

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Σχολή Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών και Περιβάλλοντος

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας

**Διερεύνηση του μηχανισμού
ανθεκτικότητας στελεχών αγρού
του μύκητα *Cercospora beticola*
με μειωμένη ευαισθησία σε
μυκητοκτόνα της ομάδας των
παρεμποδιστών βιοσύνθεσης
εργοστερόλης**

Μαρία Δ. Λυκογιάννη
Μεταπτυχιακή Διατριβή

Αθήνα 2015

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Σχολή Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών και Περιβάλλοντος

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας

*Διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας
στελεχών αγρού του μύκητα *Cercospora
beticola* με μειωμένη ευαισθησία σε
μυκητοκτόνα της ομάδας των
παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης*

Μαρία Δ. Λυκογιάννη

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Φ.Φλουρή

Αθήνα 2015

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας στελεχών αγρού του μύκητα *Cercospora beticola* με μειωμένη ευαισθησία σε μυκητοκτόνα της ομάδας των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης

Μαρία Δ. Λυκογιάννη

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπουσα:

Φλουρή Φωτεινή¹, Λέκτορας Γ.Π.Α.

Μέλη:

Βόντας Ιωάννης¹, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Καραογλανίδης Γεώργιος², Επίκουρος Καθηγητής Α.Π.Θ.

¹Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας

Ιερά Οδός 75, Βοτανικός 118 55 Αθήνα

²Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης,

541 24 Θεσσαλονίκη

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Πρώτα από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ηθική και υλική στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια του ΠΜΣ και κατά την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα κ. Φ. Φλουρή για όλη τη βοήθεια και τις παρατηρήσεις της κατά τη διάρκεια της μελέτης. Επίσης, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Ι. Βόντα, και κ. Γ. Καραογλανίδη για τις πολύτιμες συμβουλές και τις χρήσιμες παρατηρήσεις και βελτιώσεις κατά την απόδοση του τελικού κειμένου της μελέτης.

Καθοριστική ήταν η συμβολή και καθοδήγηση του διδάκτορα κ. Α. Μαλανδράκη, τόσο κατά την διάρκεια των πειραμάτων όσο και κατά τον σχολιασμό των αποτελεσμάτων, γεγονός που με κάνει να νιώθω ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους υποψήφιους διδάκτορες κ. Ι. Καλαμπόκη από το εργαστήριο Φαρμακολογίας και κ. Γ. Κουτρώτσιο από το εργαστήριο Μικροβιολογίας για την βοήθειά τους και συνεργασία τους. Δεν μπορώ να παραλείψω και όλους τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο: Μαρία Τσιούρη, Εύα Κοπάνου Ταλιάκα, Δήμητρα Καραμάνου και ιδιαίτερα τις Δήμητρα Λούκα και Μενελίνα Κουγιουμτζοπούλου για την συμπαράσταση και την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Περίληψη

Στελέχη του μύκητα *C. beticola* που ανήκουν σε διαφορετικούς φαινότυπους ανθεκτικότητας στους DMIs difenoconazole, epoxiconazole, flutriafol επιλέχθηκαν με σκοπό τη διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας σε βιοχημικό και μοριακό επίπεδο. Τα στελέχη ήταν ανθεκτικά σε έναν, δύο ή και στους τρεις DMIs. Αρχικά, έγινε διερεύνηση αν πρόκειται για εξειδικευμένο μηχανισμό ανθεκτικότητας ή όχι. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μυκητοτοξικότητας *in vitro* σε παρεμποδιστές της ευρύτερης ομάδας των EBIs και σε άλλους που δρουν σε διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια, έτσι ώστε να ελεγχθεί η ύπαρξη σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των διάφορων παρεμποδιστών.

Παρατηρήθηκε θετική διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ των DMIs που μελετήθηκαν και μεταξύ αυτών και του tolnaftate. Ακόμη, υπήρξαν κάποιοι φαινότυποι με διπλή ή μονή ανθεκτικότητα στους τρεις DMIs που παρουσίασαν θετική συσχέτιση με τα terbinafine, fenhexamid, spiroxamine. Δεν παρουσιάστηκαν σχέσεις διασταυρωτής ανθεκτικότητας με τους παρεμποδιστές που δρουν σε διαφορετικά μονοπάτια με εξαίρεση την περίπτωση του azoxystrobin.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση του μηχανισμού αποτοξικοποίησης με τον συνεργιστή PBO που έδειξε την έλλειψη συνεργισμού μεταξύ DMIs και PBO, γεγονός που ενισχύει τις ενδείξεις για μηχανισμό ανθεκτικότητας που σχετίζεται με την αλλαγή στη θέση δράσης. Για το σκοπό αυτό, απομονώθηκε το γονίδιο στόχος των DMIs (CYP51) και αλληλουχήθηκε. Βρέθηκε η αντικατάσταση του E (γλουταμινικό οξύ) από K (λυσίνη) στη θέση 149 ως κοινή μεταλλαγή στα στελέχη που ήταν ανθεκτικά και στους τρεις DMIs που μελετήθηκαν. Στις υπόλοιπες φαινοτυπικές κατηγορίες βρέθηκαν διάφορες μεταλλαγές οι οποίες δεν μπορούν να συσχετιστούν με την παρατηρούμενη ανθεκτικότητα στους DMIs που μελετήθηκαν.

