στόχοι) σε μία δεδομένη χρονική στιγμή να είναι μεγαλύτερη από 1:1. Ωστόσο υπάρχουν δύο κύριοι μηχανισμοί υπερέκφρασης του βιοχημικού στόχου μέσω των οποίων τα παθογόνα έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα.

Ο πρώτος μηχανισμός εντοπίζεται στο επίπεδο της μεταγραφής του γονιδίου που κωδικοποιεί το βιοχημικό στόχο και αφορά ποσοτικές μεταβολές που μπορούν να προκύψουν στην περιοχή του υποκινητή. Η ύπαρξη ενός τέτοιου μηχανισμού ανθεκτικότητας υποστηρίζεται για την ομάδα των DMIs, στους οποίους βρέθηκε η ανθεκτικότητα να μην συσχετίζεται με τη δημιουργία μεταλλάξεων στο *CYP51* γονίδιο των ανθεκτικών στελεχών αλλά με την διευρυμένη επέκταση του υποκινητή του *CYP51* γονιδίου (που κωδικοποιεί το βιοχημικό στόχο) κατά 5 φορές περισσότερο από ότι των ευαίσθητων στελεχών. Τα ανθεκτικά στελέχη τα οποία παρουσίαζαν αυτή την επέκταση στη περιοχή του υποκινητή είχαν έως και 100 φορές περισσότερη έκφραση του *CYP51* γονιδίου σε σχέση με τα ευαίσθητα στελέχη. Στη συνέχεια, με κατάλληλες μοριακές τεχνικές, έγινε απώλεια ενός μέρους αυτής της περιοχής γεγονός που οδήγησε ταυτοχρόνως σε μείωση της υπερέκφρασης του *CYP51* γονιδίου και του επιπέδου της ανθεκτικότητας (Hamamoto et al, 2000). Ο μηχανισμός αυτού

του τύπου της υπερέκφρασης του βιοχημικού στόχου έχει φανεί και σε διάφορες άλλες περιπτώσεις ανθεκτικότητας με την ομάδα των DMIs τόσο σε επίπεδο αγρού όσο και εργαστηρίου (Ma και Michailides, 2005; Kontoyiannis, 1999; White, 1997).

Στη δεύτερη περίπτωση η υπερέκφραση του βιοχημικού στόχου δεν εξηγείται από ποσοτική αλλά ποιοτική μεταβολή στη περιοχή του υποκινητή. Για παράδειγμα παρατηρήθηκε ότι ορισμένα στελέχη του μύκητα *V. inaequalis* με ανθεκτικότητα στους DMIs παρουσίαζαν μια παρεμβαλλόμενη περιοχή στον υποκινητή του *CYP51* γονιδίου η οποία έδινε επίπεδα υπερέκφρασης έως και 17.8 φορές περισσότερο από ότι στα άγρια στελέχη (Schnabel και Jones, 2001). Πρόσφατες ερευνητικές εργασίες στο εργαστήριο της Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γ.Π.Α. έχουν δείξει ότι ο μηχανισμός της ανθεκτικότητας στην ομάδα των DMIs οφείλονταν στην υπερέκφραση του βιοχημικού στόχου χωρίς όμως εμπλοκή του υποκινητή (Νίκου και συνεργάτες, 2009)

#### 3.2.4. Λειτουργία εναλλακτικών συστημάτων (*circumvention*)

Ένας άλλος μηχανισμός που μπορεί να οδηγήσει σε μετρίου επιπέδου ανθεκτικότητα στους εξειδικευμένους παρεμποδιστές είναι η λειτουργία εναλλακτικών μεταβολικών συστημάτων. Αυτό σημαίνει ότι εάν κάποιος παρεμποδιστής δρα σε ένα συγκεκριμένο βιοχημικό στόχο του μεταβολισμού ενός κυττάρου, τότε ο οργανισμός μπορεί να γίνει ανθεκτικός μεταβάλλοντας τον μεταβολισμό του κατά τέτοιο τρόπο έτσι ώστε ο βιοχημικός στόχος να παρακάμπτεται (Dekker, 1977). Η πρώτη ενδειξίς ενός τέτοιου μηχανισμού ανθεκτικότητας αφορούσαν την ανθεκτικότητα του μύκητα *Ustilago maydis* στην αντιμυκίνη A η δράση της οποίας βρίσκεται ένα στάδιο αμέσως μετά το σημείο δράσης των στρομπιλουρινών και συγκεκριμένα παρεμποδίζουν την αναγωγή της συμπικονόνης (Qi inhibitors) στο σύμπλοκο III της αναπνευστικής αλυσίδας (Georgopoulos και Sisler, 1970). Οι παραπάνω ερευνητές υποστηρίζουν ότι η ανθεκτικότητα σε αυτό το αντιβιοτικό μπορεί να οφείλεται στην παράκαμψη της ροής των ηλεκτρονίων από το σημείο δράσης του αντιβιοτικού. Στα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε ότι μεταλλαγμένα στελέχη στα οποία δεν ενεργοποιούταν η εναλλακτική τους αναπνοή ήταν συνάμα ευαίσθητα και στην αντιμυκίνη A. Με τη λειτουργία της αναπνοής έχουμε στην ουσία ροή των ηλεκτρονίων από την

ουμπικονόνη κατευθείαν στο  $O_2$  χωρίς την παρεμβολή των ενδιάμεσων συμπλόκων της κυτοχρωμικής οδού. Υπεύθυνο ένζυμο για την εναλλακτική μεταφορά των ηλεκτρονίων είναι η εναλλακτική οξειδάση (AOX, alternative oxidase,) (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Σε μία πρόσφατη σχετικά εργασία του εργαστηρίου μας διαπιστώθηκε ότι μερικά μετρίου-χαμηλού επιπέδου ανθεκτικά στις στρομπιλουρίνες στελέχη του μύκητα *C.beticola* παρουσίαζαν περισσότερο έντονη (εκ συτάσεως ή και ενεργοποίηση) την εναλλακτική τους αναπνοή από ότι τα άγρια στελέχη. Η διαπίστωση αυτή πηγάζει από την παρατήρηση ότι η επίδραση του παρεμποδιστού pyraclostrobin (QoIs) στην κατανάλωση του  $O_2$  των στελεχών αυτών αυξάνονταν σημαντικά με τη προσθήκη του SHAM (παρεμποδιστής εναλλακτικής αναπνοής) οδηγώντας στην υποψία για την ύπαρξη του μηχανισμού της εναλλακτικής αναπνοής ως υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα στα στελέχη αυτά. Το ενδιαφέρον που παρατηρήθηκε είναι ότι ο μηχανισμός της εναλλακτικής αναπνοής ενεργοποιούνταν και στα υψηλού επιπέδου ανθεκτικά στελέχη (στα οποία ανιχνεύτηκαν σημειακές μεταλλαγές ανθεκτικότητας στο *cyt b* γονίδιο), μόνο όταν η συγκέντρωση του μυκητοκτόνου ξεπερνούσε κάποιο κατώφλι (Μαλανδράκης, 2009; Malandrakis et al, 2006). Παρόλαυτα η ανθεκτικότητα μέσω του μηχανισμού της εναλλακτικής αναπνοής δεν φαίνεται να αποτελεί σημαντικό πρόβλημα σε πεδίο αγρού καθώς υποστηρίζεται ότι η εναλλακτική αναπνοή δεν μπορεί να εκφραστεί *in planta* ίσως λόγω ανεπαρκούς παραγωγής ATP απαιτούμενο για την παθογένεση στα φυτά (Ziogas et al, 1997) ή λόγω έκκρισης φυτικών φλαβονοειδών που παρεμποδίζουν την επαγωγή του μηχανισμού αυτού (Olaya και Koller, 1999).

Μερικές από τις μελέτες στις οποίες υποστηρίζεται η λειτουργία της εναλλακτικής αναπνοής ως υπεύθυνος μηχανισμός ανθεκτικότητας στην ομάδα των Qo μυκητοκτόνων είναι αυτές όπως στους μύκητες *S. tritici* (Ziogas et al, 1997; Miquez et al, 2003), *V. inaequalis* (Olaya και Koller, 1999; Farber και συνεργάτες, 2002; Steinfeld et al, 2001) και *Gaeumannomyces graminis var. tritici* (Joseph-Horne, 1998).

### 3.2.5. Αποτοξικοποίηση (detoxification)

Με τον όρο αποτοξικοποίηση (ή αλλιώς βιομετατροπή) νοούνται οι μηχανισμοί ενζυμικής αποδόμησης του τοξικού μορίου σε μόρια που είναι λιγότερο έως καθόλου τοξικά για το κύτταρο. Αυτό μπορεί να γίνει μέσω ενζυμικής αποδόμησης ή εναπόθεσης του τοξικού μορίου σε λιπώδη κυτταρικά συστατικά που δεν είναι απαραίτητα για το μεταβολισμό του κυττάρου του παθογόνου (Georgopoulos, 1977; Dekker, 1977). Όσο αναφορά τη τελευταία περίπτωση, ένα τέτοιο παράδειγμα θεωρείται ότι ισχύει στην περίπτωση εμφάνισης ανθεκτικότητας του μύκητα *Pyrenophora avenae* στα οργανικά υδραργυρούχα. Στην ομάδα αυτή των προσιατευτικών μυκητοκτόνων παρατηρήθηκε ότι τα ανθεκτικά στελέχη διέθεταν προϋπάρχουσες μεταβολικές δεξαμενές (metabolic pools) οι οποίες αν και δεν ήταν απαραίτητες για το κύτταρο, ωστόσο είχαν την ιδιότητα να δεσμεύουν και να απενεργοποιούν τα τοξικά ιόντα του υδραργύρου των ενώσεων αυτών. Επίσης από τον ίδιο ερευνητή βρέθηκε ότι τέτοια πιθανά ενδοκυτταρικά συστατικά ήταν διάφορα χρωστικά παράγωγα της ανθρακινόνης τα οποία δημιουργούσαν σύμπλοκες ενώσεις (chelates) με τα τοξικά ιόντα (Greenaway, 1971; 1972). Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν στη συνέχεια και άλλοι ερευνητές (Ross και Old, 1973a; Ross, 1974).

Ωστόσο ο πιο συνηθισμένος μηχανισμός ενός παθογόνου να απομακρύνει κάποιο τοξικό μόριο είναι μέσω της δραστηριότητας ενζύμων του πρωτογενούς ή δευτερογενούς μεταβολισμού του κυττάρου. Τα ένζυμα αυτά έχουν την ιδιότητα να μετατρέπουν διάφορα λιπόφιλα τοξικά μόρια, όπως είναι και τα περισσότερα φυτοφάρμακα, σε περισσότερο υδατοδιαλυτά μόρια (Chen, 2012). Μπορούν να διακριθούν δύο στάδια αποτοξικοποίησης ενός τοξικού μορίου. Η μεταβολική φάση I η οποία περιλαμβάνει την αποδόμηση του μορίου μέσω ενζυμικών οξειδώσεων, αναγωγών ή υδρολύσεων και η μεταβολική φάση II, η οποία περιλαμβάνει παραπέρα μεταβολισμό του μορίου με τη δημιουργία συμπλόκων ενώσεων μέσω ενζύμων (ένζυμα της II φάσης) τα οποία προσθέτουν στα τοξικά μόρια διάφορες ομάδες οι οποίες τα καθιστούν ανενεργά και υποβοηθούν την εκροή τους από το κύτταρο (Chen, 2012). Στη φάση I μετέχουν ένζυμα όπως οι μονοξυγονάσες του κυτοχρώματος P-450, οι υπεροξειδάσες και διάφορες υδρολάσες ενώ αντιπροσωπευτικά ένζυμα της φάσης II είναι η ομάδα των τρανσφερασών. Ο αυξημένος μεταβολισμός λόγω της δράσης των τριών ομάδων ενζύμων είναι ο κύριος μηχανισμός ανάπτυξης

ανθεκτικότητας των εντόμων σε αρκετά εντομοκτόνα της ομάδας των πυρεθρινοειδών, οργανωχλωριωμένων και οργανοφωσφορικών αλλά ίσως και των ζιζανίων σε ορισμένα ζιζανιοκτόνα (Ελευθεροχωρινός, 2008; Orpenoorth και Welling, 1976; Soderlund, 1997).

Οι **μεταφοράσες της γλουταθειόνης** (GSTs, Glutathione-S-transferases) αποτελούν μία μεγάλη κατηγορία ισοενζύμων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αδρανοποίηση διαφόρων ξενοβιοτικών ουσιών του περιβάλλοντος καταλύοντας την σύζευξη της ανοιγμένης γλουταθειόνης με ηλεκτρονιόφιλους υποκαταστάτες (αλογόνα και νιτρο-ομάδες) όπως είναι πολλά από τα εντομοκτόνα και τα ζιζανιοκτόνα (Cole και Edwards, 2000; Yang, 1976). Τελευταία, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζεται με το ισοένζυμο GST I το οποίο χρησιμοποιείται ως πρότυπο ένζυμο για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των GSTs και των διαφόρων φυτοφαρμάκων (Καρολί και συνεργάτες, 2008; Labrou et al, 2001, 2004, 2005). Επίσης, η γλουταθειόνη (GSH) μπορεί να δρα και ως υπεροξειδάση κάτω από συνθήκες έντονου οξειδωτικού στρες (Roxas et al, 1997). Πέρα από την καταλυτική τους δράση, οι GSTs μπορεί να συμπεριφέρονται και ως πρωτεΐνες-φορείς για την μεταφορά διαφόρων ενδοκυτταρικών υδρόφοβων μορίων (Acharli et al, 2004). Αναφέρεται δε ότι σε ορισμένα κύτταρα, όπως των φυτών και ίσως των εντόμων, των οποίων οι συγκεντρώσεις της GSH είναι αρκετά υψηλές, μπορεί να υπάρχουν συζεύξεις της GSH με τα τοξικά υποστρώματα ακόμη και απουσίας της καταλυτικής δράσης των GSTs (Cole και Edwards, 2000). Ωστόσο η έρευνα γύρω από τη βιοχημεία των GSTs των διαφόρων μικροοργανισμών είναι μέχρι και σήμερα περιορισμένη και σε σχέση με τα έντομα και τα φυτά οι συγκεντρώσεις των ενζύμων αυτών στα βακτήρια, στις ζύμες και στους μύκητες βρίσκονται σε αρκετά χαμηλά επίπεδα (Summer et al, 1980; Shishido, 1981; Wackett και Gibson, 1982; Lau et al, 1980). Οι **οξειδάσεις του κυτοχρώματος P450** (cytochrome P-450s) αποτελούν πολυλειτουργικά ένζυμα, τα οποία υπάρχουν σε πολλά είδη οργανισμών όπως στα θηλαστικά, στα ανώτερα φυτά στα έντομα, στα βακτήρια και στους μύκητες (Hodgson, 1974; Van den Brink, 1998;) και εκτός από τη βιοσύνθεση των φυτοορμόνων, των στεροειδών, των φλαβονοειδών και διαφόρων ενδιάμεσων προϊόντων της λιγνίνης παίζουν εξέχοντα ρόλο και στον μεταβολισμό διαφόρων ξενοβιοτικών ουσιών, μεταξύ αυτών και των φυτοφαρμάκων (Katagi και Mikami, 2000; Hodgson και Tate, 1976). Οι **υδρολάσες** (hydrolases) αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια ενζύμων που συνήθως εμπλέκονται σε

περιπτώσεις ανάπτυξης ανθεκτικότητας των εντόμων στην ομάδα των οργανοφωσφορικών (Oppenoorth και Welling, 1976). Γενικότερα, η δράση των υδρολασών εντοπίζεται σε τοξικές ενώσεις που έχουν στο μόριό τους αμιδικό ή εστερικό δεσμό. Από τις κυριότερες ομάδες υδρολασών είναι οι εστεράσες.

Σε αντίθεση με τα έντομα και τα ζιζάνια, θεωρείται ότι οι μύκητες έχουν γενικά μικρή μεταβολική ικανότητα στα μυκητοκτόνα και αυτό δικαιολογεί το γεγονός ότι σπανίως η αποτοξικοποίηση αποτελεί κύριο μηχανισμό ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα εξειδικευμένης δράσης μυκητοκτόνα (Hollomon et al, 1997). Αντιθέτως, φαίνεται ότι ο κύριος μηχανισμός άμυνας ενός παθογόνου εναντίον κάποιας μη εκλεκτικά τοξικής ένωσης, όπως είναι τα προστατευτικά μυκητοκτόνα, είναι μέσω του μηχανισμού της αποτοξικοποίησης και συγκεκριμένα μέσω θειούχων πολυπεπτιδίων όπως η GSH και οι διάφορες μεταλλοθειονίνες. Για παράδειγμα, ανθεκτικά στις ενώσεις chlorothalonil και captan στελέχη του μύκητα *B. cinerea* βρέθηκαν να παρουσιάζουν υψηλή παραγωγή σε GSH, ειδικότερα όταν στο υλικό ανάπτυξης είχε προστεθεί captan, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η ανθεκτικότητα μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα αυτών των στελεχών να απενεργοποιούν τις τοξικές αυτές ενώσεις μέσω της αυξημένης ενζυμικής δράσης των GSTs (Barak και Edgington, 1984). Παρόμοιος μηχανισμός ανθεκτικότητας στη προστατευτική ένωση chlorothalonil έχει διαπιστωθεί και στη περίπτωση με τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* (Shin και συνεργάτες, 2003). Αντίστοιχα πειράματα με την ίδια ένωση, έδειξαν να συνδέεται η ανθεκτικότητα ενός μεταλλαγμένου στελέχους του *Azospirillum brasilense* με υψηλή παραγωγή GSH, η οποία βρέθηκε να είναι έως και 100 φορές περισσότερη σε σχέση με αυτή του αγρίου στελέχους. Σε αυτή τη περίπτωση επίσης, το ανθεκτικό αυτό στέλεχος εξέφραζε έως και δέκα φορές υψηλότερη δραστικότητα των GST σε σχέση με το ευαίσθητο στέλεχος. Ισχυρή ένδειξη ότι η ανθεκτικότητα οφείλεται στην δράση της GSH προκύπτει από το γεγονός ότι η προσθήκη GSH ή κυστεινης στο υλικό ανάπτυξης του αγρίου στελέχους άρει την τοξική δράση του captan (Gallori και συνεργάτες, 1988). Σε αρκετές περιπτώσεις βακτηρίων έχει αναφερθεί παρόμοιος μηχανισμός ανθεκτικότητας με το αντιβιοτικό φοσφομυκίνη (Allocati και συνεργάτες, 2008). Έχει αποδειχτεί ότι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μυκήτων σε ανόργανες ενώσεις χαλκού και καδμίου οφείλεται στην αυξημένη δράση ορισμένων πολυπεπτιδίων κυστεινης που καλούνται μεταλλοθειονίνες. Η συμβολή τους στο μηχανισμό ανθεκτικότητας στα μέταλλα γίνεται μέσω του μηχανισμού της

ομοιόστασης του κυττάρου κάτω από υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων που υπάρχουν στο περιβάλλον ανάπτυξης του μύκητα. Αυτό επιτυγχάνεται με το υπερεκφράζον κάτω από αυτές τις συνθήκες τα γονίδια που είναι υπεύθυνα να κωδικοποιούν τις μεταλλοθειονίνες σε βαθμό τέτοιο που να επιτρέπουν να συσσωρεύεται μόνο μία μικρή ποσότητα του τοξικού μετάλλου την οποία χρειάζονται τα κύτταρα ενώ το μεγαλύτερο μέρος από αυτή το μεταβολίζουν μέσω σύζευξης του με τα μόρια της κυστεΐνης (Macreadie et al, 1994).

Μία περίπτωση πιθανής ύπαρξης του μηχανισμού αποτοξικοποίησης λόγω εμπλοκής των P450s έχει αναφερθεί με στελέχη του μύκητα *B. cinerea* ανθεκτικά στην ένωση fenhexamid (Leroux et al, 2001). Παρόμοιος μηχανισμός ανθεκτικότητας έχει αναφερθεί και για το οργανοφωσφορικό μυκητοκτόνο kitazin-P (Uesugi και Sisler, 1978). Υψηλής ανθεκτικότητας στελέχη του μύκητα *Pyricularia oryzae*, φάνηκαν να διασπούν το δεσμού S-C του μορίου της ένωσης οδηγώντας σε λιγότερο τοξικά παράγωγα, πιθανώς μέσω των P450s. Επίσης, ενδείξεις για την εμπλοκή των P450s στο μηχανισμό αποτοξικοποίησης υπάρχουν σε ορισμένες περιπτώσεις ανθεκτικότητας με τα αντιβιοτικά της ομάδας των τετρακυκλινών και στις ενώσεις rifampin, virginiamycin M1 και isoniazid (Wright, 2005).

Η εμπλεκόμενη λειτουργία των εστερασών φαίνεται να δικαιολογεί σε ορισμένες περιπτώσεις την ύπαρξη ανθεκτικότητας στις μυκητοκτόνες ενώσεις. Για παράδειγμα έχει αποδειχτεί ότι η ύπαρξη φυσικής ανθεκτικότητας του μύκητα *F. oxysporum f.sp. lycopersici* στο αντιβιοτικό ασκοιτίνη συνδέεται με την ικανότητα του μύκητα να μεταβολίζει την ένωση αυτή σε λιγότερο τοξικά διυδροξυ-παράγωγα (Nakanishi και Oku, 1969). Επίσης, σε πρόσφατες μελέτες, βρέθηκαν ορισμένα ανθεκτικά στελέχη του μύκητα *V. inaequalis*, να παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα υδρόλυσης (πιθανώς μέσω εμπλοκής κάποιας εστεράσης) της ένωσης kresoxim-methyl (Jabs et al, 2001).

### 3.2.6. Μειωμένη μετατροπή του μη τοξικού μορίου

Σε αντίθεση με το μηχανισμό της αποτοξικοποίησης, σε μερικές περιπτώσεις οι μύκητες μπορούν να μετατρέπουν μια μη τοξική πρόδρομη ένωση (pro-fungicide) σε τοξική (Georgopoulos, 1976). Η διεργασία αυτή λέγεται *θανατηφόρος σύνθεση* (lethal

synthesis) (Dekker, 1977). Πράγματι, ορισμένα μυκητοκτόνα είναι αδρανή στο κύτταρο και προκειμένου να ασκήσουν την τοξική δράση τους θα πρέπει πρώτα να προηγηθεί η μετατροπή τους στην επιθυμητή τοξική μορφή από συγκεκριμένα ενζυμικά συστήματα του ίδιου του μύκητα. Στις περιπτώσεις αυτές ανθεκτικότητα μπορεί να προκύψει σαν αποτέλεσμα αλλαγών στα ενζυμικά αυτά συστήματα που οδηγούν σε μειωμένη μετατροπή της αρχικής μη τοξικής ουσίας σε τοξική.

Τέτοια είναι η περίπτωση με τα οργανοφωσφορικά μυκητοκτόνα τα οποία για να ασκήσουν την δράση τους απαιτείται να προηγηθεί η βιομετατροπή τους στην αντίστοιχη τοξική τους μορφή (Braun και Shreiber, 1995). Η μετατροπή αυτή υποστηρίζεται ότι καταλύεται από την δράση των οξειδάσεων μεικτής λειτουργίας του κυτοχρώματος P-450 (MFOs), οι οποίες διασπούν τα οργανοφωσφορικά μυκητοκτόνα στους δεσμούς P-S και S-C (Kodama et al, 1982). Η ανθεκτικότητα του μύκητα *P. oryzae* στα οργανοφωσφορικά μυκητοκτόνα pyrazophos, edifenphos, iprobenfos υποστηρίζεται ότι οφείλεται σε αδυναμία των ανθεκτικών στελεχών να συνθέτουν τις αντίστοιχες τοξικές μορφές εντός του κυτάρου (Uesugi και Katagiri, 1983; Kurogochi et al, 1985; De Waard και Nistelrooy, 1980). Έχει επίσης προταθεί ότι για να δράσει το μυκητοκτόνο triadimefon απαιτείται να προηγηθεί η ενζυμική διάσπαση του στο διαστερομερές του triadimenol. Όσο αναφορά το τελευταίο βρέθηκαν ανθεκτικά στελέχη τα οποία αδυνατούσαν να πραγματοποιήσουν τη μετατροπή αυτή (Fuchs και De Vries, 1984). Τα χημικά ανάλογα της πουρίνης και της πυριμιδίνης αποτελούν επίσης κλασσικά παραδείγματα ενώσεων που γίνονται τοξικά μόνο αφού μετατραπούν σε νουκλεοτίδια. Για παράδειγμα με την ένωση 6-azauracil, βρέθηκε ότι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας του μύκητα *Cladosporium cucumerinum* οφειλόταν σε μειωμένη μετατροπή της ένωσης αυτής στην πιο τοξική της μορφή 6-azauridine-5'-phosphate (Dekker, 1968).

### 3.2.7. Μειωμένη είσοδος-αυξημένη απέκκριση

Τα κύτταρα των μυκήτων μπορούν να γίνουν ανθεκτικά στα μυκητοκτόνα και με αλλαγές που κρατούν το τοξικό μόριο μακριά από την ευαίσθητη θέση δράσης. Αυτές οι αλλαγές παρεμποδίζουν την συσσώρευση του μυκητοκτόνου σε τοξικά επίπεδα



συγκεντρώσεων εντός του κυττάρου μέσω παρεμπόδισης της εισόδου των μυκητοκτόνων, με το να οδηγούν σε αυξημένη απέκκριση του μυκητοκτόνου αμέσως μετά την είσοδο του (Dekker, 1995).

#### *Μειωμένη περατότητα μέσω μεμβρανών*

Είναι απολύτως σαφές ότι το τοξικό μόριο ενός παρασιτοκτόνου, εκτός από τη τοξική του δράση με την οποία πρέπει να είναι προικτισμένο, εναντίον του παθογόνου, πρέπει να μπορεί να διέρχεται από τη κυτταρική μεμβράνη του παθογόνου και αφού φτάσει σε κατάλληλη συγκέντρωση, να εκδηλώνει εν συνεχεία, εντός αυτού, τη τοξική του δράση. Η μεταφορά των τοξικών μορίων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να γίνει με τρεις κύριους μηχανισμούς: α) μέσω παθητικής διάχυσης (diffusion)-λιπόφιλα μόρια διαχέονται λόγω διαφοράς συγκέντρωσης, β) διευκολυμένη διάχυση (facilitated diffusion)- μεταφορά με ειδικούς ενζυμικούς φορείς (περμεάσες) και γ) με ενεργητική μεταφορά (energy dependent transport)- είσοδος μέσω φορέα με ταυτόχρονη κατανάλωση ενέργειας (Μαρσέλος, 2006). Είναι λοιπόν πιθανόν, μια κατάλληλη μεταλλαγή στο γονίδιο που ελέγχει κάποιο συστατικό από αυτά τα συστήματα μεταφοράς που προαναφέρθηκαν, να μειώσει τη περατότητα της μεμβράνης στο τοξικό μόριο, με αποτέλεσμα να μη συσσωρεύεται σε τοξικές συγκεντρώσεις εντός του κυττάρου οδηγώντας έτσι σε ανθεκτικότητα (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Αλλαγές στην ανατομία των κυτταρικών μεμβρανών μπορεί να επηρεάσουν τη μετακίνηση και συσσώρευση των τοξικών μορίων εντός του κυττάρου. Για παράδειγμα αλλαγές στην αναλογία των υδρόφοβων προς υδρόφιλων συστατικών των μεμβρανών μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών βακτηρίων μπορούν να εξηγήσουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας που έχει παρουσιαστεί σε ορισμένα αντιβιοτικά (Bengoechea et al , 1998; Seydel et al, 1985). Η διέλευση ορισμένων υδρόφιλων τοξικών μορίων όπως τα αμινογλυκοσίδια και τα παράγωγα της β-λακτάμης γίνεται αποκλειστικά μέσω των πορινών των κυτταρικών μεμβρανών των βακτηρίων. Διάφορα είδη βακτηρίων έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα λόγω απουσίας πορινών στις κυτταρικές τους μεμβράνες, αποτρέποντας έτσι τα αντιβιοτικά αυτά να εισέρχονται εντός των κυττάρων των βακτηρίων ( Kumar και Schweizer, 2005).

Από την άλλη, έχει διαπιστωθεί ότι η ανθεκτικότητα του μύκητα *Alternaria kikuchiana* στη πολυοξίνη-B, ήταν το αποτέλεσμα μειωμένης μεταφοράς του

αντιβιοτικού στο βιοχημικό στόχο. Αυτό συνέβαινε λόγω μειωμένης δραστηριότητας μιας περμεάσης διπεπτιδίων, η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά των πολυοξινών στο εσωτερικό του κυττάρου του μύκητα (Misato και συνεργάτες, 1977). Ο ίδιος μηχανισμός εξηγεί και για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του μύκητα *Candida albicans* στις νικομυκκίνες (Yadan και συνεργάτες, 1984) ενώ άλλες περμεάσες μπορεί να οδηγούν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε διάφορες άλλες τοξικές ουσίες (Georgopoulos, 1977).

Μειωμένη είσοδος του τοξικού μορίου στο εσωτερικό του κυττάρου μπορεί να εξηγείται και με αλλαγές στο σύστημα που εμπλέκεται στη ενεργό μεταφορά του τοξικού μορίου. Ανθεκτικά στο βενζιμιδαζολικό μυκητοκτόνο carbendazim στελέχη του *Sporobolomyces roseus* βρέθηκαν να συσσωρεύουν 5 φορές λιγότερη ποσότητα μυκητοκτόνου σε σχέση με τα ευαίσθητα ενώ βρέθηκε η συσσώρευση του μυκητοκτόνου στα κύτταρα των στελεχών να εξαρτάται από την κατανάλωση ενέργειας. Όπως υποστηρίζουν οι παραπάνω ερευνητές, η διαφορετική απορρόφηση του μυκητοκτόνου από τα κύτταρα των ευαίσθητων και των ανθεκτικών στελεχών, μπορεί να οφείλεται σε κάποια αλλαγή ενός μηχανισμού ενεργειακά εξαρτώμενου που μεταφέρει φυσικά υποστρώματα εντός του κυττάρου τα οποία ομοιάζουν με τη δομή των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων (Nachmias και Barash, 1976).

Η δέσμευση του τοξικού μορίου στο κυτταρικό τοίχωμα είναι ένας απλός μηχανισμός που μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της εισόδου του τοξικού μορίου στα κύτταρα του παθογόνου όπως έχει διαπιστωθεί στη περίπτωση των SBIs (Μαρκόγλου, 1997; Wellmann και Schauz, 1993).

#### *Αυξημένη απέκκριση*

Σε αρκετές περιπτώσεις, έχει αποδειχτεί ότι η ανθεκτικότητα μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικό βαθμό απέκκρισης των τοξικών μορίων από τα κύτταρα των ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών του παθογόνου. Στη περίπτωση αυτή, η υψηλή ικανότητα απέκκρισης του τοξικού παράγοντα από τα ανθεκτικά στελέχη, έχει ως αποτέλεσμα να διατηρούνται υποτοξικά επίπεδα συγκεντρώσεων των τοξικών μορίων αμέσως μετά την απορρόφηση τους από τα κύτταρα, μη επιτρέποντας έτσι τα μόρια του μυκητοκτόνου να προσεγγίσουν το βιοχημικό τους στόχο και να επιτευχθούν συγκεντρώσεις τέτοιες που να είναι τοξικές για το κύτταρο (de Waard και Fuchs, 1982).

Μέχρι τώρα, έχουν αναγνωρισθεί δύο κύριες οικογένειες διαμεμβρανικών μεταφορέων που συμβάλλουν στην αυξημένη απέκκριση των μυκητοκτόνων και των αντιβιοτικών. Πρόκειται για τους ABC μεταφορείς (ABC transporters) και τους MFS μεταφορείς (MFS transporters) (Sorbo και συνεργάτες, 2000). Οι ABC μεταφορείς (στη βιβλιογραφία περιγράφονται και σαν P-glycoproteins) για τη λειτουργία τους απαιτούν την παροχή ενέργειας με υδρόλυση ATP επιτρέποντας έτσι να επιτευχθεί η μεταφορά των τοξικών μορίων από περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης (ενδοκυττάριος χώρος) προς περιοχές υψηλότερης συγκέντρωσης (εξωκυττάριος χώρος). Οι ABC μεταφορείς αποτελούν την πολυπληθέστερη και σημαντικότερη ομάδα μεταφορέων που προστατεύουν του μύκητες από τα διάφορα τοξικά μόρια (Stergiopoulos et al, 2002). Η εμπλοκή τέτοιου είδους μεταφορέων έχει αποδειχθεί σε περιπτώσεις ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα με τους μύκητες *S. cerevisiae*, *A.*, *B. cinerea*, *M. graminicola*, *Candida sp.* και πιθανόν με τον *P. digitatum* (de Waard, 2006) και στα αντιβιοτικά με το βακτήριο *Lactococcus lactis* (Kumar και Schweizer, 2005). Αντίθετα με τους ABC μεταφορείς, οι λειτουργία των MFS δεν γίνεται μέσω ATP αλλά τα τοξικά μόρια μεταφέρονται μέσω της διαφοράς ηλεκτροχημικού δυναμικού που υπάρχει στις μεμβράνες (Sorbo et al, 2000). Η εμπλοκή αυτών των μεταφορέων έχει αποδειχθεί σε περιπτώσεις ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα με τους μύκητες *B. cinerea*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* (Sorbo et al, 2000) και στα αντιβιοτικά με διάφορα είδη αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων (Kumar και Schweizer, 2005).

Λόγω της ιδιότητας των δύο αυτών ειδών μεταφορέων να απεκκρίνουν από τα ανθεκτικά κύτταρα του παθογόνου διάφορες ομάδες τοξικών χημικών ενώσεων, το φαινόμενο αυτό καλείται πολλαπλή (MultiDrug Resistance, MDR) ή αλλιώς πλειοτροπική (PDR) ανθεκτικότητα (Sorbo et al, 2000). Αυτό μπορεί να γίνει με δύο κύριους τρόπους: α) με υπερέκφραση των γονιδίων που ελέγχουν τους μεταφορείς αυτούς ή β) με αυξημένη δραστηριότητα των μεταφορέων αυτών (Hollomon και συνεργάτες, 1997). Από τους διάφορους μηχανισμούς ανθεκτικότητας των παθογόνων στα τοξικά μόρια, ο μηχανισμός της πολλαπλής ανθεκτικότητας είναι αυτός που μέχρι σήμερα έχει απασχολήσει περισσότερο την επιστημονική κοινότητα τόσο στο χώρο της γεωργικής όσο και της ιατρικής φαρμακολογίας. Ένα από τα κυριότερα ζητήματα που φαίνεται να έχει απασχολήσει του περισσότερους ερευνητές είναι το πώς αυτές οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες-μεταφορείς μπορούν να επιλέγουν και να απεκκρίνουν στο περιβάλλον του παθογόνου μόνο τα τοξικά μόρια όχι όμως τα

ενδοκυτταρικά μόρια. Μία από τις πιο επικρατέστερες θεωρίες είναι αυτή που βασίζεται σε διαφορές που υπάρχουν στις φυσικοχημικές ιδιότητες μεταξύ τοξικών και ενδογενών μορίων του κυττάρου (Lewis, 1999).

### 3.3. Η σημασία μελέτης του μηχανισμού ανάπτυξης ανθεκτικότητας των μυκητοκτόνων

Όσο περισσότερο εμβαθύνουμε τη γνώση μας σε θέματα που αφορούν τη γενετική, βιοχημική και φυσιολογική μελέτη της ανθεκτικότητας, τόσο περισσότερο κατανοούμε τον μηχανισμό με τον οποίο αυτή ελέγχεται άρα και το τρόπο με τον οποίο μπορούμε να διαχειριστούμε ορθά υπάρχοντα ή μελλοντικά προβλήματα ανθεκτικότητας στη γεωργική πράξη. Η κύρια προσέγγιση που υπάρχει μέχρι σήμερα για τη διαχείριση του προβλήματος της ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα είναι η πρόληψη. Αυτό γίνεται μέσω κατάλληλων στρατηγικών εφαρμογής των μυκητοκτόνων, καλλιεργητικών τεχνικών και ενημέρωσης σχετικά με θέματα που αφορούν την ανθεκτικότητα των μυκητοκτόνων, εκτίμησης του κινδύνου εμφάνισης νέων ανθεκτικών στελεχών στο εργαστήριο καθώς και μέσω παρακολούθησης (monitoring) του φυσικού πληθυσμού του παθογόνου στον αγρό (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου δύναται να αντιμετωπιστούν προβλήματα ανθεκτικότητας των παθογόνων στα τοξικά μόρια. Ελπιδοφόρες προσπάθειες από τη σκοπιά αυτή, γίνονται σήμερα για την αναζήτηση ενώσεων φυσικής κυρίως προέλευσης που θα δρουν ανασταλτικά στο μηχανισμό της πολλαπλής ανθεκτικότητας η οποία οδηγεί σε αυξημένη απέκκριση των τοξικών μορίων από τα κύτταρα των παθογόνων. Πρόκειται για ουσίες οι οποίες άρουν την δραστηριότητα των υπεύθυνων πρωτεϊνικών μεταφορέων που ευθύνονται για την αυξημένη απέκκριση των τοξικών μορίων από τα κύτταρα των ανθεκτικών παθογόνων.

Η γνώση που αποκτούμε στο τρόπο με τον οποίο μπορούμε να διαχειριστούμε το πρόβλημα της ανθεκτικότητας μας οδηγεί παράλληλα στο να παρατείνουμε τη διάρκεια ζωής των «καλών» διασυστηματικών μυκητοκτόνων που έχουμε στη διάθεση μας αλλά και να αυξήσουμε την αποτελεσματικότητά τους μέσω ορθότερης εφαρμογής τους στα προγράμματα χημικής φυτοπροστασίας (Georgopoulos, 1977).

Πέρα της πρακτικής σημασίας της, η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στα τοξικά μόρια έχει εγείρει ερωτήματα σε σημαντικές πτυχές της γενετικής αλλά και μοριακής βιολογίας (Georgopoulos, 1977). Η διερεύνηση για παράδειγμα του μηχανισμού της αλλαγής στη θέση δράσης έχει δώσει σημαντικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς εκλεκτικής τοξικότητας των παρασιτοκτόνων. Δεν είναι τυχαίο άλλωστε που η μελέτη του μηχανισμού της ανθεκτικότητας σε μία τοξική ένωση συμβάδισε πολλές φορές και με το μηχανισμό με τον οποίο αυτή δρα σε υποκυτταρικό επίπεδο, όπως για παράδειγμα με τους SDHIs και τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. Για παράδειγμα χρήσιμες πληροφορίες μπορούν να αποκτηθούν για τον άγνωστο μηχανισμό της βιοχημικής δράσης του μυκητοκτόνου μέσω πειραμάτων διασταυρωτής ανθεκτικότητας με ενώσεις που έχουν παρόμοιες χημικές ιδιότητες. Αλλαγή των αμινοξέων πάνω σε κάποιο ένζυμο ή πρωτεΐνη με εκείνα που προέρχονται από φυσικές ή τεχνητές μεταλλάξεις ανθεκτικότητας μας έχει δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη σπουδαιότητα τους στις θέσεις προσκόλλησης των τοξικών μορίων πάνω σε αυτά. Αυτό κατ'επέκταση μας ανοίγει νέους ορίζοντες για την σχεδίαση νέων τοξικών μορίων που θα δρουν αποτελεσματικά σε παρόμοιες λειτουργικές βιοχημικές θέσεις αποφεύγοντας παράλληλα εκείνες που μπορεί να οδηγήσουν σε προβλήματα ανθεκτικότητας (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2005).

#### 4. Η ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα

Η ομάδα των βενζιμιδαζολικών (MBC) μυκητοκτόνων περιλαμβάνει ενώσεις με εξειδικευμένο μηχανισμό δράσης σε υποκυτταρικό επίπεδο, γιαυτό και ο κίνδυνος εμφάνισης ανθεκτικότητας τους στον αγρό είναι πολύ υψηλός (FRAC, 2007). Μετά από μόλις 1-2 χρόνια εφαρμογής τους στην πράξη εμφανίστηκαν τα πρώτα προβλήματα ανθεκτικότητας (Peterson, 1969). Τα περιστατικά που ακολούθησαν τα επόμενα χρόνια έγιναν πιο συχνά και ακόμη και σήμερα εξακολουθούν να αναφέρονται περιπτώσεις εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στα μυκητοκτόνα αυτά. Σήμερα τουλάχιστον 100 είδη μυκήτων έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στην ομάδα των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων (FRAC, 2011). Στη περίπτωση όμως του μύκητα *F. graminearum* οι πρώτες αναφορές για εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών διαπιστώθηκαν το 1992 στη Κίνα (Zhou et al 1994), σχεδόν τρεις δεκαετίες μετά από την εισαγωγή του στα σιτηρά. Τα επόμενα χρόνια που ακολούθησαν, οι περιπτώσεις εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών αυξήθηκαν κατά πολύ (Wang et al., 2002). Σήμερα έχει πλέον εξακριβωθεί, από διάφορες εργαστηριακές μελέτες, ότι οι περιπτώσεις ανθεκτικότητας για την ομάδα αυτή οφείλονται κυρίως σε αλλαγές αμινοξέων της β-τουμπουλίνης (Qiu et al., 2010). Μία μεταλλαγή ενός γόνου που θα προκύψει θα οδηγήσει σε αλλαγή της τρισδιάστατης δομής του μορίου με αποτέλεσμα το μυκητοκτόνο να αδυνατεί να προσκολληθεί στη θέση δράσης και έτσι να μειώνεται η αποτελεσματικότητά του.

Γενετικές μελέτες με στελέχη του μύκητα *F. graminearum* ανθεκτικά στο carbendazim έδειξαν την ύπαρξη ολιγονοκικού χαρακτήρα της ανθεκτικότητας με μεταλλαγές σε ένα κυρίαρχο γονίδιο. Η χρήση της γενετικής μέσω αναδιασταυρώσεων και ειδικών δεικτών (markers) στο μύκητα *F. graminearum* έχει εξηγήσει τη κληρονομούμενη μεταφορά της ανθεκτικότητας στους απογόνους κατά τρόπο μενδελιακό (Yuan and Zhou, 2005). Η ανάπτυξη μοριακών διαγνωστικών έχει δώσει σημαντικό έναυσμα από την δεκαετία του '90 στην ανίχνευση διαφόρων τέτοιων μεταλλαγών στα ανθεκτικά στελέχη των διαφόρων μυκήτων.

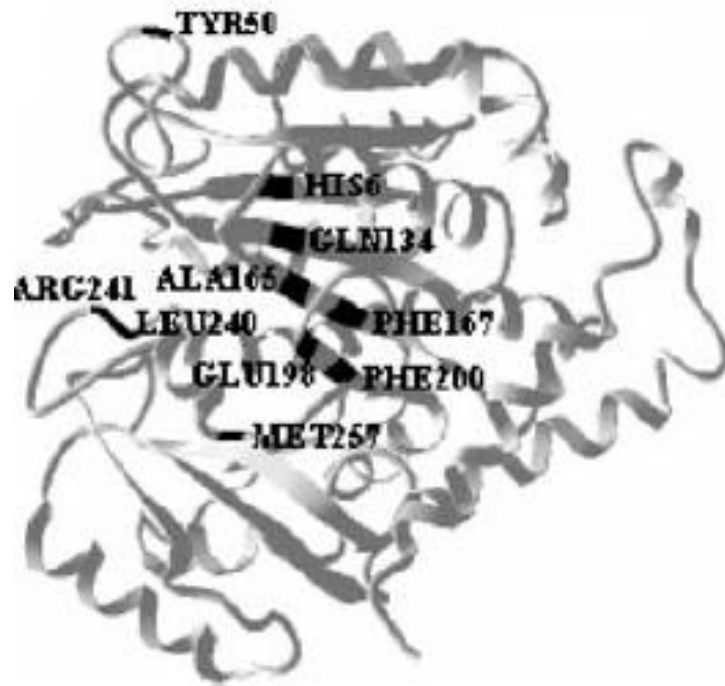
Οι μεταλλαγές που έχουν συνδεθεί με ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά σε διάφορα είδη μυκήτων είναι κατά μειούμενη σειρά σημαντικότητας στις θέσεις 198, 200, 167, 240, 6, 73, 50, 134, 165, 241 και 257 των αμινοξέων (Ma and Michailides, 2005; Thomas et al.1985; Yan and Dickman, 1996). Ωστόσο οι

μεταλλαγές αυτές (Πίνακας 1.6) δεν έχουν όλες παρουσιαστεί σε στελέχη αγρού αλλά και μετά από πρόκληση μεταλλάξεων *in vitro*. Οι μεταλλαγές σε κάθε μία περίπτωση από τις παραπάνω, δίνουν και διαφορετικό επίπεδο ανθεκτικότητας στους διάφορους μύκητες. Από ορισμένους ερευνητές υποστηρίζεται ότι συνήθως τα ανθεκτικά στελέχη του *F. graminearum* παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας ( $R_f = 16.21$ ) στα βενζιμιδαζολικά, σε σχέση με άλλους μύκητες ( $R_f > 1000$ ) όπως *B. cinerea*, *S. homoeocarpa*, *V. nashicola* (Chen et al., 2007; Faretra και Pollastro, 1991; Ishii και Davidse, 1986).