Συμπερασματικά, η αλλαγή στη θέση δράσης δεν εξηγεί όλους τους φαινότυπους ανθεκτικότητας. Εικάζεται ότι ο μηχανισμός που θα μπορούσε να εξηγήσει τους φαινότυπους σε έναν ή δύο από τους DMIs, με βάση τη βιβλιογραφία, πιθανώς να είναι η υπερέκφραση του γονιδίου στόχου αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να εξακριβωθεί ο ισχυρισμός αυτός.

Λέξεις κλειδιά: *Cercospora beticola*, DMIs, ανθεκτικότητα

*Resistance mechanism of *Cercospora beticola* field isolates with reduced sensitivity to sterol-demethylation-inhibiting fungicides*

Abstract

Isolates of *Cercospora beticola* belonging to different sensitivity phenotypes to the sterol demethylation-inhibiting (DMIs) fungicides difenoconazole, epoxiconazole and flutriafol were tested in terms of the resistance mechanism responsible by both biochemical and molecular assays. The selected isolates were resistant to either one, two or three DMIs. Cross-resistance studies with other inhibitors of the Ergosterol biosynthesis showed positive cross resistance between the three DMIs that were tested and between DMIs and tolnaftate. There were also some cases of positive cross resistance between some of the DMIs and terbinafine, fenhexamid, spiroxamine. Cross resistance studies with other inhibitors showed no correlation between them and the DMIs tested except for azoxystrobin, where a positive correlation was recorded.

The detoxification mechanism was tested using PBO showing an antagonistic action to DMIs. These results suggest that the mechanism is target modification, so we performed sequence analysis of the gene target of the DMIs (CYP51). We found a common mutation (E149K) in isolates that were resistant to all three DMIs tested, while in the other isolates a number of different mutations were found with no correlation to the observed resistance phenotypes.

In conclusion, site modification does not explain all the resistant phenotypes. It is possible that the mechanism that explains these phenotypes is overexpression, something that has already been shown in other studies, but in order to be able to claim something like this more research must be done.

Keywords: *Cercospora beticola*, DMIs, resistance

Πίνακας Περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Το παθογόνο <i>Cercospora beticola</i>	12
1.1.1 Η κερκοσπορίωση των τεύτλων	13
1.1.2 Μέθοδοι αντιμετώπισης της κερκοσπορίωσης.....	16
1.2 Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης EBIs	18
1.2.1 Η βιοσύνθεση και ο ρόλος της εργοστερόλης.....	18
1.2.2 Μηχανισμός δράσης και ταξινόμηση των EBIs παρεμποδιστών	20
1.2.3 Μηχανισμός δράσης των DMIs παρεμποδιστών	22
1.3 Το πρόβλημα της Ανθεκτικότητας	24
1.3.1 Χημική Καταπολέμηση και Εμφάνιση Ανθεκτικότητας	24
1.3.2 Γενετικός έλεγχος Ανθεκτικότητας	27
1.3.3 Βιοχημικοί μηχανισμοί Ανθεκτικότητας.....	28
1.3.4 Διερεύνηση του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας στον αγρό	31
1.3.5 Διαχείριση του προβλήματος της Ανθεκτικότητας	34
1.3.6 Προβλήματα και μηχανισμοί ανθεκτικότητας των DMIs παρεμποδιστών	35
1.3.6.1 Μεταλλαγές στο CYP51.....	38
1.3.6.2 Υπερέκφραση του CYP51	39
1.3.6.3 Αυξημένη απέκκριση	40
1.3.6.4 Επιπλέον μηχανισμοί	41
1.3.7 Προβλήματα ανθεκτικότητας της κερκοσπορίωσης των τεύτλων	42
1.3.7.1 <i>C. beticola</i> & το πρόβλημα της Ανθεκτικότητας	42
1.3.7.2 <i>C. beticola</i> & μηχανισμός ανθεκτικότητας στους DMIs	44
1.4 Σκοπός της εργασίας	45

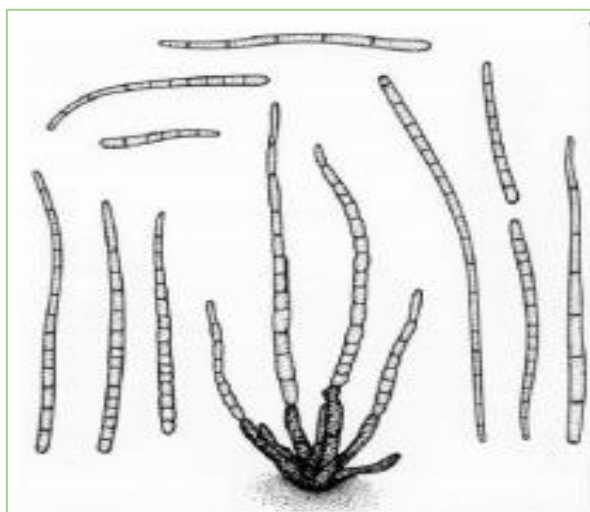
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
2.1 Βιολογικό υλικό	47
2.2 Υλικά καλλιέργειας	50
2.3 Καλλιέργεια, διατήρηση και ανανέωση στελεχών του μύκητα <i>C. beticola</i>.....	51
2.4 Πειράματα διερεύνησης μηχανισμού ανθεκτικότητας στελεχών του μύκητα <i>C. beticola</i> ...	51
2.4.1 Έλεγχος ευαισθησίας στελεχών και διερεύνηση ύπαρξης σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας.....	52
2.4.2 Διερεύνηση του μηχανισμού αποτοξικοποίησης με τη χρήση συνεργιστών (PBO)	56
2.4.3 Διερεύνηση του μηχανισμού αλλαγή στη θέση δράσης.....	57
2.4.3.1 Απομόνωση ολικού DNA και ολικού RNA.....	57
2.4.3.2 Σύνθεση μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA (cDNA)	59
2.4.3.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου CYP51 που κωδικοποιεί την 14α – απομεθυλάση και αλληλούχιση	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63
3.1 Μελέτη της ύπαρξης διασταυρωτής ανθεκτικότητας σε παρεμποδιστές της ομάδας των EBIs και άλλους παρεμποδιστές στελεχών του μύκητα <i>C. beticola</i>	63
3.1.1 Αποτελεσματικότητα διάφορων παρεμποδιστών	64
3.1.2 Διερεύνηση της ύπαρξης σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των DMIs και διάφορων παρεμποδιστών	67
3.2 Διερεύνηση του μηχανισμού αποτοξικοποίησης μέσω μονοοξυγονασών (P450s) στελεχών του μύκητα <i>C. beticola</i>	74
3.3 Απομόνωση και αλληλούχιση τμήματος του γονιδίου CYP51 και χαρακτηρισμός μεταλλαγών ανθεκτικότητας στελεχών του μύκητα <i>C. beticola</i>	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	82
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	87

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

Η σακχαρόζη από τα ζαχαρότευτλα είναι ένα απαραίτητο συστατικό στη διαίτα παγκοσμίως. Με παραγωγή περίπου 35000000 τόνους το 2002, περίπου το ένα τρίτο της παραγωγής σουκρόζης προέρχεται από τα ζαχαρότευτλα (Anonymous, 2003). Τα ζαχαρότευτλα καλλιεργούνται σε ηπειρωτικές περιοχές που χαρακτηρίζονται από μέτρια κλίματα και συμπληρώνουν την παραγωγή ζάχαρης που προέρχεται από το ζαχαροκάλαμο, σε πιο τροπικές περιοχές.

Στην Ελλάδα, ο τομέας των ζαχαρότευτλων και της ζάχαρης είναι ένας σχετικά νέος τομέας αφού η δραστηριότητα του ξεκίνησε με τη ίδρυση της Ελληνικής Βιομηχανίας Ζάχαρης (EBZ) το 1960. Τα ζαχαρότευτλα αποτελούσαν μέχρι το 2005 ένα πολύ σημαντικό φυτό για την ελληνική γεωργία στον τομέα των φυτών της μεγάλης καλλιέργειας, με τη σημασία του να έχει μειωθεί αρκετά μετά τη μεταρρύθμιση της Κοινής Οργάνωσης Αγοράς της ζάχαρης το Νοέμβριο του 2005. Μόλις ένα από τα πέντε εργοστάσια της EBZ που λειτούργησαν τη δεκαετία του 1960 και 1970 παραμένει λειτουργικό σήμερα, στο Πλατύ Ημαθίας (Αυγουλάς, 2013; 2014).

Τα σημαντικότερα παθογόνα που προσβάλλουν το φύλλωμα των τεύτλων είναι τα *Ramularia beticola*, *Cercospora beticola*. Μεγαλύτερης σημασίας ασθένεια για τα εύκρατα κλίματα είναι η κερκοσπορίωση (Vereijssen, 2004).