Η πιο συχνή μεταλλαγή που έχει βρεθεί σε στελέχη μυκήτων ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα είναι στην θέση 198 (Koenraad et al., 1992) (Πίνακας 1.3). Συνήθως η μεταλλαγή E198A, στην οποία υπάρχει αντικατάσταση της γλυκίνης με αλανίνη, δίνει υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στους διάφορους μύκητες. Όμως το επίπεδο της ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά που προκύπτει δεν εξαρτάται μόνο από τον οργανισμό αλλά και από την εκάστοτε μεταλλαγή που προκύπτει (Michailides et al.; 2005). Κατά κανόνα η μετατροπή του γλουταμικού οξέος σε αλανίνη, γλυκίνη ή γλουταμίνη στη θέση 198, δίνει αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα με τα φαινυλοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα (Yurden and Katan, 1993; Malandrakis et al., 2010; Koendraad et al., 1992; Albertini et al., 1999; Fujimura et al., 1994; Wheeler et al., 1994). Από έρευνες που έγιναν στον μύκητα *F. graminearum*, βρέθηκε ότι στελέχη ανθεκτικά με μεταλλαγή στη θέση 198, που είχε μετατραπεί το γλουταμικό οξύ σε λευκίνη, παρουσίαζαν πολύ υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στο carbendazim (Chen et al.; 2009).

Μία ακόμη συνήθης μεταλλαγή για ανθεκτικότητα είναι η 200, η οποία οφείλεται στην αντικατάσταση του αμινοξέος της φαινυλανίνης από τυροσίνη. Η μεταλλαγή στην θέση 200 έχει εμφανιστεί τόσο σε στελέχη αγρού όσο και σε στελέχη εργαστηρίου του μύκητα *F. graminearum* (Chen et al., 2009, Liu et al., 2010; Qiu et al., 2010). Συνήθως δίνει μετρίου επιπέδου ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα (Chen et al., 2009; Qiu et al., 2010).

**Εικόνα 1.7.** Οι θέσεις στη δομή της β-τουμπουλίνης που εμπλέκονται με ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα (προσαρμογή από Li and Yang, 2007).



Μία τελευταία σημαντική μεταλλαγή για ανθεκτικότητα, είναι η περίπτωση της αντικατάστασης της φαινυλανίνης από τυροσίνη στην θέση 167. Η μεταλλαγή αυτή βρέθηκε αρχικά στον μύκητα *Neurospora crassa*, ενώ σήμερα έχει βρεθεί και σε διάφορους άλλους μύκητες (βλέπε Πίνακας 1.3.). Η μεταλλαγή αυτή στο μύκητα *F. graminearum* έχει εμφανίσει μετρίου έως υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα τόσο σε στελέχη αγρού, όσο και σε στελέχη εργαστηρίου (Liu et al, 2010; Chen et al., 2009; Qiu et al, 2010). Λιγότερο συχνές και μικρότερης σημασίας θεωρούνται οι μεταλλαγές στις θέσεις 6, 73, 50, 165, 241 και 257.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 1.3.**

Διαπιστωμένες ανθεκτικότητες σε διάφορους μύκητες στα βενζιμιδαζολικά  
μυκητοκτόνα.

Θέση αλλαγής	Αντικατάσταση	Οργανισμός	Πηγή
198	Glu σε Ala	<i>B. cinerea</i> <i>Helminthosporium solani</i> <i>M. fruticola</i> <i>P. aurantiogriseum</i> <i>P. expansum</i> <i>T. yallundae</i> <i>T. acuformis</i> <i>V. inaequalis</i> <i>V. pyrina</i>	*    *
198	Glu σε Gln	<i>T. acuformis</i> <i>T. yallundae</i> <i>H. solani</i> <i>F. graminearum</i>	*   Qiu et al, 2010; Liu et al, 2010
198	Glu σε Gly	<i>T. acuformis</i> <i>T. yallundae</i> <i>V. inaequalis</i> <i>Rhynchosporium secalis</i> <i>N. crassa</i>	*   Buters και Hollomon;1999 Fujimura et al;1991
198	Glu σε Lys	<i>M. fruticola</i> <i>P. aurantiogriseum</i> <i>P. digitatum</i> <i>S. homoeocarpa</i> <i>V. inaequalis</i> <i>P. expansum</i> <i>T. yallundae</i> <i>T. aquiformis</i> <i>F. graminearum</i> <i>B. cinerea</i>	*        Qiu et al, 2010 Malandrakis et al; 2010
198	Glu σε Val	<i>P. expansum</i>	
198	Glu σε Leu	<i>F. graminearum</i>	Chen et al, 2009
200	Phe σε Tyr	<i>P. aurantiogriseum</i> <i>P. italicum</i> <i>V. inaequalis</i> <i>V. pirina</i> <i>T. yallundae</i> <i>P. digitatum</i> <i>R. secalis</i> <i>F. graminearum</i>	*        Schmidt et al;2006 Butters και Hollomon;1999 Chen et al, 2009; Liu

167	<i>Phe</i> σε <i>Tyr</i>	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> <i>P. expansum</i> <i>N. crassa</i> <i>F. graminearum</i>	et al, 2010; Qiu et al, 2010 *
6 50	<i>His</i> σε <i>Tyr</i> <i>Tyr</i> σε <i>Cys</i>	<i>M. fruticola</i> <i>Cladobotryum dendroides</i> <i>F. graminearum</i>	Orback et al.;1986 Chen et al, 2009; Liu et al, 2010; Zhang et al, 2009; Qiu et al, 2010 *
240	<i>Leu</i> σε <i>Phe</i>	<i>M. laxa</i> <i>Tapesia yallundae</i>	Qiu et al, 2010 *
241 165	<i>Arg</i> σε <i>His</i> <i>Val</i> σε <i>Ala</i>	<i>F. graminearum</i> <i>A. nidulans</i>	Qiu et al, 2010 Katherine και Oakley;1990
250 237 73	<i>Ala</i> σε <i>Val</i> <i>Leu</i> σε <i>Phe</i> <i>Thr</i> σε <i>Ala</i> <i>Gln</i> σε <i>Arg</i>	<i>F. graminearum</i> <i>N. crassa</i> <i>N. crassa</i> <i>F. graminearum</i>	Qiu et al, 2010 Fujimura et al.;1994 Fujimura et al.;1994 Chen et al, 2009

Πηγή: \*Michailides et al. 2005.

#### Η επίδραση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στις παραμέτρους προσαρμοστικότητας των στελεχών

Η ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, χαρακτηρίζεται συνήθως από την επικράτηση μεταλλαγμένων στελεχών με ελάχιστα ή καθόλου μειωμένη φυτοπαθογόνο προσαρμοστικότητα έναντι των αγρίων στελεχών (Chen et al, 2007a; Chen and Zhou, 2009; Zhang et al.,2009).

Στα ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά στελέχη μπορεί να εμφανίζονται φαινόμενα πλειοτροπισμού (επιδράσεις ενός γονιδίου σε περισσότερα του ενός φαινοτυπικά χαρακτηριστικά). Για παράδειγμα, σε ανθεκτικά στελέχη των μυκήτων *S. cerevisiae* και *A. nidulans* οι μεταλλαγές στην β-τουμπουλίνη τους οδήγησαν σε ευαισθησία τους σε υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες (Davidse, 1986; Thomas et al ,1985). Άγρια στελέχη που έχουν στην θέση 200 τη φαινυλανίνη χαρακτηρίζονται με ανθεκτική την τουμπουλίνη τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η ανθεκτικότητα όμως με μεταλλαγή Phe200Tyr συνήθως προσδίδει στα στελέχη ανθεκτικότητα της τουμπουλίνης τους σε υψηλές θερμοκρασίες (Paluh et al .,2004). Στελέχη του

μύκητα *M. fruticola* με υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας, μετά την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών (>31°C), έχασαν την ανθεκτικότητα τους στα βενζιμιδαζολικά, ενώ άλλα που παρουσίαζαν χαμηλό επίπεδο ανθεκτικότητας την έχασαν σε χαμηλές θερμοκρασίες (<15° C). Επίσης, έχει καταγραφεί και η περίπτωση ενός ανθεκτικού στελέχους του μύκητα *F.moniliforme*, με μεταλλαγή στην θέση 50 της β-τουμπουλίνης, που παρουσίαζε ευαισθησία σε χαμηλές θερμοκρασίες (Yan and Dickman,1996). Μέχρι τώρα δεν έχουν ανιχνευτεί μεταλλαγές ανθεκτικότητας σε στελέχη του μύκητα *F. graminearum* που να επηρεάζουν την ευαισθησία του μύκητα στις ακραίες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας.

Αρκετές μελέτες με ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά στελέχη μυκήτων που φέρνουν τη μεταλλαγή E198A εμφανίζουν αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα με τα φαινυλοκαρβαμιδικά. Αν και η τελευταία ομάδα περιέχει μόρια με ζιζανιοκτόνο δράση, το παραπάνω φαινόμενο οδήγησε στην δημιουργία ενός μείγματος φαρμάκου (benomyl- diethofencarb) από την εταιρία Sumitomo το 1987 με σκοπό την λύση του προβλήματος την ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά. Αργότερα όμως, εμφανίστηκαν στελέχη αγρού και εργαστηρίου που δεν παρουσίαζαν ευαισθησία και στην παρουσία του μυκητοκτόνου αυτού (Ζιώγας, 2000). Μία άλλη περίπτωση, είναι η εμφάνιση μεταλλαγμένων στελεχών του μύκητα *Botrytis cinerea* που έφεραν την μεταλλαγή E198A τα οποία παρουσίαζαν αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα με το zoxamide (βενζαμίδια) ενώ άλλα με τη μεταλλαγή E198K παρουσίαζαν θετική. Σχετικά με τον μύκητα *F. graminearum*, πρόσφατες μελέτες στη Κίνα, δείχνουν προβλήματα εμφάνισης θετικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των βενζιμιδαζολικών και μίας νέας ομάδας μυκητοκτόνων, των κυανοκρυσλικών (Chen and Zhou, 2009).

Η ανθεκτικότητα σε μία και μόνο ένωση της ομάδας των βενζιμιδαζολικών κατά κανόνα οδηγεί και σε απώλεια της αποτελεσματικότητας και των άλλων ενώσεων εντός της ομάδας αυτής. Έχουν αναφερθεί όμως και περιπτώσεις εμφάνισης αρνητικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας στον μύκητα *Aspergillus nidulans*, μεταξύ του thiabendazole και των υπολοίπων βενζιμιδαζολικών (Katherine and Oakley,1990) ή η περίπτωση στελεχών του γένους *Penicillium spp* που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα μόνο στη μία ένωση από τις thiophanate-methyl και thiabendazole (Scholberg et al.,2005).

## 5. ΣΚΟΠΟΣ

Η ανθεκτικότητα των παθογόνων στα διάφορα τοξικά μόρια, αποτελεί ζήτημα βαρύνουσας σημασίας, εξίσου σημαντικό σε γεωργικό και ιατρικό τομέα. Η ανθεκτικότητα των φυτοπαθογόνων μυκήτων στα μυκητοκτόνα είναι ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που δυσχεραίνουν την αποτελεσματική άσκηση της χημικής φυτοπροστασίας λόγω μειωμένης ευαισθησίας των φυτοπαθογόνων στα μυκητοκτόνα εξειδικευμένης δράσης. Στη περίπτωση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων, το πρόβλημα της ανθεκτικότητας δεν εντοπίζεται μόνο στην απώλεια της παραγωγής αλλά και στον αυξημένο κίνδυνο κατανάλωσης των αγροτικών προϊόντων από την εσωτερική ή διεθνή αγορά μολυσμένων με μυκοτοξίνες.

Ο μύκητας *F. graminearum* με τον οποίο ασχοληθήκαμε στη παρούσα μελέτη, αποτελεί ένα από τα σπουδαιότερα μυκοτοξικογόνα είδη φυτοπαθογόνων μυκήτων των σιτηρών που οδηγεί ετησίως σε τεράστιες οικονομικές ζημιές ύψους εκατοντάδων εκατομμυρίων δολαρίων σε όλο το κόσμο. Η αποτελεσματική αντιμετώπιση του και των μυκοτοξινών του σε χώρες τις Ευρώπης και ιδίως της Ασίας στηρίζεται κατά κύριο λόγο στη χρήση των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων. Η ανάγκη επομένως να διατηρήσουμε την αποτελεσματικότητα των ενώσεων αυτών είναι επιτακτική. Το πρόβλημα όμως της ανθεκτικότητας σε αυτή την ομάδα μυκητοκτόνων είναι ιδιαίτερα αισθητό. Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί περισσότερες από 100 περιπτώσεις ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών σε διάφορα είδη φυτοπαθογόνων μυκήτων στα μυκητοκτόνα αυτά. Στη πράξη, προβλήματα ανθεκτικότητας με τον μύκητα *F. graminearum* άρχισαν να εμφανίζονται προσφάτως, μετά από 30 χρόνια εφαρμογής, ιδίως σε περιοχές της ανατολικής Ασίας. Σε ορισμένες δε περιπτώσεις, έχουν εντοπιστεί ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά στελέχη στα οποία ο μηχανισμός ανθεκτικότητας δεν έχει διαλευκανθεί. Η γρήγορη επικράτηση ανθεκτικών στελεχών του μύκητα αυτού στις σιτοκαλλιέργειες προκαλεί ιδιαίτερα ανησυχία λόγω του περιορισμένου χημικού οπλοστασίου των μυκητοκτόνων που είναι διαθέσιμα για την αντιμετώπιση του (Zhou et al, 1994; Yuan και Zhou, 2005; Chen et al, 2007; Chen et al, 2008; Chen et al, 2009; Luo et al, 2009; Liu et al, 2010).

Με σκοπό την απόκτηση γνώσης σχετικά με το μηχανισμό ανθεκτικότητας του μύκητα *F. graminearum* στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν ανθεκτικά στα βενζιμιδαζολικά στελέχη εργαστηρίου τα οποία είχαν διερευνηθεί σε προηγούμενες μελέτες σχετικά με τη φυτοπαθογόνο προσαρμοστικότητα τους

προσεγγίζοντας αυτή τη φορά **στη διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας μέσω α) μοριακής μελέτης του βιοχημικού στόχου δράσης των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων** αλλά και **β) βιοχημικής μελέτης άλλων μηχανισμών ανθεκτικότητας**. Η αναγκαιότητα μιας τέτοιου είδους ερευνητικής μελέτης έχει τη πιο πειστική εξήγηση στο γεγονός ότι οι ενώσεις αυτές δεν έχουν μόνο αντιμυκοτοξική δράση αλλά έχουν βρεθεί ότι παρουσιάζουν και αντιμυκοτοξικογόνες ιδιότητες, πράγμα που σημαίνει ότι για να μπορέσουμε να διατηρήσουμε την αποτελεσματικότητα των ενώσεων αυτών θα πρέπει να διαχειριστούμε φαινόμενα ανθεκτικότητας που συνδέονται με αυτές, και παράλληλα να κατανοήσουμε περισσότερο τη φυσιολογία και τη βιοχημεία του φαινομένου που την ελέγχει.



## **ΜΕΡΟΣ ΙΙ**

# **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

---





## ΥΛΙΚΑ

### 12. Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη του μύκητα *F. graminearum*. Ως ευαίσθητο στέλεχος χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος CBS 110261 της Ολλανδικής τράπεζας γενετικού υλικού *Entraalbureau voor Schimmel cultures* (CBS). Μερικοί άλλοι κωδικοί με τους οποίους φυλάσσεται και σε άλλες τράπεζες βιολογικού υλικού είναι ATTC 46779 και MAFF 237812. Το στέλεχος αυτό απομονώθηκε από καλλιέργεια καλαμποκιού από την περιοχή Οχάιο των Η.Π.Α. Τα 6 ανθεκτικά στελέχη που εξετάστηκαν (FG-1, FG-2, FG-3, FG-4, FG-5, FG-6) πάρθηκαν από το ευαίσθητο στέλεχος μετά από μεταλαξίγνεση και επιλογή σε θρεπτικό υλικό που περιείχε 10 µg/mL carbendazim. Τα στελέχη αυτά είχαν χαρακτηριστεί φυτοπαθολογικά σε προηγούμενη δημοσιευμένη μελέτη «Διερεύνηση της ανθεκτικότητας του μύκητα *F. graminearum* στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα (Sevastos A.A., Malandrakis A. και Markoglou A.N, 2013) η οποία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γ.Π.Α (2011-12). Στο παρακάτω πίνακα δίνονται ορισμένα χαρακτηριστικά από τα στελέχη αυτά.

στελέχη	R <sub>F</sub> MBC	R <sub>F</sub> TBZ	Μυκηλιακή ανάπτυξη	Παραγωγή κονιδίων	Βλαστική ικανότητα	Ευαισθησία στο ψύχος
w.t.	1	1	-	-	-	Όχι
FG-1	174,6	1,76	-	—	-	Όχι
FG-2	42,09	7,42	+	—	-	Όχι
FG-3	16,83	6,01	—	—	—	Ναι
FG-4	13,35	9,15	-	—	-	Ναι
FG-5	13,9	54,82	-	—	-	Όχι
FG-6	21,24	13,7	-	—	-	όχι
	RF=EC50 mutant/EC50 wild-type		—: αρνητική επίδραση + : θετική επίδραση			

### 13. Θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας

Για την καλλιέργεια, διατήρηση και ανανέωση του αγρίου και των ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *F. graminearum* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato-Dextrose-Agar), η σύσταση του οποίου δίνεται παρακάτω:

Για την παρασκευή ενός λίτρου:

Πατάτα .....	200 g
Dextrose .....	20 g
Agar .....	20 g
Νερό .....	1 lt

Επίσης για την απόκτηση μυκηλιακής μάζας χρησιμοποιήθηκε το υγρό θρεπτικό υλικό PDB (Potato Dextrose-Broth) στο οποίο έγινε η προσθήκη των ίδιων υλικών όπως και στο PDA εκτός του άγαρ. Η αποστείρωση του υλικού γινόταν σε κλίβανο υγρής θερμότητας στους 120 °C για 20 λεπτά. Το υλικό PDA χρησιμοποιήθηκε για όλα τα πειράματα μυκητοτοξικότητας των ανθεκτικών στελεχών.

#### **14. Καλλιέργεια, διατήρηση και ανανέωση των στελεχών του μύκητα *F. graminearum***

Η διατήρηση του αγρίου και των ανθεκτικών στελεχών του μύκητα γινόταν σε σωλήνες και τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υλικό PDA και ανανεωνόταν κάθε 30-60 ημέρες με την τεχνική της μονόσπορης καλλιέργειας. Για το σκοπό αυτό αιώρημα κονιδίων απλωνόταν σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό PDA και ακολουθούσε η επώαση του. Η πυκνότητα του αιωρήματος ήταν τέτοια που να επιτρέπει την επιτυχή εκτέλεση μονόσπορων απομονώσεων. Τα σπόρια αφήνονταν να βλαστήσουν στον επωαστικό κλίβανο και την επόμενη μέρα ένα κομμάτι υλικού που περιείχε μία αποικία, μεταφέρονταν σε σωλήνες ή τρυβλία με θρεπτικό υλικό PDA .

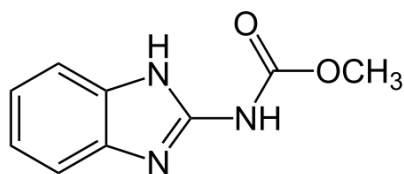
Η επώαση των καλλιεργειών του μύκητα πραγματοποιούνταν σε επωαστικούς θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών με θερμοκρασία 25 °C και απουσία φωτισμού.

#### **15. Χημικές ουσίες**

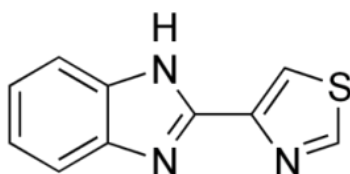
##### ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ

Τα δύο μυκητοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα βιοχημικά πειράματα ήταν τα βενζιμιδαζολικά carbendazim (Bayer, 99%) thiabendazole (TECTO, 99%). Επίσης στα διάφορα πειράματα *in vivo* και κινητικής εισόδου-απέκκρισης χρησιμοποιήθηκε μυκητοκτόνο carbendazim από εμπορικό σκεύασμα (Image 50 % WP). Η χημική τους δομή δίνονται παρακάτω.

carbendazim,

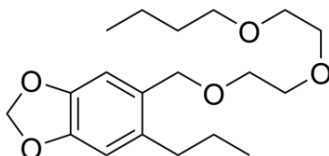


thiabendazole,

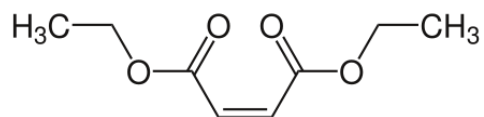


### ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΕΣ

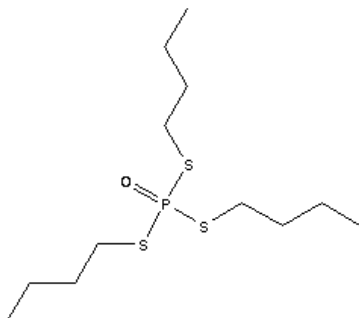
Οι συνεργιστές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το piperonyl butoxide (PBO),



η ένωση diethyl malate (DEM),



και η ένωση s,s,s-tributyl phosphorotrithioate (Tirbufos, DEF)



Και οι τρεις παραπάνω ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας (>99%).

### ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Στα πειράματα των ενζυμικών δοκιμών χρησιμοποιήθηκαν οι εξής χημικές ενώσεις: για τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιήθηκαν η αλβουμίνη από ορρό μόσχου και η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250. Για τη εκτίμηση την ενζυμικής δραστικότητας των ενζύμων της μεταφοράσης της γλουταθειόνης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, ), coumen peroxide (99%, Fluka), glutathione-reduced (99%, Aldrich), glutathione reductase (Aldrich) και NADPH (Aldrich).

### **ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **16. Επίδραση του carbendazim στη μορφολογία των κυττάρων**

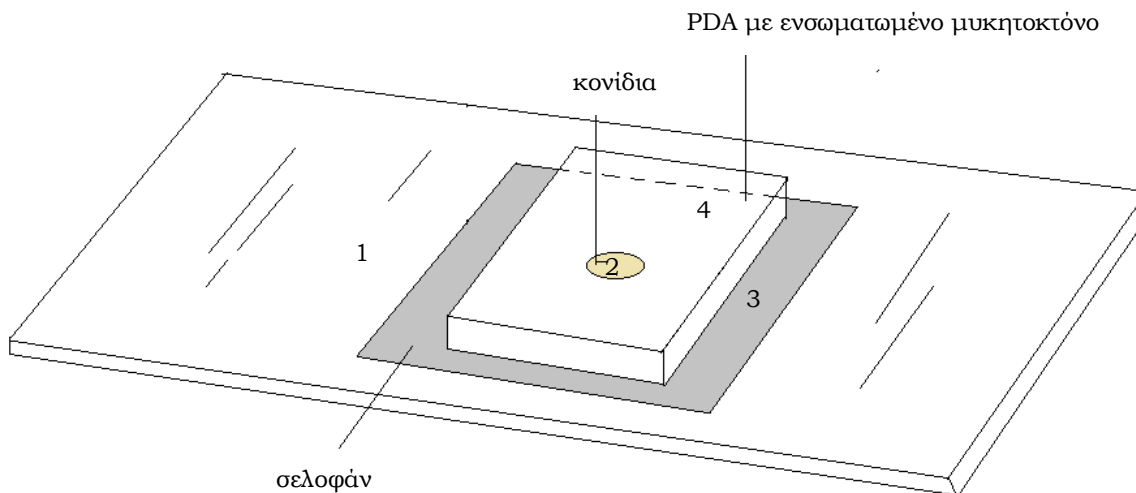
Για τη παρατήρηση μέσω οπτικού μικροσκοπίου της επιδράσεως του carbendazim στη μορφολογία των κονιδίων ακολουθήθηκε η μέθοδος που είναι γνωστή στη βιβλιογραφία ως “cellorphane/sandwich culture technique”. Σύμφωνα με τους Bi και συνεργάτες (2009) η τεχνική αυτή είχε ως εξής:

Αρχικά τοποθετήθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες μικροσκοπίου σταγόνες των 20  $\mu\text{L}$  από κάθε αιώρημα κονιδίων του κάθε στελέχους. Οι καλυπτρίδες καλύφθηκαν με μονή στρώση τεμαχίου σελοφάν και από πάνω τοποθετήθηκαν κομμάτια 2x2 cm PDA στα οποία είχε ενσωματωθεί carbendazim με τελικές συγκεντρώσεις 0, 2 και 10

μg/Μl (Εικόνα 1.1.). Οι δύο συγκεντρώσεις του παρεμποδιστή επιλέχθηκαν με το εξής σκεπτικό: η μεν συγκέντρωση των 2 μg/mL αποτελεί συγκέντρωση υποτοξική για άγριο στέλεχος ενώ ελάχιστη είναι η επίδραση της στα ανθεκτικά στελέχη. Επομένως θα αναμενόταν οι τυχόν μορφολογικές αλλαγές που θα παρατηρούσαμε στο άγριο στέλεχος να οφειλόταν στην επίδραση του carbendazim στο μηχανισμό της μίτωσης. Η συγκέντρωση των 10 μg/mL είναι τοξική για το άγριο στέλεχος και σε ελάχιστο έως μικρό βαθμό στα ανθεκτικά στελέχη, πράγμα που σημαίνει ότι σε αυτή τη συγκέντρωση τα στελέχη αναμενόταν να εκφράσουν της ανθεκτικότητά τους στο παρεμποδιστή σε σχέση με το ευαίσθητο στέλεχος.

Οι καλυπτρίδες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες που βρίσκονταν μέσα σε τρυβλία petri. Τα τρυβλία σκεπάστηκαν και εισηχθήσαν σε επωαστικούς θαλάμους σταθερών συνθηκών θερμοκρασίας (25 °C) και υγρασίας (75 %). Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τα κονίδια αφέθηκαν στη συνέχεια να επωαστούν για διάστημα 8 ωρών. Ο χρόνος αυτός επώασης επιλέχτηκε διότι από προηγούμενα πειράματα είχε διαπιστωθεί ότι η βλάστηση των κονιδίων του μύκητα συμβαίνει από τις 4,5 ώρες και μετά. Θελήσαμε να εξασφαλίσουμε έτσι ότι θα έχει επέλθει ήδη η βλάστηση, καθώς από πειράματα μας αλλά και άλλων ερευνητών έχει βρεθεί ότι το carbendazim επιδρά κυρίως μετά το στάδιο της βλάστησης- στην επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα των κονιδίων.

Μετά την παρέλευση του χρόνου επώασης αφαιρέθηκαν με ιδιαίτερη προσοχή το σελοφάν μαζί με το κομμάτι PDA και για κάθε καλυπτρίδα ακολουθήθηκε κατευθείαν προσήλωση σε αντικειμενοφόρο πλάκα και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Οι παρατηρήσεις έγιναν σε μεγενθύσεις φακών 10X και 40X με το οπτικό μικροσκόπιο OLYMPUS BX40 ενώ η φωτογράφιση μέσω φωτογραφικού συστήματος OLYMPUS U-TVO.5XC-3.



**Εικόνα 1.1.** Η τεχνική “cellophane/sandwich culture technique” για τη μελέτη της επιδράσεως του carbendazim στη μορφολογία των κονιδίων (οι αριθμοί της εικόνας αντιστοιχούν στην σειρά των υλικών με την οποία τοποθετήθηκαν πάνω στη καλυπτρίδα).

### 17. Αποτελεσματικότητα καταπολέμησης των ανθεκτικών στελεχών με βενζιμιδαζολικά *in vivo*.

Για τον έλεγχο της έκφρασης της ανθεκτικότητας των ανθεκτικών στελεχών, έγιναν πειράματα σε σπάδικες καλαμποκιού που είχαν εμβαπτιστεί προηγουμένως με διάφορες συγκεντρώσεις του carbendazim και οι οποίοι εμβολιάστηκαν με το ευαίσθητο και τα ανθεκτικά στελέχη. Συγκεκριμένα η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Αρχικά έγινε επιλογή όσο το δυνατόν ομοιόμορφων σπαδικών γλυκού καλαμποκιού εγκώριας ποικιλίας. Οι σπάδικες απολυμάνθηκαν με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (εμπορική χλωρίνη) 10 % για 10 λεπτά και κατόπιν εκπλύθηκαν με χρήση απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού. Εν συνεχεία ακολούθησε εμβάπτιση των σπαδικών για διάστημα 45 λεπτών σε πλαστικά δοχεία που περιείχαν διάλυμα μυκητοκτόνου carbendazim τελικών συγκεντρώσεων 250 και 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν με κριτήριο την συνιστώμενη δόση (0.5g/L) και την διπλάσια της. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες σπάδικες που δεν εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα μυκητοκτόνου αλλά σε απιονισμένο νερό. Μετά την

ολοκλήρωση του χρόνου εμβάπτισης, οι σπάδικες αφέθηκαν να στεγνώσουν υπό την επίδραση θερμοκρασίας δωματίου.

Για την μόλυνση των σπαδικών χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι διαμέτρου 6 mm οι οποίοι αποκόπτονταν από την περιφέρεια των καλλιεργειών PDA του αγρίου στελέχους και των ανθεκτικών στελεχών και εμβολιάζονταν σε δύο σημεία του κάθε σπάδικα με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Οι εμβολισμένοι με τα στελέχη σπάδικες τοποθετήθηκαν κατόπιν μέσα στα ίδια πλαστικά δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν και για την απολύμανση στα οποία είχαν τοποθετηθεί διπλές στρώσεις ενυδατωμένου διηθητικού χαρτιού. Μεταξύ των σπαδικών τοποθετήθηκαν χάρτινα αποστειρωμένα πλαίσια με τέτοιο τρόπο ώστε να απομονώνουν τους σπάδικες μεταξύ τους και να αποτρέπουν ανεπιθύμητες επιμολύνσεις μεταξύ των στελεχών. Όλη η πορεία εκτέλεσης των πειραμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε σε ειδικούς χώρους (Laminar) υπό ασηπτικές συνθήκες όπου και ακολούθησε η επώαση των σπαδικών.

Η εκτίμηση της παθογόνου δύναμης των στελεχών παρουσία και απουσία του μυκητοκτόνου έγινε με καταγραφή του αριθμού των μολυσμένων σπόρων κάθε σπάδικα στις 28 και 38 ημέρες καθώς ο ανομοιόμορφος τρόπος εξελίξεως των μολύνσεων, επί της επιφάνειας των σπαδικών, δεν έδωσε τη δυνατότητα για μέτρηση της γραμμικής αύξησής τους.

## **18. Μοριακός χαρακτηρισμός του γονιδίου της $\beta_2$ και $\beta_1$ -τουμπουλίνης**

### **18.1. Απομόνωση ολικού γονιδιακού DNA και RNA**

Για την απομόνωση ολικού DNA και RNA από το άγριο και τα μεταλλαγμένα στελέχη, χρησιμοποιήθηκαν αποικίες οι οποίες αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA παρουσία ή όχι μυκητοκτόνου. Το μυκήλιο των αποικιών αποξέονταν από την επιφάνεια της καλλιέργειας των στελεχών με αποστειρωμένο νυστέρι και μεταφέρονταν σε αποστειρωμένα εppendorfs των 1.5 mL. Σε αυτή τη φάση, το μυκήλιο μπορούσε να αποθηκευτεί σε συνθήκες υπερκατάψυξης (-80 °C) για μεγάλα χρονικά διαστήματα, ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Για τη διάσπαση των

κυτταρικών τοιχωμάτων του μυκηλίου έγινε χρήση υγρού αζώτου μέχρις ότου καταστεί υπό μορφή κονιορτοποιημένης σκόνης.

**Παραλαβή ολικού DNA.** Η παραλαβή ολικού DNA από τα στελέχη του μύκητα έγινε με τη χρήση εμπορικού Kit της Qiagen (DNeasy Plant Mini Kit 50).

Για κάθε 100 mg κονιορτοποιημένης σκόνης μυκηλίου προστίθονταν σε eppendorf tubes 400  $\mu$ L buffer AP1 και 4  $\mu$ L ενζύμου RNase A και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση των δειγμάτων σε συσκευή vortex έως ότου να μην διακρίνονται υπολείμματα του μυκηλιακού ιστού.

Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για 10 λεπτά στους 65 °C και γινόταν ανάμειξη τους ανά 2-3 λεπτά με απλή ανάδευση των tubes έτσι ώστε να επιταχυνθεί στο σημείο αυτό η λύση των κυττάρων.

Στα δείγματα, προστέθηκαν 130  $\mu$ L buffer AP2 και οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε παγόλουτρο για 5 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στις 14,000 rpm.

Εν συνεχεία, συλλέχτηκε με προσοχή, χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα που είχε προκύψει στον πυθμένα, το υπερκείμενο διάλυμα και μεταφέρθηκε σε ειδικές στήλες QIAshredder Mini spin columns. Οι στήλες τοποθετήθηκαν σε ειδικά tubes συλλογής των 2 mL και φυγοκεντρήθηκαν για 2 λεπτά στις 14,000 rpm. Μέσα στο διάλυμα προστέθηκαν 1,5 όγκοι buffer AP3/E και αναμείχτηκε το μίγμα μέσω πιπέτας. Το μίγμα που προέκυψε, μεταφέρθηκε σε στήλες DNeasy Mini spin columns προσαρμοσμένες σε tubes συλλογής του Kit και ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 1 λεπτό στις 8000 rpm. Σε αυτό το στάδιο έγινε η πρόσδεση του DNA από τις ειδικές μεμβράνες των στηλών ενώ το απορρέον διάλυμα που συλλέχτηκε απορρίφθηκε.

Έπειτα ακολούθησε η έκπλυση των ειδικών μεμβρανών και η παραλαβή του DNA. Οι στήλες με το προσροφημένο DNA τοποθετήθηκαν σε ίδια tubes συλλογής που χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως, ακολούθησε προσθήκη 500  $\mu$ L buffer AW και φυγοκέντρηση τους για 1 λεπτό στις 8000 rpm. Το απορρέον διάλυμα που συλλέχτηκε απορρίφθηκε. Το προηγούμενο βήμα επαναλήφτηκε για άλλη μία φορά αλλά η φυγοκέντρηση έγινε για 2 λεπτά στις 14000 rpm έτσι ώστε να στεγνώσει



πλήρως η μεμβράνη και να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αιθανόλης που εμπεριέχονταν στο buffer AW.

Οι στήλες τοποθετήθηκαν σε καινούρια tubes και ακολούθησε η προσθήκη 100 buffer AE μέσω του οποίου θα γινόταν η έκλυση του DNA. Τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και έγινε μία τελευταία φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 8000 rpm έτσι ώστε να παραληφθεί το DNA στα tubes. Τα tubes μέσα στα οποία εμπεριέχονταν το γενωμικό DNA, αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη στους -20 °C μέχρι την χρησιμοποίησή τους.

**Παραλαβή ολικού RNA.** Η παραλαβή ολικού RNA από τα στελέχη του μύκητα *F. graminearum* έγινε με τη χρήση εμπορικού Kit της Qiagen (RNAase Plant Mini Kit). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο η διαδικασία είχε ως εξής:

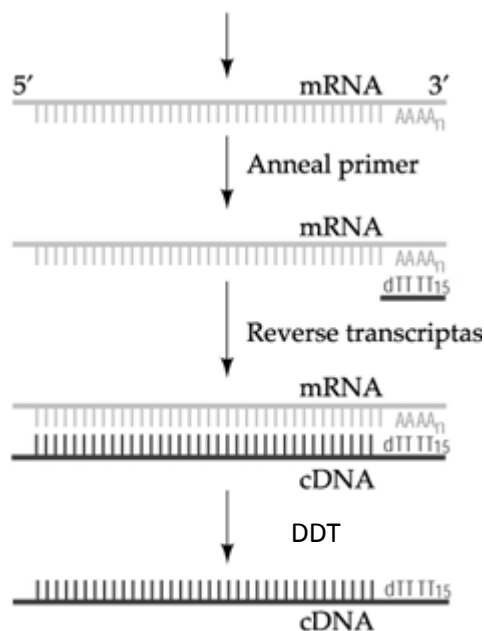
Αρχικά προστέθηκαν για κάθε 100 mg κονιοροποιημένου μυκηλίου 450 μl ρυθμιστικού διαλύματος RLC και στη συνέχεια ακολουθούσε ανατάραξη σε συσκευή vortex. Στη συνέχεια γινόταν μεταφορά του δείγματος σε ειδικές στήλες της εταιρίας που τοποθετούνταν σε tubes των 2 ml για παραλαβή του υπερκλειμένου. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 10000 g. Το υπερκλειμένο από το υγρό που προέκυπτε από τη φυγοκέντρηση μεταφερόταν σε καινούριο tube συλλογής χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα από τα κυτταρικά υλικά. Σε κάθε στήλη προστέθηκαν 0.5 όγκοι του συνολικού διαλύματος σε αιθανόλη και κατόπιν ακολούθησε ανάδευση με πιπέτα.

Μεταφέρθηκε στη συνέχεια το μίγμα σε στήλη RNeasy Mini spin μαζί με ένα tube συλλογής και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 8000 g, ενώ το εκλούμενο διάλυμα απομακρύνθηκε. Ακολουθούσαν ακόμη 3 φυγοκέντρησεις με προσθήκη κατά σειρά buffer RW1 700 μl τη, buffer RPE 500 μl και buffer RPE 500 μL, για 15 λεπτά εκτός της τέταρτης για 2 λεπτά, στα 8000 g, ενώ κάθε φορά το εκλούμενο υγρό απομακρυνόταν.

Στη στήλη RNeasy με το δείγμα RNA προστέθηκαν 30 μl RNase-free water και μεταφέρθηκε σε καινούριο tube συλλογής των 1.5 mL. Ακολούθησε μια τελευταία φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό στα 8000 g όπου και έγινε παραλαβή του RNA.

## 18.2. Σύνθεση μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Με βάση το ολικό RNA που αποκτήθηκε με την παραπάνω διαδικασία, έγινε η σύνθεση μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης Superscript II RNase H-(GIBCO) και τον εκκινητή προσαρμογέα oligodT [5'-GACTCGAGTCGACATCGA (-dT)<sub>17</sub> -3'] ο οποίος υβριδίζει με την 3' πολυ-αδενοσύνο ουρά του mRNA κατά την *Εικόνα 1.2*.



**Εικόνα 1.2.** Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής σύνθεσης συμπληρωματικού DNA (cDNA). Αρχικά η μακριά αμινοξική ουρά στο άκρο 3' του μεταφορικού RNA (mRNA) υβριδίζει με τον προσαρμογέα oligo (dT) του εκκινητή και έτσι προκύπτει η πρώτη μονόκλωνη αλυσίδα cDNA. Στη συνέχεια το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης μεταγράφει το συμπληρωματικό cDNA αρχίζοντας από το άκρο του εκκινητή. Η αποδιάταξη του cDNA από το RNA γίνεται με αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος της αντίδρασης και για αυτό το σκοπό χρησιμοποιείται η ένωση dithiothreitol (DDT).

Ακολούθησε μια αντίδραση για τη σύνθεση του cDNA για την οποία έγινε η προσθήκη κατά σειρά των ακόλουθων:

1. 5 µg ολικού RNA
2. 1 µL oligo dT-17
3. DEPC-dd H<sub>2</sub>O μέχρι τα 20 mL

*Συυθήκες PCR.* Η αντίδραση ξεκίνησε με επώαση των δειγμάτων στο κυκλοποιητή σε θερμοκρασία 70 °C για χρόνο 10 λεπτά ώστε να διαλυθεί η δευτεροταγής δομή του RNA και να καταστεί γραμμικό και να επιτραπεί έτσι ο υβριδισμός του με τον εκκινητή. Τα δείγματα στη συνέχεια μεταφέρθηκαν γρήγορα σε πάγο και ακολούθησε η προσθήκη κατά σειρά των ακόλουθων αντιδραστηρίων:

1. 4 μL 5x ρυθμιστικού διαλύματος First –Stand Buffer (GIBGO-BRL)
2. 2 μL 0.1 M DTT (dithiothreitol) ως παράγοντας αποδιάταξης
3. 1 μL 10 mM dNTP Mix (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στο κυκλοποιητή σε θερμοκρασία 42 °C για χρόνο 2 λεπτά. Στο σημείο αυτό έγινε διακοπή της αντίδρασης και προσθήκη μέσα στον κυκλοποιητή γρήγορα 1 μL Superscript II RNase H, ένζυμο το οποίο καταλύει την αντίστροφη μεταγραφή του συμπληρωματικού DNA. Η αντίδραση συνεχίστηκε με επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία 50 °C για μία ώρα και τέλος στους 70 °C για 15 λεπτά με σκοπό την απενεργοποίηση του ενζύμου αυτού.

### 18.3.Σχεδιασμός εκκινητών

Ο σχεδιασμός των εξειδικευμένων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμές PCR με σκοπό την ανάκτηση και ενίσχυση των γονιδίων  $\beta_2$  και  $\beta_1$ -τουμπουλίνης στο άγριο και στα μεταλλαγμένα στελέχη, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού primer3 Output software το οποίο βρίσκεται διαθέσιμο στο διαδίκτυο στη διεύθυνση [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3\\_www.chi.c](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3_www.chi.c) .

Η επιλογή και η σχεδίαση των εκκινητών έγινε σύμφωνα με τα δημοσιευμένα δεδομένα του Liu και των συνεργατών του (2010) για το μύκητα *F. graminearum*. Έτσι σχεδιάστηκαν και προμηθεύτηκαν από την εταιρεία MWG οι εξής εκκινητές:

- Χρησιμοποιήθηκαν τρία ζεύγη εκκινητών για ανάκτηση και ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων της  $\beta_2$ -και  $\beta_1$ -τουμπουλίνης, ένα ζεύγος για την  $\beta_2$ -τουμπουλίνη και δύο ζεύγη για τη  $\beta_1$ -τουμπουλίνη (με σκοπό την ανάκτηση όσο το δυνατόν μεγαλύτερου μέρους του γονιδίου) :

	<i>Ονομασία</i>	<i>Αλληλουχία (5'-3')</i>	<i>Αναμενόμενο μέγεθος στη PCR (σε bp)</i>
β <sub>2</sub> - τουμπουλίνη	Tub2-seq-F	ACAAACGCACACACACACACA	1,306
	Tub2-seq-R	TCGCTTGTTCCGCCATCTT	
β <sub>1</sub> - τουμπουλίνη	FGtub1F1	TTGTTACCTTCAGACCGGT	637
	FGtub1R1	AGCTGTCCAACCCCTCTTAC	
	FGtub1F2	GGCGACCTGAACTACCTTGT	674
	FGtub1R2	AGAGGAGTACGAGGAGGAGC	

- Εξειδικευμένοι εκκινητές για την ανίχνευση σημειακών μεταλλαγών στη β<sub>2</sub>-τουμπουλίνη των ανθεκτικών στελεχών

Οι εκκινητές του πίνακα χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με την εργασία των Liu et al (2010) με σκοπό να εφαρμοστούν μοριακά διαγνωστικά που ανηχνεύουν τις μεταλλαγές ανθεκτικότητας F167Y, E198A και F200Y στις αντίστοιχες θέσεις του γονιδίου της β<sub>2</sub>-τουμπουλίνης.

<i>Ονομασία</i>	<i>Αλληλουχία (5'-3')</i>	<i>Αναμενόμενο μέγεθος στη PCR (σε bp)</i>
Tub-F	TTGTAATTGCAAATTTCAACGTG	
167-RB	AATCCGTTATGCCCTCGC	398
198-RB	CTGACCTTCTGTATCGATAACG	494
200-RB	AATGTATCGATAACGAGGC	498

#### 18.4. Αντιδράσεις και συνθήκες PCR

Για την ενίσχυση των τμημάτων των γονιδίων β<sub>2</sub> και β<sub>1</sub>-τουμπουλίνης πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με δείγματα gDNA του ευαίσθητου και των

μεταλλαγμένων στελεχών του μύκητα *F.graminearum* με χρήση του αντίστοιχου ζεύγους εξειδικευμένων εκκινητών.

Συγκεκριμένα, η κάθε αντίδραση συνολικού όγκου 25  $\mu$ L περιείχε:

- 1  $\mu$ L cDNA (template),
- 2,5  $\mu$ L 10x buffer (Qiagen) 10 mM,
- 2  $\mu$ L  $MgCl_2$  (25 mM),
- 1  $\mu$ L dNTPs (10 mM),
- 1  $\mu$ L Tub2-seq-Forward εκκινητής (10 mM),
- 1  $\mu$ L Tub2-seq-Reverse εκκινητής (10 mM),
- 0,3  $\mu$ L Hotstart *Taq* plus DNA Polymerase (Qiagen),
- 16,2  $\mu$ L dd  $H_2O$ .

Καθόλη τη διαδικασία προετοιμασίας των αντιδράσεων, τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με το gDNA παρέμειναν σε πάγο. Επίσης πραγματοποιούνταν και η παρασκευή ενός μίγματος ως αρνητικός μάρτυρας, που περιελάμβανε όλα τα επιμέρους αντιδραστήρια της PCR πλην της μήτρας DNA η οποία είχε αντικατασταθεί με αντίστοιχο όγκο υπερκάθαρου νερού (dd- $H_2O$ ).

Οι σωλήνες με τα μίγματα των αντιδράσεων τοποθετούνταν σε συσκευή PCR PTC-200 (MJ Research) (θέρμοκυκλοποιητής) με σκοπό την ενίσχυση των επιλεγμένων τμημάτων του γονιδίου  $\beta_2$  και  $\beta_1$ -τουμπουλίνης. Οι συνθήκες της PCR ήταν 95  $^{\circ}C$  για 3 λεπτά, 35 κύκλοι με 95  $^{\circ}C$  για 30 sec, 58  $^{\circ}C$  για 40 sec, 72  $^{\circ}C$  για 1,5 min και μια τελική φάση επέκτασης 5 min στους 72  $^{\circ}C$ .

#### 18.5. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτική αγαρόζη

Για την παρασκευή της πηκτικής αγαρόζης για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA χρειάστηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- 10 mg/mL διάλυμα EtBr (Ethidium Bromide)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE, για την παρασκευή 1 L: 242 g Trizma base, 57,1 mL glacial acetic acid, 100 mL 0,5- M EDTA (pH 8) και συμπλήρωση μέχρι 1 L με Miliqwater.
- Αγαρόζη

Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής ξεκίνησε με την παρασκευή 1% πηκτώματος αγαρόζης με προσθήκη 0.5 g αγαρόζης σε 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος 1x TAE. Βράστηκε το περιεχόμενο έτσι ώστε η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως και όταν το περιεχόμενο κρύωσε στους 50 °C προστέθηκε τέτοια ποσότητα EtBr έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του στην πηκτική να είναι 4 %. Ενώ η αγαρόζη ήταν ακόμη ζεστή, τοποθετήθηκε η κτένα δημιουργίας των πηγαδιών. Αφού είχε πήξει, η πηκτική τοποθετήθηκε στην υποδοχή της οριζόντιας ηλεκτροφορητικής συσκευής. Μέσα στα πηγάδια που είχαν διαμορφωθεί από τη κτένα φορτώθηκαν κατά σειρά η κλίμακα (ladder- ακολουθίες DNA γνωστών μοριακών βαρών) DNA (Fermentas O'Gene Ruler 50 bp DNA) και τα δείγματα των προϊόντων της PCR. Τέλος, εφαρμόστηκε κατάλληλη τάση (55-60 V) προκειμένου να διαχωριστούν τα διάφορα τμήματα DNA και κατόπιν ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση.

Η οπτικοποίηση της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε με έκθεση της πηκτής σε κατάλληλη συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UVITEC) ενώ ακολούθησε η φωτογράφιση μέσω συστήματος Kodak EDAS 290. Το μήκος των προϊόντων της PCR αξιολογήθηκε μετά από σύγκριση με τα αντίστοιχα γνωστά τμήματα ladder.

#### 18.6. Καθαρισμός προϊόντων

Τα προϊόντα της PCR με το αναμενόμενο μέγεθος, αποκόπηκαν από την πηκτική και ακολούθησε καθαρισμός του ενισχυμένου DNA με τη χρήση κατάλληλου για τον σκοπό αυτό εμπορικού Kit (Fermentas, GenJET PCR Purification Kit).

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας, αρχικά προστέθηκε ένα μέρος όγκου Binding Buffer για κάθε όγκο προϊόντος PCR. Από το μίγμα που προέκυψε, πάρθηκαν 800  $\mu$ L και μεταφέρθηκαν σε ειδικές κολώνες GeneJT Purification columns και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 λεπτό. Το εκλούόμενο υγρό απορρίφθηκε και κατόπιν προστέθηκαν στις κολώνες GeneJT Purification columns 700  $\mu$ L από το Wash Buffer. Οι κολώνες φυγοκεντρήθηκαν ξανά στις 13.000 rpm για 1 λεπτό και το εκλούόμενο υγρό που προέκυψε απορρίφθηκε. Στο στάδιο αυτό έγινε μια ακόμη φυγοκέντρηση χωρίς την προσθήκη κάποιου διαλύματος με στόχο την απομάκρυνση τυχόν υπολείμματος αιθανόλης που περιέχεται στον Wash Buffer.

Τέλος, οι κολόνες μεταφέρθηκαν σε καινούριο σωλήνα συλλογής του 1.5 mL και ακολούθησε παραλαβή του προσδεμένου στη κολόνα DNA προσθέτοντας 50  $\mu$ L Elution Buffer και φυγοκεντρώντας για 1 λεπτό στις 13.000 rpm. Τα tubes με τα καθαρισμένα δείγματα DNA φυλάχτηκαν για παραπέρα ανάλυση σε συνθήκες κατάψυξης (-20 C).

#### 18.7. Αλληλούχιση προϊόντων PCR

Τα δείγματα cDNA και DNA, από τις διάφορες δοκιμές PCR απεστάλησαν στα εργαστήρια της εταιρείας VbCbioTECH της Βιέννης όπου αλληλουχήθηκαν με χρήση της τεχνικής ABI Prism 3100 και ABI Prism 3730XL capillary sequencer. Ο έλεγχος και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης έγιναν με χρήση του προγράμματος DNA STAR (LASER GENE INC).

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που προέκυψαν από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης σαρώθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού BLAST-X (Basic Local Alignment Search Tool) που χρησιμοποιεί κατάλληλο ευρεστικό αλγόριθμο για την αναζήτηση και σύγκριση ομόλογων αλληλουχιών καταχωρημένων στις βάσεις δεδομένων με βάση τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούν.

Η διερεύνηση ύπαρξης σημειακών μεταλλαγών έγινε με σύγκριση των αλληλουχιών του αγρίου στελέχους με τα ανθεκτικά με τη βοήθεια του προγράμματος Clastal-w.

### 19. Ομόλογη μοντελοποίηση της $\beta_2$ -τουμπουλίνης

Οι νουκλεοτιδική αλληλουχία της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης του μύκητα *F. graminearum* αποκτήθηκε από τη βάση δεδομένων NCBI GenBank υπό μορφή FASTA. Ακολούθησε ομόλογη μοντελοποίηση της αλληλουχίας αυτής η οποία έγινε μέσω του λογισμικού SWISS MODEL το οποίο υπάρχει διαθέσιμο στο διαδίκτυο στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://www.expasy.ch/swissmod/>. Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλογραφημένη δομή της  $\beta$ -τουμπουλίνης του χοίρου η οποία βρίσκεται καταχωρημένη στη βάση δεδομένων NCBI με το κωδικό PDB: 4ihjB. Η μήτρα αυτή έδειξε ένα ικανοποιητικό ποσοστό ομολογίας 74.065% με την αλληλουχία της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης του *F. graminearum*. Στη συνέχεια οι αντίστοιχες τριτοδιάστατες δομές της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης των μεταλλαγμένων στελεχών προετοιμάσθηκαν τροποποιώντας την αρχική δομή της πρωτεΐνης του αγρίου

στελέχους, με αντικατάσταση των αμινοξέων στις θέσεις που βρέθηκαν οι αντίστοιχες μεταλλαγές, διορθώνοντας παράλληλα τη δομή τους και ελαχιστοποιώντας την ενέργεια τους. Η διαδικασία και η ανάλυση έγινε σύμφωνα με τις αναφορές των Arnold et al (2006), Schwaebe et al (2003) και Guex και Peitsch (1997). Οι προκύπτουσες τρισδιάστατες δομές της πρωτεΐνης του αγρίου στελέχους και των ανθεκτικών στελεχών απεικονίστηκαν εν συνεχεία μέσω του προγράμματος PyMOL. Η απεικόνιση των κοιλοτήτων των μεταλλαγμένων αμινοξέων έγινε μέσω του λογισμικού CASTp σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται από τους Dundas et al (2006).

## 20. Μελέτη του μηχανισμού υπερέκφρασης των γονιδίων $\beta_1$ και $\beta_2$ -τουμπουλίνης

### 20.1. Σχεδιασμός εκκινητών

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων  $\beta_1$  και  $\beta_2$ -τουμπουλίνης είναι αυτοί που δίνονται στον κάτωθι πίνακα οι οποίοι αποκτήθηκαν από την εργασία των Liu et al (2010). Συγκεκριμένα, τα αντίστοιχα τμήματα του κάθε γονιδίου ενισχύθηκαν με τη βοήθεια της ποσοτικής PCR (RT-PCR) αληθούς χρόνου και συγκρίνονταν ποσοτικά με το αντίστοιχο γονίδιο αναφοράς (ακτίνης) το οποίο είχε ενισχυθεί στις ίδιες συνθήκες για κάθε στέλεχος.

Ονομασία	Αλληλουχία βάσεων (5'-3')
F-actin-F	CGCAACATGAAGACTTTCCA
F-actin-R	CAAATGTGGATCTCCAAGCA
Tub2-RT-F	ATCCACGTCACCACTTTCAA
Tub2-RT-R	AACAACGTCCAAACTTCCGT
Tub1-RT-F	TTTCTGGCAGACCATCTCTG
Tub1-RT-R	TTTCCGACCCGACAACT

### 20.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Αρχικά έγινε απομόνωση και μέτρηση της συγκέντρωσης cDNA από υγρές καλλιέργειες των στελεχών που αναπτύχθηκαν παρουσία ή απουσία του



μυκητοκτόνου carbendazim με τη χρήση φασματοφωτομέτρου NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific). Συγκεκριμένα επιλέξαμε τη συγκέντρωση των 10 μg/mL στην οποία υφίσταται ολική παρεμπόδιση του αγρίου στελέχους.

### 20.3. Αντιδράσεις και συνθήκες RT-PCR

Οι διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος cDNA από το άγριο στέλεχος που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο χρησιμοποιήθηκαν ως βάση ενίσχυσης ενώ πραγματοποιήθηκαν και τριών ειδών ακόμη αντιδράσεις σε PCR tubes χρησιμοποιώντας cDNA ίσης συγκέντρωσης από το άγριο και τα μεταλλαγμένα στελέχη. Συγκεκριμένα, στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών Tub2-RT-F/ Tub2-RT-R με σκοπό την ενίσχυση του μελετώμενου γονιδίου της β2-τουμπουλίνης, στη δεύτερη αντίδραση το ζεύγος εκκινητών Tub1-RT-F/Tub1RT-R, για την ενίσχυση της β1-τουμπουλίνης και στη τρίτη αντίδραση το ζεύγος των εκκινητών F-actin-F/ F-actin-R για την ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς (β-ακτίνη). Η ενίσχυση των τμημάτων του γονιδίου έγινε με χρήση του συστήματος Mini Opticon (BioRad) ενώ για τη σήμανση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η ειδική φθορίζουσα χρωστική SYBR-Green χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο SYBR-Green I PCR kit (Qiagen).

Η κάθε μία αντίδραση για τα δύο ζεύγη εκκινητών περιείχε τα εξής:

• cDNA.....	3 μL
• 2 x SYBR.....	7,5 μL
• Tub1-RT-F/ F-actin-F.....	0,6 μL
• Tub1-RT-R/F-actin-R.....	0,6 μL
• dd H <sub>2</sub> O.....	3,3 μL
Συνολικός όγκος	<u>15 μL</u>

Οι συνθήκες της RT-PCR ήταν 95 °C για 15 min και 35 κύκλοι με 94 °C για sec, 52 °C για sec και 72 °C για sec ενώ ακολούθησε η φάση της αποδιάταξης με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από 60 σε 95 °C. Η κάθε μία αντίδραση καθενός δείγματος πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

#### 20.4. Υπολογισμός της σχετικής έκφρασης του γονιδίου της $\beta_2$ και $\beta_1$ -τουμπουλίνης στα δείγματα cDNA

Η σχετική έκφραση της ενίσχυσης του γονιδίου της  $\beta_2$  και  $\beta_1$ -τουμπουλίνης μεταξύ αγρίου στελέχους και ανθεκτικών στελεχών με τον συνδυασμό του ζεύγους εκκινητών Tub2-RT-F/ Tub2-RT-R έγινε με βάση τη μέθοδο  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001) εκτιμώντας την σχετική ποσοτική ενίσχυση μεταξύ του γονιδίου της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης και του γονιδίου αναφοράς (F-ακτίνη). Συγκεκριμένα, η σχετική ποσοτικοποίηση εκτιμήθηκε με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$\Delta\Delta CT = \frac{2^{CT}}{2^{CR}}$$

όπου  $\Delta\Delta CT$  είναι η σχετική ποσοτική έκφραση του γονιδίου της  $\beta$ -τουμπουλίνης σε σχέση με το γονίδιο της F-ακτίνης,  $CT$  οι κύκλοι στους οποίους η ενίσχυση της  $\beta$ -τουμπουλίνης ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης,  $CR$  οι κύκλοι στους οποίους η ενίσχυση της F-ακτίνης ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης.

## 21. Διερεύνηση του μηχανισμού της αποτοξικοποίησης

### 21.1. *In vitro* αποτοξικοποίηση με τη χρήση συνεργιστών

Αρχικά διερευνήθηκε η ευαισθησία του αγρίου στελέχους σε διάφορες συγκεντρώσεις των συνεργιστών. Για το σκοπό αυτό έγιναν πειράματα βιοδοκιμών σε τρυβλία petri που περιείχαν στερεό θρεπτικό υλικό μαζί με διάφορες συγκεντρώσεις των συνεργιστών. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις των 5, 20, 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Η προσθήκη του κάθε συνεργιστή γινόταν από πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (stocks) φροντίζοντας ο όγκος του διαλύτη να μην ξεπερνά το 1% του όγκου του θρεπτικού υλικού.

Η επώαση των τρυβλίων γινόταν για διάστημα 5 ημερών σε θερμοκρασία 25 °C και έπειτα εκτιμούνταν η τοξική δράση μετρώντας την γραμμική ανάπτυξη της καλλιέργειας και εκφράζοντας την ως ποσοστό επί τοις % του μάρτυρα (χωρίς προσθήκη συνεργιστού). Κάθε μέτρηση προέρχονταν από τον μέσο όρο δυο επαναλήψεων. Από τα ζεύγη τιμών (συγκεντρώσεις και ανάπτυξη) προέκυπτε σε καρτεσιανό σύστημα αξόνων η καμπύλη ευαισθησίας του αγρίου στελέχους στο συνεργιστή.

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων ευαισθησίας του στελέχους στους συνεργιστές, η συγκέντρωση των συνεργιστών που επιλέχθηκε ήταν στην περίπτωση του PBO 100 µg/mL, 50 µg/mL για το DEM και 30 µg/mL για τον DEF. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις βρέθηκε ότι η τοξική επίδραση του κάθε ενός συνεργιστή στο άγριο στέλεχος δεν ξεπερνούσε το 10% σε σχέση με τον μάρτυρα. Οι συνθήκες ανάπτυξης και επώασης είναι όμοιες με αυτές που περιγράφηκαν και στην προηγούμενη παράγραφο. Επίσης υπήρχαν μάρτυρες με τρυβλία που περιείχαν τον παρεμποδιστή και άλλα μόνο τον συνεργιστή.

Η επιλογή των συγκεντρώσεων των δύο βενζιμιδαζολικών ενώσεων έγινε με βάση την ευαισθησία του αγρίου στελέχους στις ενώσεις αυτές. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκε μια υποτοξική συγκέντρωση των 2 µg/mL, μια συγκέντρωση πολλαπλάσια της  $EC_{50}$  των 5 µg/mL (στην οποία αναμένεται πλήρης παρεμπόδιση του αγρίου στελέχους) και μια συγκέντρωση των 10 µg/mL (για το carbendazim) και 8 µg/mL (για το thiabendazole).

Η εκτίμηση της συνεργιστικής δράσης του συνεργιστή έγινε με βάση το συντελεστή συνεργισμού Synergism Index (SI), διαιρώντας την  $LD_{20}$  για την περίπτωση παρουσίας μόνο του παρεμποδιστή (μυκητοκτόνο) με την αντίστοιχη  $LD_{20}$  παρουσίας του παρεμποδιστή και του συνεργιστή, σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$SI = \frac{LD_{20} \text{ παρεμποδιστής}}{LD_{20} \text{ παρεμποδιστής και συνεργιστής}} \quad (\text{Raffa και Priester, 1984})$$

,όπου SI ο συντελεστής συνεργισμού και  $LD_{20}$  (Lethal Dose) η συγκέντρωση εκείνη στην οποία επέρχεται 20 % παρεμπόδιση της γραμμικής ανάπτυξης του στελέχους σε σχέση με τον μάρτυρα. Στη ουσία, ο συντελεστής αυτός εκφράζει κατά πόσες φορές η προσθήκη του συνεργιστή στο υλικό καλλιέργειας αυξάνει την τοξική επίδραση του παρεμποδιστή. Κάθε μέτρηση προέρχονταν από τον μέσο όρων δυο βιολογικών επαναλήψεων.

## 21.2. Εκτίμησης ενεργότητας των ενζύμων αποτοξικοποίησης

### 21.3. Λύση των κυττάρων και παραλαβή του ενζυμικού εκχυλίσματος (cell free extract)

Σε πρώτη φάση αναπτύχθηκαν υγρές καλλιέργειες των 6 ανθεκτικών στελεχών και του αγριού στελέχους του μύκητα *F. graminearum* σε κωνικές φιάλες των 500 mL που περιείχαν υγρό θρεπτικό υπόστρωμα PDB. Επίσης αναπτύχθηκαν υγρές καλλιέργειες των στελεχών που αυτή τη φορά είχε προστεθεί μια συγκεκριμένη συγκέντρωση του παρεμποδιστού carbendazim. Η δημιουργία των υγρών καλλιεργειών έγινε εμβολιάζοντας εντός του υγρού υποστρώματος PDB υπό ασηπτικές πάντοτε συνθήκες αιώρημα κονιδίων των στελεχών τέτοιου όγκου έτσι ώστε να προκύψει αιώρημα κονιδίων τελικής συγκέντρωσης  $10^5$  κονίδια/mL. Οι καλλιέργειες αφέθηκαν να επωαστούν για διάστημα περίπου 15 ημερών έως ότου αναπτυχθεί ικανή μυκηλιακή μάζα.

Στο στάδιο αυτό ακολούθησε φιλτράρισμα του μυκηλίου υπό κενό με χρήση φίλτρου τύπου Buchner. Η μυκηλιακή μάζα που συγκεντρώθηκε αφυδατώθηκε υπό πίεση διαμέσω διηθητικών χαρτιών και στη συνέχεια φυλάχθηκε μέσα σε σωλήνες τύπου Falcon σε συνθήκες ψύξης  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  έως ότου γίνουν οι ενζυμικές αναλύσεις.

Για τη λήψη του ελευθέρου-κυττάρων εκχυλίσματος, ζυγίστηκαν 200 mg αφυδατωμένου μυκηλίου και λύθηκε με την προσθήκη τετραπλάσιου όγκου ρυθμιστικό διαλύματος 0,1-M φωσφορικών (pH 7). Η λύση των κυττάρων έγινε με την επίδραση υπερήχων επί τέσσερις φορές για διάστημα 30 sec η κάθε μία με μεσοδιάστημα 1 min σε παγόλουτρο (προκειμένου να αποτραπεί η μετουσίωση των πρωτεϊνών λόγω παραγόμενης θερμότητας από τους υπερήχους).

Στη συνέχεια, το αιώρημα μυκηλίου φυγοκεντρίθηκε σε 10.000 g επί 10 min. Τέλος, το υπερκείμενο που προέκυψε παραλήφθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας.

#### 21.3.1. Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης

Η μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης στο δείγμα έγινε με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να παρουσιάζει χρωματική αλλαγή λόγω επίδρασης της με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Η ελεύθερη χρωστική είναι καστανής απόχρωσης και παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο χρωστική-πρωτεΐνη είναι κυανό με μέγιστο απορρόφησης 595 nm. Η ευαισθησία της μεθόδου εντοπίζεται σε πρωτεϊνικά δείγματα με όρια συγκεντρώσεων 0,04-0,2 mg/mL.

Μέσα σε αδιαφανές γυάλινο δοχείο (amber glass) διαλύθηκαν 100 mg της χρωστικής σε 100 mL μεθανόλης 50 %. Στο διάλυμα προστέθηκαν 100 mL φωσφορικού οξέος 85%. Το τελικό διάλυμα Bradford που προέκυψε διατηρούνταν κατά την διάρκεια των πειραμάτων στους 25 °C. Μέσα σε κυβέτες του ενός ml έγινε προσθήκη 950 µL διαλύματος Bradford που αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό σε αναλογία ¼ (το διάλυμα αυτό μπορούσε να διατηρηθεί σε θερμοκρασία δωματίου έως και 24 ώρες εντός σκούρου δοχείου. Ακολούθησε η προσθήκη 10 µL από το εκχύλισμα ελεύθερο κυττάρων και συμπληρώθηκε μέχρι τον όγκο του 1 ml με απεσταγμένο νερό. Ως διάλυμα αναφοράς (blank) χρησιμοποιήθηκαν 50 µL απεσταγμένου νερού. Οι κυβέτες με το μείγμα αντίδρασης στη συνέχεια αναδεύονταν καλά και τοποθετούνταν σε θερμοκρασία δωματίου εντός σκοτεινού θαλάμου για διάστημα τουλάχιστον 20 λεπτών.

Η εκτίμηση της ποσότητας της ολικής πρωτεΐνης κατόπιν έγινε μετρώντας την απορρόφηση του φωτός σε φωτόμετρο μονής δέσμης στα 595 nm.

Οι τιμές της απορρόφησης των δειγμάτων ανάχθηκαν σε συγκέντρωση πρωτεΐνης με βάση τη πρότυπη καμπύλη αναφοράς, από την οποία υπολογίστηκε ο συντελεστής απόσβεσης. Δόθηκε προσοχή ώστε η απορρόφηση στο φωτόμετρο κάθε μέτρησης να μην ξεπερνά το 0.6-0.8. Σε διαφορετική περίπτωση που η απορρόφηση ξεπερνούσε το παραπάνω όριο, απαιτούνταν δεκαδική αραιώση του εκχυλίσματος σε νερό, προσέχοντας πάντοτε ο συνολικό όγκος της αντίδρασης να είναι 1 mL.

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς σχεδιάστηκε έχοντας ως πρότυπο γνωστές συγκεντρώσεις (2-10 µg/mL) αλβουμίνης από ορό μόσχου (Bovine Serum Albumine/BSA), διαλυμένη σε απεσταγμένο νερό (πίνακας).

Στη συνέχεια έγινε μέτρηση της απορρόφησης για κάθε συγκέντρωση στα 595 nm σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφηκε προηγουμένως. Σχηματίστηκε έτσι η καμπύλη της συσχέτισης της ποσότητας πρωτεΐνης και απορρόφησης στα 595 nm, από την οποία βρέθηκε η κλίση της. Η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$C_1 = \frac{ABS}{\epsilon \cdot L} * \frac{V_{\tau\epsilon\lambda}}{V_{\epsilon\nu\zeta}} * d, \text{ mg/mL}$$

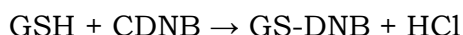
όπου *ABS* η απορρόφηση της ολικής πρωτεΐνης στα 595 nm,  $\epsilon$  η κλίση της πρότυπης καμπύλης η οποία αντιστοιχεί στον συντελεστή απόσβεσης, *L* το μήκος της

κυβέτας (1 cm, *V<sub>τελ</sub>* ο συνολικός όγκος της αντίδρασης, *V<sub>ενζ</sub>* ο όγκος του εκχυλίσματος που προστίθεται και *d* ο παράγοντας της αραιώσης (αν χρησιμοποιηθεί).

### 21.3.2. Εκτίμηση της ενεργότητας της τρoσφεράσης της γλουταθειόνης

#### **Αρχή της μεθόδου**

Η μέθοδο εκτίμησης της δραστικότητας του ενζύμου της τρoσφεράσης της γλουταθειόνης που εφαρμόστηκε είναι η μέθοδος η οποία βασίζεται στην καταλυτική δράση της τρoσφεράσης της γλουταθειόνης έχοντας ως υπόστρωμα την ένωση 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)κατά την αντίδραση:



Το υπόστρωμα αυτό πλεονεκτεί καθώς είναι κατάλληλο για ένα αρκετά μεγάλο εύρος GST ισοενζύμων. Η εκτίμηση έτσι της ενεργότητας έγινε μετρώντας φασματοφωτομετρικά στα 340 nm λόγω αύξησης της απορρόφησης του παραγόμενου συμπλόκου GS-DNB.

#### **Αντιδραστήρια**

- Φωσφορικό διάλυμα  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 M (PH 6,5) σε 37 °C
- Αναγόμενη γλουταθειόνη (GSH), 75 mM σε απεσταγμένο νερό
- CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene), 30 mM σε αιθανόλη
- Απεσταγμένο νερό

#### **Πορεία της μεθόδου**

*Φωτομετρικός προσδιορισμός της τρoσφεράσης της γλουταθειόνης*

Για κάθε μείγμα αντίδρασης 1 mL γινόταν προσθήκη σε κυβέτες του 1 mL κατά σειρά των ακόλουθων αντιδραστηρίων: 914  $\mu\text{L}$  0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  διαλύματος, 33  $\mu\text{L}$  75 mM

GSH, 33  $\mu\text{L}$  30 mM CDNB και στο τέλος προστίθονταν 20  $\mu\text{L}$  του εκχυλίσματος ελεύθερο κυττάρων (δείγμα). Για τον προσδιορισμό του πλέον κατάλληλου όγκου δείγματος (εκχύλισμα) στην αντίδραση, πραγματοποιήθηκαν αρχικά δοκιμές με διάφορες συγκεντρώσεις του δείγματος και γινόταν αντίστοιχες αναγωγές στον όγκο του φωσφορικού διαλύματος. Επίσης φτιάχνονταν και η κυβέτα αναφοράς στην οποία προστίθονταν 934  $\mu\text{L}$  0,1 από M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  διαλύματος, 33  $\mu\text{L}$  από 75 mM GSH, 33  $\mu\text{L}$  από 30 mM CDNB.

Αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος γινόταν ανάδευση και ακολουθούσε μέτρηση της απορρόφησης στα 340 nm ανά 6 δευτερόλεπτα για συνολικό χρόνο 2 λεπτών. Παρακολουθούνταν η κινητική της ενζυμικής αντίδρασης στο φωτόμετρο έτσι ώστε η μεταβολή της απορρόφησης να είναι γραμμική και να παρουσιάζει θετική κλίση. Οι μετρήσεις της δραστηριότητας του ενζύμου γίνονταν σε θερμοκρασία 25 °C με φασματοφωτόμετρο.

#### *Υπολογισμός της ειδικής ενεργότητας του ενζύμου τρανσφεράσης της γλουταθειόνης*

Λαμβάνουμε ως μονάδα (unit) ενζύμου, την ποσότητα του ενζύμου που καταλύει τον μετασχηματισμό 1  $\mu\text{mole}$  υποστρώματος CDNB στο αντίστοιχο προϊόν του στη διάρκεια ενός λεπτού, υπό τις περιγραφείσες συνθήκες του πειράματος.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος GS-DNB χρησιμοποιήθηκε ο εξής τύπος:

$$C_2 = \frac{dA_{340} * V_{\tau\epsilon\lambda}}{dt * V_{\delta\epsilon\gamma\mu}} * 1/9,6 * df, \text{ units/mL}$$

όπου:

$C_2$  η ποσότητα του ενζύμου σε units/mL,  $dA_{340}/dt$  ο ρυθμός αλλαγής της απορρόφησης του δείγματος στα 340 στο γραμμικό κομμάτι της καμπύλης απόπου έχει αφαιρεθεί η αντίστοιχη απορρόφηση για τον μάρτυρα,  $V_{\tau\epsilon\lambda}$  ο συνολικός όγκος της αντίδρασης (1mL),

$V_{\delta\epsilon\gamma\mu}$  ο όγκος του δείγματος στη αντίδραση, 1 αντιστοιχεί στο μήκος της διαδρομής του φωτός (cm), 9,6 αντιστοιχεί στον μοριακό συντελεστή της απορρόφησης  $\epsilon$  (molecular extinction coefficient) του CDNB ( $\text{mM}^{-1}$ ) και  $df$  ο παράγοντας αραιώσης του αρχικού δείγματος.

Η ειδική ενεργότητα του ενζύμου (specific activity) προέκυψε διαιρώντας τη συγκέντρωση  $C_2$  του ενζύμου με τη συγκέντρωση  $C_1$  της ολικής πρωτεΐνης και εκφράζεται τελικά σε μονάδες ενζύμου (units) ανά mg πρωτεΐνης του εκχυλίσματος.

### 21.3.3. Ενεργότητα του ενζύμου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης

#### **Αρχή της μεθόδου**

Η μέθοδος η οποία εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη για τον έμμεσο προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου της γλουταθειόνης της υπεροξειδάσης βασίζεται στην οξείδωση της γλουταθειόνης (GSH) στο οξειδωμένο παράγωγο της (GSSG) μέσω κατάλυσης από τη γλουταθειόνη του υπεροξειδίου (ή τρανσφεράση της γλουταθειόνης) χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα υπεροξειδίου του κουμενίου.

Στη συνέχεια το προϊόν GSSG χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την σύνθεση αναδρομικά της γλουταθειόνης (GSH). Η δεύτερη αντίδραση καταλύεται από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) ενώ απαιτείται και η παρουσία του συνενζύμου NADPH ως δότης ηλεκτρονίων. Οι δύο αυτές αντιδράσεις που περιγράφηκαν δίνονται στο παρακάτω σχήμα.

Η συνολική αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της απορρόφησης στα 340 nm λόγω αναγωγής του NADPH σε NADP<sup>+</sup>. Ο ρυθμός μείωσης της απορρόφησης αυτής χρησιμοποιείται ως μέσο προσδιορισμού της ενεργότητας της γλουταθειόνης του υπεροξειδίου.

#### **Αντιδραστήρια**

0,1-M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 1 mM EDTA, pH 7.5, 37 °C

1 mM αναγόμενη γλουταθειόνη (GSH) σε νερό

1,5 mM  $\text{CuOOH}$  σε αιθανόλη

0,2 mM NADPH σε νερό

Glutathione reductase

#### **Πορεία της μεθόδου**

*Φωτομετρικός προσδιορισμός της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης*



Για κάθε μείγμα αντίδρασης 1 mL γινόταν προσθήκη σε κυβέτες του 1 mL κατά σειρά των ακόλουθων αντιδραστηρίων: 500  $\mu\text{L}$  0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  +1 mM EDTA διαλύματος, 8  $\mu\text{L}$  1 mM GSH, 30  $\mu\text{L}$  1,4 mM  $\text{CuOOH}$ , 12  $\mu\text{L}$  0,2 mM NADPH, 1  $\mu\text{L}$  Glutathione reductase και στο τέλος προστίθονται 50  $\mu\text{L}$  του εκχυλίσματος ελευθέρων κυττάρων (δείγμα). Για τον προσδιορισμό του πλέον κατάλληλου όγκου δείγματος στην αντίδραση, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διάφορες συγκεντρώσεις του δείγματος με αντίστοιχες αναγωγές στον όγκο του φωσφορικού διαλύματος. Επίσης φτιαχνόταν και η κυβέτα αναφοράς στην οποία προστίθονταν 549  $\mu\text{L}$  από 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  +1 mM EDTA διαλύματος, 8  $\mu\text{L}$  από 1 mM GSH, 30  $\mu\text{L}$  από 1,4 mM  $\text{CuOOH}$ , 12  $\mu\text{L}$  από 0,2 mM NADPH και 1  $\mu\text{L}$  Glutathione reductase. Κατά την διάρκεια των δοκιμών οι φιάλες Eppendorf με τα εκχυλίσματα των κυττάρων των στελεχών βρισκόταν μέσα σε παγόλουτρο.

Αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος γινόταν γρήγορη ανάδευση και ακολουθούσε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 340 nm ανά 6 δευτερόλεπτα για συνολικό χρόνο 5 λεπτών. Παρακολουθούσαμε την κινητική της ενζυμικής αντίδρασης στο φωτόμετρο έτσι ώστε η μεταβολή της απορρόφησης να είναι γραμμική και να παρουσιάζει αρνητική κλίση, λόγω αναγωγής του NADPH. Οι μετρήσεις της δραστηριότητας του ενζύμου γινόταν σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) με φασματοφωτόμετρο.

*Υπολογισμός της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης*

Λαμβάνουμε ως μονάδα (unit) ενζύμου, την ποσότητα του ενζύμου που καταλύει τον σχηματισμό 1  $\mu\text{mol}$   $\text{NADP}^+$  από NADPH στη διάρκεια ενός λεπτού, υπό τις περιγραφείσες συνθήκες του πειράματος.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του ενζύμου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης χρησιμοποιήθηκε ο εξής τύπος

$$C_3 = \frac{dA_{340}}{dt} * \frac{V_{\text{τελ}}}{V_{\text{δείγμα}}} * d / 6,2 * (1/df), \text{ units/mL}$$

όπου:

$C_3$  η ποσότητα του ενζύμου σε units/mL,  $dA_{340}/dt$  ο ρυθμός αλλαγής της απορρόφησης του δείγματος στα 340 στο γραμμικό κομμάτι της καμπύλης απόπου έχει αφαιρεθεί η αντίστοιχη απορρόφηση για τον μάρτυρα,  $V_{tel}$  ο συνολικός όγκος της αντίδρασης (1mL),  $V_{δείγμα}$  ο όγκος του δείγματος στη αντίδραση,  $d$  (=1) είναι το μήκος της διαδρομής του φωτός (cm),  $\epsilon$  ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης (molecular extinction coefficient) του NADPH ( $\text{mM}^{-1}$ ) και  $df$  ο παράγοντας αραιώσης του αρχικού δείγματος.

Η ειδική ενεργότητα του ενζύμου (specific activity) προέκυψε διαιρώντας τη συγκέντρωση  $C_3$  του ενζύμου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης με τη συγκέντρωση  $C_1$  της ολικής πρωτεΐνης και εκφράστηκε τελικά σε μονάδες ενζύμου (units) ανά mg ολικής πρωτεΐνης του εκχυλίσματος.

#### 21.3.4. Έλεγχος δράσης των βενζιμιδαζολικών ως αναστολείς του ενζύμου GST

Για τον σκοπό αυτό έγιναν ενζυμικές δοκιμές παρουσίας διαφόρων συγκεντρώσεων των δύο βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων carbendazim και thiabendazole μέσα στο μίγμα αντίδρασης. Η πορεία της μεθόδου που ακολούθησε αναφέρεται στην παράγραφο 2.1.2.2. Οι διάφοροι συνδυασμοί μιγμάτων της αντίδρασης που δοκιμάστηκαν φαίνονται στον Πίνακα 1.1.

### Πίνακας 1.1.

Αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στις δοκιμές των GST με διάφορες συγκεντρώσεις των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων (carbendazim, thiabendazole) στο μίγμα αντίδρασης.

αντίδραση	Buffer (0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	GSH (75 mM)	CDNB (30 mM)	βενζιμιδαζόλη ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Δείγμα $\mu\text{L}$
1	934	33	33	-	-
2	914	33	33	0	5
3	904	33	33	10	5
4	924	33	33	20	5
5	894	33	33	40	5
6	854	33	33	80	5

*Οι τιμές αντιστοιχούν σε  $\mu\text{L}/1 \text{ mL}$  όγκου αντίδρασης*

## 22. Διερεύνηση της κινητικής εισόδου-απέκκρισης

*Απόκτηση μυκηλιακής μάζας.* Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν το άγριο στέλεχος (w.t.) και τα δύο ανθεκτικά στελέχη FG-1 και FG-2 για τα οποία δεν βρέθηκε από τα μέχρι τώρα πειράματα ο μηχανισμός ανθεκτικότητας. Με σκοπό την απόκτηση ικανής μυκηλιακής μάζας, ώστε να χρησιμοποιηθεί για τα μετέπειτα πειράματα κινητικής, τα στελέχη αναπτύχθηκαν κάτω από σταθερές συνθήκες των 25 °C και συνεχή ανάδευση σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα PDB σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer των 50 mL για 10 περίπου ημέρες.

Μετά την ανάπτυξη της μυκηλιακής μάζας, οι καλλιέργειες που βρίσκονταν σε εκθετική πλέον φάση ανάπτυξης φιλτραρίστηκαν με τη χρήση φίλτρου τύπου Buchner υπό κενό και τοποθετήθηκαν μεταξύ δύο διηθητικών χαρτιών και πιέσθηκε έτσι ώστε να πετύχουμε τη μέγιστη δυνατή αφυδάτωση. Η μυκηλιακή πάστα που προέκυψε εκπλύθηκε στη συνέχεια με κρύο ρυθμιστικό διάλυμα 0,1-M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7). Με το τρόπο αυτό γινόταν ανάκτηση περίπου 1 g νωπής μυκηλιακής μάζας ανά κωνική φιάλη.

*Πειράματα απορρόφησης του carbendazim.* Οι χρόνοι επώασης των στελεχών παρουσία του μυκητοκτόνου επιδέχθηκαν με βάση αποτελεσμάτων από παρόμοιες μελέτες άλλων ερευνητών για το μυκητοκτόνο αυτό σε διάφορα άλλα είδη μυκήτων.

Για τα πειράματα κινητικής εισόδου-απέκκρισης χρησιμοποιήθηκε carbendazim από εμπορικό σκεύασμα (Image 50% W/V WP). Σε σωλήνες τύπου falcon των 50 mL που περιείχαν 20 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7) τοποθετήθηκε ποσότητα της νωπής μυκηλιακής πάστας των στελεχών ίση περίπου με 1.2 g. Με σκοπό την εξισορρόπηση των συνθηκών οι φιάλες με τη μυκηλιακή μάζα παρέμειναν για 30 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση στους 25 °C οπότε και ακολούθησε προσθήκη γρήγορα του carbendazim, τέτοιου όγκου έτσι ώστε προκύψει διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Ακολούθησε επώαση των σωλήνων falcon για χρονικές περιόδους 10, 20, 40, 80 και 120 λεπτών, όπου κάθε φορά η επώαση διακόπτονταν με φυγοκέντριση στις 5000 rpm για 5 λεπτά. Ο χρόνος της φυγοκέντρωσης θεωρούνταν νεκρός για την εκτίμηση της κινητικής εισόδου απέκκρισης του μυκητοκτόνου. Οι παραπάνω χρόνοι επώασης

επιλέχτηκαν λαμβάνοντας υπ' όψη μας αποτελέσματα από παρόμοιες μελέτες άλλων ερευνητών για το μυκητοκτόνο αυτό σε διάφορα άλλα είδη μυκήτων (Nachmias και Barash, 1975).

Από τα υπερκείμενα διαλύματα γινόταν αφαίρεση 3 mL και ακολουθούσε εκτίμηση της συγκέντρωσης του διαλύματος σε carbendazim με καταγραφή της απορρόφησης μέσω φασματοφωτόμετρου UVIKON (SPECTROPHOTOMETER 922) στα 285 nm και συσχέτιση της με βάση πρότυπη καμπύλη. Για τη κατασκευή της πρότυπης καμπύλης έγινε συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων 0,625, 1.25, 2.5, 5, 10, 15 και 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του carbendazim και των αντίστοιχων απορροφήσεων στα 285 nm. Για κάθε δείγμα στελέχους υπήρχαν τρεις επαναλήψεις.

## **ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ**

# ***ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ***

---



## 7. Επίδραση του carbendazim στη μορφολογία των κυττάρων

Έγιναν πειράματα παρατήρησης της επιδράσεως του carbendazim στη μορφολογία των βλαστημένων κονιδίων του αγρίου στελέχους και των ανθεκτικών στελεχών με τη χρήση του οπτικού μικροσκοπίου. Τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων μέσω του οπτικού μικροσκοπίου φαίνονται στις παρακάτω εικόνες. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν αντιπροσωπευτικά στελέχη FG-1, FG-2, FG-3 και FG-5 από κάθε κατηγορία μηχανισμού ανθεκτικότητας.

Όταν τα κονίδια του ευαίσθητου στελέχους του μύκητα *F. graminearum* αναπτύσσονται απουσία carbendazim, παρατηρείται ότι εξελίσσεται κανονικά η διαδικασία βλαστήσεως των κονιδίων με βλαστική υφή που ξεπερνά κατά πολύ το μήκος του κονιδίου (Εικόνα 1.:A-E-1). Τον ίδιο τρόπο βλάστησης ακολουθούν και τα κονίδια των ανθεκτικών στελεχών. Αντιθέτως, όταν τα κονίδια του ευαίσθητου στελέχους αναπτύσσονται παρουσία 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  carbendazim φαίνεται ξεκάθαρα η επίδραση του παρεμποδιστού στη μορφολογία των κυττάρων (Εικόνα 1.:A-ΣΤ-2). Τα κονίδια παρατηρούνται με ανώμαλες διακλαδώσεις με έντονες παχύνσεις και εμφανώς μειωμένο μήκος της βλαστικής υφής. Όταν τα κονίδια του ευαίσθητου στελέχους αναπτύχθηκαν παρουσία 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  carbendazim η εικόνα της παραμόρφωσης τους ήταν ακόμα πιο έντονη (Εικόνα 1.:A-E-3). Τα κονίδια φαίνονται σε μεγάλο βαθμό διογκωμένα ενώ η βλάστηση τους είχε μειωθεί σε αρκετά μεγάλο βαθμό. Σε αντίθεση με το ευαίσθητο στέλεχος, τα κονίδια όλων των ανθεκτικών στελεχών δεν έδειξαν καμία ανωμαλία στην διαδικασία της βλαστήσεως τους ακόμη και στη συγκέντρωση των 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  carbendazim.





## 8. Αποτελεσματικότητα καταπολέμησης των ανθεκτικών στελεχών με βενζιμιδαζολικά *in vivo*.

Μέσω των πειραμάτων αυτών θελήσαμε να διερευνήσουμε την αποτελεσματικότητα του carbendazim στην καταπολέμηση των στελεχών του μύκητα *F. graminearum* σε σπάδικες καλαμποκιού. Με τη μέθοδο αυτή θελήσαμε να διερευνήσουμε την έκφραση της ανθεκτικότητας των στελεχών σε ιδανικά για την ανάπτυξη του μύκητα βιολογικά υποστρώματα.

Στο Πίνακα 1.1. παρατηρούμε ότι στις 28 ημέρες , απουσία μυκητοκτόνου, όλα τα ανθεκτικά στελέχη παρουσιάζουν μικρότερη παθογόνο δύναμη σε σχέση με το άγριο στέλεχος, εκτός από το στέλεχος FG-6 το οποίο δείχνει λίγο μεγαλύτερη μολυσματική ικανότητα (1.3 φορές περισσότερη). Τη μικρότερη μολυσματική ικανότητα δείχνουν τα στελέχη FG-1 και FG-3, γεγονός που συμπίπτει με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που έγιναν για τη διερεύνηση των παραμέτρων προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών στελεχών *in vivo*. Η συγκέντρωση των 0.5 g/L (συνιστώμενη δόση) παρουσιάζεται να παρεμποδίζει πλήρως την εμφάνιση συμπτωμάτων (μυκοστατική επίδραση), όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο, για το άγριο στέλεχος ενώ αυτό δεν συμβαίνει με κανένα ανθεκτικό στέλεχος (Πίνακας 1.2). Το μικρότερο βαθμό παρεμπόδισης σε αυτή τη δόση εμφανίζουν το υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητας στέλεχος FG-1 και το μετρίου επιπέδου FG-3. Στη συγκέντρωση 1 g/L (500 μg/mL) φαίνεται ότι υπάρχει μία σημαντική παρεμπόδιση κυρίως στο στέλεχος FG-6 ενώ όλα τα άλλα στελέχη παρουσιάζουν σε ένα γενικό βαθμό παρόμοια παρεμπόδιση όπως αυτή εμφανίζεται και στη προτεινόμενη δόση.

---

**Εικόνα 1.** Επίδραση του carbendazim στα κονίδια των στελεχών του μύκητα *F. graminearum* μετά από 8 ώρες επώαση στους 25 C. Τα κεφαλαία γράμματα αντιστοιχούν στα διάφορα στελέχη: Α-w.t., Β-FG-1, Γ-FG-2, Δ-FG-3, Ε-FG-6. Φωτογραφίες 1: ανάπτυξη των βλαστημένων κονιδίων υπό κανονικές συνθήκες (απουσίας μυκητοκτόνου), 2: ανάπτυξη των βλαστημένων κονιδίων παρουσίας 2 μg/mL carbendazim, 3: ανάπτυξη των βλαστημένων κονιδίων παρουσίας 10 μg/mL carbendazim. Στο άγριο στέλεχος η παρουσία carbendazim προκαλεί ανώμαλες παχύνσεις και ανάπτυξη στα κονίδια και στις βλασάνουσες υφές τους. Στα ανθεκτικά στελέχη (Β-Ε) τα κονίδια που αναπτύχθηκαν παρουσία ή όχι carbendazim δεν φαίνεται να εμφανίζουν αλλαγές στη μορφολογία τους και στη διαδικασία της βλάστησης. Όλες οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν με οπτικό μικροσκόπιο με μεγέθυνση φακού 40X.