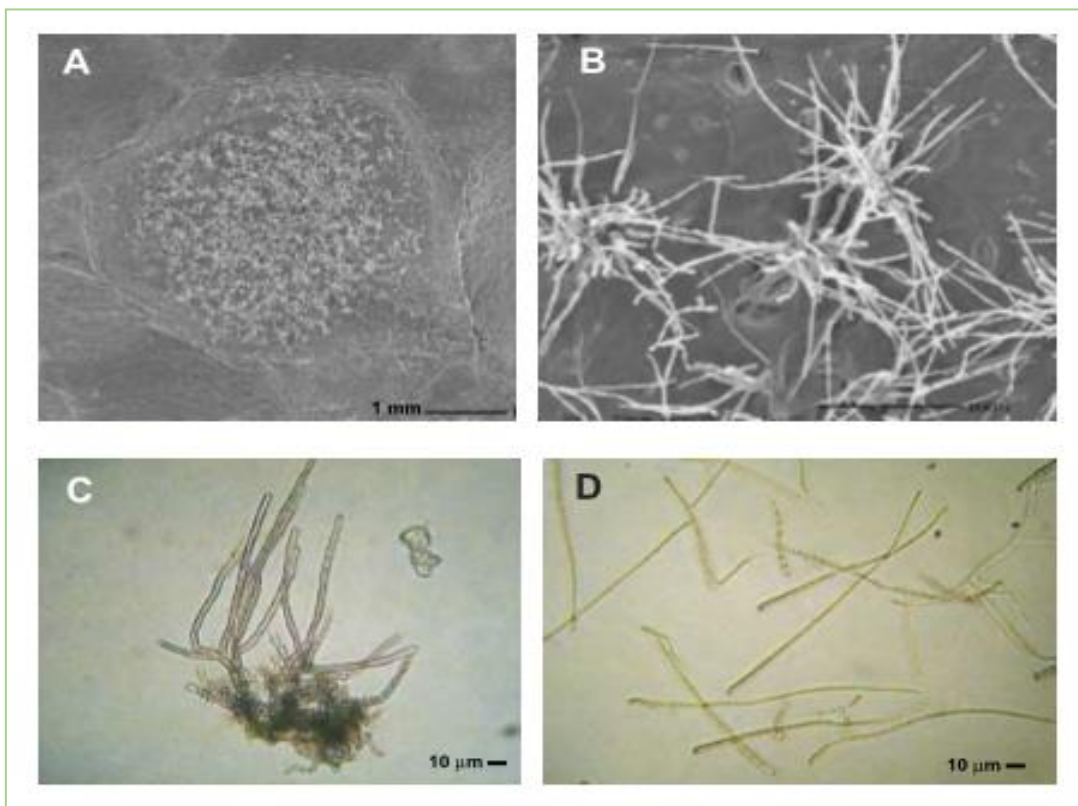
Εικόνα 1: Κονιδιοφόροι και Κονίδια της *C. beticola*
(σχέδια της Katharine A. GolasynWright)

1.1 Το παθογόνο *Cercospora beticola*

Η πρώτη αναφορά του μύκητα *C. beticola* (Εικόνα 1) έγινε το 1876 από τον Saccardo. Είναι ένας αδηλομύκητας που προσβάλλει φυτά του γένους *Beta* και γενικά προσβάλλει είδη της οικογένειας *Chenopodiaceae*. Ακόμη, προσβάλλει και είδη από τα γένη *Amaranthus*, *Atriplex*, *Chenopodium*, *Plantago* (Vestal, 1933; Frandsen, 1955; El – Kazzaz, 1977; Soyly *et al.*, 2003).

Η ταξινόμηση του παθογόνου είναι : βασίλειο Fungi, Deuteromycetes (Αδηλομύκητες), κλάση Hyphomycetes, τάξη Hyphales, οικογένεια Dematiaceae, υποοικογένεια Phaeophragmosporae, γένος *Cercospora*, είδος *Cercospora beticola* Sacc.

Ο διαχωρισμός μεταξύ των ειδών στο γένος *Cercospora* γίνεται εξετάζοντας τον ξενιστή, τις τοξίνες και με μοριακές τεχνικές (Weiland & Koch, 2004). Δεν είναι γνωστή η τέλεια μορφή του παθογόνου αλλά υπάρχουν αλληλουχίες στο rDNA που δείχνουν ότι έχει τέλεια μορφή, γεγονός που υποδεικνύει ότι μπορεί να έχει χαθεί στη διάρκεια της εξέλιξης του



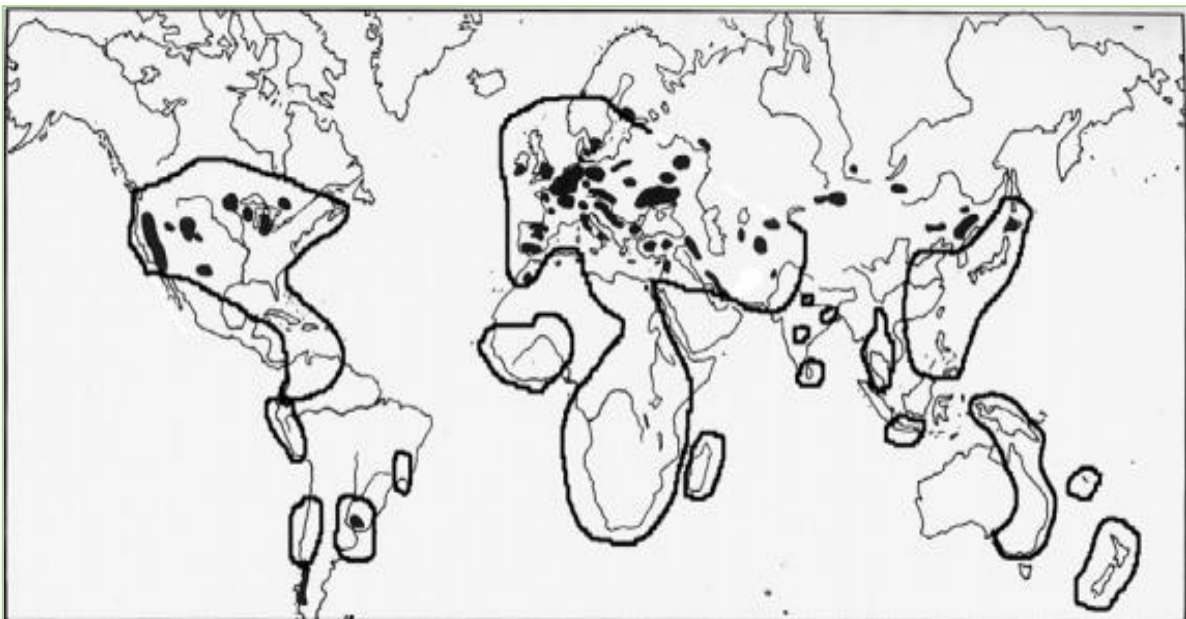
Εικόνα 2: Φωτογραφίες από μικροσκόπιο

Στις A και B φαίνονται οι κονιδιοφόροι και στις C και D φαίνονται τα κονίδια (Weiland & Koch, 2003)