**Πίνακας 1.**

Αξιολόγηση της παθογόνου ικανότητας των στελεχών του μύκητα *F. graminearum* σε σπάδικες γλυκοκαλάμποκου. Οι τιμές του πίνακα αντιστοιχούν σε ποσοστά % του ευαίσθητου στελέχους (w.t.) τα οποία υπολογίστηκαν από το μέσο όρο του αριθμού των μολυσμένων σπόρων που πάρθηκαν από δύο σημεία του σπάδικα στις 28 και 34 ημέρες. Επίσης δίνονται οι τιμές του παράγοντα ανθεκτικότητας  $R_F$  (Resistant Factor) των στελεχών για το carbendazim.

	$R_F$	28 ημέρες	34 ημέρες
w.t.	1	100	100
FG-1	174.62	37.2	59.4
FG-2	42.09	67.4	75.4
FG-3	16.83	25.5	80.1
FG-4	16.35	58.1	78.3
FG-5	13.9	46.5	100
FG-6	21.24	139.5	83

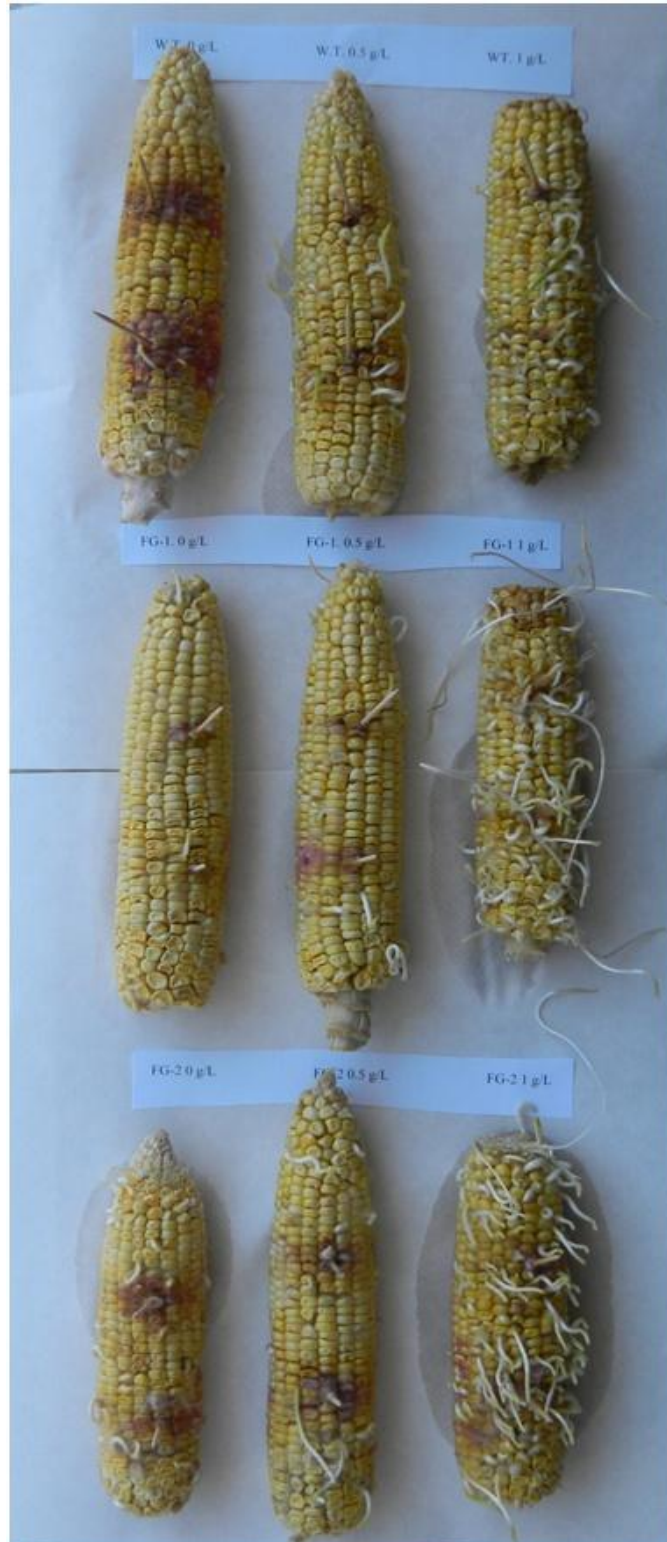
$$*R_F = \frac{EC_{50 \text{ανθεκτικού}}}{EC_{50 \text{αγρίου}}}$$

**Πίνακας 2.**

Αξιολόγηση της ευαισθησίας των στελεχών του μύκητα *F. graminearum* στο carbendazim (Image 50% WP) κατόπιν διαφόρων επεμβάσεων σε σπάδικες γλυκοκαλάμποκου. Οι τιμές του πίνακα αντιστοιχούν στα ποσοστά % του μάρτυρα (χωρίς μυκητοκτόνο) τα οποία υπολογίστηκαν από το μέσο όρο του αριθμού των μολυσμένων σπόρων που πάρθηκαν από δύο σημεία του σπάδικα. Η πρώτη επέμβαση αντιστοιχεί στην προτεινόμενη δόση που αφορά επεμβάσεις σε σπόρους καλαμποκιού.

	<b>Συγκέντρωση carbendazim (g/L)</b>			
	0.5		1	
	28 ημέρες	34 ημέρες	28 ημέρες	34 ημέρες
w.t.	97.6	88.6	100	100
FG-1	37.5	73	75	76.1
FG-2	58.6	48.7	51.7	38.7
FG-3	36.3	54.1	81.8	80
FG-4	68	44.5	72	36.1
FG-5	70	44.3	80	84.9
FG-6	91.6	82.9	91.6	80.6

**Εικόνα 2.** Εμφάνιση σήψεων στους σπόρους καλαμποκιού 38 ημέρες μετά τη μόλυνση των σπαδικών με το άγριο στέλεχος (πάνω σειρά) και τα ανθεκτικά στελέχη FG-1 και FG-2 (μεσαία και κάτω σειρά αντίστοιχα) του μύκητα *F. graminearum*. Από αριστερά προς τα δεξιά: σήψεις σε σπάδικες χωρίς εμβάπτιση σε carbendazim (μάρτυρας), σήψεις σε σπάδικες που εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα carbendazim 0.5 g/L και 1 g/L.



**Εικόνα 3.** Εμφάνιση σήψεων στους σπόρους καλαμποκιού 38 ημέρες μετά τη μόλυνση των σπαδικών με το άγριο στέλεχος (πάνω σειρά) και τα ανθεκτικά στελέχη FG-3 και FG-4 (μεσαία και κάτω σειρά αντίστοιχα) του μύκητα *F. graminearum*. Από αριστερά προς τα δεξιά: σήψεις σε σπάδικες χωρίς εμβάπτιση σε carbendazim (μάρτυρας), σήψεις σε σπάδικες που εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα carbendazim 0.5 g/L και 1 g/L.



**Εικόνα 4.** Εμφάνιση σήψεων στους σπόρους καλαμποκιού 38 ημέρες μετά τη μόλυνση των σπαδικών με το άγριο στέλεχος (πάνω σειρά) και τα ανθεκτικά στελέχη FG-1 και FG-2 (μεσαία και κάτω σειρά αντίστοιχα) του μύκητα *F. graminearum*. Από αριστερά προς τα δεξιά: σήψεις σε σπάδικες χωρίς εμβάπτιση σε carbendazim (μάρτυρας), σήψεις σε σπάδικες που εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα carbendazim 0.5 g/L και 1 g/L.



Στις 38 ημέρες , φαίνεται ότι η παρεμποδιστική ικανότητα του carbendazim και στις δύο συγκεντρώσεις μειώθηκε σε όλα τα στελέχη παρομοίως με αυτή που σημειώθηκε στις 28 ημέρες. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το άγριο φαίνεται να ανακάμπτει ελαφρώς ( $\approx 10\%$ ) σε σχέση με τον μάρτυρα (χωρίς μυκητοκτόνο), δείχνουν ότι πιθανώς ένα μέρος της αρχικής ποσότητας του carbendazim αποδομήθηκε κατά τη διάρκεια των 38 ημερών επώασης.

Ένα ενδιαφέρον αποτέλεσμα που προέκυψε από τα πειράματα αυτά είναι το γεγονός ότι στους σπάδικες που είχαν δεχτεί επέμβαση με το μυκητοκτόνο παρατηρήθηκε μεγάλη βλαστική ικανότητα των σπόρων τους. Αυτή η εικόνα φαίνεται περισσότερο έντονη στη συγκέντρωση του 1 g/L (*Εικόνες 2.,3.,4.*).

## 9. Μοριακός χαρακτηρισμός των γονιδίων $\beta_1$ και $\beta_2$ -τουμπουλίνης

### 9.1. Εισαγωγή

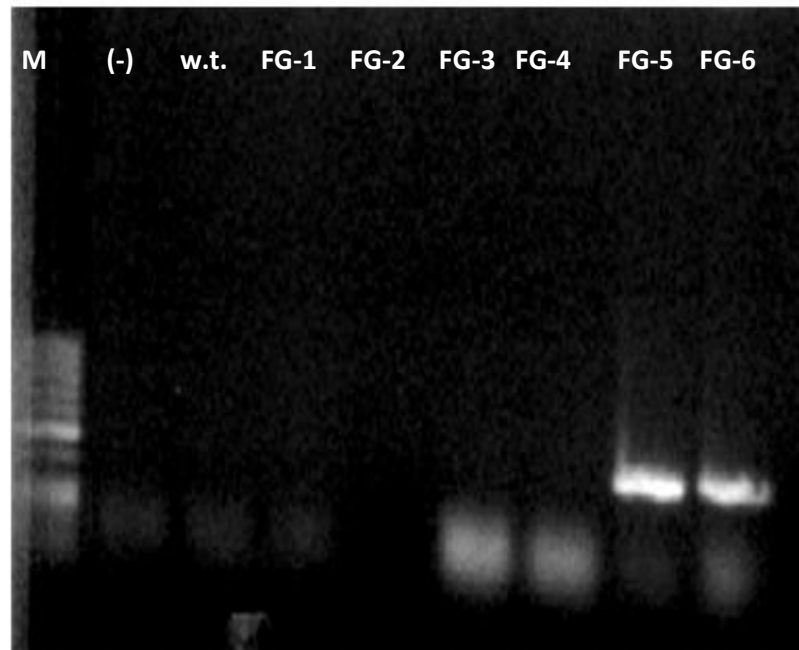
Έχοντας σε προηγούμενες μελέτες χαρακτηρίσει τα ανθεκτικά στο carbendazim στελέχη του μύκητα *F. graminearum* ως προς την επίδραση της ανθεκτικότητας στις παραμέτρους προσαρμοστικότητας τους σε σχέση με τις αντίστοιχες του αγρίου στελέχους, στη παρούσα εργασία προχωρήσαμε στην μελέτη του μηχανισμού ανθεκτικότητας των ανθεκτικών στελεχών. Συγκεκριμένα οι μελέτες αυτές αφορούσαν δύο προσεγγίσεις : α) τη μοριακή και β) τη βιοχημική διερεύνηση της ανθεκτικότητας των ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *F. graminearum* στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα.

Η πορεία μελέτης του μηχανισμού ανθεκτικότητας ξεκίνησε με την διερεύνηση ύπαρξης γνωστών μεταλλαγών των ανθεκτικών στελεχών στο γονίδιο της  $\beta$ -τουμπουλίνης που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της θέσης δράσης του παρεμποδιστού carbendazim. Η κατεύθυνση της πορείας αυτής δόθηκε από αποτελέσματα προηγούμενων πειραμάτων στα πλαίσια μελέτης που εκπονήθηκε στο εργαστήριο της γεωργικής φαρμακολογίας του Γ.Π.Α. και, τα οποία δείχνουν ότι τα ανθεκτικά στο carbendazim στελέχη να παρουσιάζουν μετρίως έως πολύ επίπεδα ανθεκτικότητας σε σχέση με του αγρίου στελέχους, γεγονός που δημιουργεί την υπόθεση για ύπαρξη του μηχανισμού αλλαγή στη θέση δράσης. Επίσης, ισχυρή ένδειξη για αυτή την υπόθεση υπήρξε το γεγονός ότι τα ανθεκτικά στελέχη δεν παρουσίαζαν διασταυρωτή ανθεκτικότητα με ενώσεις άλλων ομάδων μυκητοκτόνων, πέραν των βενζιμιδαζολικών ενώσεων (carbendazim, thiabendazole, benomyl). Ήτοι, φαίνεται ότι υπάρχει κάποιος μηχανισμός εξειδικευμένος που να οδηγεί σε απώλεια της ευαισθησίας των μεταλλαγμένων στελεχών στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα.

### 9.2. Διαγνωστική PCR

Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ύπαρξης γνωστών μεταλλαγών για το γονίδιο της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης στα ανθεκτικά στελέχη μέσω της χρήσης της τεχνικής Allele Specific PCR. Η επιλεκτική ενίσχυση των πιθανών μεταλλαγών στις θέσεις 167 (αντικατάσταση της φαινυλανίνης με τυροσίνη) 198 (αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος με γλουταμίνη) και 200 (αντικατάσταση της φαινυλανίνης με τυροσίνη) ελέγχθηκε μέσω της χρήσης εξειδικευμένων εκκινητών αντίστροφης

ενίσχυσης, 167-RB, 198-RB 200-RB και του κοινού εκκινητή πρόσθιας ενίσχυσης, Tub2-F. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 5*, η μεταλλαγή F200Y ανιχνεύτηκε στη περίπτωση των στελεχών FG-5 και FG-6 όπου παρατηρήθηκε προϊόν της PCR με το αναμενόμενο μέγεθος 498-bp. Δεν ανιχνεύτηκε καμία από τις υπόλοιπες μεταλλαγές (F167Y και E198A, 398 και 494-bp αντίστοιχα)σε κανένα από τα ανθεκτικά στελέχη.



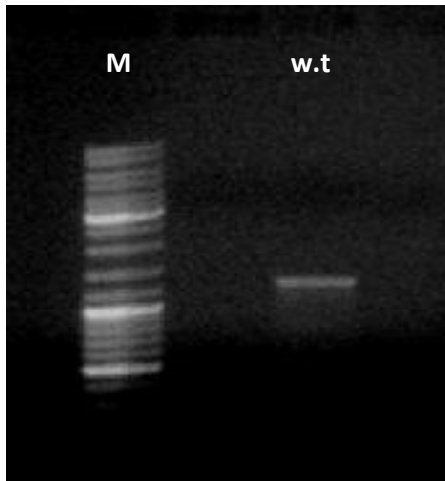
**Εικόνα 5.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1% προϊόντων PCR με ενίσχυση συγκεκριμένων κωδικονίων 167, 198 και 200 του γονιδίου της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης του αγρίου στελέχους και των ανθεκτικών στελεχών, χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών 167-RB/Tub2-F, 198-RB/Tub2-F 200-RB/Tub2-F αντίστοιχως. M: 50 bp Ladder.

### 9.3. Αλληλούχιση του γονιδίου της $\beta_1$ και $\beta_2$ -τουμπουλίνης

Προκειμένου να διερευνήσουμε τη πιθανότητα ύπαρξης άλλων μεταλλαγών ανθεκτικότητας, επιχειρήθηκε σε πρώτο στάδιο η απομόνωση και η ταυτοποίηση μέρους του γονιδίου της  $\beta_1$  και  $\beta_2$ -τουμπουλίνης του αγρίου καθώς και των ανθεκτικών στελεχών. Για τον σκοπό αυτό έγινε ενίσχυση του γονιδίου με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR και η σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών μεταξύ του ευαίσθητου και των ανθεκτικών στελεχών.



Η ενίσχυση μέρους του γονιδίου της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης του αγρίου στελέχους με τη χρήση δοκιμών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μέσω των εξειδικευμένων εκκινητών Tub2-seq-F και Tub2-seq-R έδωσε το αναμενόμενο κομμάτι μεγέθους 1,306-bp (Εικόνα 6).



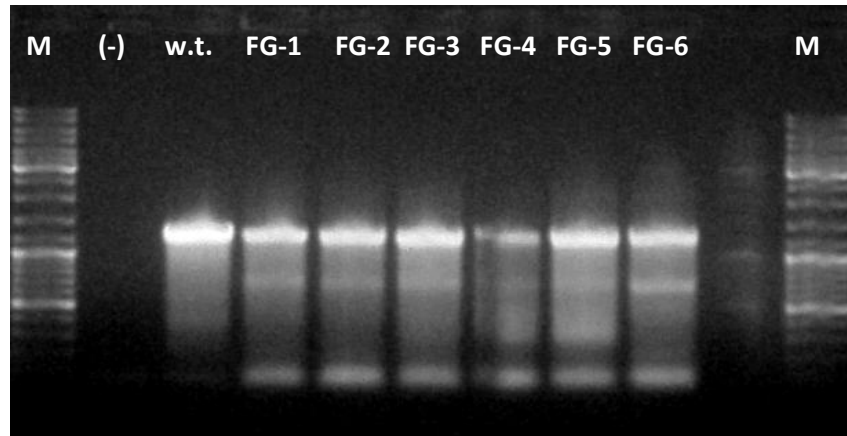
**Εικόνα 6.** Ηλεκτροφόρηση αгарόζης 1% προϊόντων PCR με ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης δειγμάτων cDNA του αγρίου στελέχους του μύκητα *F. graminearum*.

Τα προϊόντα της αλληλούχισης των γονιδίων της  $\beta_1$  και  $\beta_2$ -τουμπουλίνης του ευαίσθητου και των ανθεκτικών στελεχών φαίνονται στις Εικόνες 9, 10). Το συνολικό μέγεθος του γονιδίου του αγρίου στελέχους που αλληλουχήθηκε ήταν πάνω από 1200 ζεύγη βάσεων (>92% ανακτησιμότητα) (Εικόνες 7, 8). Η σάρωση της αλληλουχίας αυτής σε γνωστή βάση δεδομένων του NCBI στο διαδίκτυο εμφάνισε ότι υπήρχε ομολογία άνω του 95% της μεταφραζόμενης αμινοξικής αλληλουχίας των δειγμάτων μας με το αντίστοιχο τμήμα της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης για τον μύκητα *F. graminearum* που είναι καταχωρημένη στη βάση δεδομένων (Accession number: ABE68208.1) . Υψηλά ποσοστά ομολογίας φάνηκαν και σε όλα τα ανθεκτικά στελέχη (95-99%).

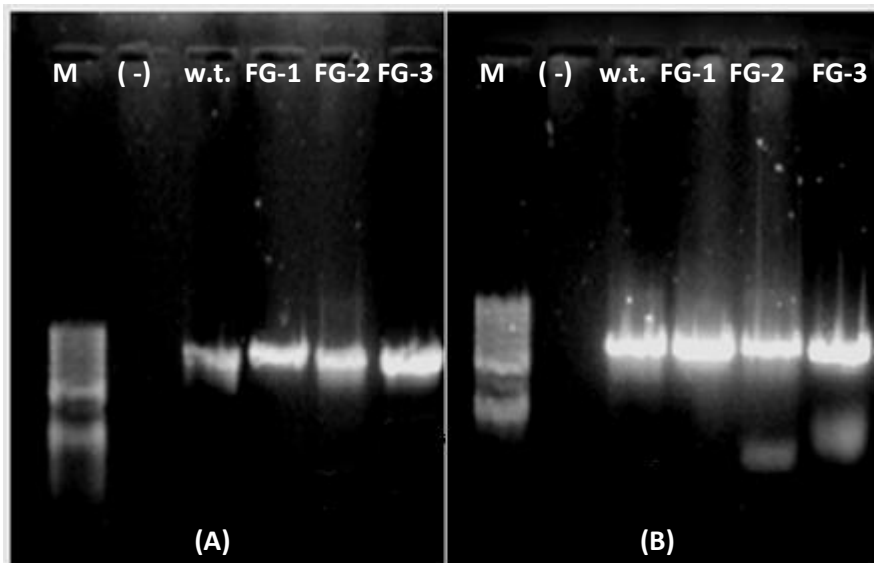


ATGCGTGAATTTAAGATTTAACTTCTGACTGAGCGCTTTGTCACTCAACCAAACTGACTTTTTCTTCAGGTCCACGTCCAGTGGCCAAATGTGTAAAGGGCGAAACCCACCACCAAAAAACCTTGAAGGCATATGTGAGTTGATGAATCTTTG 160  
 H R E I Y R F N F . L T L C H S T K L T F S F S G P R P G R P H C K G E P T T K K N L E G H H L S . . I F  
 TAGGGCAACCAAGTCGGTTCAGGCTCTGGTAAAGTCTTTTTTATAAGCTTTAAAGCTCAATTGAATCTTGAACCTAGACTAACCGTATTTCCAGBTCCACCCTCCAAAGBAGCACGGTATTGATGGCAGCGGCGGTGAGTCAACAACGTCACCGA 320  
 Y G Q P S R F Q L L V S L F L . A L S S I E S L K P R S N R I S R S T Y S K E H G I D G S G A . . Y N M V T D  
 CTTTATGCTCACACTTTTGTCTAACCTGAAKATCAGATACCAAGGAACTTCAGACCAGCGGTGAGCGCATCAACGTCTACTTTGCTGAGGTGAGTACCAATTCAGATATATTCGCAATTCGCAATTCAGGTGATTCCTAACCTTTCTCAGGGCGGCA 480  
 F H P H T F Y . P E H Q I P R N F R P A A . A H Q R L L C . G E Y Q L Q Y I A I A N F N Y I P N F L R A A  
 ACBAAABTACBTCCCCCTGCTGTCTGTGATCTTGTGATCCGGCCCAAGGATGACCATCCGCGCGGCGCTCTAGGCCAGCTGTTCGCGCGGTGAGGCCAAGTCCGGAACAACCTGGGCCAAGGGTTCATTACACCAGGG 640  
 T T S T S P Y L F W S I L S P A P R H P S A P A L . A S C S A P T T S S P Y R P Y P E T T G P R Y I T P R  
 TGCCGAGCTGTTGAGGAAGGCCATCGATGTTGTTCGTCGCGAGGTTGAGAACTGTGAACTTCCAGGTTTCCAGCTGACGCACTCTCTCGCGGTGAGTACCGGTTCGCGTATGGAAACGCTTCTGTGTCGCAAGATCCGCGAGGAGTTCGCCGATCGC 800  
 Y P S S L R R P S H L F Y A R L R T Y T T F R Y S S . R T L S A V Y P Y P W E R F F C P R S A R S S P I A  
 ATGATGGCCACCTTTTCCGTTATGCCCTGCGCCAGGTTTCCGACACCGTTGTGAACTTACAAACGCACTTTGTCTGTAAACCAAGCTCTGCGAAGACTTCTGTATCGATTAACGAGGCTCTGTACGATATCTACGAGAGGACCCCTCA 960  
 . W P P F P L C P R P R F P T P L L N L T T P L C L . T S S S R T L T R P S Y S I T R L C T I S T R G P S  
 AGATCGCCGATCTTCGTAACGCGGATCTCAACTACCTGATTTCCACCCTCATGGCCGCTGTGACGACATGTTTCGATTTCCCGGACAGCTCAACTCGGATGTGCGAAAGCTCGCTTTAACATGATTCGCTCCCGGACTTCACITTCATGATCGG 1120  
 R S P I L R T P I S T T . F P P S W P Y . R H Y S D S P D S S T R I C E S S L L T . F R S P D F T S S W S  
 ATTTGCGCTGTGACTGCGCAACATGAAAGCTTTCCAGCAGTATTCGCGGCTTGGCTGAGCAGATTTTGGAAACAAGAAATCATGCGGCTTGGCTGCGCAACGAGCATACCTGCTGTTCGCGCACTTGTAAAGTTTTGAAACTG 1280  
 D L P L . L Y A T . R L S S T L P S P A L L S R F L T T R T S W P L P I S A T D D T S L Y P P S C K F . N .  
 ACCAAATTCAAAANAACCAACAACTAAATGAAATTCGCCGCGGAGCTCTCTCAACAAGGAGATTTGAGGACAGATGCTCAAGTTCAGACCAAGACTCCGAGTCTTGTGACTGGATCCCAACAAGCTCCAAACTTCGCTGTTCCTCCGTGC 1440  
 P N F K K H Q N . . N S Q P R T S L N K G D . G P D A Q G S D Q E L R Y L C R L D P Q O R P N F R L F R A  
 TCCCGCGCTCTGACATGTCCGCGCACTTCCGTTGGCACTCCACGCGCTCCAGGAGATCTTCAGCTGTTCAGGACAGTTCCTCAGCCATGTTCCGAGCCAGTTCCTTGCATTTGATTCACAGCGAGGTAATGGACGATGAAATTCACCGAG 1600  
 S P R S R H Y R H F R W Q L H R R P G D L Q A C R R P Y L S H Y P T Q G F L A L Y H K R G Y G R D G I H R  
 GCCCAGTCCAACTTGCACGACTTGGTTTTCCGAGTACCAAGCAATACCAAGACGCGCCGACATCGACGACGAGGCTGAGGATACGAGGAGGTTGAAATTTGGTTGAGGAGGCTTGGTTAACAATCATGACTATTGGTTTATA 1760  
 G P Y Q L A R L G F R Y P A I P R R R H R R R G . G V R G G . A R G V R G L N I G W E R W L T S . L F G L Y  
 TCCCTCACTACCCCTCAAAATGTTTTCTCATCCCTCTTCGTTATACACAC 1812  
 P H Y Y P Q N Y S H P L L R Y T H

**Εικόνα 8.** Αλληλουχία νουκλεοτιδικού τμήματος του γονιδίου β<sub>2</sub>-τουμπουλίνης του μύκητα *F. graminearum* όπως προέκυψε από το συνδυασμό των τμημάτων που ανακτήθηκαν από το ζεύγος εκκινητών Tub2-seq-F/Tub2-seq-R. Οι θέσεις των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη σημειώνονται με βέλη.



**Εικόνα 9.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αραρόζης 1% προϊόντων PCR με ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της β<sub>2</sub>-τουμπουλίνης δειγμάτων gDNA του αγρίου στελέχους και των 6 ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *F. graminearum*.



**Εικόνα 10.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αραρόζης 1% προϊόντων PCR με ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της β<sub>1</sub>-τουμπουλίνης δειγμάτων cDNA του αγρίου στελέχους και ανθεκτικών στελεχών FG-1, FG-2 και FG-3 (από αριστερά προς τα δεξιά) του μύκητα *F. graminearum* με τα ζεύγη εκκινητών FGtub1-F1/ FGtub1-R1 (A) και FGtub1-F2/ FGtub1-R2 (B).

Στη συνέχεια οι αμινοξικές αλληλουχίες του προϊόντος της αλληλούχισης των ανθεκτικών στελεχών, μεταφράστηκαν σε νουκλεοτιδική αλληλουχία και κατόπιν συγκρίθηκαν με αυτή του αγρίου στελέχους. Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε μέσω του προγράμματος clustalW. Η σύγκριση αυτή αποκάλυψε συνολικά δύο διαφορετικές υποκαταστάσεις αμινοξέων με τα αντίστοιχα τους κωδικόνια (Πίνακας 3). Και στις δύο περιπτώσεις μεταλλαγών, υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που μαρτυρούν την συσχέτιση τους με ανθεκτικότητα διαφόρων φυτοπαθογόνων μυκήτων καθώς και άλλων οργανισμών στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. Συγκεκριμένα, η πρώτη μεταλλαγή βρέθηκε στα στελέχη μετρίου επιπέδου ανθεκτικότητας FG-3 και FG-4 που είχε ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος ιστιδίνη σε τυροσίνη στη θέση του κωδικονίου 6 της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης. Στη δεύτερη περίπτωση παρουσιάστηκε για τα στελέχη μετρίου επιπέδου ανθεκτικότητας FG-5 και FG-6 η αντικατάσταση της φαινυλανίνης με τυροσίνη στη θέση του κωδικονίου 200, γεγονός που επιβεβαίωσε την ανίχνευση της σημειακής αυτής μεταλλαγής με τη διαγνωστική PCR.

**Πίνακας 2.**

Μεταλλαγές που εντοπίστηκαν στην αλληλουχία των γονιδίων που κωδικοποιούν τη  $\beta_2$  και  $\beta_1$ -τουμπουλίνη στα ανθεκτικά στο carbendazim στελέχη του μύκητα *F. graminearum*.

στελέχος	Επίπεδο ανθεκτικότητας	Υποκατάσταση αμινοξέος			
		6		200	
		$\beta_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_1$
W.T.	S	His	His	Phe	Phe
FG-1	HR	His	His	Phe	Phe
FG-2	HR	His	His	Phe	Phe
FG-3	MR	<b>Asp</b>	His	Phe	Phe
FG-4	MR	<b>Asp</b>	His	Phe	Phe
FG-5	MR	His	His	<b>Tyr</b>	Phe
FG-6	MR	His	His	<b>Tyr</b>	Phe

<sup>1</sup>S: ευαίσθητο, HR:Υψηλού επιπέδου, MR:Μετρίου επιπέδου ανθεκτικότητας

<sup>2</sup>Η αρίθμηση των αμινοξέων έγινε με βάση τη μετάφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί της  $\beta$ -τουμπουλίνης στο μύκητα *F. graminearum*.

		His 6	
F. graminearum		MREIVH	LQGTGQCGNQIGAAF
F. verticillioides		MREIVH	LQGTGQCGNQIGAAF
F. culmorum	----	VH	LQGTGQCGNQIGAAF
B. cinerea	----	VH	LQGTGQCGNQIGAAF
*****.*****:*****.**			
F. graminearum		FNEASGNKYVPR	AVLVDLEPGTMDAVRAGPFGQLFRPDNFVFGQSGAGNN 100
F. verticillioides		FNEASGNKYVPR	AVLVDLEPGTMDAVRAGPFGQLFRPDNFVFGQSGAGNN 100
F. culmorum		FNEASGNKYVPR	AVLVDLEPGTMDAVRAGPFGQLFRPDNFVFGQSGAGNN 96
B. cinerea		FNEASGNKYVPR	AVLVDLEPGTMDAVRAGPFGQLFRPDNFVFGQSGAGNN 96
*****			
F. graminearum		WAKGHYTEGAEL	VLDQVLDVVRREAEGCDCLQGFQITHSLGGGTGAGMGTL 150
F. verticillioides		WAKGHYTEGAEL	VLDQVLDVVRREAEGCDCLQGFQITHSLGGGTGAGMGTL 150
F. culmorum		WAKGHYTEGAEL	VLDQVLDVVRREAEGCDCLQGFQITHSLGGGTGAGMGTL 146
B. cinerea		WAKGHYTEGAEL	VLDQVLDVVRREAEGCDCLQGFQITHSLGGGTGAGMGTL 146
*****			
		Phe 200	
F. graminearum		LISKIREEF	PDRMMATFSVVPSPKVS
F. verticillioides		LISKIREEF	PDRMMATFSVVPSPKVS
F. culmorum		LISKIREEF	PDRMMATFSVVPSPKVS
B. cinerea		LISKIREEF	PDRMMATFSVVPSPKVS
*****			

**Εικόνα 11.** Στοίχιση αμινοξέων της πρωτεΐνης της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης με τη χρήση του λογισμικού Clustal W. Οι θέσεις που εμφανίζονται με αστερίσκο υποδηλώνουν ταύτιση των αμινοξέων. Οι θέσεις των μεταλλαγών που ανιχνεύτηκαν σημειώνονται στα μαύρα πλαίσια. Οι αριθμοί καταχώρησης στη βάση δεδομένων των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη στοίχιση είναι: *F. graminearum* ABE68208.1, *F. verticillioides* AGL95857.1, *F. culmorum* ACA66198.1, *B. cinerea* ADW78883.1.

Καμία μεταλλαγή στο τμήμα του γονιδίου της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης των υψηλού επιπέδου ανθεκτικών στελεχών FG-1 και FG-2 που αλληλουχίστηκε δεν ανιχνεύτηκε (Πίνακας 3). Στην *Εικόνα 11* φαίνεται τμήμα της πρωτοταγούς δομής του γονιδίου της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης σε στοίχιση με το αντίστοιχο γονίδιο σε άλλους φυτοπαθογόνους μύκητες.

Υψηλά ποσοστά ανακτησιμότητας φάνηκαν και με το γονίδιο της  $\beta_1$ -τουμπουλίνης. Η σάρωση της αλληλουχίας των γονιδίων του αγρίου στελέχους και των ανθεκτικών στελεχών σε γνωστή βάση δεδομένων στο διαδίκτυο εμφάνισε ότι υπήρχε

ομολογία άνω του 95% της μεταφραζόμενης αμινοξικής ακολουθίας για όλα τα στελέχη με το αντίστοιχο τμήμα της β<sub>1</sub>-τουμπουλίνης για τον μύκητα *F. graminearum* που είναι καταχωρημένη στη βάση δεδομένων.

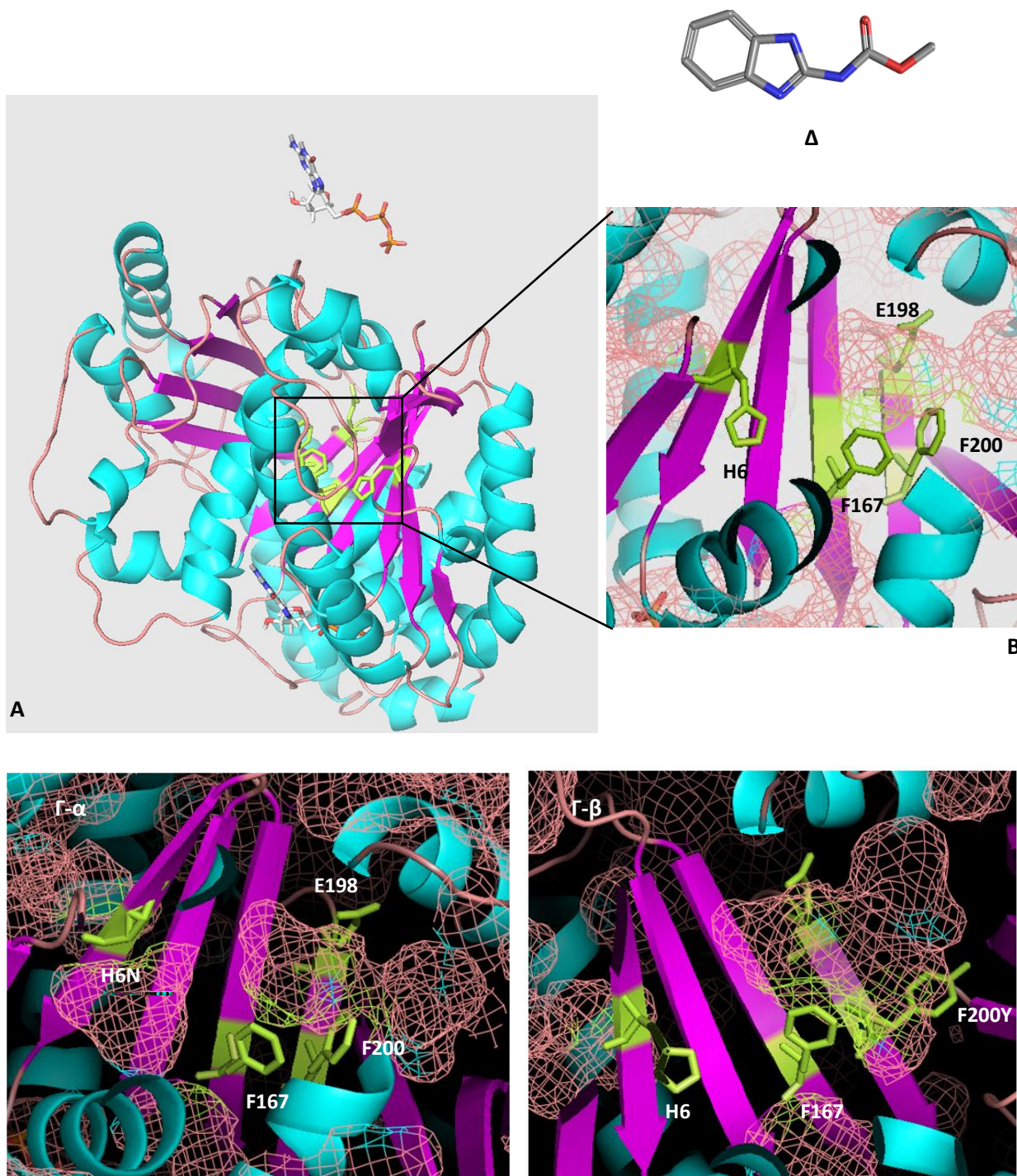
Η σύγκριση των νουκλεϊδικών αλληλουχιών των ανθεκτικών στελεχών μέσω του προγράμματος clustalw δεν έδειξε καμία μεταλλαγή δίνοντας 100% ομολογία με την αντίστοιχη αλληλουχία του αγρίου στελέχους.

#### 9.4. Μοριακή μοντελοποίηση της θέσης πρόσδεσης του μυκητοκτόνου

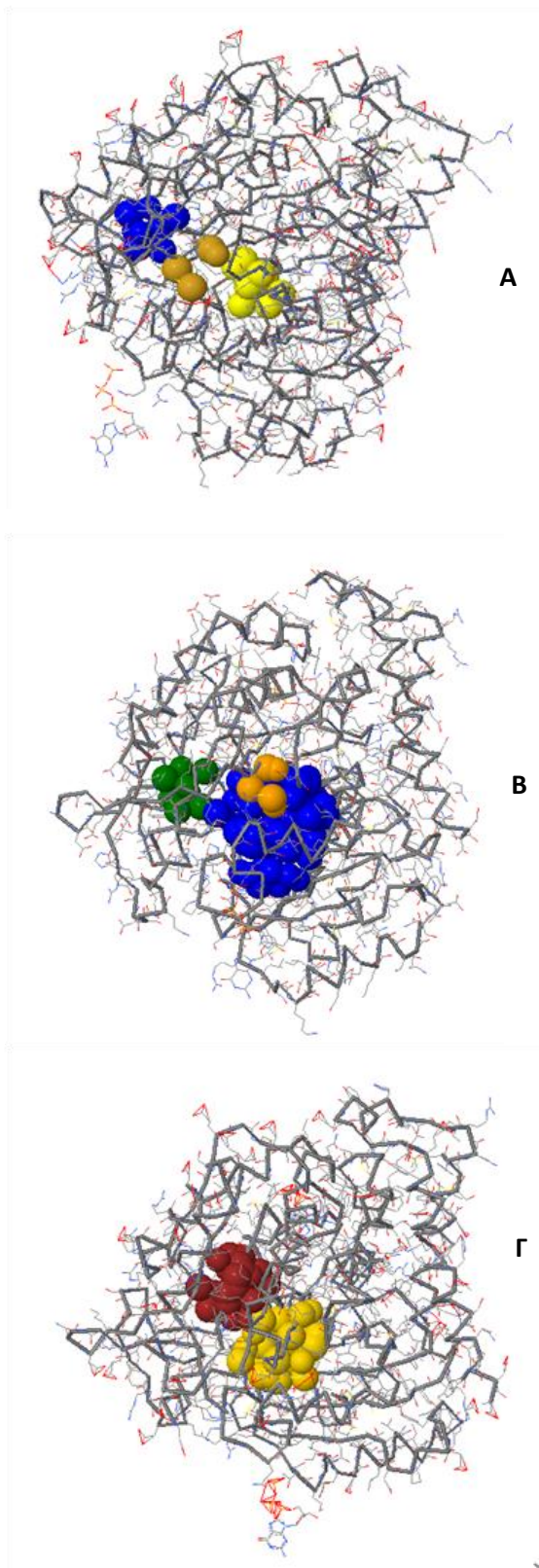
Η αξιοποίηση της μοριακής μοντελοποίησης *in silico* έχει αποτελέσει ένα αρκετά σημαντικό εργαλείο στο χαρακτηρισμό του τρόπου πρόσδεσης των βενζιμιδαζολικών ενώσεων στη β-τουμπουλίνη (Robinson και συνεργάτες, 2004) καθώς επίσης την παραπέρα εξήγηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας λόγω αλλαγή στη θέση δράσης στις ενώσεις αυτές (Li και Yang, 2007; Qiu et al, 2010; Qiu et al, 2012). Αυτή τη προσέγγιση ακολουθήσαμε και στη παρούσα εργασία σε μια προσπάθεια να εξηγήσουμε την επίδραση των δύο μεταλλαγών ανθεκτικότητας που ανηχνεύθηκαν στα 4 από τα 6 ανθεκτικά στελέχη.

Το τρισδιάστατο μοντέλο της β<sub>2</sub>-τουμπουλίνης του ευαίσθητου στελέχους του μύκητα *F. graminearum* φαίνεται στην *Εικόνα 12.A*. Στη πρωτεΐνη διακρίνονται δύο β-λωρίδες (φούξια) οι οποίες περιβάλλονται από 15 α-έλικες (τυρκουάζ). Πάνω στη δομή έχουν σημειωθεί τα αμινοξέα 6 και 200 στα οποία βρέθηκαν οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας στα 4 στελέχη του μύκητα *F. graminearum*. Επίσης διακρίνεται και το υπόστρωμα GTP όπως αυτό έχει συγκρυσταλλωθεί πάνω στη δομή της πρωτεΐνης. Στη δομή έχουν σημειωθεί και δύο άλλα αμινοξέα στις θέσεις 198 και 167 τα οποία αποτελούν συνήθη εμπλεκόμενα σε αρκετές περιπτώσεις ανθεκτικών μυκήτων στα βενζιμιδαζολικά. Παρατούμε μεταξύ των αμινοξέων στις θέσεις 167, 198 και 200 να δομείται μία κοιλότητα η οποία είναι αρκετά πιθανό, όπως υποστηρίζεται (Qiu και συνεργάτες, 2010), να αποτελεί κατάλληλη θέση για την προσάραξη του carbendazim (*Εικόνα 12.B*). Αντιθέτως, το αμινοξύ στη θέση 6 που βρέθηκε η μεταλλαγή ανθεκτικότητας στα στελέχη FG-3 FG-3 εντοπίζεται σε μια κοιλότητα πλησίον αυτής που σχηματίζεται από τα παραπάνω τρία αμινοξέα. Η ιστιδίνη στη θέση 6 φαίνεται να ασκεί άμεση επίδραση με το φυσικό υπόστρωμα GTP της β-τουμπουλίνης, καθώς εντοπίζεται πλησίον της πτυχωτής επιφάνειας όπου υπάρχει και το υπόστρωμα. Από την άλλη, αλληλεπίδραση με το GTP υπάρχει και με το αμινοξύ στη θέση 200 ωστόσο γίνεται έμμεσα λόγω μακρινότερης απόστασης μεταξύ τους. Το ενδιαφέρον που παρατηρείται στην *Εικόνα 12.Γ* είναι ότι η αντικατάσταση της ιστιδίνης 6 με την ασπαραγίνη στη θέση 6 επιφέρει μια δομική αλλαγή η οποία φαίνεται να επιδρά σημαντικά με τα υπόλοιπα 3 αμινοξέα, μέσω της δημιουργίας





**Εικόνα 12.** Α) χωροδιαταξικό μοντέλο της β<sub>2</sub>-τουμπουλίνης του μύκητα *F. graminearum*, Β) στερεοδιάταξη των κύριων αμινοξέων (πράσινο) που συμβάλλουν στη διαμόρφωση της εικαζόμενης θέσης προσάραξης των βενζιμιδαζολικών πάνω στη δομή της β-τουμπουλίνης, Γ) στερεοδιάταξη των μεταλλαγμένων θέσεων πρόδεσης της β<sub>2</sub>-τουμπουλίνης των ανθεκτικών στελεχών: α) H6N και β) F200N, Δ) τρισδιάστατη δομή του carbendazim. Οι κόκκινες και οι μπλέ περιοχές αντιστοιχούν στα σημεία με τα οποία μπορεί το μόριο να αλληλεπιδρά μέσω δεσμών υδρογόνου με τα διάφορα αμινοξέα της β-τουμπουλίνης.



**Εικόνα 13.** Χωροδιαταξικό μοντέλο της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης του μύκητα *F. graminearum* όπου απεικονίζονται οι θήκες (=κοιλότητες) που διαμορφώνονται από τα αμινοξέα ιστιδίνη στη θέση 6 (κίτρινο), φαινυλανίνη στη θέση 167 (μπλέ), γλυκίνη στη θέση 198 (καφέ) και φαινυλανίνη στη θέση 200 (μπλέ) της πρωτεΐνης. Οι θήκες απεικονίζονται ως ένα σύνολο σφαιρών που δημιουργούνται στο εσωτερικό της θέσης των αμινοξέων και αντιστοιχούν στον θεωρητικό όγκο που μπορεί να καταληφθεί από τα μόρια του υποστρώματος. Α) οι θήκες των τεσσάρων αμινοξέων του αγρίου στελέχους του μύκητα *F. graminearum*. Οι δύο φαινυλανίνες των θέσεων 167 και 200 απεικονίζονται σε μια ενιαία μπλέ θήκη, Β) οι θήκες της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης με τη μεταλλαγή F200Y. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η ιστιδίνη στη θέση 6. Τα αμινοξέα στις θέσεις 167, 200 απεικονίζονται σε μία ενιαία μπλέ θήκη η οποία βρίσκεται πλησίον της γλυκίνης (καφέ) στη θέση 198, Γ) οι θήκες της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης με τη μεταλλαγή H6N. Με μπορντό χρώμα απεικονίζεται η ασπαραγίνη στη θέση 6 ενώ τα υπόλοιπα τρία αμινοξέα στις θέσεις 167, 198 και 200 εγλωβίζονται σε μια ξεχωριστή και ενιαία κίτρινη θήκη.