παθογόνου (Goodwin *et al.*, 2001). Επίσης, θεωρείτο ότι δεν υπήρχε εγγενής αναπαραγωγή, κάτι που σε σύγχρονες μελέτες υπάρχουν ενδείξεις που το καταρρίπτουν σε θεωρία (Bolton *et al.*, 2012).

Σχετικά με τη μορφολογία του παθογόνου σχηματίζει υφές υαλώδεις έως απαλό λαδί – καφέ, με σέπτα, με διάμετρο 2 – 4 μm . Οι υφές σχηματίζουν ψευδοστρώματα (Εικόνα 2A) σε χώρους κάτω από τα στομάτια των φύλλων και εκεί σχηματίζονται οι κονιδιοφόροι σε συστάδες (Εικόνα 2B). Οι κονιδιοφόροι, που εξέρχονται μόνο από τα στόματα, είναι 10-100 (κυρίως 46-60) μm \times 3-5,5 μm και μη διακλαδισμένοι, και πάνω τους φαίνονται ευκρινώς τα κονίδια (Εικόνα 2C). Τα κονίδια, 20-200 \times 2,5-4 μm (κυρίως 36-107 \times 2-3 μm), είναι με λεία τοιχώματα, είναι υαλώδη, ευθεία ή ελαφρώς καμπυλωτά, με 3-14 σέπτα (μερικές φορές μέχρι 24) (Εικόνα 2D). Η τέλεια μορφή του μύκητα δεν είναι γνωστή (Crous & Braun, 2003).

1.1.1 Η κερκοσπορίωση των τεύτλων

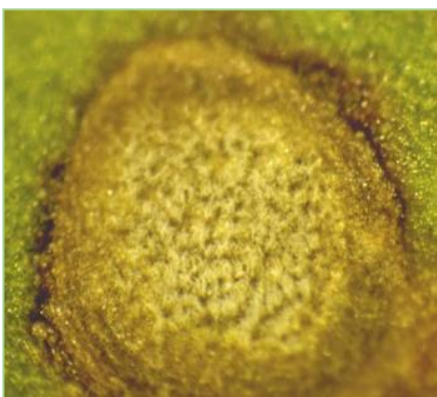


Εικόνα 3: Εξάπλωση της καλλιέργειας των ζαχαρότευτλων με μύκητες και εντός των μαύρων γραμμών βλέπουμε την εξάπλωση του μύκητα *C. beticola* (και σε περιοχές που προσβάλλει άλλα φυτά - σπανάκι, σέσκουλο (Bleiholder & Wetzien, 1972; Anonymous, 1969)

Το παθογόνο *Cercospora beticola* προκαλεί την κερκοσπορίωση των τεύτλων, που είναι η πιο σημαντική ασθένεια φυλλώματος των ζαχαρότευτλων. Υπό ευνοϊκές συνθήκες, θερμού



Εικόνα 6: Προσβεβλημένο φύλλο από *C. beticola* (Vereijssen, 2004)



Εικόνα 6: Κηλίδα που έχει προκληθεί από τη *C. beticola* (Vereijseen, 2004)

Οι μικρές μαύρες κηλίδες είναι ψευδοστρώματα με κονιδιοφόρους, ενώ οι γκριζωπές περιοχές είναι τα κονίδια που φέρονται στους κονιδιοφόρους



Εικόνα 6: Προσβεβλημένο φυτό από *C. beticola* (Vereijseen, 2004)

και υγρού καιρού, μπορεί να προκαλέσει μέχρι και πλήρη αποφύλλωση. Αυτή η ζημία οδηγεί σε μείωση τόσο στην ποσότητα όσο και στην ποιότητα της απόδοσης των ζαχαρότευτλων (Weiland & Koch, 2004). Σε ένα φυτό μπορεί να προκαλέσει μείωση στην παραγωγή του έως και 40% (Vereijssen, 2004). Επιπλέον των ζημιών που προκαλεί το παθογόνο υπάρχει και αυξημένο κόστος από την εφαρμογή μυκητοκτόνων για την αντιμετώπιση του (Weiland & Koch, 2004).

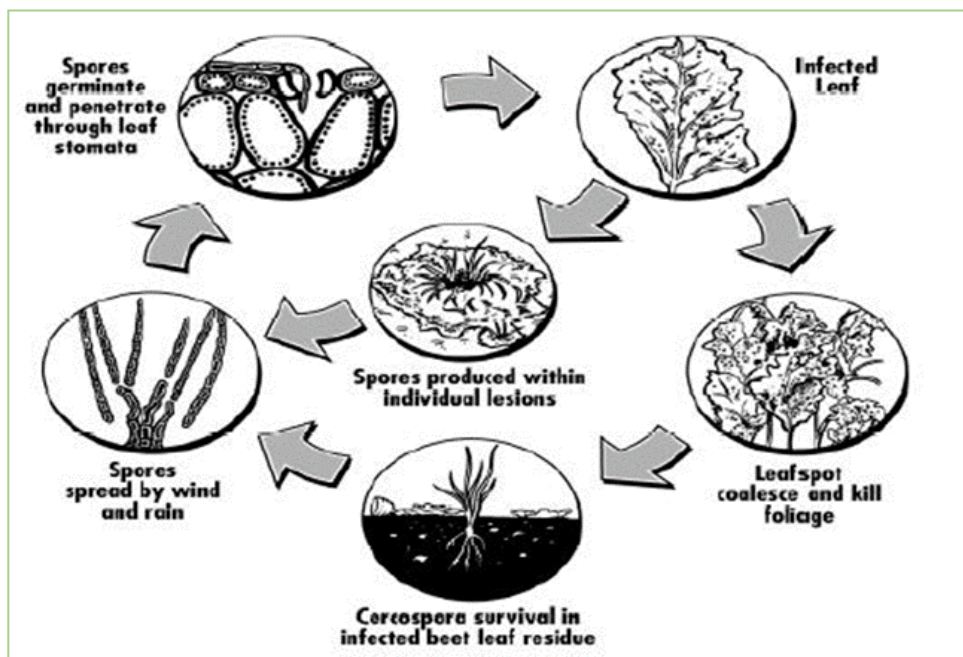
Το παθογόνο το συναντάμε στη Μεσόγειο (Holtshulte, 2000), αλλά και σε πιο κρύα κλίματα και περιοχές όπως: Ολλανδία, Γερμανία, Βόρεια Ντακότα, Μίτσιγκαν – ΗΠΑ και Οντάριο – Καναδά (Εικόνα 3) (Vereijssen *et al.*, 2003; Khan & Smith, 2004; Racca & Jorg, 2007; Trueman *et al.*, 2013). Η εξάπλωση του παθογόνου προς βορειότερες περιοχές μπορεί να σχετίζεται με την κλιματική αλλαγή ή γενετικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των στελεχών στους πληθυσμούς στις βορειότερες περιοχές σε σχέση με τις νοτιότερες (Vereijssen, 2004).

Τα συμπτώματα της ασθένειας περιλαμβάνουν κυκλικές τεφροκάστανες κηλίδες (Εικόνα 4, 5) οι οποίες διαμορφώνονται σε παλαιότερα φύλλα και μεγαλώνουν 2-5 mm καθώς ωριμάζουν. Βλάβες συμβαίνουν και στους μίσχους των φύλλων. Κυκλικές βλάβες μπορούμε να δούμε και στο υποκοτυλίδιο που δεν καλύπτεται από χώμα (Giannopolitis, 1978). Μεμονωμένες κηλίδες στα φύλλα του φυτού αυξάνονται καθώς εξελίσσεται η ασθένεια με αποτέλεσμα μεγάλες περιοχές ή ολόκληρα φύλλα ξηραίνονται. Μικρές μαύρες βούλες, ψευδοστρώματα, είναι ορατά στο κέντρο ώριμων κηλίδων. Υπό υγρό καιρό, κονιδιοφόροι σχηματίζονται

στο κέντρο των κηλίδων χρωματίζοντας γκρι τις κηλίδες και δίνοντας βελούδινη υφή με την παραγωγή κονιδίων. Τα προσβεβλημένα φύλλα τελικά πέφτουν στο έδαφος. Τα νεότερα φύλλα προσβάλλονται αργότερα από τα παλαιότερα (Εικόνα 6). Τέλος, πρέπει να αναφέρουμε ότι είναι δυνατό να προσβληθούν όλα τα υπέργεια μέρη του φυτού.

Το *C. beticola* είναι αδρανής σε θερμοκρασίες κάτω των 10°C. Μπορεί να ξεκινήσει η προσβολή μεταξύ 12-37°C. Η καλύτερη θερμοκρασία για την παραγωγή κονιδίων είναι μεταξύ 20-26°C εάν η σχετική υγρασία κυμαίνεται από 98-100% (Pool & McKay, 1916) ή 25°C (Frandsen, 1955). Σοβαρές επιδημίες αναμένονται όταν η σχετική υγρασία παραμένει υψηλότερη από 96% για 10-12 ώρες κάθε μέρα για περίπου 3-5 μέρες και η θερμοκρασία είναι ανώτερη των 10°C (Mische, 1960). Η απελευθέρωση των κονιδίων επηρεάζεται από τη βροχή και το δρόσο (Meredith, 1967). Τα κονίδια διαδίδονται κυρίως με τις σταγόνες της βροχής (Pool & McKay, 1916; Carlson 1967), και λιγότερο με τον άνεμο (McKay & Pool, 1918), το νερό της άρδευσης, τα έντομα και τα ακάρεα (McKay & Pool, 1918; Meredith, 1967).