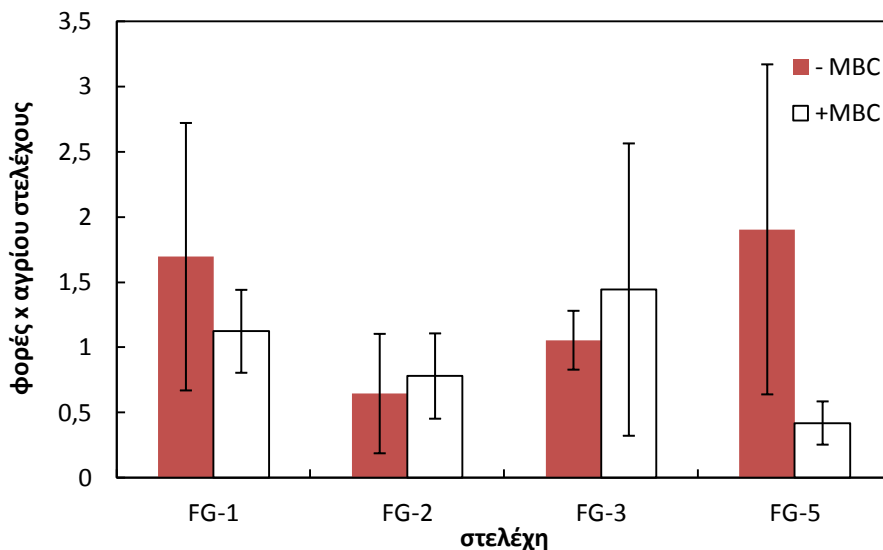
ενός είδους φραγμού πλησίον αυτών. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις βλέπουμε πάλι να επέρχονται όταν υπάρχει η αντικατάσταση της φαινυλαλίνης με την τυροσίνη στη θέση 200. Σε αυτή τη περίπτωση η κύρια επίδραση φαίνεται να γίνεται με τη γειτονική θέση 167 που υπάρχει η φαινυλανίνη. Εν συνεχεία οι μεταλλαγές αυτές στις θέσεις 6, 198, 167 και 200 υποβλήθηκαν σε μελέτες με τη χρήση του λογισμικού CASTp το οποίο απεικονίζει τις κοιλότητες πρόσδεσης που υπάρχουν στις θέσεις αυτές (*Εικόνα 13.*) Μέσω αυτής της ανάλυσης βλέπουμε ότι η μεταλλαγή στη θέση 200 οδηγεί στη δημιουργία μιας ευρύτερης και ενιαίας κοιλότητας (*Εικόνα 13.B*) η οποία εγκλωβίζει τις κοιλότητες των γειτονικών αμινοξέων που αλληλεπιδρούν με τα μόρια του βενζιμιδαζολικού, όπως αυτά στις θέσεις 167, 165 και 198. Αυτό δείχνει ότι η μεταλλαγή F200Y αυξάνει την ικανότητα της υδρόφιλης τυροσίνης να αλληλεπιδρά με τα γύρω αμινοξέα περισσότερο εκτεταμένα από ότι η φαινυλανίνη.

#### 4. Έκφραση των γονιδίων $\beta_2$ και $\beta_1$ -τουμπουλίνης

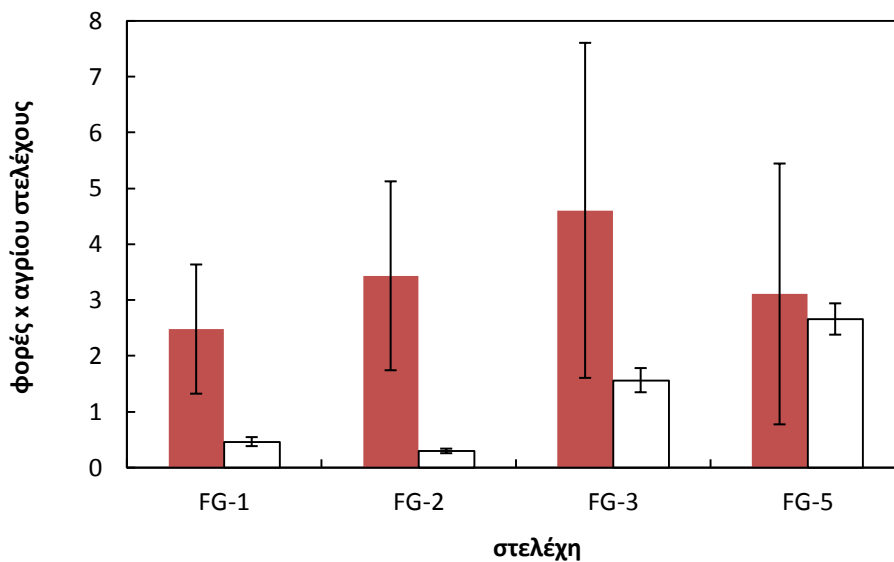
Το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου της  $\beta_1$  και  $\beta_2$ -τουμπουλίνης των ανθεκτικών στελεχών σε σύγκριση με το ευαίσθητο στέλεχος του μύκητα *F. graminearum* εκτιμήθηκε με βάση τη τεχνική Real Time PCR εκτιμώντας την διαφορά στους κύκλους έναρξης της ενίσχυσης επιλεγμένου τμήματος του γονιδίου και ενός γονιδίου αναφοράς κάνοντας χρήση κατάλληλου συνδυασμού γενικών εκκινητών Tub2-RT-F και Tub2-RT-R.

Στα *Γραφήματα 1 και 2* βλέπουμε τα επίπεδα έκφρασης της  $\beta_1$  και  $\beta_2$  τουμπουλίνης των 4 αντιπροσωπευτικών στελεχών σε σύγκριση με του αγρίου στελέχους μετά από επίδραση ή όχι MBC. Παρατηρούμε ότι απουσία παρεμποδιστού, όλα τα ανθεκτικά στελέχη παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης σε σχέση με του αγρίου στελέχους, με επίπεδα να κυμαίνονται από 2.47- 4.6. Τα αντίστοιχα επίπεδα της  $\beta_1$ -τουμπουλίνης παρατηρούμε ότι βρίσκονται σε επίπεδα μικρότερα ή λίγο μεγαλύτερα με εκείνα του αγρίου στελέχους.

Συγκεκριμένα, με τη  $\beta_2$ -τουμπουλίνη, το μετρίου επιπέδου ανθεκτικό στέλεχος FG-3 παρουσίασε τα υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα υπόλοιπα ανθεκτικά στελέχη, ενώ ακολουθούσαν κατά μειούμενη σειρά FG-5, FG-2 και FG-1. Αντίστοιχα, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στη  $\beta_1$ - τουμπουλίνη φάνηκαν με το στέλεχος FG-5. Όταν τα ανθεκτικά στελέχη αναπτύσσονται παρουσία 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MBC, παρατηρούμε να εκφράζουν σε μικρότερα επίπεδα τη  $\beta_2$ -τουμπουλίνη σε σύγκριση με τους μάρτυρες (απουσία MBC). Συγκεκριμένα, στη περίπτωση της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης, τα μικρότερα επίπεδα εμφανίζονται με τα δύο στελέχη FG-1 και FG-2 με ποσοστά 0.45 και 0.29 %, αντίστοιχα, σε σχέση με του αγρίου στελέχους. Η  $\beta_1$ -τουμπουλίνη, παρουσία του MBC, εμφανίζει παράμοια επίπεδα έκφρασης με την  $\beta_2$ -τουμπουλίνη. Το MBC δεν βλέπουμε να επηρεάζει σημαντικά την έκφραση της  $\beta_1$ -τουμπουλίνης, καθώς παρατηρούμε να κυμαίνεται σε παρόμοιες τιμές με τη αντίστοιχη στους μάρτυρες, με εξαίρεση ίσως το στέλεχος FG-5 το οποίο έδειξε περίπου 4.6 φορές λιγότερη έκφραση από ότι στη  $\beta_2$ -τουμπουλίνη.



**Γράφημα 1.** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της β<sub>1</sub>-τουμπουλίνης αντιπροσωπευτικών ανθεκτικών στελεχών σε σχέση με του αγρίου στελέχους μετά την επίδραση (Λευκές μπάρες) ή όχι 10 µg/mL MBC. Οι τιμές που απεικονίζονται αντιστοιχούν στους μέσους όρους τριών επαναλήψεων.



**Γράφημα 2.** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της β<sub>2</sub>-τουμπουλίνης αντιπροσωπευτικών ανθεκτικών στελεχών σε σχέση με του αγρίου στελέχους μετά την επίδραση (Λευκές μπάρες) ή όχι 10 µg/mL MBC. Οι τιμές που απεικονίζονται αντιστοιχούν στους μέσους όρους τριών επαναλήψεων.

## 11. Διερεύνηση του μηχανισμού της αποτοξικοποίησης

### 11.1.Εισαγωγή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η απώλεια της ευαισθησίας ενός παθογόνου σε ένα μυκητοκτόνο μπορεί να προκληθεί μεταξύ των άλλων και από μειωμένη συσσώρευση του μορίου σε τοξικά επίπεδα συγκεντρώσεων είτε μέσω της αποτοξικοποίησης του μορίου σε λιγότερο έως καθόλου τοξικά για το κύτταρο μόρια είτε μέσω της μειωμένης εισόδου ή αυξημένης απέκκρισης του τοξικού μορίου στον υποκυτταρικό στόχο.

Δεδομένου ότι με τις προηγούμενες προσπάθειες των μοριακών αναλύσεων, σε ορισμένα στελέχη δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλαγές του γονιδίου στόχου ( $\beta_2$ -τουμπουλίνης) που να εμπλέκονται στην μείωση της ευαισθησίας του μύκητα *F. graminearum* στο παρεμποδιστή, προχωρήσαμε στη διερεύνηση της αποτοξικοποίησης και της μειωμένης εισόδου/αυξημένης απέκκρισης του τοξικού μορίου ως πιθανούς εμπλεκόμενους μηχανισμούς ανθεκτικότητας των ανθεκτικών αυτών στελεχών στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα.

Με σκοπό να μελετηθεί ο μηχανισμός της αποτοξικοποίησης, έγιναν αρχικά μελέτες που βασιζόνταν στη χρήση παρεμποδιστών των ενζύμων αποτοξικοποίησης και σε μετρήσεις της ενζυμικής δραστηριότητας από εκχυλίσματα κυττάρων. Η συνδυασμένη μελέτη των παραπάνω δύο μεθόδων, όπως άλλωστε υποστηρίζεται (Oppenoorth and Wellining, 1976) για την περίπτωση των εντομοκτόνων, θα αποτελούσε ένα σημαντικό βήμα προς την διερεύνηση ενδεχόμενης εμπλοκής του μηχανισμού αποτοξικοποίησης στο μηχανισμό της ανθεκτικότητας των στελεχών του μύκητα *F. graminearum*.

Αναφορικά με τη πρώτη προσέγγιση, η μελέτη του μηχανισμού αποτοξικοποίησης βασίστηκε στη χρήση ενώσεων που παρεμβαίνουν στη λειτουργία των ενζύμων αποτοξικοποίησης διαφόρων οργανισμών. Τέτοιες ουσίες, που βρίσκουν εφαρμογή κατά κόρον σε περιπτώσεις μελέτης του μηχανισμού ανθεκτικότητας και αύξηση της αποτελεσματικότητας των εντομοκτόνων, ονομάζονται συνεργιστές (synergists). Η χρήση των συνεργιστών αποτελεί μια άμεση μέθοδο αντιμετώπισης της ανθεκτικότητας στη περίπτωση που αυτή οφείλεται σε αποτοξικοποίηση, λόγω της άμεσης παρεμπόδισης του ίδιου του μηχανισμού της ανθεκτικότητας από τον συνεργιστή (Raffa και Priester, 1984).

Δηλαδή ο συνεργιστής από μόνος του δεν επιτελεί κάποια τοξική δράση, τουλάχιστον μέχρι ενός ορίου συγκεντρώσεων, αλλά δρα στα ένζυμα που αποτοξικοποιούν το τοξικό μόριο αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα του τοξικού μορίου. Το αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης λόγω του συνεργιστή καλείται με τον όρο *δυναμοποίηση* (potentiation) (Raffa and Priester, 1984). Για να υπάρχει δυναμοποίηση μεταξύ μιας τοξικής ένωσης A και ενός συνεργιστή B θα πρέπει η συνδυασμένη απόκριση (A+B) των δύο αυτών ενώσεων να είναι μεγαλύτερη της αποκρίσεως εξαιτίας της ένωσης A (A) (Moshkovsky, 1943).

Οι συνεργιστές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη, είναι το piperonyl butoxide με δράση στις μονοϋδραζενάσεις του κυτοχρώματος P-450 [οι οποίες ανήκουν στις οξειδάσες μεικτής λειτουργίας-Mixed Function Oxidases (MFOs)], το diethyl malate (DEM) με δράση στις τρανσφεράσες της γλουταθειόνης και το s,s,s-tributyl phosphorotrithioate (DEF) στις εστεράσες (Παράγραφος 4. Υλικά και Μέθοδοι). Τα ένζυμα στα οποία αυτές οι ενώσεις δρουν είναι τα πιο συνήθη που φαίνεται να εμπλέκονται στην αποτοξικοποίηση διαφόρων φυτοφαρμάκων, κυρίως εντομοκτόνων (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Θα πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι η παραπάνω μέθοδος από μόνη της δεν μπορεί να οδηγήσει σε βέβαια συμπεράσματα. Η ένδειξη παρουσίας δυναμοποίησης δεν αποτελεί επιβεβαίωση για την εμπλοκή των συγκεκριμένων ενζύμων αποτοξικοποίησης. Αυτό σημαίνει ότι η δράση των συνεργιστών σε κάθε οργανισμό δεν είναι και απαραίτητως εκλεκτική με τα συγκεκριμένα ένζυμα (Oppenooth and Welling, 1976). Ένα άλλο πρόβλημα που πρέπει να επισημανθεί είναι η ενδεχόμενη πρόκληση ανεπιθύμητης τοξικότητας είτε λόγω εφαρμογής υψηλών συγκεντρώσεων των συνεργιστών, είτε εξαιτίας έμμεσης δυναμοποίησης λόγω του ότι ο συνεργιστής μπορεί να βελτιώνει την μετακίνηση του παρεμποδιστή στον στόχο δράσης (Oppenooth and Welling, 1976; Raffa and Piester, 1984). Αλλά και η απουσία συνεργιστικής δράσης δεν μπορεί να αποκλείσει την περίπτωση αποτοξικοποίησης- και αυτό διότι σε ορισμένες περιπτώσεις ένα μέρος του συνεργιστή μπορεί να αδρανοποιείται μέσα στον οργανισμό πριν προλάβει να ασκήσει τη δράση του ή επειδή μπορεί να διαπερνά τα κύτταρα του οργανισμού με μικρότερο ρυθμό από ότι ο παρεμποδιστής (Raffa and Piester, 1984).

Πολλά από τα μειονεκτήματα της προηγούμενης μεθόδου μπορούν να αντιμετωπιστούν μέσω των ενζυμικών δοκιμών. Επομένως, προκειμένου να

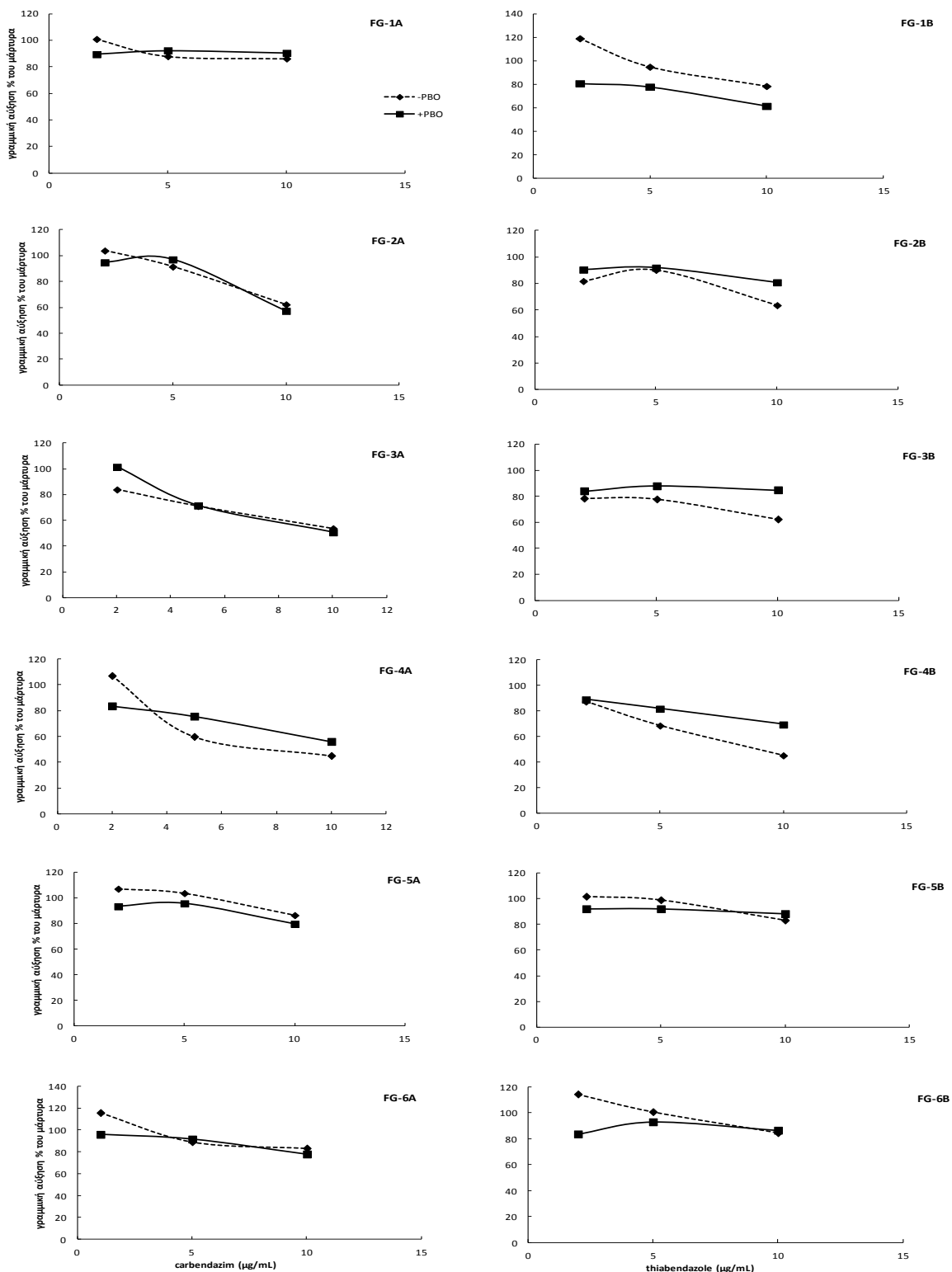
πάρουμε επιπρόσθετες πληροφορίες για το μηχανισμό της αποτοξικοποίησης των ανθεκτικών στελεχών πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέτρησης της ενζυμικής δρασικότητας των ενζύμων αποτοξικοποίησης σε εκχυλίσματα κυττάρων των στελεχών. Ορισμένες αδυναμίες της δεύτερης μεθόδου είναι ότι ορισμένες φορές η εκτίμηση της ενεργότητας κάποιου ενζύμου μπορεί να υποεκτιμηθεί είτε λόγω της παρουσίας στο εκχύλισμα των κυττάρων διαφόρων αναστολέων της δράσης των ενζύμων αποτοξικοποίησης είτε λόγω καταστροφής ή απώλειας μέρους των ενζύμων κατά την πορεία λήψης του εκχυλίσματος (Oppenooth and Welling, 1976).

#### 11.2. Μυκοτοξική δράση βενζιμιδαζολικών παρουσία συνεργιστών

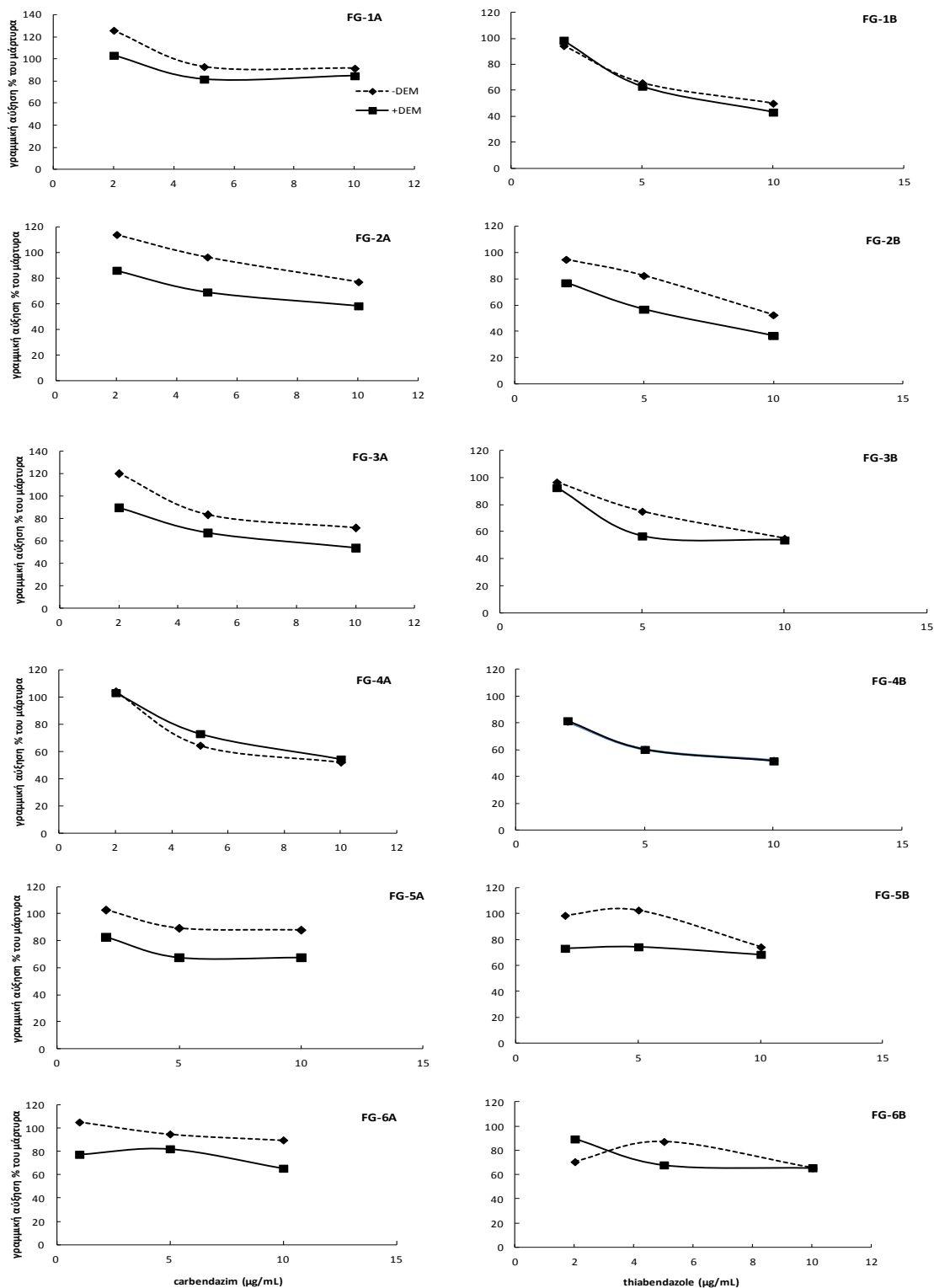
Τα πειράματα αυτά διενεργήθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό στα οποία περιείχαν διάφορες συγκεντρώσεις του παρεμποδιστή μαζί με μια καθορισμένη συγκέντρωση ενός εκ των τριών συνεργιστών. Τα αποτελέσματα της επίδρασης των συνεργιστών PBO, DEM και DEF στη ευαισθησία των 6 ανθεκτικών στελεχών στα μυκητοκτόνα carbendazim και thiabendazole δίνονται στα κάτωθι Γραφήματα 3,4 και 5.

Οι καμπύλες συνεργιστικής δράσης του PBO (*Γράφημα 3*) δείχνουν ότι σε μερικά στελέχη εμφανίζεται ένα μικρό ποσοστό συνεργιστικής δράσης καθώς η καμπύλη ευαισθησίας παρουσίας του συνεργιστή βρίσκεται μετατοπισμένη προς τα κάτω σε σχέση με την αντίστοιχη καμπύλη που υπάρχει μόνο ο παρεμποδιστής. Δηλαδή υπάρχει μετατόπιση της καμπύλης σε τιμές μεγαλύτερης ευαισθησίας. Αντιθέτως, σε άλλες περιπτώσεις δεν διαφαίνεται η ύπαρξη συνεργιστικής δράσης καθώς οι δύο καμπύλες συμπίπτουν σε αρκετό βαθμό. Επίσης, απουσία συνεργιστικής δράσης διαφαίνεται ακόμη και σε εκείνες τις περιπτώσεις που προσθήκη του συνεργιστή δείχνει αντίθετα αποτελέσματα, δηλαδή μειώνει την ευαισθησία των στελεχών στον παρεμποδιστή. Έτσι, εν συνεχεία, προχωρήσαμε στην εκτίμηση του βαθμού συνεργισμού του PBO με τους δύο παρεμποδιστές. Η συνεργιστική δράση εκτιμήθηκε για κάθε στέλεχος μέσω του συντελεστή συνεργισμού SI βασισμένος στην LD<sub>20</sub>, συγκέντρωση στην οποία τα μετρίου και υψηλού επιπέδου ανθεκτικά στελέχη εμφάνισαν μικρή ευαισθησία στους δύο παρεμποδιστές carbendazim και thiabendazole.

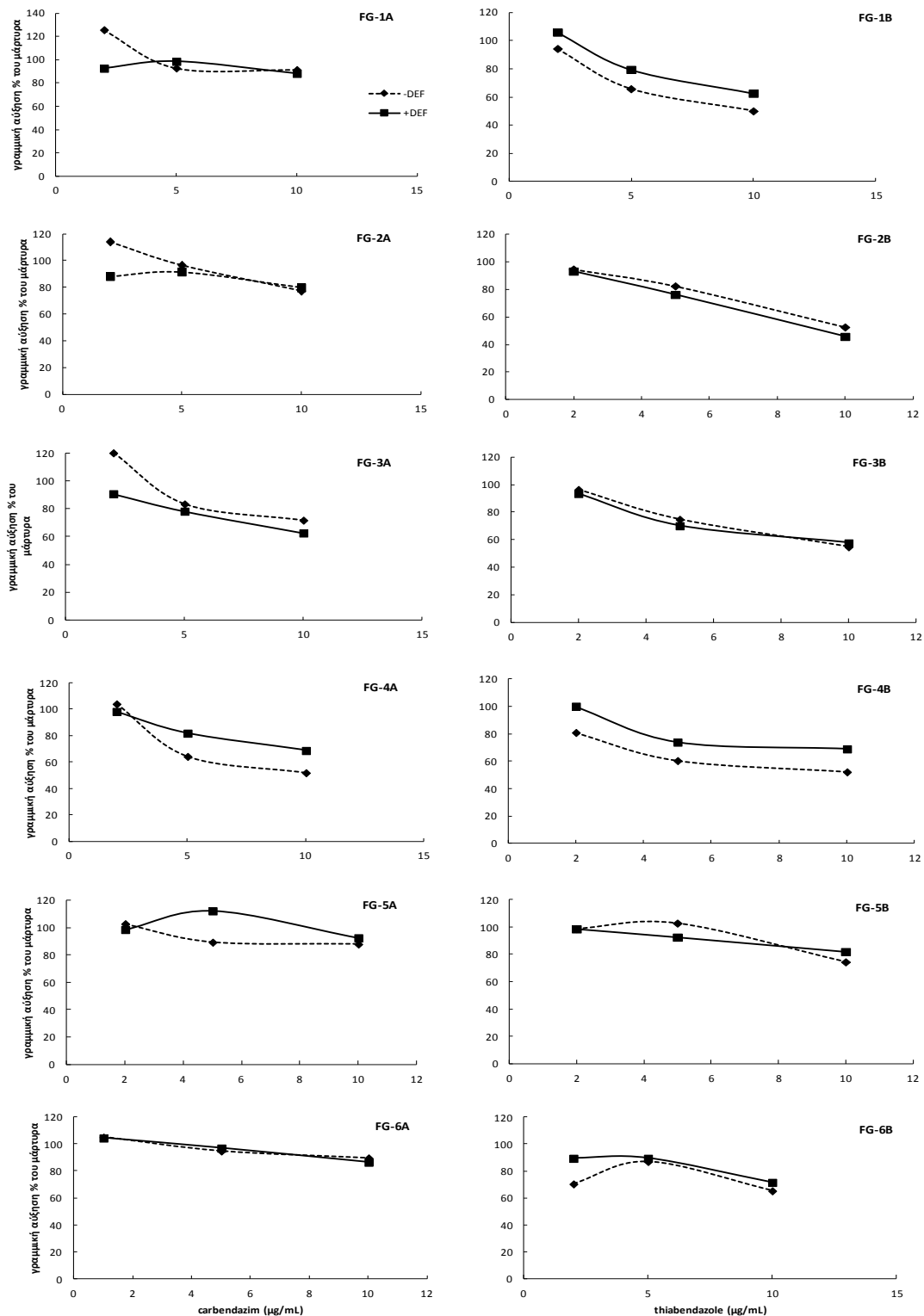




**Γράφημα 3.** Μυκοτοξική δράση του carbendazim (A) και thiabendazole (B) παρουσίας 100  $\mu\text{g/ml}$  piperonyl-butixide στο θεραπευτικό υλικό ανάπτυξης. Τα σημεία προέρχονται από το μέσο όρο δύο μετρήσεων που πάρθηκαν μετά από επώαση 6 ημερών στους 25  $^{\circ}\text{C}$ .



**Γράφημα 4.** Μυκοτοξική δράση του carbendazim (A) και thiabendazole (B) παρουσίας 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diethyl malate στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης. Τα σημεία προέρχονται από το μέσο όρο δύο μετρήσεων που πάρθηκαν μετά από επώαση 6 ημερών στους 25  $^{\circ}\text{C}$ .



**Γράφημα 5.** Μυκοτοξική δράση του carbendazim (A) και thiabendazole (B) παρουσίας 100 μg/mL DEF στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης. Τα σημεία προέρχονται από το μέσο όρο δύο μετρήσεων που πάρθηκαν μετά από επώαση 6 ημερών στους 25 °C.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3) αναγράφονται οι τιμές του SI των 6 ανθεκτικών στελεχών όπως αυτός προέκυψε από τις τιμές των LD<sub>20</sub> (δες παράγραφο Υλικά και Μέθοδοι 8.1.1.1.). Στο άγριο στέλεχος, λόγω του εύρους ευαισθησίας του (MIC < 3 μg/mL) η συνεργιστική επίδραση του PBO καθώς και των υπολοίπων συνεργιστών εκφράστηκε ως λόγος του ποσοστού αύξησης του (Total growth) στα 2 μg/mL carbendazim προς το ποσοστό αύξησης στα 2 μg/mL carbendazim παρουσία του συνεργιστού. Στις περιπτώσεις που περιγράφηκαν ανωτέρω και που δεν υφίσταται φαινόμενο συνεργισμού ο συντελεστής SI είναι μικρότερος ή ίσος του 1.

Για την περίπτωση του παρεμποδιστή carbendazim (MBC) σε κανένα ανθεκτικό στέλεχος δεν διαφαίνεται η ύπαρξη σημαντικής συνεργιστικής δράσης με το PBO (SI ≈ 1), (στο βαθμό τουλάχιστον που είναι εφικτό να μετρηθεί με την παρούσα μέθοδο). Παρόμοια αποτελέσματα φαίνονται και στα πειράματα συνεργισμού με τον παρεμποδιστή thiabendazole (TBZ) εκτός του υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητας στελέχους FG-1, όπου παρατηρείται μια συνεργιστική δράση επιπέδου περίπου στο 3,07.

**Πίνακας 3.**

Εκτίμηση της συνεργιστικής δράσης του PBO στην τοξικότητα του carbendazim (MBC) και thiabendazole (TBZ) βάση του συντελεστή συνεργισμού (Selectivity Index, SI) στα ανθεκτικά στελέχη του μύκητα *F. graminearum*.

στέλεχος	MBC			TBZ		
	LD <sub>20MBC</sub>	LD <sub>20PBO</sub>	SI	LD <sub>20TBZ</sub>	LD <sub>20PBO</sub>	SI
W.T.			0,66*			0,75*
FG-1	-	-	≤1	9,26	3,01	3,07
FG-2	6,22	-	≤1	9,8	11,8	0,83
FG-3	2,89	2,87	1	-	-	<1
FG-4	3,62	3,22	1,12	3,2	5,74	0,55
FG-5	12,76	10,72	1,19	-	-	≤1
FG-6	-	-	≤1	-	-	≤1

\*Τιμή που αναφέρεται στον λόγο  $TG_2/TG_{2+synergist}$  (όπου TG: Total Growth; συνολική αύξηση), \*\* οι παύλες υποδηλώνουν την αδυναμία υπολογισμού της τιμής LD<sub>20</sub>

Στα πειράματα συνεργιστικής δράσης με το DEM (Γράφημα 3), διαφαίνεται ότι σε μερικά στελέχη υπάρχει συνεργιστική δράση, σε κάποια και στους δύο παρεμποδιστές και σε άλλα μόνο στον έναν εκ των δύο. Τον υψηλότερο συντελεστή συνεργισμού με τον παρεμποδιστή carbendazim παρουσιάζει το στέλεχος FG-5 (SI=8,6) και ακολουθεί το στέλεχος FG-6 (SI=4,2), ενώ τα ίδια στελέχη δεν δείχνουν φαινόμενο συνεργισμού στην περίπτωση του παρεμποδιστή thiabendazole. Αντιθέτως, στα στελέχη FG-2 και FG-3 φαίνεται ότι υπάρχει συνεργιστική δράση του DEM σε βαθμό παρόμοιο και με τους δύο παρεμποδιστές, carbendazim και thiabendazole, με συντελεστές 3.2, 1,2 και 2.7, 1,3 αντιστοίχως (Πίνακας 4).

**Πίνακας 4.**

Εκτίμηση της συνεργιστικής δράσης του DEM στην τοξικότητα του carbendazim (MBC) και thiabendazole (TBZ) βάση του συντελεστή συνεργισμού (Selectivity Index, SI) στα ανθεκτικά στελέχη του μύκητα *F. graminearum*.

στέλεχος	MBC			TBZ		
	LD <sub>20MBC</sub>	LD <sub>20PBO</sub>	SI	LD <sub>20TBZ</sub>	LD <sub>20PBO</sub>	SI
W.T.			1,24			0,69
FG-1	13,32	10,38	1,28	3,23	3,31	0,97
FG-2	9,16	2,81	3,25	5,02	1,82	2,75
FG-3	3,7	2,98	1,24	3,91	2,83	1,38
FG-4	4,13	3,78	1,09	9,87	9,87	1
FG-5	18,54	2,14	8,66	-	-	≤1
FG-6	44,9	10,5	4,27	-	-	≤1

\*Τιμή που αναφέρεται στον λόγο  $TG_2/TG_{2+synergist}$  (όπου TG: Total Growth; συνολική αύξηση), \*\* οι παύλες υποδηλώνουν την αδυναμία υπολογισμού της τιμής LD<sub>20</sub>

Τέλος, στην περίπτωση με τον συνεργιστή DEF, δεν φαίνεται ότι υπάρχει κάποια σημαντική συνεργιστική δράση στα ανθεκτικά στελέχη με κανέναν εκ των δύο παρεμποδιστών (Γράφημα 4 και Πίνακας 5).

**Πίνακας 5.**

Εκτίμηση της συνεργιστικής δράσης του DEF στην τοξικότητα του carbendazim (MBC) και thiabendazole (TBZ) βάση του συντελεστή συνεργισμού (Selectivity Index, SI) στα ανθεκτικά στελέχη του μύκητα *F. graminearum*.

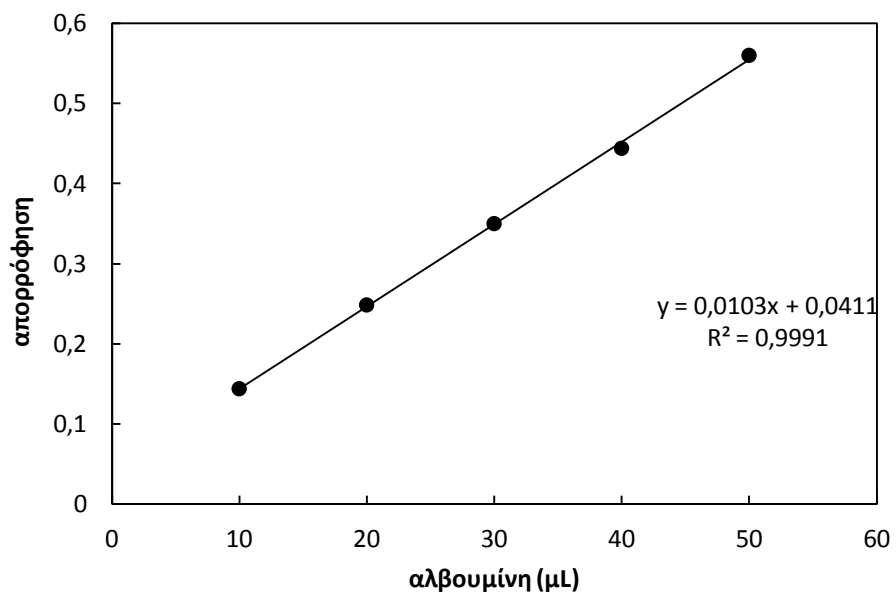
στέλεχος	MBC			TBZ		
	LD <sub>20MBC</sub>	LD <sub>20PBO</sub>	SI	LD <sub>20TBZ</sub>	LD <sub>20PBO</sub>	SI
W.T.			1,2			0,83
FG-1	-	-	≤1	3,22	5,1	0,63
FG-2	-	-	<1	5,02	4,26	1,17
FG-3	6,8	4,82	1,41	3,89	3,52	1,1
FG-4	3,78	5,52	0,68	1,95	4,8	0,4
FG-5	-	-	<1	12	25,25	0,47
FG-6	15,19	13,36	1,13	-	-	<1

\*Τιμή που αναφέρεται στον λόγο  $TG_2/TG_{2+synergist}$  (όπου TG: Total Growth; συνολική αύξηση), \*\* οι παύλες υποδηλώνουν την αδυναμία υπολογισμού της τιμής LD<sub>20</sub>

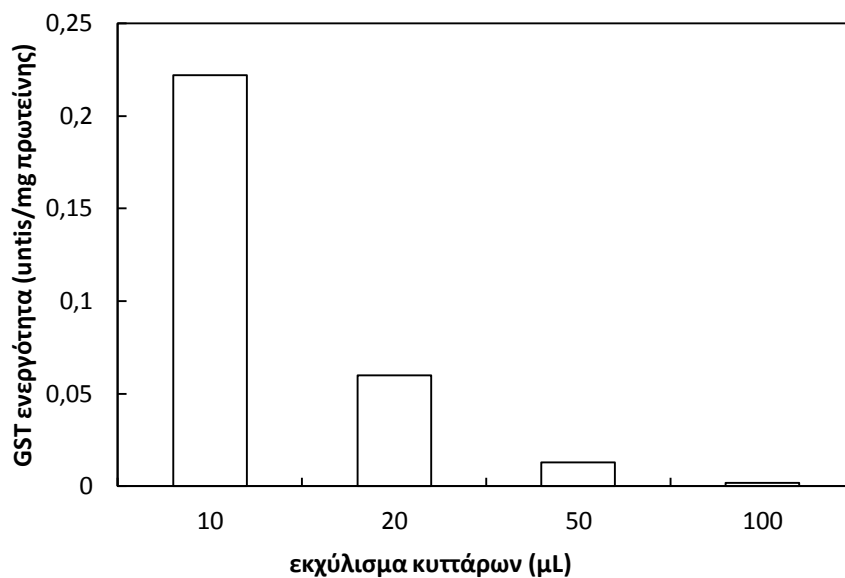
### 11.3. Εκτίμησης ενεργότητας των ενζύμων αποτοξικοποίησης

#### 11.3.1. Ενεργότητα του ενζύμου της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης

Σε πρώτο στάδιο ελέγχτηκε η επίδραση του όγκου του δείγματος (εκχύλισμα ελευθέρων κυττάρων) στην ενζυμική δραστικότητα του ενζύμου της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης του αγρίου στελέχους του μύκητα *F. graminearum* (Γράφημα 6). Για το σκοπό αυτό έγινε προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας του ενζύμου παρουσίας 10, 20, 50 και 100  $\mu$ L δείγματος στο μείγμα αντίδρασης που περιγράφεται στη παράγραφο 10.2.3. Η ειδική ενζυμική δραστικότητα εκφράστηκε ως λόγος της συγκέντρωσης του ενζύμου προς την συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης. Η πρότυπη καμπύλη της ολικής πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford φαίνεται στο Γράφημα 5. Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα του διαγράμματος (Εικόνα. 1), η μέγιστη ενζυμική δραστικότητα παρατηρήθηκε στα 10  $\mu$ L ενώ φαίνεται αυτή να μηδενίζεται σε όγκους 100  $\mu$ L και άνω.



**Γράφημα 6.** Σχέση απορροφήσεως στα 595 nm και συγκέντρωσης αλβουμίνης από ορό μύοξου σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford. (κλίση ευθείας  $e=0,01$ ).

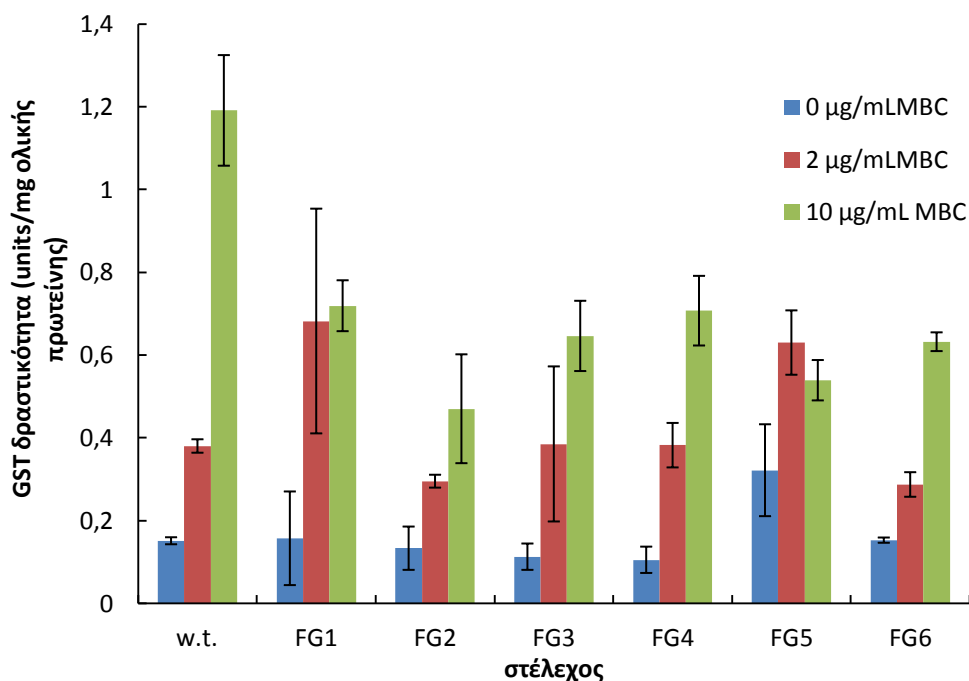


**Γράφημα 7.** Επίδραση του όγκου του δείγματος στην ενεργότητα των τρανσφερασών της γλουταθειόνης στο άγριο στέλεχος του μύκητα *F. graminearum*.

Τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων αποτοξικοποίησης παρουσίας των συνεργιστών έδειξαν ότι σε μερικά στελέχη πιθανώς να εμπλέκεται η δράση των ενζύμων αποτοξικοποίησης και αυτό οδήγησε στην ιδέα να εξετάσουμε με την βοήθεια ενζυμικών μεθόδων αναλυτικότερα την ενζυμική δραστηριότητα των πιθανολογούμενων ενζύμων αυτών.