Όταν ξεκινήσει η προσβολή, βλαστήσουν τα κονίδια, ο μύκητας διεισδύει στο στόματα και πάει στο παρεγχυματικό ιστό όπου με την έκκριση τοξινών διευκολύνει την εγκατάσταση του (Daub & Ehrenshaft, 2000). Τα κονίδια παράγονται στο νεκρωτικό ιστό του φυτού αποτελούν το μόλυσμα για την επόμενη προσβολή. Οι τοξίνες που παράγει το παθογόνο είναι οι μικρού μοριακού βάρους: κερκοσπορίνη (cercosporin) (Daub & Ehrenshaft, 2000) και οι μπετικολίνες (beticolins) (Goudet *et al.*, 2000). Και οι δύο συμβάλλουν στην προσβολή.



Εικόνα 7: Ο κύκλος της ασθένειας
(Vereijssen, 2004)

Τα κονίδια του μύκητα παραμένουν στα υπολείμματα των προσβεβλημένων φύλλων για 1-4 μήνες (Pool & McKay, 1916) αλλά τα ψευδοστρώματα επιβιώνουν για 1-2 χρόνια και λειτουργούν σαν πηγές μόλυνσης (Εικόνα 7) (Pool & McKay, 1916; McKay & Pool, 1918; Canova 1959). Επίσης, υπάρχουν καταγραφές για επιδημίες *C. beticola* σε ολλανδικούς αγρούς μετά από 1:4 ή 1:5 εναλλαγές σε συστήματα αμειψισποράς, ακόμα και σε αγρούς που δεν είχαν καλλιεργηθεί ζαχαρότευτλα για 20 χρόνια. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μη απομάκρυνση των φύλλων των ζαχαρότευτλων από τον αγρό (τα φύλλα, παλαιότερα, μαζεύονταν και δίνονταν στα ζώα) (Vereijssen, 2004). Ακόμη, υπάρχουν καταγραφές για πηγές μόλυσματος: τους προσβεβλημένους σπόρους (McKay & Pool, 1918; Schurnbrand, 1952), τα ζιζάνια ή άλλους αυτοφρούς ξενιστές (Vestal, 1933) και τις ρίζες (Vereijssen *et al.*, 2004).

1.1.2 Μέθοδοι αντιμετώπισης της κερκοσπορίωσης

Οι μέθοδοι αντιμετώπισης της κερκοσπορίωσης είναι κυρίως τρεις: καλλιεργητικά μέτρα, ανθεκτικές ποικιλίες και χημική καταπολέμηση (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Εγκεκριμένες δραστικές ουσίες ενάντια της κερκοσπορίωσης (πηγή minagric.gr)

Δραστικές Ουσίες					
Qo παρεμποδιστές	Χαλκούχα	Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης RNA	Διθειοκαρβαμιδικά	DMIs	Λοιποί SBIs
azoxystrobin	calcium copper	hymexazol	mancozeb	cyproconazole	fenpropidin
pyraclostrobin	copper hydroxide		maneb	difenoconazole	fenpropimorph
trifloxystrobin	copper oxychloride			epoxiconazole	
	tribasic copper sulfate			flutriafol	
				propiconazole	
				tetraconazole	

Τα καλλιεργητικά μέτρα περιλαμβάνουν αμειψισπορά, βαθύ όργωμα που επισπεύδει τη νέκρωση των μολυσμένων τμημάτων και οδηγεί σε θάνατο του μύκητα (Canova, 1959). Οι ανθεκτικές ποικιλίες χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στο πλαίσιο μιας ολοκληρωμένης αντιμετώπισης του παθογόνου. Η κύρια μέθοδος αντιμετώπισης είναι με χημικά μέσα και πλέον χρησιμοποιούνται προγράμματα πρόβλεψης της ασθένειας για μείωση των εισροών σε μυκητοκτόνα (Racca & Jorg, 2007; Cioni *et al.*, 2014).

Παρατηρούμε στον Πίνακα 1, στη χημική αντιμετώπιση οι πιο πολλές εγκεκριμένες δραστικές ουσίες ανήκουν στους παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης.

1.2 Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης EBIs

1.2.1 Η βιοσύνθεση και ο ρόλος της εργοστερόλης

Οι στερόλες είναι κύρια συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών (μύκητες, φυτά, ανώτερα θηλαστικά) που έχουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση και αναπαραγωγή αυτών (Burden *et al.*, 1989; Vanden Bossche, 1990). Από άποψη χημικής δομής, είναι υδροξυστεροειδή της κατηγορίας των στεροειδών. Τα στεροειδή μαζί με τα καροτινοειδή, τα τερπενοειδή και τις λιποδιαλυτές βιταμίνες αποτελούν την ομάδα των ισοπρενοειδών ενώσεων, που με τη σειρά τους ανήκουν στα λιποειδή.

Η εργοστερόλη είναι η κύρια στερόλη των μεμβρανών (τόσο της κυτοπλασματικής όσο και εκείνων του ενδοπλασματικού δικτύου, των μιτοχονδρίων κλπ.) των ανώτερων μυκήτων, όπως των Ασκομυκήτων, Βασιδιομυκήτων και Αδηλομυκήτων, αλλά και των κατώτερων Ζυγομυκήτων (Lossel, 1990). Δεν παράγουν όλα τα είδη μυκήτων εργοστερόλη. Στις μεμβράνες των θηλαστικών κύρια στερόλη είναι η χοληστερόλη, τα φυτά συνθέτουν διάφορες άλλες φυτοστερόλες και τα βακτήρια σχηματίζουν τα σπανοειδή.