Η δραστηριότητα του ενζύμου της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης παρουσία και απουσία του παρεμποδιστή εκτιμήθηκε από εκχυλίσματα ελευθέρων κυττάρων των ανθεκτικών στελεχών και του αγρίου στελέχους με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 10.2.5. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε το CDNB ως υπόστρωμα και μετρήθηκε ο σχηματισμός από αυτό του παραγόμενου συμπλόκου GS-CDN.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών φαίνονται στο *Γράφημα 7*.



**Γράφημα 8.** Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων του βενζιμιδαζολικού μυκητοκτόνου carbendazim (MBC) στην ενζυμική δραστηριότητα των τρανσφερασών της γλουταθειόνης (GST) του ευαίσθητου και των ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *F. graminearum*.



Στα αποτελέσματα του *Γραφήματος 2*, βλέπουμε ότι απουσία του παρεμποδιστή carbendazim, το μετρίου επιπέδου ανθεκτικότητας στέλεχος FG-5 παρουσιάζει εξοχιστάσσεως την υψηλότερη ενζυμική δραστικότητα των ενζύμων τρانشερασών της γλουταθειόνης σε βαθμό έως 2.1 φορές από την αντίστοιχη του αγρίου στελέχους. Όλα τα υπόλοιπα στελέχη φαίνονται να εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα δραστικότητας του ενζύμου σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Συγκεκριμένα, το στέλεχος FG-4 φαίνεται να έχει την μικρότερη ενζυμική δραστικότητα σε βαθμό έως 0.6 φορές σε σχέση με την αντίστοιχη του αγρίου στελέχους.

Όταν τα στελέχη αναπτύσσονται παρουσία του παρεμποδιστή carbendazim, η δραστικότητα του ενζύμου παρουσίαζε αυξητική τάση σε σχέση με την αντίστοιχη απουσία του παρεμποδιστή. Η αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου παρουσία 2 μg/mL carbendazim κυμαίνεται από 1.8 φορές (FG-6) έως 4.3 φορές (FG-1) σε σχέση με την δραστικότητα του ενζύμου απουσία του παρεμποδιστή. Τα υψηλότερα επίπεδα δραστικότητας των ενζύμου για την συγκέντρωση των 2 μg/mL carbendazim παρουσιάζουν το υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητας στέλεχος FG-1 (x 1.79) και το μετρίου επιπέδου ανθεκτικότητας στέλεχος FG-5 (x 1.6) σε σχέση με την αντίστοιχη δραστικότητα του αγρίου στελέχους. Όλα τα άλλα ανθεκτικά στελέχη φαίνεται να παρουσιάζουν είτε ίδια επίπεδα ενζυμικής δραστικότητας (FG-3, FG-4) είτε μικρότερα (FG-2, FG-6) σε σχέση με το άγριο στέλεχος.

Αυξητική τάση της δραστικότητας του ενζύμου επίσης φαίνεται και στη περίπτωση ανάπτυξης των στελεχών παρουσίας 10 μg/mL carbendazim. Το ενδιαφέρον που παρατηρείται στη συγκέντρωση των 10 μg/mL, είναι η δραστικότητα του ενζύμου στο άγριο στέλεχος αυξάνεται έως και 6,6 φορές σε σχέση με την αντίστοιχη απουσία του παρεμποδιστή. Τα μετρίου επιπέδου ανθεκτικά στελέχη FG-3, FG-4 παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα δραστικότητας έως 5.7 και 6.7 φορές αντιστοίχως, σε σχέση με τα αντίστοιχα τους επίπεδα απουσία του παρεμποδιστή. Ακολουθούν τα στελέχη FG-2, FG-6 με τιμές έως και 3,5, 4,1 φορές αντιστοίχως. Αντιθέτως, φαίνεται ότι το στέλεχος FG-5 παρουσιάζει σταθεροποίηση της ενζυμικής του δραστικότητας σε επίπεδα παρόμοια με τη συγκέντρωση των 2 μg/mL. Όσον αναφορά τη σχετική δραστικότητα των ενζύμων μεταξύ των στελεχών για την συγκέντρωση των 10 μg/mL carbendazim, από το

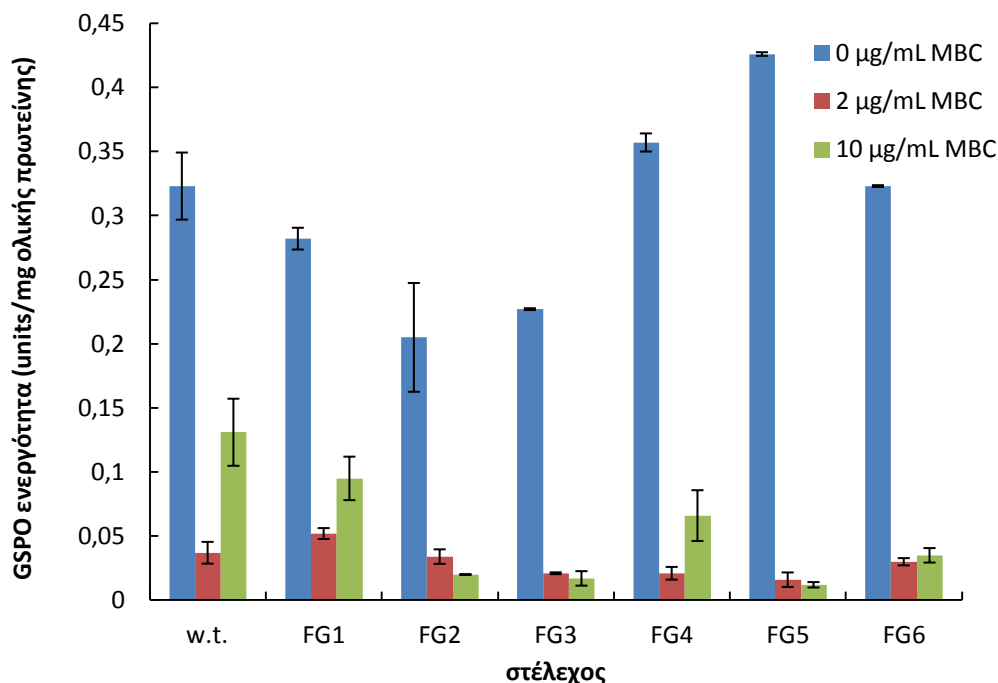
διάγραμμα βλέπουμε ότι όλα τα ανθεκτικά στελέχη υστερούν σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Συγκεκριμένα παρουσιάζουν δραστηριότητες που κυμαίνονται από 0.47 έως 0.7 φορές σε σύγκριση με την αντίστοιχη του αγρίου στελέχους.

#### 11.3.2. Ενεργότητα του ενζύμου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης

Η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης παρουσία και απουσία του παρεμποδιστή εκτιμήθηκε από εκχυλίσματα ελευθέρων κυττάρων των ανθεκτικών στελεχών και του αγρίου στελέχους με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 8.1.1.2.4. του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Η μέτρηση έγινε με καταγραφή στα 340 μέσω φωτομέτρου του αναγόμενου NADP<sup>+</sup>.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών φαίνονται στο παρακάτω *Γράφημα 8*. Βλέπουμε ότι απουσία του παρεμποδιστού, η ενζυμική δραστηριότητα των ανθεκτικών στελεχών βρίσκεται περίπου σε ίδια ή και μικρότερα επίπεδα σε σχέση με του αγρίου στελέχους. Μικρότερη ενζυμική δραστηριότητα παρουσίασαν τα στελέχη FG-2 και FG-3.

Όταν τα στελέχη αναπτύσσονται παρουσία του παρεμποδιστού carbendazim, στο υγρό θρεπτικό καλλιέργειας, η ενζυμική δραστηριότητα πέφτει κοντά σε μηδενικά επίπεδα. Όσον αναφορά την ενζυμική δραστηριότητα παρουσίας 2 μg/mL carbendazim, την μεγαλύτερη πτωτική τάση παρουσιάζει το στέλεχος FG-5 η οποία μειώνεται έως και 97 % σε σχέση με την αντίστοιχη δραστηριότητα απουσίας του παρεμποδιστή. Μεταξύ των στελεχών, φαίνεται όλα τα ανθεκτικά στελέχη να δείχνουν μειωμένα επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας σε σχέση με του αγρίου στελέχους.

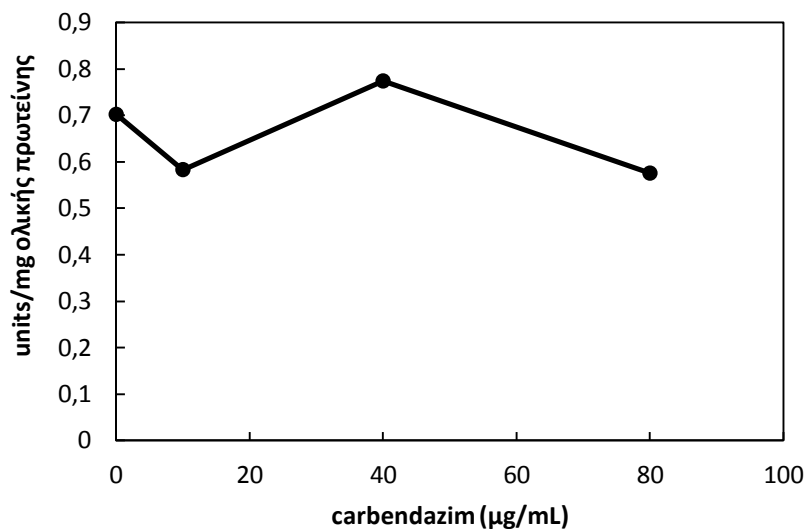


**Γράφημα 9.** Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων του βενζιμιδαζολικού μυκητοκτόνου carbendazim (MBC) στην ενζυμική δραστικότητα της υποροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSPO) του ευαίσθητου και των ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *F. graminearum*.

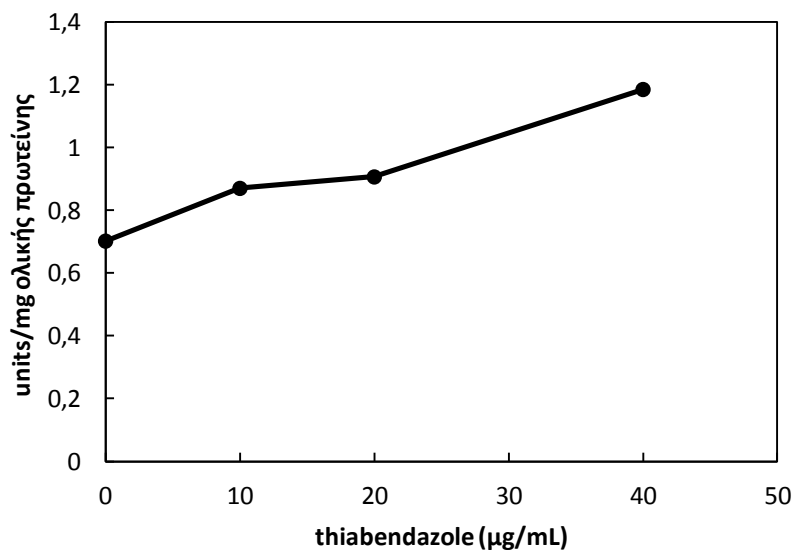
Η πτωτική τάση της ενζυμικής δραστικότητας των στελεχών FF-3, FG-4 και FG-5 φαίνεται ακόμη πιο έντονη στην περίπτωση παρουσίας 10 µg/mL carbendazim. Πιο έντονη παρουσιάζεται η μείωση της ενζυμικής δραστικότητας του μετρίου επιπέδου ανθεκτικότητας στελέχους FG-5. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι στη συγκέντρωση των 10 µg/mL το άγριο στέλεχος παρουσίασε 3,5 φορές περισσότερη ενζυμική δραστικότητα σε σύγκριση με την αντίστοιχη παρουσίας 2 µg/mL παρεμποδιστού. Όλα τα ανθεκτικά στελέχη, όπως και στην περίπτωση των 2 µg/mL δείχνουν μικρότερα επίπεδα ενζυμικής δραστικότητας σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Τα μικρότερα επίπεδα παρουσιάζονται στο στέλεχος FG-5.

### 11.3.3. Έλεγχος δράσης των βενζιμιδαζολικών ως αναστολείς του ενζύμου GST

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στα παρακάτω *Γραφήματα 9 και 10*.



**Γράφημα 10.** Ενζυμική δραστικότητα των τρανσφερασών της γλουταθειόνης του αγρίου στελέχους του μύκητα *F. graminearum* παρουσίας διαφόρων συγκεντρώσεων carbendazim ως ανταγωνιστικού υποστρώματος στο μίγμα αντίδρασης.



**Γράφημα 11.** Ενζυμική δραστικότητα των τρανσφερασών της γλουταθειόνης του αγρίου στελέχους του μύκητα *F. graminearum* παρουσίας διαφόρων συγκεντρώσεων thiabendazole ως ανταγωνιστικού υποστρώματος στο μίγμα αντίδρασης.

Στη περίπτωση που πράγματι η βενζιμιδαζόλη αποτελούσε αναστολέας για την τρανσφεράση της γλουταθειόνης τότε θα υπήρχε ανταγωνιστική δράση με το

τεχνητό υπόστρωμα CDNB. Επομένως, αντί για αύξηση της απορρόφησης στα 340 nm λόγω δημιουργίας του συμπλόκου GS-DNB, θα παρατηρούνταν μείωση της απορρόφησης στο ίδιο μήκος κύματος. Με βάση αυτή την παρατήρηση θα προέκυπε η καμπύλη συσχέτισης της απορρόφησης στα 340 και της συγκέντρωσης του αναστολέα (MBC, TBZ). Από την καμπύλη αυτή στη συνέχεια μέσα από την εξίσωση της γραμμής τάσης θα μπορούσαμε να υπολογίσουμε τη  $IC_{50}$ , η συγκέντρωση δηλαδή του αναστολέα στην οποία επέρχεται 50 % παρεμπόδιση πρόσδεσης της GST με το τεχνητό υπόστρωμα CDNB.

Από τα πειράματα αυτά διαφαίνεται ότι τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα που εξετάστηκαν ενδέχεται να μην αλληλεπιδρούν με το ένζυμο GST από το γεγονός ότι δεν προκαλούν μείωση (inhibition) της απορρόφησης στα 340 nm. Αντιθέτως, το thiabendazole φαίνεται να προκαλεί κάποια αύξηση στην ειδική δραστηριότητα του ενζύμου (*Γράφημα 10*). Λόγω των αποτελεσμάτων αυτών δεν δόθηκε η δυνατότητα για υπολογισμό της  $IC_{50}$ .

## **12. Διερεύνηση της κινητικής εισόδου-απέκκρισης**

### 12.1.Εισαγωγή

Η μελέτη αυτή αποσκοπεί να φανερώσει τυχόν υπάρχουσες διαφορές σε βιοχημικό επίπεδο που να εξηγούν και να ερμηνεύουν το φαινόμενο της εξειδικευμένης ανθεκτικότητας των ανθεκτικών στα βενζιμιδαζολικά στελεχών, έναντι του ευαίσθητου στελέχους, ως αποτέλεσμα αυξημένης λειτουργίας στα στελέχη αυτά του μηχανισμού απέκκρισης του τοξικού παράγοντα ή κάποιου άλλου μηχανισμού που να συνδέεται στενά με το φαινόμενο αυτό.

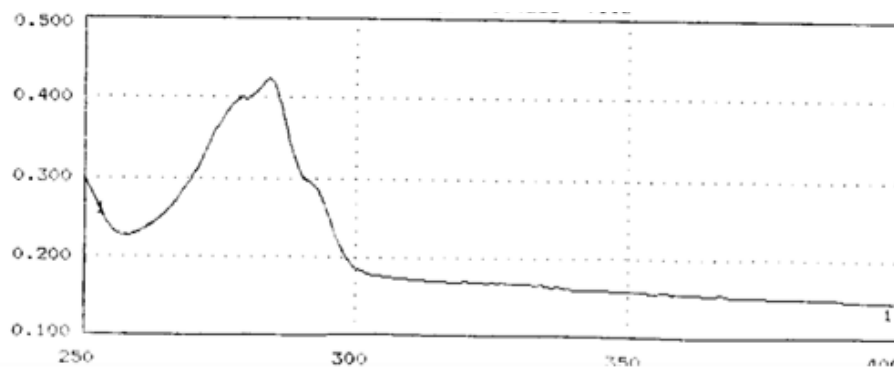
Ένα πρόβλημα που είχαμε να αντιμετωπίσουμε ήταν η τεχνική της ανάλυσης του μυκητοκτόνου η οποία θα μπορούσε να δώσει έγκυρα και ικανοποιητικά κατώτατα όρια ανιχνευσιμότητας των συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου στα διάφορα βιολογικά διαλύματα των στελεχών. Η προσέγγιση μιας τέτοιας μελέτης μπορεί να γίνει με φασματοφωτομετρία, ραδιοχημική ανάλυση ή με τη χρήση σύγχρονων μικροαναλυτικών τεχνικών (Richmond, 1977). Στη βιβλιογραφία συναντάται συχνά η μέθοδος της ραδιοανάλυσης, η οποία περιλαμβάνει τη χρήση σημασμένων με διάφορα ραδιενεργά ισότοπα μυκητοκτόνων μέσω της οποίας δύναται να ανιχνεύονται με αρκετά υψηλή ακρίβεια απειροελάχιστες ποσότητες των ραδιοσημασμένων μορίων.

Καθώς μια τέτοια τεχνική δεν ήταν δυνατό να εφαρμοστεί στα πλαίσια των δυνατοτήτων του εργαστηρίου μας, επικεντρώσαμε αρχικά τις μελέτες μας με τη βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας (LS, Liquid Spectrometry) με χρήση UV-ανιχνευτή. Πραγματοποιώντας διάφορες δοκιμές, παρόλα αυτά δεν κατορθώσαμε να αναπτύξουμε μια μέθοδο που να μας παρέχει αρκετά υψηλή ανακτησιμότητα του μυκητοκτόνου από τα διάφορα βιολογικά υλικά. Έτσι επικεντρώσαμε την ανάλυση μας με τη χρήση φασματοφωτομετρίας όπου η απορρόφηση του carbendazim από τα διάφορα στελέχη εκτιμήθηκε έμμεσα μετρώντας την συγκέντρωση του μυκητοκτόνου που παρέμενε στο υπερκείμενο διάλυμα μετά από διάφορες χρονικές περιόδους. Εξάλλου, η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί από πολύ παλιά με επιτυχία και σε αντίστοιχες μελέτες εκτίμησης της απορρόφησης

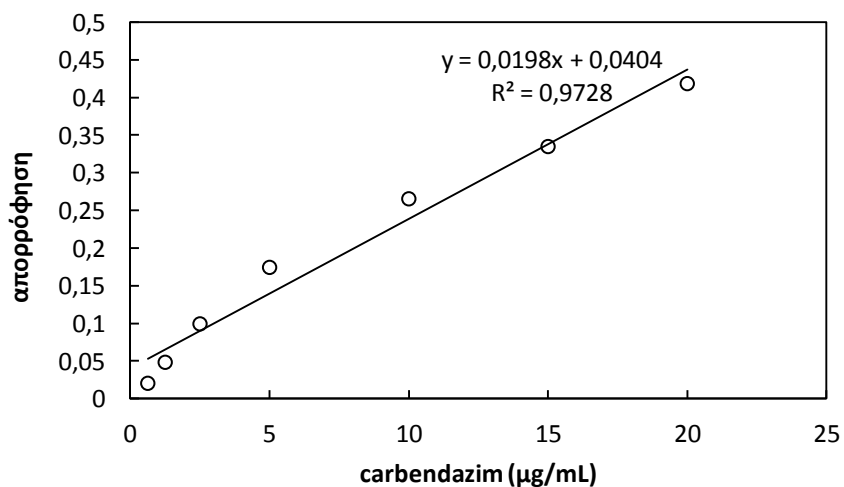
διαφόρων βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων από υγρές καλλιέργειες μυκήτων (Stutzenberger και Parle, 1972).

## 12.2. Πειράματα κινητικής απορρόφησης του carbendazim

Το φάσμα απορρόφησης του carbendazim (Εικόνα 11) μεταξύ 250- 400 nm, παρουσίασε το αναμενόμενο μήκος κύματος διέγερσης ( $\lambda_{ex}$ ) στα 256 nm και μέγιστο απορρόφησης ( $\lambda_{max}$ ) στα 285 nm λόγω απορροφήσεως του βενζιμιδαζολικού δακτυλίου στη περιοχή αυτή του φάσματος. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του υγρού καλλιέργειας σε carbendazim χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη καμπύλη (Γράφημα 11) που προέκυψε από τη συσχέτιση της συγκέντρωσης διαλυμάτων σε carbendazim (σε  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) και της απορρόφησης στα 285 nm. Η καμπύλη έδειξε μεγάλο επίπεδο συσχέτισης μεταξύ συγκεντρώσεων 0,625-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

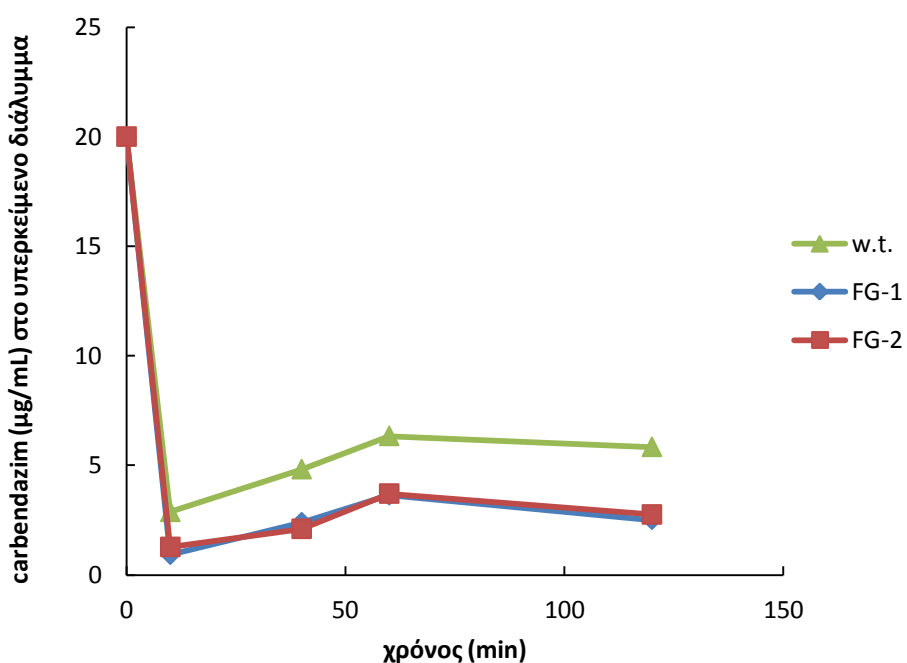


**Εικόνα 14.** Φάσμα UV 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του μυκητοκτόνου carbendazim (σε φωσφορικό buffer pH 7).



**Γράφημα 12.** Πρότυπη καμπύλη συσχέτισης της συγκέντρωσης διαλυμάτων carbendazim (0,1-M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7) και της απορρόφησης στα 285 nm.

Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης που προέκυψε υπολογίστηκαν στη συνέχεια η συγκέντρωση των υπερκείμενων διαλυμάτων των καλλιεργειών σε carbendazim. Τα αποτελέσματα της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης του carbendazim και του χρόνου παραμονής των μυκηλιακών κυττάρων των στελεχών στο διάλυμα με το μυκητοκτόνο φαίνονται στο παρακάτω *Γράφημα 12*.



**Γράφημα 13.** Κινητική μείωσης της συγκέντρωσης του carbendazim ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) από μυκηλιακή μάζα του αγρίου στελέχους (w.t.) και των δύο ανθεκτικών στελεχών (FG-1 και FG-2). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στο μέσο άθροισμα τριών βιολογικών επαναλήψεων. Η επώαση των μυκηλιακών μαζών έγινε μέσα σε διαλύματα buffer φωσφορικών pH 7 που περιείχαν 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  carbendazim.

Φαίνεται ότι η απορρόφηση του φαρμάκου σε όλα τα στελέχη είναι ταχεία αφού από την αρχική συγκέντρωση του carbendazim των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  μετά από τα πρώτα δέκα μόλις λεπτά το 7- 15 % είχε παραμείνει στο υπερκείμενο διάλυμα επώασης



των στελεχών. Μετά από 20 λεπτά επώασης, η συγκέντρωση στο υπερκείμενο διάλυμα άρχισε να αυξάνεται μέχρι και το χρόνο των 60 λεπτών όπου από εκεί και έπειτα παρουσιάζονταν να μένει σε σχετικά σταθερά επίπεδα.

Τα αποτελέσματα αυτά στη συνέχεια εκφράστηκαν ως θεωρητικές απορροφήσεις-προσορήσεις ανά mg μυκηλιακής μάζας αφαιρώντας από την αρχική συγκέντρωση (20 µg/mL) την συγκέντρωση που παρέμεινε στο υπερκείμενο διάλυμα μετά το χρόνο επώασης και πολλαπλασιάζοντας τη διαφορά με τον ολικό όγκο του υπερκειμένου (30 mL) (Πίνακας 7).

**Πίνακας 7.**

Συγκεντρώσεις στα υπερκείμενα διαλύματα ( $c_i$ ), και θεωρητικές τιμές απορρόφησης-προσορήσης (Θ.Τ.Α.-Π.) από τις μυκηλιακές μάζες ( $w$ ) του carbendazim μετά από σε διάλυμα με αρχικής συγκέντρωσης carbendazim ( $c_0$ ) 20 µg/mL.

στέλεχος	χρόνος (min)	συγκέντρωσ η στο υπερκείμενο (µg/mL)	συγκέντρωσ η % του $c_0$	Θ.Τ.Α.-Π.* (µg/mg ξηρού μυκηλίου)	SDEV
w.t.	10	2,8	14,3	2,9	0,279
	40	4,8	24,1	2,6	1,149
	60	6,3	31,6	2,3	0,241
	120	5,8	29,1	2,4	0,583
FG-1	10	0,9	4,5	4,7	0,917
	40	2,4	11,9	4,3	0,333
	60	3,6	18,1	4,1	0,269
	120	2,5	12,5	4,3	0,577
FG-2	10	1,2	6,3	3,1	0,384
	40	2,1	10,4	2,9	0,419
	60	3,7	18,5	2,6	0,536
	120	2,7	13,7	2,8	0,625

$$\Theta.Τ.Α.-Π. = [(c_0 - c_i) \times 30] / w$$

Το πείραμα της κινητικής εισόδου-απέκκρισης επαναλήφθηκε ακόμη μία φορά και παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα. Στη τελευταία περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η υποδιπλάσια μάζα μυκηλιακής πάστας και φάνηκε το μυκητοκτόνο να παραμένει σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο υπερκείμενο διάλυμα.

**ΜΕΡΟΣ IV**  
***ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ***

---



Σε προηγούμενη μελέτη (Sevastos και συνεργάτες, 2013) πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα στο μύκητα *F. graminearum*. Μετά από μεταλαξινέωση και επιλογή σε θρεπτικό υλικό που περιείχε carbendazim προέκυψαν 6 ανθεκτικά στελέχη (FG-1, FG-2, FG-3, FG-4, FG-5 και FG-6). Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης αυτής, έδειξαν τα εξής:

- *μέτρια συχνότητα ανθεκτικότητας*
- *στελέχη δύο φαινοτυπικών κατηγοριών με μέσο (Rf: 10-20) και υψηλό (Rf: 40-170) επίπεδο ανθεκτικότητας*
- *παρουσία εξειδικευμένης ανθεκτικότητας που εντοπίζονται μόνο στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα*
- *απουσία σημαντικών επιδράσεων των μεταλλαγών ανθεκτικότητας στη παραγωγή κονιδίων, μυκηλιακή ανάπτυξη, βλαστική ικανότητα και στη μυκοτοξικόνο ικανότητα των στελεχών αυτών έναντι του αγρίου στελέχους.*

Στη παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκαν πειράματα **έκφρασης της ανθεκτικότητας των στελεχών αυτών in vivo** έχοντας ως βιολογικό υπόστρωμα σπάδικες καλαμποκιού. Οι μετρήσεις αφορούσαν τη καταγραφή των μολυσμένων σπόρων των σπαδικών στις 28 και 34 ημέρες. Και στα πειράματα αυτά επιβεβαιώθηκε ότι οι μεταλλαγές για ανθεκτικότητα να επηρέασαν σε ορισμένο βαθμό αρνητικά την φυτοπαθογόνο ικανότητα των ανθεκτικών στελεχών. Μάλιστα, το στέλεχος FG-1 το οποίο έχει εμφανίσει το υψηλότερο επίπεδο ανθεκτικότητας, υπολείπονταν σημαντικά σε μολυσματική ικανότητα έναντι του αγρίου στελέχους. Τόσο στη προτεινόμενη (250 µg/mL) όσο και στη διπλάσια δόση (500 µg/mL), φάνηκε να εκφράζεται η ανθεκτικότητα των στελεχών, αφού μόνο το άγριο παρεμποδίζονταν πλήρως στη συγκέντρωση αυτή. Με βάση τα παραπάνω, ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας από την εμφάνιση τέτοιων στελεχών θα μπορούσε να θεωρηθεί υπαρκτός.

Βασικός όμως άξονας της παρούσας εργασίας ήταν η μοριακή και βιοχημική διερεύνηση του υπεύθυνου μηχανισμού ανθεκτικότητας των 6 αυτών ανθεκτικών στελεχών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε **μοριακή μελέτη του βιοχημικού στόχου δράσης των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων** αλλά και

**βιοχημική μελέτη άλλων μηχανισμών ανθεκτικότητας** πέραν της αλλαγής στη θέση δράσης.

Ο κύριος μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας του μύκητα *F. graminearum* καθώς και αρκετών άλλων φυτοπαθογόνων μυκήτων στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα είναι η αλλαγή στη θέση δράσης (Ma και Michailides, 2005). Λαμβάνοντας υπόψη τα μετρίως έως πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας και την απουσία διασταυρωτής ανθεκτικότητας σε ενώσεις άλλων ομάδων μυκητοκτόνων, πλην των βενζιμιδαζολικών ενώσεων, οδηγηθήκαμε στην υπόθεση ότι ο πιθανότερος μηχανισμός ανθεκτικότητας στα 6 αυτά στελέχη είναι να υπάρχει **μεταλλαγή στη θέση δράσης**.

Οι κύριες σημειακές μεταλλαγές υψηλού κινδύνου όπως προκύπτουν από τα μέχρι τώρα δεδομένα στο μύκητα αυτό καθώς και σε διάφορα άλλα παθογόνα είναι οι E198A, F200Y και F167Y (Ma και Michaelides, 2005) οι οποίες εντοπίζονται στο γονίδιο της β<sub>2</sub>-τουμπουλίνης. Με σκοπό την ανίχνευση των μεταλλαγών αυτών εφαρμόστηκε κατάλληλο μοριακό διαγνωστικό (Liu και συνεργάτες, 2010) με βάση τη τεχνική Allele Specific PCR. Από αυτές, η μόνη μεταλλαγή που ανιχνεύτηκε ήταν αυτή στη θέση 200 της β<sub>2</sub>-τουμπουλίνης που αφορούσε στην αντικατάσταση του αμινοξέος φαινυλανίνη από τη τυροσίνη (**F200Y**) και η οποία βρέθηκε στα μετρίου ανθεκτικότητας στελέχη FG-5 και FG-6. Η ύπαρξη αυτής της μεταλλαγής επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια και με αλληλούχιση του γονιδίου της β<sub>2</sub>-τουμπουλίνης και σύγκριση των αλληλουχιών με την αντίστοιχη του αγρίου στελέχους. Η F200Y μεταλλαγή έχει εμφανίσει παρόμοια επίπεδα ανθεκτικότητας και σε στελέχη αγρού του μύκητα *F. graminearum* (Chen και συνεργάτες, 2009; Qiu και συνεργάτες, 2010). Η ίδια μεταλλαγή έχει οδηγήσει σε παρόμοιους φαινοτύπους στελεχών αγρού επίσης στους μύκητες *P. aurantiogriseum*, *P. italicum*, *V. inaequalis*, *V. pirina*, *T. yallundae* (Koenraadt και συνεργάτες, 1992), *P. digitatum* (Schmidt και συνεργάτες, 2006), *R. secalis* (Butters και Hollomon, 1999) και *Botrytis cinerea* (Yarden και Katan, 1993). Ακόμα έχει επιβεβαιωθεί από στοχευόμενες μεταλλάξεις ότι η συγκεκριμένη μεταλλαγή συνδέεται πράγματι με την ανθεκτικότητα των μυκήτων στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα (Li και συνεργάτες, 1996).

Αλληλούχιση και κατόπιν σύγκριση των αλληλουχιών του γονιδίου της β<sub>2</sub>-τουμπουλίνης των στελεχών FG-1 και FG-2 με αυτή του αγρίου στελέχους

απεκάλυψε ότι υπήρχε απόλυτη ομολογία μεταξύ τους χωρίς την ύπαρξη σημειακών μεταλλαγών. Η δεύτερη μεταλλαγή η οποία εντοπίστηκε με αλληλούχιση τμήματος της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης στα δύο μέτριας ανθεκτικότητας στελέχη FG-3 και FG-4 ήταν στη θέση 6. Πρόκειται για την υποκατάσταση της ιστιδίνης από ασπαραγίνη (**H6N**) στο γονίδιο της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης. Από όσο είναι δυνατόν να γνωρίζουμε αυτού του είδους η μεταλλαγή στη συγκεκριμένη θέση της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης ανιχνεύεται για πρώτη φορά σε κάποιο οργανισμό. Η απόκτηση αυτής της μεταλλαγής επιβεβαίωσε την αρχική μας υπόθεση ότι τα στελέχη αυτά μπορεί να έχουν την ίδια μεταλλαγή ανθεκτικότητας λόγω δύο βασικών ενδειξεων: ίδια επίπεδα ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά και απώλεια της ανθεκτικότητας τους στις χαμηλές θερμοκρασίες (15 °C). Στη βιβλιογραφία η μοναδική ίσως περίπτωση τέτοιας πλειοτροπικής μεταλλαγής στη θέση 6 έχει αναφερθεί για τη περίπτωση ανθεκτικότητας του μύκητα *M. fruticola* (Ma και συνεργάτες, 2003) στην οποία υπήρχε αντικατάσταση της ιστιδίνης σε τυροσίνη (H6Y). Αναφέρεται πως κάθε μεταλλαγή που βρίσκεται πλησίον της επιφάνειας στην οποία συμβαίνει ο πολυμερισμός της  $\beta$ -τουμπουλίνης, όπως και η παραπάνω στη θέση 6, οδηγούν σε απώλεια της ανθεκτικότητας των ανθεκτικών στελεχών στις χαμηλές θερμοκρασίες (Richards και συνεργάτες, 2000). Η πληροφόρηση σχετικά με την ύπαρξη τέτοιων ανθεκτικών στελεχών στον αγρό θα μπορούσε να αποτελέσει μια σημαντική στρατηγική για την διαχείριση της ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά, εφαρμόζοντας ψεκασμούς σε δροσερές ημέρες (Ma και Michailides, 2005).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ομόλογη μοντελοποίηση της  $\beta$ -τουμπουλίνης προκειμένου να εξηγήσουμε την επίδραση των δύο μεταλλαγών H6N και F200Y, στην πρόκληση ανθεκτικότητας. Αμφότερες οι παραπάνω μεταλλαγές εντοπίζονται σε μία κοιλότητα που σχηματίζεται στη περιοχή των αμινοξέων Phe167, Glu198 και Phe200, στις οποίες υποστηρίζεται ότι γίνεται η πρόσδεση των βενζιμιδαζολικών στη  $\beta$ -τουμπουλίνη (Qiu και συνεργάτες, 2010). Μετά από ανάλυση των μοριακών επιφανειών των θέσεων πρόσδεσης 198, 200 και 167 είδαμε ότι η μεταλλαγή F200Y οδηγούσε στη δημιουργία μια μεγάλης και ενιαίας κοιλότητας πρόσδεσης σε αντίθεση με την αντίστοιχη κοιλότητα στη περίπτωση της  $\beta$ -τουμπουλίνης του ευαίσθητου στελέχους. Κάτι τέτοιο πιθανώς να σημαίνει ότι η ύπαρξη τυροσίνης στη θέση 200 οδηγεί σε αύξηση της ικανότητας της να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα γειτονικά αμινοξέα λόγω του υδρόφιλου

χαρακτήρα της σε αντίθεση με την περίπτωση που στην ίδια θέση υπάρχει η υδρόφοβη φαινυλανίνη. Αν κάτι τέτοιο πράγματι ισχύει τότε αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται η ικανότητα της θέσης 200 να αλληλεπιδρά με τα μόρια του βενζιμιδαζολικού και να παρατηρείται έτσι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα στελέχη FG-5 και FG-6. Η παραπάνω υπόθεση υποστηρίζεται άλλωστε και από τους Robinson et al (2004), Aguayo-Ortiz et al (2013). Στη περίπτωση της μεταλλαγής H6N παρατηρείται ότι η αντικατάσταση της ιστιδίνης από ασπαραγίνη προκαλεί μια εμφανή αλλαγή της στερεοχημικής δομής της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης. Αυτή η δομική αλλαγή θα μπορούσε να υποτεθεί ότι δρα ως ένα είδος φραγμού για την προσπέλαση του μορίου από τη θέση 6 προς τη κοιλότητα των θέσεων 167, 198 και 167 όπου συμβαίνει η εικαζόμενη πρόσδεση των βενζιμιδαζολικών. Ωστόσο τα παραπάνω σχετικά με το τρόπο πρόσδεσης των βενζιμιδαζολικών στη  $\beta_2$ -τουμπουλίνη πρέπει να εξετασθούν με μία μικρή επιφυλακτικότητα. Μόνο πειράματα κρυσταλλογράφησης της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης του μύκητα *F. graminearum* θα μπορούσαν να διευκρινίσουν το σημείο αυτό (Qiu et al, 2012). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί, ότι αν και η μεταλλαγή F200Y ανιχνεύθηκε και στα δύο στελέχη FG-5 και FG-6, παρόλα αυτά το επίπεδο ανθεκτικότητας του στελέχους FG-5 ήταν αρκετά υψηλότερο από του δεύτερου. Ικανοποιητική εξήγηση αυτής της παρατήρησης θα μπορούσε να δώσει η παραδοχή ύπαρξης ενός επιπλέον μηχανισμού ανθεκτικότητας πέραν την αλλαγής στη θέση δράσης στο στέλεχος FG-5.

Από ότι αναφέρεται, στο μύκητα *F. graminearum* υπάρχουν δύο ομόλογα γονίδια  $\beta$ -τουμπουλίνης, η  $\beta_1$  και η  $\beta_2$ -τουμπουλίνη, τα οποία παρουσιάζουν μεταξύ τους αρκετή ομολογία (84%). Ωστόσο, με εξαίρεση τη θέση 240, οι κύριες περιοχές των αμινοξέων που έχουν εμφανίσει μέχρι τώρα ανθεκτικότητα φαίνεται να είναι ταυτόσημες και στις δύο ισομορφές της  $\beta$ -τουμπουλίνης (Qiu και συνεργάτες, 2012). Σκεφτήκαμε έτσι ότι θα ήταν σκόπιμο να διερευνήσουμε τη πιθανότητα ύπαρξης μεταλλαγών στη  $\beta_1$ -τουμπουλίνη των δύο στελεχών FG-1 και FG-2 τα οποία δεν εμφάνισαν μέχρι τώρα κάποια μεταλλαγή ανθεκτικότητας στη  $\beta_2$ -τουμπουλίνη. Όμως η σύγκριση των αλληλουχιών της  $\beta_1$ -τουμπουλίνης μεταξύ των δύο αυτών ανθεκτικών στελεχών και του αγρίου στελέχους δεν απεκάλυψε για μία ακόμη φορά καμία σημειακή μεταλλαγή στο γονίδιο αυτό. Είναι επομένως πολύ πιθανόν **η ανθεκτικότητα των FG-1 και FG-2 στελεχών να οφείλεται σε**



### **κάποιο άλλο βιοχημικό μηχανισμό ανθεκτικότητας πέραν της αλλαγής στη θέση δράσης.**

Δομικές και ποσοτικές μεταβολές στο επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου που κωδικοποιεί το βιοχημικό στόχο δράσης των μυκητοκτόνων, μπορεί να οδηγήσουν σε **υπερέκφραση του βιοχημικού στόχου** οδηγώντας κατά αυτό το τρόπο σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Ma και Michaelides, 2005). Στην ύπαρξη ενός τέτοιου μηχανισμού έχουν αποδοθεί ορισμένες περιπτώσεις ανθεκτικότητας με τα μυκητοκτόνα της ομάδας των DMIs (Hamamoto et al, 2000; Kontoyiannis, 1999; White, 1997; Schnabel και Jones, 2001). Στο μύκητα *F. graminearum* έχει βρεθεί τα επίπεδα σχετικής έκφρασης των γονιδίων της  $\beta_1$  και  $\beta_2$ - τουμπουλίνης ότι μπορούν να επηρεαστούν μεταξύ τους και να οδηγήσουν σε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας (Qiu et al, 2012), στη περίπτωση που κάποιο από αυτά απολεσθεί. Δεν έχουμε ωστόσο ενδείξεις ότι κάτι τέτοιο μπορεί να συμβεί κάτω από πραγματικές συνθήκες αγρού. Θέλοντας να ελέγξουμε την ύπαρξη μιας τέτοιας ενδεχόμενης υπερέκφρασης των γονιδίων της  $\beta_1$  και  $\beta_2$  τουμπουλίνης διενεργήσαμε πειράματα RT-PCR με στελέχη τα οποία είχαν προηγουμένως αναπτυχθεί παρουσία ή όχι carbendazim. Όταν τα στελέχη αναπτύσσονταν απουσία του μυκητοκτόνου φάνηκε η έκφραση της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης να βρίσκεται σε σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα (έως και 460%) σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Όσο αναφορά τα στελέχη FG-1 και FG-2 δεν φάνηκε να εκφράζουν τη  $\beta_2$ -τουμπουλίνη τους σε βαθμό που να δικαιολογεί το μηχανισμό της υπερέκφρασης καθώς και τα υπόλοιπα στελέχη στα οποία βρέθηκαν προηγουμένως οι μεταλλαγές F200Y, H6N παρουσίαζαν ίδια ή και μεγαλύτερα επίπεδα σε σχέση με αυτά. Όταν όμως τα ανθεκτικά στελέχη αναπτύσσονταν παρουσία μυκητοκτόνου η έκφραση της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης παρουσιάζονταν αρκετά μειωμένη σε σχέση με την αντίστοιχη απουσία του μυκητοκτόνου. Τα μικρότερη επίπεδα έδειξαν τα στελέχη FG-1 και FG-2 σε βαθμό 45 και 30 % του αγρίου στελέχους. Η μείωση του επιπέδου έκφρασης της  $\beta_2$ -τουμπουλίνης που παρατηρήθηκε όταν τα στελέχη αναπτύσσονταν παρουσία του μυκητοκτόνου μπορεί να σημαίνει ότι κάτω από τις συνθήκες αυτές ο μύκητας δεν απαιτεί τη παραγωγή υψηλών επιπέδων  $\beta_2$ -τουμπουλίνης. Δεν μπορούμε να γνωρίζουμε αν η έντονη μείωση της έκφρασης που παρατηρήθηκε με τα στελέχη FG-1 και FG-2, δύναται να συνδέεται έμμεσα με τον μηχανισμό ανθεκτικότητας των στελεχών αυτών. Στη περίπτωση με τη  $\beta_1$ -

τουμπουλίνη τα επίπεδα έκφρασης των ανθεκτικών στελεχών έδειξαν κάτι ανάλογο να συμβαίνει όπως και με τη β<sub>2</sub>-τουμπουλίνη. Η έκφραση της β<sub>1</sub>-τουμπουλίνης των FG-1 και FG-2 κυμάνθηκε σε επίπεδα μικρότερα ή και ίδια με του αγρίου στελέχους. **Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι ο μηχανισμός ανθεκτικότητας των στελεχών FG1 και FG-2 δεν φαίνεται να οφείλεται στην υπερέκφραση των γονιδίων της β<sub>1</sub> και β<sub>2</sub>-τουμπουλίνης.**

Ορισμένες φορές η ανθεκτικότητα των μυκήτων στα μυκητοκτόνα μπορεί να εξηγηθεί με έναν τρίτο κατά σειρά σπουδαιότητας μηχανισμό ανθεκτικότητας' αυτόν της **αποτοξικοποίησης του τοξικού μορίου από τα ανθεκτικά στελέχη σε σχέση με τα ευαίσθητα.** Ένζυμα όπως οι *τρανσφεράσες της γλουταθειόνης* (GSTs, Glutathione-S-transferases), οι *υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης* (GSPOs, Glutathione peroxidase), οι *οξειδάσεις του κυτοχρώματος P450* (cytochrome P-450s) και οι *υδρολάσες* (hydrolases), αποτελούν τις σημαντικότερες ομάδες ενζύμων που έχουν μέχρι τώρα βρεθεί αποδεδειγμένως να εμπλέκονται στην αποτοξικοποίηση των διαφόρων φυτοφαρμάκων, κυρίως εντομοκτόνων και ζιζανιοκτόνων (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Σε ορισμένες περιπτώσεις τέτοιες ομάδες ενζύμων αποτοξικοποίησης μπορεί να εμπλέκονται και στο μηχανισμό ανθεκτικότητας των μυκήτων στα διάφορα τοξικά μόρια. Για παράδειγμα η ανθεκτικότητα διαφόρων μυκήτων και ζυμών στις ενώσεις captan, chlorothalonil, μετάλλων χαλκού, καδμίου και θείου έχει αποδειχθεί ότι οφείλεται στην αυξημένη δραστικότητα ενζύμων GST (Barak και Edgington, 1984; Shin et al, 2003; Gallori και συνεργάτες, 1988; Macreadie et al, 1994). Επίσης, περιπτώσεις ανθεκτικότητας λόγω P-450s έχουν αναφερθεί στα μυκητοκτόνα fenhexamid (Leroux et al, 2001), και kitazin-P (Uesugi και Sisler, 1978) και σε διάφορα αντιβιοτικά (Wright, 2005) ενώ σε άλλες όπως η ασκοχιτίνη (Nakanishi και Oku, 1969) και η kresoxim-methyl (Jabs et al, 2001) υποστηρίζεται ότι οφείλεται στη λειτουργία κάποιων εστερασών.

Για το σκοπό αυτό σε πρώτη φάση μελετήθηκε η επίδραση των **συνεργιστών** (synergists) PBO, DEM και DEF στην μυκητοτοξικότητα των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων, προσπαθώντας έτσι να δώσουμε μία απάντηση για τον μηχανισμό ανθεκτικότητας στα δύο στελέχη FG-1 και FG-2. Όσο αναφορά το συνεργιστή PBO (με δράση στις οξειδάσες του P-450), από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει σημαντική συνεργιστική δράση με τα δύο

βενζιμιδαζολικά MBC και TBZ στα ανθεκτικά στελέχη με εξαίρεση ίσως στο στέλεχος FG-1 όπου φάνηκε να αυξάνεται η ευαισθησία του στο TBZ παρουσία του συνεργιστή στο υλικό καλλιέργειας. Παρομοίως, δεν παρουσιάστηκε συνεργιστική επίδραση του DEF (με δράση στις εστεράσες) στα ανθεκτικά στελέχη με τα δύο βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. Από τα αποτελέσματα με τον συνεργιστή DEM (με δράση στις τρανσφεράσες της γλουταθειόνης) σε ορισμένα στελέχη και κυρίως στο FG-5, διαφαίνεται ότι υπάρχει μία σημαντική συνεργιστική δράση με την ένωση MBC.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αποτοξικοποίησης παρουσία του συνεργιστή DEM έδειξαν ότι σε μερικά στελέχη πιθανώς να εμπλέκεται η δράση των ενζύμων αποτοξικοποίησης και αυτό οδήγησε στην ιδέα να εξετάσουμε με την βοήθεια **ενζυμικών μεθόδων** αναλυτικότερα την δραστικότητα των ενζύμων αυτών. Με αυτό το σκεπτικό αποφασίσαμε λοιπόν να μελετήσουμε, την επίδραση των ενζύμων της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSPO) του ευαίσθητου και των ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *F.graminearum* στην αποτοξικοποίηση των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων. Μειρήσεις από εκχυλίσματα ελεύθερα κυττάρων έδειξαν ότι η δραστικότητα της GST των ανθεκτικών στελεχών ήταν ίδια ή και χαμηλότερη με αυτή του αγρίου στελέχους με εξαίρεση τη περίπτωση του FG-5 που σημείωσε διπλάσια δραστικότητα. Παρόλα αυτά, όταν τα στελέχη αναπτύσσονταν παρουσία 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MBC, η ενζυμική δραστικότητα της GST σημείωσε αρκετά σημαντική αύξηση σε βαθμό έως και 430 % σε σύγκριση με την αντίστοιχη απουσίας μυκητοκτόνου. Σε αυτή τη συγκέντρωση τη μεγαλύτερη δραστικότητα σε σχέση με το άγριο παρουσίασε το υψηλής ανθεκτικότητας FG-1 στέλεχος και το FG-5 στέλεχος. Ακόμη μεγαλύτερη επαγωγή της GST σημειώθηκε σε ορισμένα ανθεκτικά στελέχη όταν αναπτύσσονταν σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MBC. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε αυτή τη συγκέντρωση η υψηλότερη δραστικότητα σημειώθηκε από το άγριο στέλεχος η οποία φάνηκε να είναι έως και 660 % περισσότερη σε σχέση με την αντίστοιχη απουσία του παρεμποδιστή. Η αυξημένη δραστηριότητα των GSTs που παρατηρήθηκε στα στελέχη του μύκητα *F.graminearum* πιθανώς να ερμηνεύεται από το ότι η παρουσία τοξικών συγκεντρώσεων του παρεμποδιστού στο υλικό ανάπτυξης του μύκητα να προκαλεί

στα κύτταρα του αγρίου στελέχους ένα είδος στρες επάγοντας την δραστηριότητα των GSTs.

Στη περίπτωση του ενζύμου GPO φάνηκαν ακριβώς τα αντίθετα αποτελέσματα. Σε όλα τα στελέχη δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές της δραστικότητας σε σχέση με του αγρίου στελέχους όταν αυτά αναπτύσσονταν απουσία του μυκητοκτόνου. Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι τα επίπεδα δραστικότητας της GPO που παρουσίασε ο μύκητας *F. graminearum* είναι ιδιαίτερος υψηλά σε σύγκριση με αυτά που μετρούνται σε άλλους ευκαριωτικούς οργανισμούς (Λάμπρου, προσωπική επικοινωνία). Παρουσία όμως του μυκητοκτόνου η δραστικότητα φάνηκε να ακολουθεί πτωτική τάση, η οποία έφτανε έως μηδενικά επίπεδα. Ιδιαίτερα το FG-5 παρουσίασε έντονα αυτή την αρνητική συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης μυκητοκτόνου και ενζυμικής δραστικότητας. Μία απάντηση σε αυτό θα ήταν ότι ο μύκητας κάτω από αυτές τις συνθήκες δεν χρειάζεται την παραγωγή GPO. Δεν αποκλείεται βέβαια η περίπτωση να χρησιμοποιεί την γλουταθειόνη που έχει στη διάθεση του για την σύνθεση της GST, η οποία από τα προηγούμενα πειράματα φάνηκε να ακολουθεί αντίστροφη πορεία. Η δεύτερη υπόθεση είναι και η πιο πιθανή και αυτό διότι θα μπορούσε να εξηγήσει την περίπτωση του στελέχους FG-5, το οποίο αν και είχε την ίδια μεταλλαγή με το FG-6, ωστόσο τα επίπεδα ανθεκτικότητας του πρώτου στελέχους ήταν πολλαπλάσια του δεύτερου. Μέχρι στιγμής δε υπάρχουν στη βιβλιογραφία μαρτυρίες για το ρόλο των GSTs στην ανθεκτικότητα των μυκήτων στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. Ωστόσο έχουν εμφανιστεί περιπτώσεις ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά με τα παράσιτα *Fasciola hepatica* και *Haemonchus contortus* (Scarcella et al, 2012; Kerboeuf και Aycardi, 1999; Kawalek et al, 1984) οι οποίες οφείλονταν στην εμπλοκή των GSTs. Πειράματα ελέγχου για τη πιθανότητα δράσης των βενζιμιδαζολικών ως αναστολείς του ενζύμου GST που ακολούθησαν με το μύκητα *F. graminearum* δεν έδειξαν τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα να αποτελούν υποστρώματα για τις GSTs. Αναφέρεται όμως ότι πέραν της καταλυτικής τους δράσης τα ένζυμα αυτά μπορεί να συμπεριφέρονται και ως ενδοκυτταρικοί μεταφορείς (Axarli και συνεργάτες, 2004) και κάτι τέτοιο ίσως να δικαιολογεί την αυξημένη δραστικότητα των GSTs που παρατηρήθηκε στα στελέχη όταν αυτά αναπτύσσονταν παρουσία MBC. Σύμφωνα με τα ανωτέρω θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι η δραστικότητα των

GST συμβάλει εν μέρη στην ανθεκτικότητα του στελέχους FG-5. **Καμία πάντως σημαντική διαφορά στα επίπεδα δραστηκότητας των GST και GPO δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των FG-1 και FG-2 στελεκών και του αγριου στελέχους** παρουσίας ή όχι MBC στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης που να δικαιολογεί και το μηχανισμό ανθεκτικότητας σε αυτά τα στελέχη.

Οι τελευταίοι μηχανισμοί κατά σειρά σπουδαιότητας στην ανθεκτικότητα των μυκήτων στα μυκητοκτόνα είναι η **μειωμένη είσοδος και η αυξημένη απέκκριση**. Μελέτες με τους μύκητες *P. digitatum* (Greenaway et al, 1978) και *S. roseus* (Nachmias και Barash, 1976) έδειξαν να υφίστανται τέτοιοι μηχανισμοί με τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα. Από τα αποτελέσματα της φασματοφωτομετρικής ανάλυσης που πραγματοποιήσαμε, φάνηκε ότι η συγκέντρωση του μυκητοκτόνου που υπήρχε στο υλικό καλλιέργειας των στελεκών μειώνεται έως 93% κατά τα πρώτα μόλις 10 λεπτά, κατόπιν να αυξάνεται μέχρι και το χρόνο των 30 λεπτών όπου από εκεί και έπειτα παρέμενε σταθερή. Σε παρόμοια συμπεράσματα καταλήγουν και οι ερευνητές με το μύκητα *Pithomyces chartarum* (Stutzenberger και Parle, 1972). Η απέκκριση του μυκητοκτόνου που παρατηρήθηκε από τα κύτταρα των στελεκών σύμφωνα με άλλες εργασίες μπορεί να συνδέεται με την ύπαρξη κάποιου ενεργοβόρου μηχανισμού (Greenaway et al, 1978). Όσον αφορά τον ρυθμό απέκκρισης φάνηκε τα δύο ανθεκτικά στελέχη να οδηγούν σε εντονότερη μείωση της συγκέντρωσης του carbendazim από το υλικό καλλιέργειας σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι είναι μάλλον απίθανο να υφίσταται ο μηχανισμός της αυξημένης απέκκρισης του μυκητοκτόνου από τα ανθεκτικά αυτά στελέχη. Θα ήταν όμως δυνατόν να συμβαίνει το ακριβώς αντίθετο: η ύπαρξη ενός μηχανισμού που να συνδέεται με τη αυξημένη ικανότητα προσρόφησης του φαρμάκου από τα κυτταρικά περιβλήματα των στελεκών, μειώνοντας κατά αυτό το τρόπο δε την ποσότητα του φαρμάκου που εισέρχεται εντός των κυττάρων. Οι περιπτώσεις ανθεκτικότητας στο μύκητα *U. maydis* στα μορφολινικά μυκητοκτόνα (Μαρκόγλου, 1997; Wellmann και Schauz, 1993), ήταν το αποτέλεσμα ενός παρόμοιου μηχανισμού. Μόνο πειράματα με τη συγκριτική ευαισθησία των πρωτοπλαστών από ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη θα μπορούσαν να διευκρινίσουν το σημείο αυτό.

Υποστηρίζεται από άλλους ερευνητές ότι η υψηλή ανθεκτικότητα που έχει καταγραφεί σε στελέχη του ίδιου μύκητα είναι δυνατόν να οφείλεται σε κάποιο

άλλο μηχανισμό πέραν της αλλαγής της θέσης δράσης (Li και συνεργάτες, 2003; Chen και συνεργάτες, 2007; Bi και συνεργάτες, 2009). Ειδικότερα στελέχη του ίδιου μύκητα τα οποία παρουσίαζαν υψηλή ανθεκτικότητα και δεν είχαν καμία μεταλλαγή στο γονίδιο της β-τουμπουλίνης, βρέθηκαν να παρουσιάζουν έντονες μορφολογικές ανωμαλίες όταν αναπτύσσονταν υπό συγκεντρώσεις 10 μg/mL MBC σε αντίθεση με ανθεκτικά στελέχη άλλων μυκήτων (Bi και συνεργάτες, 2009). Προκειμένου να διερευνήσουμε το σημείο αυτό πραγματοποιήσαμε αντίστοιχα πειράματα με κονίδια των ανθεκτικών στελεχών και είδαμε ότι ακόμα και συγκεντρώσεις των 10 μg/mL MBC δεν παρουσίαζαν καμία τέτοια μορφολογική επίδραση στη βλάστηση των κονιδίων τους. Είναι φανερό ότι ο μηχανισμός της μίτωσης στα ανθεκτικά αυτά στελέχη παραμένει ανεπηρέαστος κατά την διαδικασία επώασης των κονιδίων με MBC. Πρόσθετες μαρτυρίες για την ύπαρξη ενός άγνωστου μηχανισμού ανθεκτικότητας στα βενζιμιδαζολικά υπάρχουν και με διάφορους άλλους μύκητες όπως το *Giberella pulicaris* (Kawchuk και συνεργάτες, 2002), το *B. cinerea* (Ziogas και συνεργάτες, 2009) και το *Trichoderma virens* (Mukherjee και συνεργάτες, 2003). Αν και πρέπει να τονιστεί ότι σε καμία από τις άνωθι περιπτώσεις δεν αναφέρεται από τους συγγραφείς αν μελετήθηκε ή όχι κάποιος άλλος μηχανισμός πέραν της αλλαγής στη θέση δράσης.

Συνοψίζοντας, υπάρχει έκφραση της ανθεκτικότητας των στελεχών *in vivo*, η οποία είναι εξειδικευμένη και συνδέεται με την ύπαρξη των σημειακών μεταλλαγών H6N και F200Y στη β<sub>2</sub>-τουμπουλίνη των στελεχών FG-3, FG-4 και FG-5, FG-6, αντιστοίχως. Η μεταλλαγή H6N, φαίνεται να συνδέεται με απώλεια της ανθεκτικότητας στις χαμηλές θερμοκρασίες. Δευτερεύοντες μηχανισμοί δεν φαίνεται να εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα στα περισσότερα από τα ανθεκτικά στελέχη. Εξαιρετική ίσως αποτελεί η περίπτωση του FG-5 όπου ενδεχομένως να εμπλέκεται εν μέρει και ο μηχανισμός της αποτοξικοποίησης. Η μειωμένη ευαισθησία στα βενζιμιδαζολικά των υψηλής ανθεκτικότητας στελεχών FG-1 και FG-2 δεν δείχνει να συνδέεται με μηχανισμούς όπως η αλλαγή στη θέση δράσης, η υπερέκφραση του βιοχημικού στόχου δράσης, η αποτοξικοποίηση και η αυξημένη απέκκριση.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι πέραν των γνωστών μεταλλαγών ανθεκτικότητας στη β<sub>2</sub>-τουμπουλίνη, προβλήματα ανθεκτικότητας μπορούν να προκύψουν και από στελέχη με υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας το

οποίο οφείλεται σε μηχανισμούς πέραν των κύριων βιοχημικών μηχανισμών ανθεκτικότητας. Ευελπιστούμε δε να αποτελέσουν εφαλτήριο για μετέπειτα σχετικές εργασίες, ώστε να διαλευκανθεί ο υπεύθυνος μηχανισμός ανθεκτικότητας τέτοιων στελεχών γεγονός που θα συμβάλει στη κατάρτιση κατάλληλων στρατηγικών καταπολέμησης τέτοιων φαινοτύπων στον αγρό.





**ΜΕΡΟΣ V**  
***ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ***

---



**Abramson D., Clear R.M., and Smith D.M.** 1993. Trichothecene production by *Fusarium spp.* isolated from Manitoba grain. *Can. J. Plant Pathol.*, **15**: 147

**Abramson D.**1997. *Plant and Fungal Toxicants* (JP Felix D'Mello, ed).CRC Press,New York,p. 303-317.

**Adams J. and Whitaker T.B.** 2004. Peanuts, aflatoxin, and the U.S. origin certification program. In: *Meeting the mycotoxin menace* (Barug D,Egmond, H,Lopez-Garcia R,Osenbrugger T, Aivisconti, eds), Wageningen Academic Publishers, Netherlands, p. 183-196.

**Aguayo-Ortiz R., Mendez-Lucio O., Romo-Mancillas A., Castillo R., Yopez-Mulia L., Medina-Franco J.L., and Hernandez-Campos A.** 2013. Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel b-tubulin binding site model. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **45**: 26-37.

**Aist J.R., and Williams P.H.** 1972. *j. Cell. Biol.* **55**: 368-389.

**Albertini C., Gredt M., and Leroux P.** 1999. Mutation of the  $\beta$ -tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallunde* and *Tapesia acurformis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **64** : 17-31.

**Allen P.M., and Gottlieb D.** 1970. Mechanism of action of the fungicide thiabendazole, 2-(-4'-thiazolyl) benzimidazole. *Applied Microbiology* **20**: 919-926.

**Allocati N., Federici L., Masulli M., and Di Ilio C.** 2008. Glutathione transferases in fungi. *FEBS Journal* **276**: 58-75.

**an A., and Albertini D.F.** 1997. Stage specific effects of carbendazim (MBC) on meiotic cell cycle progression in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **46**: 351-362.

**Anderson A.L.** 1948. The development of *Gibberella zea head blight* of wheat. *Phytopathology* **48**: 595-611.

**Applebaum R.S., Brackett R.E., Wiseman D.W. and Marth E.H.** 1982. Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: Feed intake and yield, toxin content and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin . *J. Dairy Sci.* **65**: 1503-1508.

**Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T.** 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics* **22**: 195-201.

**Avenot H.F. and Michailides T.J.** 2010. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDH) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* **29**: 643-651.

**Avento H.F., Sellman A., Karaoglanidis G., and Michailides T. J.** Characterization of mutations in the iron sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. *Phytopathology* **98**: 736-742.

**Avila-Adame C., and Koller W.** 2003. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. *Current Genetics* **42**: 332-338.

**Azarli I.A., Ridgen D.J., Labrou N.E.** 2004. Characterization of the ligandin site of the maize S- transferase I. *Biochemistry Journal* **382**: 885-893.

**Bamburg J.R.** 1976. Chemical and biochemical studies of the trichothecene mycotoxins. *Mycotoxins and other fungal related food problems* (Rodricks J.V.ed), Amer. Chem. Soc. Washington,D.C. p. 144-162.

**Barak E., and Edgington L.V.** 1984. Glutathion synthesis in response to captan: a possible mechanism for resistance of *Botrytis cinerea* to the fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **21**: 412-416

**Baraldi E., Mari M., Chierici E., Pondrelli M., Bertolini P., and Pratella G.C.** 2003. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: Pathogenic fitness and genetic characterization. *Plant Pathology* **52**: 362-370.

**Bardas G.A., Doukas E.G., Konstantinou S., Kalampokis I., Markoglou A.N., and Karaoglanidis G.S.** 2010. Fungicide sensitivity, fitness and mycotoxin production of *Penicillium expansum* field isolates from apple. Proceeding of symposium on "Modern Fungicides and Antifungal Compounds", Germany, p. 100.

**Bardas G.A., Myresiotis C.K., Karaoglanidis G.S.** 2008. Stability and fitness of anilinopyrimidine-resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **98**: 443-450.

**Beardall J.M. and Miller J.D.** 1994. Diseases in humans with mycotoxins as possible causes. *Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin*, Miller J.D. and Trenholm H.L.,Eds.,Egan Press,St. Paul.,Chap 14.

**Bengoechea J.A., Brandenburg K., Seydel U., Diaz R., Moriyon I.** 1998. *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* show increased outer membrane permeability to hydrophobic agents which correlates with lipopolysaccharide acid-chain fluidity. *Microbiology* **144**: 1517-1526.

**Berek L., Petri I.B., Masterhazy A., Teren J and Molnar J.** 2001. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicol. in vitro* **15**: 25-30.

**Billard A., Fillinger S., Leroux P., Bach J., Lanen C., Lachaise H., Beffa R., and Debieu D.** 2012. Fenhexamide resistance in *Botrytis* species complex, responsible for grey mould disease. *Fungicides- Beneficial and Harmful Effects*.

**Bishop P., Sorochan J., Ownley B.H., Samples T.J., Windham A.S., Windham M.T., and Trigiano R.N.** 2008. Resistance of *Sclerotinia homoeocarpa* to iprodione, propiconazole, and thiophanate-methyl in Tennessee and Northern Mississippi. *Crop Science* **48**: 1615-1620.

**Bottalico A.** 1977. Presenza di zearaleone nelle spighe di granturco (*Zea mays* L.) infette da *Gibberella zeae* (Shw.) Petch. nel Metapontino. *Phytopathologia Mediterranea* **16**: 14-17.

**Bottalico A., Perrone G.** 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small – grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 611-624.

**Bottalico A., Logrieco A., and Visconti A.** 1989. *Fusarium* species and their mycotoxins in infected cereals in the field and in stored grains. *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (Chelowski, J, ed.) Elsevier, New York, p 85-119.

**Brend K.J. and Hollomon D.W.** 1998. *Fungicide resistance: The assessment of risk*. FRAC Monograph No 2. Global Crop Protection Federation (Brussels), p.1-48.

**Brennan J.M., B. Fagan, A. van Maanen, B.M. Cooke and F.M. Doohan.** 2003. Studies on in vitro growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 577-587.

**Brown D.W., McCormick S.P., Alexander N.J., Proctor R.H., Desjardins A.E.** 2001. A Genetic and Biochemical Approach to study Trichothecene Diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* **32**: 121-133.

**Brown H.D., Matzuk A.R., Iivues I.R., Peterson L.H., Harris S.A., Sarett L.H., Edgerton G.R., Jaktis J.J., Campbell W.C., and Cucler A.C.** 1961. *J. Am. CHEM. Soc.* **83**: 1764-1765.

**Burgess L.W., Wearing A.H., and Toussoun T.A.** 1975. Surveys of Fusaria associated with crown rot of wheat in Eastern Australia. *Aust j. Agrc. Res.* **6** : 791-799.

**Butler, Sir Edwin J. and Jonew s.g.** 1949. *Plant pathology*. MacMillan and Co.Ltd., London. p. 979 .

**Butters J.A., Zhou M., and Hollomon D.W.** 2000. The mechanisms of resistance to sterol 14a-demethylation inhibitors in a mutant (*Erg 40*) of *Ustilago maydis*. *Pesticide Managment Science* **56**: 257- 263.

**Caldwell R.W. and Tuite J.** 1970. Zearalenone production in field corn in Indiana. *Phytopathology* **60**: 1696-1697.

**Caldwell R.W. and Tuite J.** 1974. Zearaleone in freshly harvested corn. *Phytopathology* **64**: 752-753.

**Calmon J.P., and Sayag D.R.** 1976. *J. Agric. Food. Chem.* **24**: 311

**Calvano F., Ritien A.,Piva G., and Pietri A.** 2005. Mycotoxins in the human food chain.*The mycotoxin blue book* (Diaz D.,ed), Nottingham University Prees, United Kindom, p. 187-224.

**Carin Jansen, Diter vot Wettstein, Wilhelm Shafer, Karl-Heinz Kogel, Angelika Felk, and Frank J. Maier.** 2005. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *PNAS* **102**: 16892-16897.

**Carter J.P., Rezanoor H.N., Desjardins A.E., and Nicholson P.** 2000. Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin. *Plant Pathology* **49**: 452-460.

**Carter J.P., Rezanoor H.N., Desjardins A.E., Plattner R.D., and Nickolson P.** 2002. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum* . *European Journal of Plant Pathology* **108**: 573-583.

**CAST.** 2003. *Mycotoxins : Risks in Plant and Animal Systems*. Task Force Report 139, Council for Agricultural Science and Technology, Ames,Iowa, p.199.

**Chabbert Y.A., Baudens J.G., and Bouanchaud D.H.** 1969. *Bacterial Episomes and Plasmids* (Wolstenholme G.E.W. and O'Connor C.M., eds), Ciba Foundation Symposium, Churchill, London, pp. 227-243.

**Chelkowski J.** 1989. Formation of mycotoxins produced by Fusaria in heads of wheat, triticale and rye. *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (Chelowski,J,ed.) Elsevier, New York, p. 63-84.

**Chelkowski J.** 1989. Mycotoxins Associated with Corn Cob Fusariosis. *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (Chelowski,J,ed.), Elsevier, New York, p. 53-62.

**Chen C., Zhou L., Bi C., Li H., Wang J. and Zhou M.** 2008. Resistant mechanism of *Fusarium graminearum* against carbendazim, unrelative to alpha2-tubulin gene. *Nanjing Agricultural University* **48**: 1356-1361.

**Chen C.J., Wang J.X., Luo Q.Q., Yuan S.K., Zhou M.G.** 2007a. Characterization and fitness of carbendazim-resistant strains of *Fusarium graminearum*. *Pesticide Management Science* **63**: 1201-1207.

**Chen C.L., Li J., Qi Z.Q., Wang J.X., and Zhou M.G.** 2005. Cloning of alpha-tubulin gene from *Fusarium graminearum* and analyzing its relationship with carbendazim-resistance. *Nanjing Agricultural University* **45**: 288-291.

**Chen Y., Wang J.X., Zhou M.G., Chen J.C., and Yuan S.K.** 2007b. Vegetative compatibility of *Fusarium graminearum* isolates and genetic study on their carbendazim-resistance recombination in China. *Phytopathology* **97**: 1584-1589.

**Chen Yu and Zhou M.G.** 2009. Sexual recombination of carbendazim resistance in *Fusarium graminearum* under field conditions. *Pesticide Management Science* **65**: 398-403.

**Chun J.H.** 1963. Epidemiological survey of human mycotoxicosis caused by scabby cereals. In *Ministry of Agriculture and Forestry*, (Republic of Korea ,ed.), *Research report of heat and barley scab*. Ministry of Agriculture and Forestry, Seoul Korea. (In Korean.) p. 385-507.

**Clemons G.P., and Sisler H.D.** 1969. Formation of a fungitoxic derivative from benlate. *Phytopathology* **59**: 705.

**Cohen N.C.** 1996. *Molecular Modeling in Drug Design*. Academic Press, New York, 235-336.

**Cole D.J., and Edwards R.** 2000. Secondary metabolism of agrochemicals in plants. *Metabolism of Agrochemicals in Plants* (Roberts T., ed), John Wiley & Sons, New York, 43.

**Cook R.J.** 1981. *Fusarium* diseases of wheat and other small grains in North America. *Fusarium :diseases, biology and taxonomy* (Nelson P.E., Toussoun T.A., and Cook R.J. eds) Penn. State Univ. Press, University Park. p. 39-52.

**Cowen L.E.** 2001. Predicting the emergence of resistance to antifungal drugs. *FEMS Microbiology Letters* **204**: 1-7.

**D'Mello J.F.P, Macdonald A.M.C., Postel D., Dijkema W.T.P., Dujardin A., and Placinta C.M.** 1998. Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phyopathogens. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 741-751.

**D'Mello J.P.F., Porter J.K., Macdonald A.M.C., and Placinta C.M.** 1997. *Plant and Fungal Toxicants* ( D'Mello,JPF, ed).CRC Press, New York, p. 287-301.

**Davidse L.C.** 1975. Antimitotic activity of methyl benzimidazol-2-yl carbamate in fungi and its binding to cellular protein. *Microtubuls and Microtubule Inhibitors* (M.Borgers & M. de Brabander ,eds) North Holland Publ. Co., Amsterdam, p. 483-495.

**Davidse L.C.** 1976. Metabolic conversion of methyl benzimidazol-2yl-carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **6**: 538-546.

**Davidse L.C.** 1986. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. *Annual Review of Phytopathology* **24**: 4365.

**Davidse L.C.** 1987. Biochemical aspects of phenylamide fungicides-action and resistance. *Modern Selective Fungicides* (Lyr H., ed), Gustav Fischer Verlag, New York, 1<sup>st</sup> edition, 275.

**Davidse L.C. and Flach W.** 1977. Differential binding of methyl benzimidazole-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Asperillus nidulans*. *J. Cell. Biol.* **72**: 174-193.

**Davidse L.C. and Ishi H.** 1995. Biochemical and molecular aspects of the mechanisms of action of benzimidazoles, *N*-phenylcarbamates and *N*-phenylformamidoximes and the mechanisms of resistance to these compounds in fungi. *Modern Selective Fungicides* (Lyr H., ed), Gustav Fischer, New York, 305-322.

**De Waard M.A., and Nistelrooy J.G.M.** 1980. Mechanism of resistance to pyrazophos in *Pyricularia oryzae*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **86**: 251 p-258.

**De Waard M.A., Andrade A.C., Hayashi K., Schoonbeek H-J., Stergiopoulos I., Zwiers L.H.** 2006. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pesticide Management Science* **62**: 195-207.

**De Waard M.A., Andrade A.C., Hayashi K., Shoonbeek H-J, Stergiopoulos I, and Zwiers L-H.** 2006. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. Resistance to Fungicides which inhibit sterol 14a-demethylation, an Historical Perspective,*Pesticide Management Science* **62**: 195-207.



**De Warrd M.A. and Van Nistelrooy J.G.M.** 1982. Differential accumulation of fenarimol by wild-type isolate and fenarimol-resistant isolates of *Penicillium italicum*, *Netherlands Journal of Plant Pathology* **90**: 143.

**Decallone J.R., Monique Genot and Meyer J.A.** 1975. Effects of benomyl, carbendazim and thiophanates on respiration and oxidative phosphorylation of *Fusarium oxysporum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Pesticides Science* **6**: 113-120.

**DeHaan K., Stock r., Brink D., Klopkenstein T., and Schneider N.** 1984. Scabby wheat influence on performance.MP-47, Nebraska Beef Cattle Report, Nebraska.

**Deising H., Reimann S., and Pascholati S.** 2008. Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology* **39**: 286-295.

**Dekker J.** 1968. The development of resistance in *Cladosporium cucumerinum* against 6-azauracil, a chemotherapeutant of cucumber scab, and its relation to biosynthesis of RNA-precursors. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **74**: 127-136.

**Dekker J.** 1977. Resistance. *Systemic Fungicides*. 2<sup>nd</sup> edition, (Marsh R.W. ed.), Longman Group Limited, London.

**Dekker J.** 1995. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. *Modern Selective Fungicide*, (Lyr H, ed), Gustav Fischer Verlag, New York, 2<sup>nd</sup> edition.

**Dekker J. and Georgopoulos S.G.** 1982. *Fungicide Resistance in Crop Protection* Pucoc, Wageningen.

**Del Sorbo G., Schoonbeek H-J., De Waard M.A.** 2000. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genetics and Biology* **30**: 1-15.

**Delp C.J.** 1988. *Fungicide Resistance in North America*. APS Press, St. Paul., Minnesota.

**Delp C.J. Benzimidazoles and related compounds.**1995. *Modern Selective Fungicides* (Lyr H., ed), Gustav Fischer, New York, 291-303.

**Delp C.J., and Klopping H.L.** 1968. Performance attributes of a new fungicide and mite ovicide candidate. *Plant. Disease Repr.* **52**: 95.

**Delye C., Bousset L., and Corio-Coster M.F.** 1998. PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14a-demethylase (CYP51) gene from *Erysiphe graminis f.sp. hordei*, a “recalcitrant” fungus. *Current Genetics* **34**: 399-403.

**Delye C., Laigret F., and Corio-Coster M.F.** 1997. A mutation in the 14a-demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Applied of Environmental Microbiology* **63**: 2966-2970.

**Demopoulos V.P. and Ziogas B.N.** 1994. Studies on the mechanism of expression of a major gene mutation for resistance to triadimenol in the filamentous phytopathogenic ascomycete *Nectria haematococca var. curcubitae*, *Pesticide Biochemistry and Physiology* **50**: 159.

**Desjardins A.E., Manandhar H.K., Plattner R.D., Manandhar G.G., Poling S.M. and Maragos C.M.** 2000. *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Applied Environmental Microbiology* **66**: 1020-1025.

**Donald M. Gardiner , Sheree Osborne, Kemal Kazan and John M. Manners.** 2009. Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. *Microbiology* **155**: 3149-3156.

**Doohan F.M., Brennan J. and Cooke B.M.** 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* **109** : 755-768.

**Doohan F.M., Parry D.W., Jenkinson P. and Nicholson P.** 1998. The use of species-specific PCR-based assays to analyse *Fusarium* ear blight of wheat. *Plant Pathology* **47**: 197-205.

**Dorn B., Forre H.R., Jenny E., Wettstein F.E., Bucheli T.D. and Vogelgsang S.** 2011. *Fusarium* species complex and mycotoxins in grain maize from maize hybrid trials and from grower’s fields. *Journal of Applied Microbiology* **111**: 693-706.

**Doukas E.G.,Markoglou A.N.,and Ziogas B.N.** 2007. Fungicide resistance and aflatoxin production: The effect of resistance to mutations to triazoles, phynylpyrroles and anilinopyrimidine fungicides on aflatoxigenic ability of *Aspergillus parasiticus*. Proceedings of symposium on “Best Practice in Disease, Pest and Weed Management”, Germany, p. 62-63.

**Dundas J., Ouyang Z., Tseng J., Binkowski A., Turpaz Y., and Liang J.** 2006. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acid Research* **34**: 116-118.

**Eaton D.L. and Gallagher E.P.** 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**: 135.

**Edwards S.G., Pirgozliev S.R., Hare M.C. and Jenkinson P.** 2001. Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against *Fusarium* head blight of winter wheat. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1575-1580.

**Elad Y., Shabi E., and Katan T.** 1988. Negative cross resistance between benzimidazole and N-phenylcarbamate fungicides and control of *Botrytis cinerea* on grapes. *Plant Pathology* **37**: 141-147.

**Elad Y., Yunis H., Katan T.** 1992. Multiple fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathology* **41**: 41-46.

**Elling F., Hald B., Jacobsen C., and Krogh P.** 1975. Spontaneous toxic nephropathy in poultry associated with ochratoxin A. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A* **83**: 739.

**Ellis E.M., Judah D.J., Neal G.E. and Hayes J.D.** 1993. An ethoxyquin-includible aldehyde reductase from rat liver that metabolises aflatoxin B1 defines a subfamily of aldo-keto reductases. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 350.

**Erwin D.C.** 1973. Systemic fungicides: Disease control, translocation and mode of action. *Annual Review Phytopathology* **11**: 389.

**Essigman J.M., Croy R.G., Nadzan A.M., Busby W.F., Reingold V.N., Buchi G., and WOGAN G.N.** 1977. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B1 in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74** : 1870-1874.

**Feretra F. and Pollastro S.** 1991. Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide in *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res* **95** : 943-951.

**Fillinger S., Leroux P., Auclair C., Barreau C., Al Hajj C., Debieu D.** 2008. Genetic analysis of fenhexamid-resistant field isolates of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 3933-3940.

**Fischer N., and Meunier B.** 2005. Re-examination of inhibitor resistance conferred by Qo-site mutations in cytochrome b using yeast as a model system. *Pesticide Management Science* **61**: 973-978.

**FRAG-UK.** 2011. <http://frag.csl.gov.uk/cropspecific.cfm>.

- Friedman P.A., and Platzer E.G.** 1978. Interaction of athelmintic benzimidazoles and benzimidazole derivatives with bovine brain tubulin. *Biochim. Biophys. Acta* **544**: 605-614.
- Frisvad J.C., and Thrane U.** 1995. Mycotoxin production by food-borne fungi. In *Introduction to Food-Borne Fungi*, 4<sup>th</sup> Edition, Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., and Thrane U., eds., Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, p. 251.
- Fritz R., Lanen C., Colas V., and Leroux P.** Inhibition of methionine biosynthesis in *Botrytis cinerea* by the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. *Pesticide Science* **49**: 40-46.
- Fuchs A., and De Vries F.W.** 1984. Diastereomer-selective resistance in *Cladosporium cucumerinum* to triazole-type fungicides. *Pesticide Science* **15**: 90.
- Fujimura M., Kamakura T., Inoue H., and Yamaguchi I.** 1994. Amino-acid alterations in the beta-tubulin gene of *Neurospora crassa* that confer resistance to carbendazim and diethofencarb. *Current Genetics* **25**: 418-422.
- Fujimura M., Ochiai N., Oshima M., Matouama T., Ichichi A., Usami R., Horikochi K., Yamaguchi G.** 2003. Putative homologs of SSK22 MAPKK kinase and PBS2 MAPK kinase of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by *os-4* and *os-5* genes for osmotic sensitivity and fungicide resistance in *Neurospora crassa*. *Biosc. Biotechn. Biochem.* **67**: 186-191.
- Gafur A., Tanaka C., Shimizu K., Ouchi S., Tsuda M.** 1998. Molecular analysis and characterization of the *Cochliobolus heterostrophus* beta-tubulin gene and its possible role in conferring resistance to benomyl. *Journal Genetics and Applied Microbiology* **44**: 217-223.
- Gallori E., Casalone E., Nocita O., Turbanti L., and Porsinelli M.** 1988. Isolation and characterization of a glutathione-overproducing, captan-resistant mutant of *Azospirillum brasilense*. *Journal of General Microbiology* **134**: 3173-3178.
- Gareis M., Bauer J., Ender C., Gedec B.** 1989. *Fusarium mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity*, (Chelkowski J, ed) Elsevier, Amsterdam, p. 441-472.
- Gary P. Munkvold** .2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 705-713.
- Gaunt R.E., Elmer P.A.G., and Sanoomuang N.** 1994. The epidemiological and genetical basis of benzimidazole and dicarboximide resistance in *Monilinia fruticola* Stone fruit, BCPC Monograph No 60. In: *Fungicide Resistance* (Heaney S., Slawson D., Hollomon D.W., Smith M., Ruse II P.E., and Parry D.W., eds), United Kingdom, p. 233-237.

- Georgopoulos S.G.** 1976. The genetics and biochemistry of resistance to chemicals in plant protection. *Proceedings of American Phytopathological Society* Vol. 3, 53.
- Georgopoulos S.G.** 1977. Development of fungal resistance to fungicides. *Antifungal compounds* Vol. II (Malcolm R. Siegel, Hugh D. Sisler), Marcel Dekker, New York and Basel, p. 439-495.
- Georgopoulos S.G. and Sisler H.D.** 1970. Genetic mutation eliminating antimycin A- tolerant electron transport in *Ustilago maydis*. *Journal Bacteriology* **103**: 745.
- Georgopoulos, S.G.** 1987. The development of fungicide resistance. *Populations of Plant Pathogens: their Dynamics and Genetics*, (Wolfe M.S. και Caten C.E., eds), Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Gerlach W., and Nirenberg H.** 1982. *The genus Fusarium – a pictorial atlas*. Mitt.Biol. Bundesanstalt H.209, p. 406.
- Giannaopolitis C.N.** 1978. Occurrence of strains of *Cercospora beticola* resistant to triphenyltin fungicides in Greece, *Plant Dis. Report.*, **62**: 205.
- Giegler W.B., Conn J.E.** 1945. The mechanism of the antibiotic action of clavacin and penicillic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **67**: 112-115.
- Gisi U., Sierotzki H., Cook A., and McCaffery A.** 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pesticide Management Science* **58**: 859-867.
- Glattli A., Stammler G., Grote T., and Shlehuber S.** 2010. SDH inhibitors: history, biological performance, and molecular mode of action. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. 16<sup>th</sup> International eds), Firendrichroda, Germany, pp 50-54.
- Glavits R.** 1993. Nephropathy caused by ochratoxin A in a Hungarian swine stock. *Magyar Allatorvosok Lapja* **48**: 343-349.
- Gortz A., Oerke E.C., Steiner U., Waalwijk C., de Vries I., & Dehne H.W.** 2008. Biodiversity of *Fusarium* species causing ear rot of maize in Germany. *Cereal Research Communications* **36**: 617-622.
- Goswami R.S., and Kistler C.** 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* **5**: 515-525.
- Goswami R.S., and Kistler H.C.** 2005. Pathogenicity and in plant mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology* **95**: 1397-1404.

**Grabarkiewicz-Szczesna J., Foremska E., and Golinski P.** 1996. Distribution of trichothecene mycotoxins in maize ears infected with *F.graminearum* and *F.crookwellense*. *Mycotoxin Research* **12**:

**Greenaway W.** 1971. Relationships between mercury resistance and pigment production in *Pyrenophora avenae*. *Transactions of the British Mycological Society*. **56**:37.

**Greenhalgh R., Meier R.M., Blackwell B.A., Miller J.D., Taylor A. and Apsimon J.W.** 1984. Minor metabolites of *Fusarium roseum* (ATCC 28114) *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **32**: 1261-1264.

**Griffin D.H.** 1994. *Fungal Physiology* 2<sup>nd</sup> Edition (DH Griffin ed).Willey-Lyss, New York.

**Guex N., and Peitsch.** 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714-2723.

**Gustin M.S., Albertyn J., Alexander M., and Davenport K.** 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Molecular and Biological Reviews* **64**: 1264-1300.

**Hamamoto H., Hasegawa K., Nakaune R., Jin Lee U., Makizumi Y., Akutsu K., and Hibi T.** 2000. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14<sup>α</sup>-demethylase gene (*CYP51*) in *Penicillium digitatum*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3421-3426.

**Hamilton P.B., Huff W.E., Harris J.R. and Wyatt R.D.** 1982. Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. *Poultry Science* **61**: 1832-1841.

**Hart W.E., Braselton J.R. and Stebbins T.C.** 1982. Production of zearalenone and deoxynivalenol in commercial Sweet corn. *Plant Disease* **66**: 1133-1135.

**Heath I.B.** 1978. Experimental studies of mitosis in the fungi. In: *Nuclear Division in the Fungi* (IB Heath ed).Academic Press, New York, p. 89-176.

**Helweg A.** 1972. Microbial breakdown of the fungicide benomyl. *Soil. Biol. Biochem.* **4**: 377.

**Hirschfeld T., Ellner F., Buschhaus H., and Gossmann M.** 2011. New insights in the mode of action of thiophanate-methyl. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds VI*, Germany, 417-421.

**Hitchcock C.A., Barrett K.J., and Russel N.J.** 1986. The lipid composition of azole-sensitive and azole-resistant strains of *Candida albicans*, *Jurnal of General Microbiology*, **132**: 2421.

- Hodgson E., and Philpot R.M.** 1974. Interaction of methylenedioxyphenyl (1,3-benzodioxole) compounds with enzymes and their effect, in vitro, on animals. *Drug Metabolism Reviews* **3**: 231-301.
- Hodgson E., and Tate L.G.** 1976. Cytochrome P450 interactions. *Insecticide Biochemistry and Physiology* (Wilkinson C.F., ed), Plenum Press, New York and London, 115.
- Hollomon D.W., Butters J.A., and Kendall S.J.** 1997. Mechanism of resistance to fungicides. *Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals* (Sjut D., ed), Springer-Verlag, Germany, 1-20.
- Horberg H.G.** 2002. Patterns of splash dispersed conidia of *Fusarium poae* and *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 73-80.
- Howard R.J., and Aist J.R.** 1977. *Protoplasma* **92**: 195-210.
- Howard S.J., Cerar D., Anderson M.J., Albarrag A, and Fisher M.C.** 2009. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerging Infectious Diseases* **15**: 1068- 1076.
- Huang K.T., Misato T., and Asuyama H.** 1964. Selective toxicity of blasticidin S to *Pyricularia oryzae* and *Pellicularia sasakii*. *Journal of Antibiotics* **17**: 71.
- Inaba T., and Mirocha C.J.** 1979. Preferential binding of radiolabeled zearalenone to a protein fraction of *Fusarium roseum graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology* **37**: 80-84.
- Ishii H., and Davidse L.C.** 1986. Decreased binding of carbendazim to cellular protein from *Venturia nashicola* and its involvement in benzimidazole resistance. *Proceeding of British Crop Protection Conference-Pests and Diseases*, BCPC,Fernham, Surrey,UK, p. 567-573.
- Jabs T., Cronshaw K., and Freund A.** 2001. New strobilurin resistance in apple scab (*Venturia inaequalis*) and its distribution in Europe. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, 13<sup>th</sup> International Rheinhardtbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany.
- Jenczmionka N.J., Maier F.J., Losch A.P.,and Shafer W.** 2003. Mating, conidiation and pathogenicity of *Fusarium graminearum*, the main casual agent of head -blight disease of wheat, are regulated by the MAP kinase gpmk1. *Current Genetics* **43**: 87-95.
- Jencznionka N.J. and Shaefer W.** 2005. The Gmpk1 MAP kinase of *Fusarium graminearum* regulates the induction of specific secreted enzymes. *Current genetics* **47** : 29-36.

**Jian -Hua Wang, Mbacke Ndoye, Jing Bo-Jhang, He-Ping Li, and Yu-Cai Liao.** 2011. Population structure Genetic diversity of the *Fusarium graminearum* Species complex. *Toxins* **3**: 1020-1037.

**Jones D.R.** 1994. Strategies for management of fungicide resistance: Cereals. BCPC Monograph No 60. In: *Fungicide Resistance*, Monograph No 60 (Heaney S., Slawson D., Hollomon D.W., Smith M., Ruse II P.E., and Parry D.W., eds), United Kingdom, p 357-364.

**Joseph- Horne T. and Holomon D.W.** 1997. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. *FEMS Microbiology Letters*, **149**: 141- 149.

**Joseph-Horne T., Wood P.M., Wood C.K., Moore A.L., Headrick J., and Hollomon D.** 1998. Characterization of a split respiratory pathway in the wheat 'Take-all' Fungus, *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. *Journal Biology and Biochemistry* **273**: 11127-11133.

**Jouany J-P, and Diaz D.E.** 2005. Effects of mycotoxins in ruminants. In: *The Mycotoxin Blue Book* (Diaz D., ed), Nottingham University Press, United Kingdom, p. 295-321.

**Julliana A. Galli, Simone A. Fessel, Rita C. Panizzi.** 2005. Effect of *Fusarium graminearum* and infection index on germination and vigor of maize seeds. *Fitopatologia Brasileira* **30**: 1-7.

**Kaars Sijpesteijn A., Dekhuijzen H.M., and Vonk J.W.** 1977. Biological conversion of fungicides in plants and microorganisms. *Antifungal Compounds* (Siegel M.R. and Sisler H.D., eds) Marcel and Dekker, New York, 91-147.

**Kaars Sijpesteijn A.** 1977. Effects on fungal pathogens. *Systemic Fungicides* (Marsch R.W., ed), Longman, New York, 131-159.

**Kabeere F., Hampton JG and Hill MJ.** 1997. Transmission of *Fusarium graminearum* (Schwabe) from maize seeds to seedlings. *Seed Science Technology* **25**: 245-252.

**Kamimura H., Nishijima M., Saito K., Yasuda K., Ibe A., Nagayama T., Ushiyama T., and Naoi Y.** 1979. The decomposition of trichothecene mycotoxins during food processing. *J. Fd Hyg. Soc., Japan* **20**: 352-357.

**Kanetis L., Forster H., and Adaskaveg J.E.** 2010. Determination of natural resistance frequencies in *Penicillium digitatum* using a new air-sampling method and characterization of fludioxonil-resistance isolates. *Phytopathology* **100**: 733-746.

**Kapoli P., Axarli I.A., Platis D., Fragoulaki M., Paine M., Hemingway J., Vontas J., Labrou N.E.** 2008. *Biosensors and Bioelectronics* **24**: 498-503.



- Karaoglanidis G.S., Markoglou A.N., Bardas G.A., Doukas E.G., Konstantinou S., and Kalampokis J.F.** 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**: 195-204.
- Katagi T., and Mikami N.** 2000. Primary metabolism of agrochemicals in plants. *Metabolism of Agrochemicals in Plants* (Roberts T., ed), John Wiley & Sons, New York, 43.
- Katan T., Elad Y., and Yunis H.** 1989. Resistance to diethofencarb (NPC) in benomyl-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* **38**: 86-92.
- Katherine M.J., and Oakley B.R.** 1990. Identification of an amino acid substitution in the benA,  $\beta$ -tubulin gene of *Aspergillus nidulans* that confers thiabendazole resistance and benomyl supersensitivity. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **17**: 87-94.
- Kaufman D.D.** 1977 Soil-fungicide interactions. *Antifungal Compounds* (Siegel M.R. and Sisler H.D., eds) Marcel and Dekker, New York, 1-49.
- Kawalek J.C., Rews R.S., and Heavner J.** 1984. Glutathione S-transferase, a possible drug metabolizing enzyme in *Haemonchus contortus*: comparative activity of a cambendazole-resistant and a susceptible strain. *Int. J. Parasitol.* **14**: 173-175.
- Kawchuk L.M., Hutchison L.J., Verhaeghe C.A., Lynch D.R., Bains P.S., and Holley J.D.** 2002. Isolation of the  $\beta$ -tubulin gene and characterization of thiabendazole resistance in *Gibberella pullicaris*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **24**: 233-238.
- Kendal S., Hollomon D., Ishii H., and Heaney S.P.** 1994. Characterization of benzimidazole-resistant strains of *Rhynchosporium secalis*. *Pesticide Science* **40**: 175-181.
- Kerboeuf D., Aycardi J.** 1999. Unexpected increased thiabendazole tolerance in *Haemonchus contortus* resistant to anthelmintics by modulation of glutathione activity. *Parasitology Res.* **85**: 713-718.
- Kerry O' Donnell, H. Corby Kistler, Beth K. Tacke, and Howard H. Casper.** 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *PNAS* **79** : 7905-7910.
- Khonga E.B., Sutton J.C.** 1988. Inoculum production and survival of *Gibberella zeae* in maize and wheat residues. *Canadian Journal of Plant Pathology* **10**: 232-240.

- Kiecana I.** 1986. Fuzarioza klosow pszentyta. *Roczniki Nauk Roln.* ,Ser.E. **16**: 59-68.
- Kimura M., Anzai H., and Yamaguchi I.** 2001. Microbial toxins in plant-pathogen interactions : biosynthesis, resistance mechanisms, and significance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **47** : 149-160.
- Koenraadt H., Somerville S.C., and Jones A.L.** 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* **82** : 1348-1354.
- Kontoyiannis D.P., Sagar N., and Hirschi K.D.** 1999. Overexpression of Erg11P by the regulatable *GAL1* promoter confers fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 2798-2800.
- Korzybski T., Kowszyk-Gindifier Z., Kurylowicz S.** 1967. *Antibiotics origin, nature, and properties* Vol II. Pergamon Press, New York, p. 1223-1230.
- Kruger W.** 1989. Maize diseases caused by Fusaria: Involved species and mycotoxins. *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (Chelowski, J, ed.) Elsevier, New York, p 297-317.
- Kuiper-Goodman T., Scott P.M. and Watanabe H.** 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **7**: 253-306.
- Kumar A., and Schweizer H.P.** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**: 1486-1513.
- Kuroguchi S., Katagiri M., Takase I., and Uesugi Y.** 1985. Metabolism of edifephos by strains of *Pyricularia oryzae* with varied sensitivity to phosphorothiolate fungicides. *Journal of Pesticide Science* **10**: 41-46.
- Labrou N.E., Karavangeli M., Tsiftaris A., and Clonis Y.D.** 2005. Kinetic analysis of maize glutathione-S-transferase I catalyzing the detoxification from chloroacetanilide herbicides. *Planta* **222**: 91-97.
- Labrou N.E., Kotzia G.A., and Clonis Y.D.** 2004. Engineering the xenobiotic substrate specificity of maize glutathione-S-transferase I. *Protein Engineering, Design & Selection* **17**: 741-748.
- Labrou N.E., Mello L.V., and Clonis Y.D.** 2001. The conserved Asn49 of maize glutathione-S-transferase I modulates substrate binding, catalysis and intersubunit communication. *European Journal Biochemistry* **268**: 3950-3957.

- Lacicowa B.** 1989. *Fusarium* diseases of wheat and triticale in some regions of Eastern Europe. *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (Chelowski, J., ed.) Elsevier, New York, p. 283-296.
- Lacicowa B., Kiecana I.** 1987. Występowanie *Fusarium culmorum* (WG.Sm.) Sacc. i *Fusarium avenaceum* (Fries.) Sacc. na pszenicy oraz podatność rodów hodowlanych na porażenie. *Rocz. Nauk Roln., Ser E.* **17**: 161-178.
- Lai C.L., Fuh Y-M, Smith DY-C.** 2000. Detection of mycotoxin patulin in apple juice. *J. Food Drug Anal.* **2**: 85-96.
- Lalancette N., Hickey K.D., and Cole H.J.** 1987. Parasitic fitness and intrastain diversity of benomyl-sensitive and benomyl-resistant subpopulations of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **77**: 1600-1606.
- Lau E.P., Niswander L., Watson D., and Fall R.R.** 1980. Glutathione-S-transferase is present in a variety of microorganisms. *Chemosphere* **9**: 565.
- Lauren D.R., Jensen D.J., Smith W.A., Dow B.W. and Sayer S.T.** 1996. Mycotoxins in New Zealand maize: A study of some factors influencing contamination levels in grain. *New Zealand Journal of Crop and Horticulture Science* **24**: 13-20.
- Leibetseder J.** 1995. The European perspective on mycotoxins. *Bio-technology in the Feed Industry: Proceedings of Alltech's 11<sup>th</sup> Annual Symposium* (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds). Nottingham University Press, UK, p.65-74
- Lengkeek V.H.** 1980. Efficacy of chemical control of stalk and ear rot of corn in southwest Kansas. Fungicide and Nematicide Test. Field and Cereal Disease Reports, Texas, A. & M. Univ. **36**: 83.
- Leroux P., Credt M., Leroch M., Walker A-S.** 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of grey mold. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 6615-6630.
- Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Arnold A., Bach J., Chapeland F., Fournier E., Fritz R., Gredt M., Hugon M., Lanen C., Mallose C, and Thebaud G.** 2001. The hydroxyanilide botrycide fenhexamid: mode of action and mechanism of resistance. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, 13<sup>th</sup> International Rheinhardtsbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany.
- Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M., and Chapeland F.** Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Management Science* **58**: 876-888.

- Lewis K.** 1999. Multidrug Resistance efflux. *Transport of molecules across microbial membranes* (Broome-Smith J.K., Baumerg S., Stirling C.J., and Ward F.B., eds), Symposium 58, Cambridge University Press, United Kingdom.
- Liu X., Yu F., Schnabel G., Wu J., Wang Z., Ma Z.** 2011. Paralogous cyp51 genes in *Fusarium graminearum* mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *Fungal Genetics and Physiology* **48**: 113-123.
- Loffler H.J.M., Cohen E.B., Oolbekkink G.T., and Schippers B.** 1986. Nitrite as a factor in the decline of *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* in soil supplemented with urea and ammonium chloride. *Neth. J. Pl. Path.* **92**: 153-162.
- Logrieco A, Mule G., Moriatti A and Bottalico A.** 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 597-609.
- Logrieco A., Bottalico A., Mule G., Moretti A. and Perrone G.** 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 645-667.
- Luo Q.Q, Xu J.Q, Hou Y.P., Chen C.J., Wang J.X., and Zhou M.G.** 2009. PIRA-PCR for detection of *Fusarium graminearum* genotypes with moderate resistance to carbendazim. *Plant Pathology* **58**: 882-887.
- Ma J., and Michailides T.** 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* **24**: 853-863.
- Ma Z., Yan L., Lou Y., and Michailides T.J.** Sequence variation in the two-component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **88**: 300-306.
- Ma Z., Yoshimura M., and Michaelides T.J.** 2003. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fruticola* from stone fruit orchards in California. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7145-7152.
- MacNeill B.H. and Schooley J.** *Canadian Journal of Botany*, **51**: 379.
- Macreadie I.G., Sewell A.K., and Winge D.R.** 1994. Metal ion resistance and the role of metallothionein in yeast. *Metal Ions in Fungi* (Winkelmann G. and Winge D.R., eds), Marcel Dekker, New York, 279-310.
- Madigan M.T., Martinko J.M., and Perker J.** 2005. (σε Ελληνική απόδοση) *Βιολογία των Μικροοργανισμών* Τόμος Ι. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης.

- Malandrakis A.A., Markoglou A.N., Nikou D.C., Vontas J.G, and Ziogas B.N.** 2006. Biological and molecular characterization of laboratory mutants of *Cercospora beticola* to Qo inhibitors, *European Journal of Plant Pathology*, **116**: 155-166.
- Maldonado-Ramirez S.L., Shmale III D.G., Shields E.J., Bergstrom G.C.** 2005. The relative abundance of viable spores of *Gibberella zeae* in the planetary boundary layer suggest the role of long-distance transport in regional epidemics of Fusarium head blight. *Agricultural and Forest Meteorology* **132**: 20-27.
- Manka M.** 1988. Pathogenicity of *Fusarium graminearum* Schabe isolates from Polant seedlings of cereal species. Mycotoxin Research, European Seminar ‘Fusarium-Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity’, p.11-14.
- Manka M.** 1989. Fusaria as pathogens of cereal seedlings. *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (Chelowski,J,ed.) Elsevier, New York, p 329-355.
- Manninger I.**, 1979. Resistance of maize to ear rot on the basis of natural infection and inoculation. In: *Proc. 10th meeting, Eucarpia, Maize, Lorghum,Sec., Varna, Bulgaria*, p. 181-184.
- Marin S.E., Sanchis E. and Ramos A.J.** 1998. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. *Mycology Residues* **120**: 959-964.
- Markoglou A.N., Doukas E.G., and Malandrakis A.A.** 2011. Effect of anilinopyrimidine resistance on aflatoxin production and fitness parameters in *Aspergillus parasiticus* Speare. *International Journal of Food Microbiology* .
- Markoglou A.N., Doukas E.G., Ziogas B.N.** 2008. Phenylpyrrole-resistance and mycotoxin production in *Aspergillus parasiticus* Speare. *International Journal of Food Microbiology*
- Markoglou A.N., Vattis K., Dimitriadis K., Doukas E.G., and Ziogas B.N.** 2008. Effect of phenylpyrrole resistance mutations on mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Penicillium expansum*. Proceeding of symposium on ‘Best Practice in Disease, Pest and Weed Management’, Germany, p.62-63.
- Markoglou A.N., Vitoratos A.G., Doukas E.G., and Ziogas B.N.** 2009. Phytopathogenic and mycotoxigenic characterization of laboratory mutant strains of *Fusarium verticillioides* resistant to triazole fungicides. In: Proceedings of Symposium in ‘Crop Plant Resistance to Biotic and Abiotic Factors’, Germany, p. 195.

**Martin R.A. and Johnson H.W.** 1982. Effects and control of *Fusarium* diseases of cereal grains in the Tlantic provinces. *J. Plant Pathol* **4** : 210-216.

**Masterhazy A.** 1982. Resistance of corn to *Fusarium* ear rot and its relation to seedling resistance. *Phytopathology Z.* **103**: 218-231

**Matolcsy G., Nadasy M., and Andriska V.** 1988. Azole compounds. *Pesticide Chemistry* (Matolcsy G., Nadasy M., and Andriska V., eds), Elsevier, New York, 388-421.

**Matta A., and Abbatista Gentile I.** 1971. Activation of the thiophanate systemic fungicides by plant tissues. *Meded. Fac. Landbouwwetensch. Rijksuniv. Gent.* **36**: 1151.

**Maymon M., Zveibil A., Pivonia S., Minz D , and Freeman .** 2006. Identification and characterization of benomyl-resistant and -sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from statice ( *Limonium* spp.), *Phytopathology* **96**: 542-548.

**Mc Lellan L.I., Judah D.J., Neal G.E. and Hayes J.D.** 1994. Regulation of aflatoxin B1-metabolising aldehyde reductase and glutathione S-transferase by chemoprotectors.

**McGee D.C., and Zuck M.G.** 1981. Competition between benomyl-resistant and sensitive strains of *Venturia inaequalis* on apple seedlings. *Phytopathology* **71**: 529-532.

**McLaughlin C.S., Vaughn M.H., Campbell J.M., Wei C.M., and Stafford M.E.** 1977. Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. *Mycotoxins in human and Animal health.* (J.V.Rodricks,C.V. Hesseltine, and M.A.,Mehlman, eds) Pathotoxin Publishers, Park Forest, III, p.263-273.

**Mesterhazy A.** 1984. A laboratory method to predict Pathogenicity of *Fusarium graminearum* in Field and Resistance of Wheat to Scab. *Acta Phytopathology* **19**: 205-218.

**Mesterhazy A.** 1984. *Fusarium* species of wheat in South Hungary, 1970-1983. *Cer. Res. Comm.* **12**: 167-170.

**Mesterhazy A.** 2003. Control of *Fusarium* Head Blight of wheat by fungicides. In: *Fusarium Head Blight in Wheat and Barley* (Leonard K.J,Bushnell W.R,eds), The American Phytopathology Society,USA, p-363-380.

**Miedaner T., Bolduan C., Melchinger A.E.** .2010. Agressiveness and mycotoxin production of eight isolates each of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* for ear rot on susceptible and resistant early maize inbred lines. *European Journal of Plant Pathology* **127**: 113-123.

- Mielke H. and Weinert J.** 1996. Investigations on the effect of various fungicides on the pathogen of partial head blight (*Fusarium culmorum*/W.G.Sm./Sacc.) Nachrichtenbl.Dtsch. Pflanzenschutzdienstes **48**: 93-95.
- Miender T., Bolduan C., Melchinger A.E.** 2010. Aggressiveness and mycotoxin production of eight isolates each of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* for ear rot on susceptible and resistant early maize. *European Journal of Plant Pathology*. **127**: 113-123.
- Miller J.D.** 1994. Epidemiology of fusarium ear diseases of cereals. *Mycotoxins in grain-compounds other than aflatoxin*. Miller J.D.;Trenholm ,H.L. ed St Paul , MN,Eagen Press, p. 19-36.
- Miller J.D., Taylor A. and Greenhalgh R.** 1983. Production of deoxynivalenol and related compounds in liquid culture by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Microbiology* **29**: 1171-1178.
- Miller J.D., Young J.C., and Trenholm H.L.** 1983. *Fusarium* toxins in field corn.I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. *Canadian Journal of Botany* **61**: 3080-3087.
- Miquez M., Reeve C., Wood P.M., and Hollomon D.W.**2003. Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to Qo fungicides. *Pesticide Management Science* 60: 3-7.
- Misato T., and Kakiki K.** 1977. Inhibition of fungal cell wall synthesis and cell membrane function. *Antifungal Compounds Vol 2. Interactions in Biological and Ecological Systems* (Siegel M.R and Sisler H.D., eds), Marcel Dekker, New York, pp. 439-495.
- Moake M.M., Padilla-Zakour O.I., and Worobo R.W.** 2004. Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol 1.
- Molnar A., Hornok L., and Miklo's P.** 1985. The high level of benomyl tolerance in *Fusarium oxysporum* is determined by the synergistic interaction of two genes. *Exp. Mycol.* **9** : 326-333.
- Muehlbauer G.J., and Shoner G.** 2003. Transgenic approaches to Fusarium Head Blight resistance. In: *Fusarium Head Blight in Wheat and Barley* (Leonard K.J,Bushnell W.R,eds),The American Phytopathology Society, USA, p. 318-362.
- Mukherjee M., Hadar R., Mukherjee P.K., and Horwitz B.A.** 2003. Homologous expression of a mutated beta-tubulin gene does not confer benomyl resistance on *Trichoderma virens*. *Journal of Applied Microbiology* **95**: 861-867.

**Nakanishi T., and Oku H.** 1969. Mechanism of selective toxicity: absorption and detoxication of an antibiotic, ascochyne, by sensitive and insensitive fungi. *Phytopathology* 59: 1563.

**Nakauna R. and Nakano N.** 2007 Benomyl resistance of *Colletotrichum acutatum* is caused by enhanced expression of  $\beta$ -tubulin 1 gene regulated by putative leucine zipper protein CaBEN1. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 1324-1335.

**Nganje W.E., Johnson D.D., Wilson W.W., Leistritz F.L., Bangsund D.A., Tiapo N.M.** Economic Impacts of *Fusarium* Head blight in Wheat and Barley: 1998-2000. In *Proceedings of Agribusiness and Applied Economics Report*, North Dakota State University, Fargo ,N.D.,USA,2001,p. 1-41.

**Nirenberg H.I.** 1989. Identification of *Fusaria* occurring in Europe on cereals and potatoes. *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (Chelowski,J,ed.) Elsevier, New York,p. 179-193.

**Ochiai N., Fujimura M., Motoyama J., Ichichi A., Usami R., Horikochi K., Yamaguchi G.** 2001. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the *os-1* mutants of *Neurospora crassa*. *Pesticide Management Science* **57**: 437-442.

**Olaya G., and Koller W.** 1999. Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl. *Plant Disease* **83**: 274-278.

**Old K.M.** 1968. Mercury-tolerant *Pyrinophora avenae* in seed oats, *Transactions of the British Mycological Society*, **51**: 525.

**Olsen M.** 1989. Metabolism of zearalenone in farm animals. *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (Chelowski,J,ed.) Elsevier, New York, p. 167-177.

**Olutiola P.O.,** 1978. Growth, sporulation and production of pectic and cellulolytic enzymes in *Fusarium oxysporum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **70**: 109-114.

**Orback M.J., Porro E.B., and Yanofsky C.** 1986. *Mol Cell Biol* **6** : 2452-2461.

**Osborne L.E., Stein J.M.** 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* **119**: 103-108.

**Oshima M., Fujimura M., Bannos S., Hashimoto C., Matoyama J., Ichichi A., and Yamaguchi G.** 2002. A point mutation in the two component histidine



kinase *BcOS-1* gene confer dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **92**: 75-80.

**Paluh J.L., Killilea A.N., Detrich H.W. 3<sup>rd</sup>, and Downing K.H.** 2004. Meiosis – specific failure of cell cycle progression in fission yeast by mutation of a conserved  $\beta$ -tubulin residue. *Mol. Biol. Cell* **15**: 1160-1171.

**Panigrahi S.** 1997. *Plant and Fungal Toxicants* (JP Felix D’Mello, ed), CRC Press, New York, p. 319-337.

**Pasche J.S., Piche L.M., and Gudmestad N.C.** 2005. Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration. *Plant Disease* **89**: 269-278.

**Paul P.A., El-Allaf S.M., Lipps P.E., Madden L.V.** 2004. Rain splash dispersal of *Gibberella zeae* within wheat canopies in Ohio. *Phytopathology* **94**: 1342-1349.

**Paulson G.D.** 1977. Biological conversions of fungicides in animals. *Antifungal Compounds* (Siegel M.R. and Sisler H.D., eds) Marcel and Dekker, New York, 149-208.

**Peres N.A.R., Souza N.L., Peever T.L., and Timmer L.W.** 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease* **88**: 125-130.

**Pereyra S.A., Dill Macky R., Sims A.L.** 2004. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Disease* **88**: 724-730.

**Peterson C.A., and Edgington L.V.** 1971. Transport of benomyl into various plant organs. *Phytopathology* **61**: 91.

**Peterson R.A.** 1969. Field resistance to benomyl in cucurbit powdery mildew. *Australian Plant Pathology* **2**: 27-28.

**Pirgozliev S.R., Edwards S.G., Hare M.C. and Jenkinson P.** 2003. Strategies for the control of Fusarium Head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology* **109** :7 31-742.

**Pitt J.I., and Hocking A.D.** 2004. Current mycotoxin issues in Australia and Southeast Asia. In: *Meeting the mycotoxin menace* (Barug D, Egmond, H, Lopez-Garcia R, Osenbrugger T, Aivisconti, eds), Wageningen Academic Publishers, Netherlands, p. 69-86.

**Placinta C.M., D’Mello J.P.F., and McDonald A.M.C.** 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* **78**: 21-37.

- Podunavac-Kuzmanovic S.O., Barna D.J., Cvetkovic D.D.** 2007. Quantitative-structure- activity relationship of some 1-benzyl benzimidazole derivatives as antifungal agents. *APTEFF* **38**: 139-147.
- Preluski D.B., Trenholm H.L., Lawrence G.A.,and Scott P.M.** 1984. Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to milk following administration to dairy cows. *Environ. Sci. Helth B* **19**: 593-609.
- Prelusky D.B., Rotter B.A., and Rotter R.G.** 1994. Toxicology of Mycotoxins. *Mycotoxins in grain:Compounds other than Aflatoxin*, (J.D. Miller and H.L. Trenholm Eds.) Egan Press, St. Paul, Minnesota, p. 359-403.
- Preston P.N., Smith D.M., and Tennant G.** 1981. Benzimidazoles and Congeneric Tricyclic Compounds. Μέρος 1. Interscience Publication, John Wiley and Sons, New York.
- Pringle A., and Taylor J.W.** 2002. The fitness of filamentous fungi. *Trends in Microbiology*, **10**: 474-481.
- Purdy R.E., Kolattukuky P.E.** 1975. Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition and molecular weight of two isoenzymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani f.pisi*. *Biochemistry* **14** : 2824-2831.
- Purss G.S.** 1971. Pathogenic specialization in *Fusarium graminearum*. *Aust. J. Agrc. Res.* **22**: 553-561.
- Qiu J., Huang T.T., Xu J., Bi C.W., Chen C., and Zhou M.** 2012.β-tubulins in *Giberella zeae*: their characterization and contribution to carbendazim resistance. *Pesticide Management Science* **68**: 1191-1198.
- Qiu J.,Xu J.,Yu J.,Bi C.,Chen C.,and Zhou M.**2011.Localization of the benzimidazole fungicide binding site of *Gibberella zeae* β2-tubulin studied by site-directed mutagenesis.*Pesticide Management Science* **67**:191-198.
- Raisuddin S.**1993.Toxic responses to aflatoxins in a developing host.*J. Toxicol. Toxin Rev.*,**12**: 178.
- Ralski E.** 1978. Rola hodowli odpornosciowej w ochronie roslin zbozowych. *Zesz. Probl. Post. N.Rol.* **198**: 12-19.
- Rapilly F., Lamaire J.M. and Cassini R.** 1971. Les Fusarioses in: *Les principales maladies cryptogamiques des cereals*, p. 119-138.
- Richards K.L., Anders K.R., Nogales E., Schwartz K., Downing K.H., and Botstein D.** 2000. Structure-function relationships in yeast tubulin. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 1887-1903.

**Ringot D., Chango A., Schneider Y.J., and Larondelle Y.** 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A: An update. *Chemo-Biological Interactions* **159**: 18-46.

**Robinson M.W., McFerran N., Trudgett A., Hoey L., Fairweather I.** 2004. A possible model of benzimidazole binding to  $\beta$ -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **23**: 275-284.

**Ronald F., Vesonder and Golinski P.** 1989. Metabolites of *Fusarium*. *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (Chelowski,J,ed.) Elsevier, New York, p. 1-39.

**Ross I.S.** 1974. Non-protein thiols and mercury resistance of *Pyrenophora avenae*. *Transactions of the British Mycological Society* **63**:77.

**Ross I.S. and Old K.M.** 1973a. Mercury chloride resistance of *Pyrenophora avenae*. *Transactions of the British Mycological Society* **60**:293.

**Ross I.S. and Old K.M.** 1973b. Thiol compounds and resistance of *Pyrenophora avenae* to mercury. *Transactions of the British Mycological Society* **60**:301.

**Roxas V.P., Smith R.K., Allen E.R., and Allen R.D.** 1997. Overexpression of glutathione-S- transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnology* **15**: 988-991.

**Rutqvist L., Bjorklund N.E., Hult K.,and Gatenbeck S.** 1977. Spontaneous occurrence of ochratoxin residues in kidneys of fattening pigs. *Zbl. Vet. Med. Reihe A*.**24**: 402.

**Ryley J.F., Wilson R.G., and Barrett-Be K.J.** 1984. Azole resistance in *Candida albicans*, Sabourandia. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **22**: 53.

**Sanoamuang N., and Gaunt R.E.** 1991. Survival of *Monilinia fruticola* resistant to MBC and dicarboximide fungicides on twig cankers and mummified fruits. *Proceeding New Zealand Weed and Pest Control Conference* **44**: 225-228.

**Scarcella S., Lamenza P., Virkel G., and Solana H.** 2012. Expression differential of microsoma and cytosolic glutathione-S-transferases in *Fasciola hepatica* resistant at triclabendazole. *Molecular and Biochemical Parasitology* **181**: 37-39.

**Schmidt L.S., Ghosop J.M., Margosan D.A., and Smilanick J.L.** 2006. Mutation at  $\beta$ -tubulin codon 200 indicated thiabendazole resistance in

*Penicillium digitatum* collected from California citrus packinghouses. *Plant Disease* **90**: 765-770.

**Schnabel S., and Jones A.J.** 200. The 14a-demethylase (*CYP51A1*) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil.

**Scholberg P.L., Harlton C., Haag P., Levesque C.A., Gorman D.O., and Seifert K.** 2005. Benzimidazole and diphenylamine sensitivity and identity of *Penicillium* spp. That cause postharvest blue mold of apples using  $\beta$ -tubulin gene sequences. *Postharv. Biol. Technol.* **36**: 41-49.

**Schwede T., Kopp J., Guex N., and Peitsch M.C.** 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modelling server. *Nucleic Acids Research* **31**: 3381-3385.

**Schwinn F.J.** 1982. Socio-economic impact of fungicide-resistance. *Fungicide Resistance in Crop Protection* (Dekker J. and Georgopoulos S.G., eds), Pudoc. Wageningen, 16-23.

**Scott P.M.** 1989. The natural occurrence of trichothecenes. *Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiology Effects*. Volume 1, Beasley V.R., ed., CRS Press Inc., Boca Raton, Chap 1.

**Sevastos A.A., Malandrakis A., and Markoglou A.N.** 2013. Effect of carbendazim resistance on fitness parameters of *Fusarium graminearum*. 65<sup>th</sup> International Symposium on Crop Protection, Ghent.

**Seydel J.K., Wiese M., Cordes H.P., Chi H.L., Schaper K.J., Coats E.A., Kunz B., Engel J., Kutscher B., and Emig H.** 1985. QSAR: Rational Approaches to the Design of Bioactive Compounds (Silipo C. and Vitoria A., eds), Elsevier, Amsterdam, 367-376.

**Shea Miller S., Lana M. Reid, and Linda J. Harris.** 2007. Colonization of maize silks by *Fusarium graminearum*, the causative organism of gibberella ear rot. *Can. J. Bot.* **85**: 369-376.

**Shieser W.T., Shieser A.C., Xie W. and Mirocha C.J.** 2001. Structure- activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon* **39**: 1435-1438.

**Shin J-H., Kim Y-M., Park J-W., Kim J-E., and Rhee I-K.** 2003. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to fungicide chlorothalonil. *The Journal of Microbiology* **41**: 219-223.

**Shipchandler M.T.** 1975. Chemistry of zearalenone and some of its derivatives. *Heterocycles* **3**: 471-520.

- Shishido T.** 1981. Glutathione-S-transferase from *Escherichia coli*. *Agricultural Biology and Chemistry* **45**: 2951
- Siegel M.R.** 1975. Benomyl-soil-microbial interactions. *Phytopathology* **65**: 219.
- Sierotzki H., Frey R., Wullshleger J., Palermo S., Karlin S., and Godwin J. και άλλοι.** 2007. Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. *Pesticide Management Science*: **63**: 225-233.
- Sierotzki H., Parisi S., Steinfeld U., Tenzer I., Poirey S., and Gisi U.** 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc(1) enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolate. *Pesticide Management Science* **56**: 833-841.
- Sierotzki H., Wullshleger J., and Gisi U.** 2000. Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis f.sp. tritici* field isolates. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **68**: 107-112.
- Skylakakis. G.** 1987. Changes in the composition of pathogen populations caused by resistance to fungicides. *Populations of Plant Pathogens: their Dynamics and Genetics*, (Wolfe M.S. και Caten C.E., eds), Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Smalley E.B.** 1977. Results in practice-V. Forestry. *Systemic Fungicides* (Marsch R.W., ed), Longman, New York, 294-319.
- Smith J.E., Solomons G., Lewis S., and Anderson J.G.** 1995. Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. *Nat. Toxins* **3**: 187.
- So derlund D.M.** 1997. Molecular mechanisms of insecticide resistance. *Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals* (Sjut D., ed), Springer-Verlag, Germany, 21-56.
- Solel Z., Schooley J.M., and Edgington L.V.** 1973. Uptake and translocation of benomyl and carbendazim (methyl benzimidazol-2-yl-carbamate) in the symplast. *Pesticide Science* **14**: 713.
- Spencer D.M.** 1977. Results in practice-II. Glasshouse crops. *Systemic Fungicides* (Marsch R.W., ed), Longman, New York, 255-256.
- Staron T., and Allard C.** 1964. *Phytiat.-Phytopharm.* **13**:163.
- Steinfeld U., Sierotzki H., Parisi S., Poirey S., and Gisi U.** 2001. Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*. *Pesticide Management Science* **57**: 787-796.

- Stergiopoulos I., Zwiers L-H., and de Waard M.A.** 2002. Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator superfamily. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 719-734.
- Stover R.H.** 1977. Extranuclear inherited tolerance to benomyl in *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **68**: 122-124.
- Stover R.H.** 1977. Extranuclear inherited tolerance to benomyl in *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **68**: 122.
- Stoyan R. Pirgozliev , Simon G. Edwards, Martin C. Hare and Peter Jenkinson.** 2003. Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 731-742.
- Summer K.H., Goggelman W., and Greim.** 1980. Glutathione and Glutathione-S-transferases in the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **70**: 269
- Sutton J.C.** 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **4**: 195-209.
- Sutton J.C., Balico W., and Funell H.S.** 1976. Evidence for translocation of zearalenone in corn plants colonized by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Science* **56**: 7-12.
- Teich A.H.** 1989. Epidemiology of corn (*Zea Mays* L.) ear rot caused by *Fusarium* spp. In: *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (Chelowski,J,ed.) Elsevier, New York, p. 319-328.
- Teich A.H.** 1989. Epidemiology of wheat (*Triticum aestivum* L.) scab caused by *Fusarium* spp. In: *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (Chelowski,J,ed.) Elsevier, New York, p. 269-282.
- Teich A.H., and Hamilton J.R.** 1985. Effect of cultural practices, soil phosphorus, potassium, and pH on the incidence of fusarium head blight and deoxynivalenol levels in wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1429-1431.
- Terao K. and Ohtsubo K.** 1991. Biological activities of mycotoxins: Field and experimental mycotoxicoses. In: *Mycotoxins and Animal Foods* (J.E.Smith and R.S. Henderson,eds).CRS Press, Boca Raton, FL, p.455-488.
- Thomas J.H., Neff N.H., and Botstein D.** 1985. Isolation and characterization of mutations in the  $\beta$ -tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **112**: 715-734.

- Thrane U.** 1989. *Fusarium* species and their specific profiles of secondary metabolites. *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (Chelowski, J., ed.) Elsevier, New York, p. 199-225.
- Ueno Y.** 1977. Trichothecenes: Overview address. *Mycotoxins in human and animal health*. (Rodricks J.V., Hesseltine C.W. and Mehlman M.A. Pathox Publishers, eds), INC. Park Forest South, Illinois, p. 189-207.
- Ueno Y., and Ishii K.** 1984. Chemical and biological properties of trichothecenes from *Fusarium sporotrichioides*. *Trichothecenes and others Mycotoxins*, Proceedings of Symposium in Sydney (Lacey J., ed) , p 307-316.
- Uesugi Y., and Katagiri M.** 1983. Metabolism of a phosphorothiolate fungicide IBP by strains of *Pyricularia oryzae* with varied sensitivity. *Pesticide Chemistry: Human welfare and environment* (Miyamoto J., and Kearney P.C., eds), Pergamon Press, Oxford, 165-170.
- Uesugi Y., and Sisler H.D.** 1978. Metabolism of a phosphoramidate by *Pyricularia oryzae* in relation to tolerance and synergism by a phosphorothiolate and isoprothiolane. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 9: 247-254.
- Uoti I.** 1975. Occurrence and pathogenicity of *Fusarium* species in cereal in Finland. *EPPO Bull.* 5: 419-425.
- Urbanek H.** 1989. The role of cutinase and cell wall degrading enzymes produced by *Fusaria* in pathogenesis. In : *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (Chelowski, J., ed.) Elsevier, New York, p. 243-256.
- Vallieres C., Trouillard M., Dujardin G., and Meunier B.** 2011. Deleterious effect of the Qo inhibitor compound resistance-conferring mutation G143A in the intron -containing cytochrome b gene and mechanisms for bypassing it. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 2088-2093
- Van den Brink H.M., van Gorcom R.F.M., van den Hondel C.A.M.J.J., and Punt P.J.** 2000. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 23: 1-17.
- Van Tuyl T.M.** 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides, Mededelingen Lanbouwhogeshool, Wageningen, 71, 1.
- Vanden Boossche H.** 1990. Importance and role of sterols in fungal membranes. *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi* (Kuhn P.J., Trinci A.P.J., Joung M.J., Goosey M.W. and Copping L.G., eds), Springer-Verlag.
- Velluti A., Marin S., Bettucci L., Ramos A.J. and Sanchis V.** 2000. The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F.*

*proliferatum* and *F. graminearum* and fumonisin B1 and zearalenone formation. *International Journal of Food Microbiology* **59**: 59-66.

**Vigier B., Rei L.M., Seifert K.A., Stewart D.W. and Hamilton R.I.** 1997. Distribution and prediction of *Fusarium* species associated with maize ear rot in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology* **19**: 60-65.

**Vonk J.W., and Kaars Silpestejin A.** 1971. Methyl benzimidazol-2-yl carbamate, the fungitoxic principle of thiophanate-methyl. *Pesticide Science* **2**: 160.

**Vonk J.W., and Kaars Silpestejin A.** 1977. Metabolism. Systemic Fungicides (Marsch R.W., ed), Longman, New York, 160-175.

**Wackett L.P., and Gibson D.T.** 1982 Metabolism of xenobiotic compounds by enzymes in cell extracts of the fungus *Cunninghamella elegans*. *Biochemistry Journal* **205**:117

**Walker A-S., Auclair C., Gredt M., and Leroux P.** 2009. First occurrence of resistance to strobilurin fungicides in *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* from French naturally infected wheat grains. *Pesticide Management Science* **65**: 906-915.

**Wang J.X., Zhou M.G., Lu Y.J., and Ye Z.Y.** 2002. Dynamics of resistant population of *Fusarium graminearum* to carbendazim and substitutable fungicide screening. *J. Nanjing Agricultural University* **25**:43-47.

**Wang M.C., Erwin D.C., Sims J.J., Keen N.T., and Borum D.E.** 1971. Translocation of <sup>14</sup>C-labelled thiabendazole in cotton plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **1**: 188.

**Wanyoike M.W., Kang Zhensheng , and Heinrich Buchenauer.** 2002. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infaction of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 803-810.

**Ward T.J., Bielawski J.P., Kistler H.C., Sullivan E., and O'Donnell K.** 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 9278-9283.

**Watanabe M, and Shimizu H.** 2005. Detection of patulin in apple juices marketed in the Tohoku district, Japan. *J. Food Prot.* **68**: 610-612.

**Webster J., and Weber R.W.S.** 2007. *Introduction to Fungi* (J Webster and RWS Weber eds). Cambridge University Press, New York, p. 343-348.



- Weete J.D.** 1989. Structure and function of sterols in fungi. *Advances in Lipid Research*, (Paolett R and Kritcevsy D. eds), 23: 115
- Wellman H., and Schauz K.** 1993. DMI-resistance in *Ustilago maydis*. II. Effect of triadimefon on regenerating protoplasts and analysis of fungicide uptake. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **46**: 55.
- Wheeler I., Kendall S., Butters J., and Hollomon D.** 1994. Rapid detection of benzimidazole resistance in *Rhynchosporium secalis* using allele-specific oligonucleotide probes. *Fungicide Resistance*. Heaney S., Slawson (D., Hollomon D.W., Smith M., Russell P.E. and Parry D.W., eds.), p. 259-263.
- White S., John O'Callagan, and Dobson D.W.** Cloning and molecular characterization of *Penicillium expansum* genes upregulated under conditions permissive for patulin biosynthesis. *FEMS Microbiology* **255**: 17-26.
- White T.C.** 1997. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**: 1482-1487.
- White T.C., Marr K.A. and Bowden R.A.** 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 382-402.
- WHO.** 2002. *Evaluation of certain mycotoxins in food*. WHO Technical Report Series n.906, World Health Organization, Geneva, p.8-42.
- Wilcoxson R.D.** 1996. *Fungicides for control of Fusarium Head blight-A review*. Minn. Agr. Exp. Sta. Paper No.22507, p. 19.
- Wilmar Corio da Luz, Stockwell C.A., and Bergstrom G.C.** 2003. Biological control of *Fusarium graminearum* of wheat in China. *Fusarium Head Blight in Wheat and Barley* (Leonard K.J, Bushnell W.R, eds), The American Phytopathology Society, USA, p 381-394.
- Winder B.S., Strandgaard C.S., and Miller M.G.** 2001. The role of GTP Binding and microtubule-associated proteins in the inhibition of microtubule assembly by carbendazim. *Toxicological Sciences* **59**: 138-146.
- Wolfe M.S.** 1982. Dynamics of the pathogen population in relation to fungicide resistance. *Fungicide resistance in crop protection*, (Dekker J. and Georgopoulos S.G., eds), Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.
- Wood G.E.** 1992. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. *J.Anim.Sci.* **70**: 3941-3949

- Wood P.M, and Hollomon D.W.** 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strubilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pesticide Management Science* **59**: 499-511.
- Woodcock D.** 1977. Nonbiological conversions of fungicides. *Antifungal Compounds* (Siegel M.R. and Sisler H.D., eds) Marcel and Dekker, New York, 209-249.
- Woriedh M.** 2011. *Cloning expression and functional characterization of deoxyhypusine synthase from the pathogenic fungus Fusarium graminearum Schwabe (telomorph Gibberella zeae), wheat (Triticum aestivum L.) and maize (Zea mays L.)*. Ph D. dissertation.
- Wright G.D.** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**: 1451-1470.
- Yadan J.C., Gonneau M., Sarthou P., and Le Goffic M.** 1984. Sensitivity to nikkomycin Z in *Candida albicans*: role of peptide permeases. *Journal Bacteriology* **160**: 884-888.
- Yan K., and Dickman M.B.** 1996. Isolation of a  $\beta$ -tubulin gene from *Fusarium moniliforme* that confers cold-sensitive benomyl resistance. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 3053-3056.
- Yang R.S.H.** 1976. Enzymatic conjugation and insecticide metabolism. *Insecticide Biochemistry and Physiology* (Wilkinson C.F., ed), Plenum Press, New York and London, 115.
- Yarden O., and Katan T.** 1993. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* **83**: 1478-1483.
- Yasuda Y., Hashimoto S., Soeda Y., and Noguchi T.** 1973. Metabolism of thiophanate-methyl by phytopathogenic fungi and antifungal activity of its metabolites. *Ann. Phytopath. Soc. Jap.* **39**: 49.
- Ye Z.Y., and Zhou M.G.** 1985. Determination of tolerance to methyl-2-benzimidazole carbamate (MBC) in wheat scab (*Fusarium graminearum*) in Jiang Huai area of China. *Acta Phytophylacica Sin.* **12**: 188-189.
- Yoshozawa T.** 1983. Red -mold diseases and natural occurrence in Japan. *Trichothecenes-chemical, biological and toxicological aspects*. Y.Ueno (Ed), Elsevier and Kodansha Ltd., Amsterdam and Tokyo, p.195-209.
- Yuan S., and Zhou M.G.** 2005. A major gene for resistance to carbendazim, in field isolates of *Gibberella zeae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **27**: 58-63.

- Zhang Y.J., Yu J.J., Zhang Y.N., Zhang X., Cheng C.J., Wang J.X., Hollomon D.W., Fan P.S., and Zhou M.G.** 2009. Effect of carbendazim resistance on trichothecene production and aggressiveness of *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 1143-1150.
- Zhou M.G., Ye Z.Y., and Liu J.F.** 1994. Progress in fungicide resistance research. *J. Nanjing Agri. Univ.* **17**: 33-41.
- Ziogas B.N., Baldwin B.C., and Young J.E.** 1997. Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pesticides Science* **50**: 28-34.
- Ziogas B.N., Markoglou A.A., and Spyropoulou V.** 2005. Effect of phenylpyrrole-resistance mutations on ecological fitness of *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*. *European Journal of Plant Pathology* **113**: 83-100.
- Ziogas B.N., Markoglou A.N., and Malandrakis A.A.** 2003. Studies on the inherent resistance risk to fenhexamide in *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 311-317.
- Ziogas B.N., Nikou D., Markoglou A.N., Malandrakis A.A. and Vontas J.** 2009. Identification of a novel point mutation in the b-tubulin gene of *Botrytis cinerea* and detection of benzimidazole resistance by a diagnostic PCR-RFLP assay. *European Journal of Plant Pathology* **125**: 97-107.
- Ζιώγας Β., και Μαρκόγλου Α.** 2007. *Γεωργική Φαρμακολογία* (Ζιώγας, Β, Μαρκόγλου, Α, ΚΑ) α' έκδοση, Ζιώγας και Μαρκόγλου, Αθήνα.
- Γεωργόπουλος Σ.Γ., και Ζιώγας Β.Ν.** 1992. *Αρχές και Μέθοδοι Καταπολέμησης των Ασθενειών των Φυτών*, Αθήνα.
- Ζιώγας Β.Ν., και Μαρκόγλου Α.Ν.** 2005. Νέα Μυκητοκτόνο και οι σύγχρονες τάσεις. *Γεωπονικά* **410**: 6-12.
- Λουκάς Μ.Γ.** 2000. *Γενετική Τόμος Α'*, Εκδόσεις Σταμούλης Α.Ε., Αθήνα
- Ma Z., Yoshimura M., Holtz B.A., Michailides T.J.** 2005. Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. *Pesticide Management Science*.
- Malandrakis A., Markoglou A., and Ziogas B.** 2010. Molecular characterization of benzimidazole-resistant *B. cinerea* field isolates with reduced or enhanced sensitivity to zoxamide and diethofencarb. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.

**Μαρκόγλου Α.** Διερεύνηση της ανθεκτικότητας του μύκητα *Ustilago maydis* στα μορφολογικά μυκητοκτόνα. Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

**Μαρσέλος Μ.** 2006. Συνοπτική Φαρμακολογία. Σημειώσεις Ιατρικής Φαρμακολογίας, Ιωάννινα, σελ. 3.