Από χημικής άποψη, η εργοστερόλη είναι μία αλκοόλη με 28 άτομα άνθρακα, που χημικά είναι παρόμοια με τη χοληστερόλη των ζωικών οργανισμών αλλά διαφέρουν στο ότι εργοστερόλη έχει επιπλέον δύο διπλούς δεσμούς μεταξύ $C^7 - C^8$ και $C^{22} - C^{23}$.

Η βιοσύνθεση της εργοστερόλης αποτελεί τμήμα του γενικού μεταβολισμού των λιπιδίων και ειδικά των ισοπρενοειδών ενώσεων που ανήκουν τα στεροειδή. Η διαδικασία της πορείας βιοσυνθέσεως και σχηματισμού των ισοπρενοειδών ξεκινά από το μεβαλλονικό οξύ. Τρία μόρια οξικού οξέος ενώνονται και δίνουν το πρόδρομο μόριο του μεβαλλονικού οξέος. Η διαδικασία χωρίζεται σε δύο φάσεις: την αναερόβια και την αερόβια (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Η πρώτη, αναερόβια φάση, ξεκινάει από το οξικό οξύ (acetic acid) και το ακετυλοσυνένζυμο Α (acetyl - CoA) και μετά από μία αλληλουχία βιοχημικών αντιδράσεων και ενδιάμεσων προϊόντων, καταλήγει στο σχηματισμό του μη πολικού μορίου του σκουαλενίου. Το στάδιο αυτό είναι κοινό στους μύκητες, φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς και στα βακτήρια.

Στη δεύτερη, αερόβια φάση, το σκουαλένιο μεταφέρεται στις κυτταρικές μεμβράνες, όπου μετά από μία σειρά οξειδωτικών, κυρίως, ενζυμικών αντιδράσεων, κυκλοποιείται σε στερόλες στους μύκητες, τα θηλαστικά και τα φυτά και σε οπανοειδή στα βακτήρια. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά δρα το ένζυμο εποξειδάση του σκουαλενίου στο σκουαλένιο μετατρέποντάς το σε 2,3 – επόξυ – σκουαλένιο, το οποίο στη συνέχεια με τη δράση του ενζύμου οξειδάση του σκουαλενίου σχηματίζει τη λανοστερόλη. Η λανοστερόλη αποτελεί την πρώτη στερόλη από την οποία με μία σειρά αντιδράσεων προκύπτει η εργοστερόλη (Εικόνα 8).

Τα κύρια στάδια βιοσύνθεσης είναι:

1. Απομεθυλίωση του C-24 του μορίου της λανοστερόλης
2. Αναγωγή του διπλού δεσμού $\Delta^{24(25)}$ και σχηματισμός του διπλού δεσμού $\Delta^{24(28)}$
3. Απομεθυλίωση μιας μεθυλομάδας στη θέση C - 14 και δύο από τη θέση C - 4
4. Αναγωγή του διπλού δεσμού Δ^{14}
5. Μετατόπιση του διπλού δεσμού από τη θέση $\Delta^{8,9}$ στη θέση $\Delta^{8,7}$
6. Εισαγωγή διπλών δεσμών στις θέσεις Δ^5 και Δ^{22}
7. Αναγωγή διπλού δεσμού $\Delta^{24(28)}$

Η βιοσύνθεση της εργοστερόλης είναι μια ενεργειακά πολυδάπανη διαδικασία αφού απαιτούνται τουλάχιστον 25 αντιδράσεις στις οποίες καταναλώνονται 10 μόρια ATP και 16 NADPH (Mercer, 1984; Vanden Bossche, 1990; Koller, 1992). Είναι μία πολύ σημαντική διαδικασία γιατί η εργοστερόλη έχει σα βασικό ρόλο τη διατήρηση της ρευστότητας των κυτταρικών μεμβρανών και επιτρέπει την ανάπτυξη των μυκήτων σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών. Ακόμη, προσδίδει μεγαλύτερη ακαμψία στο κυτταρικό τοίχωμα, ρυθμίζει την περατότητα στα κατιόντα και έχει συνδεθεί ο ρόλος της με την έναρξη της ανάπτυξης, συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Μαρκόγλου, 1997).

1.2.2 Μηχανισμός δράσης και ταξινόμηση των EBIs παρεμποδιστών

EBIs – Ergosterol Biosynthesis Inhibitors ή SBIs – Sterol Biosynthesis Inhibitors.

Οι EBIs είναι μια ομάδα διασυστηματικών μυκητοκτόνων που εμφανίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του '70. Με την ανακάλυψη του μηχανισμού δράσης του triarimol το 1968 μέχρι και σήμερα αποτελούν τη σημαντικότερη και μεγαλύτερη ομάδα διασυστηματικών μυκητοκτόνων. Χρησιμοποιούνται ευρύτατα, σε πολλές καλλιέργειες (σιτηρά, μηλοειδή, κολοκυνθοειδή, ψυχανθή, καλλωπιστικά), ενάντια διάφορων παθογόνων (οιδίων, σκωριάσεων και *Monilinia spp*, *Septoria spp*, *Venturia spp*, *Cercospora spp*, *Fusarium spp*, *Alternaria spp*, *Penicillium spp*) (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

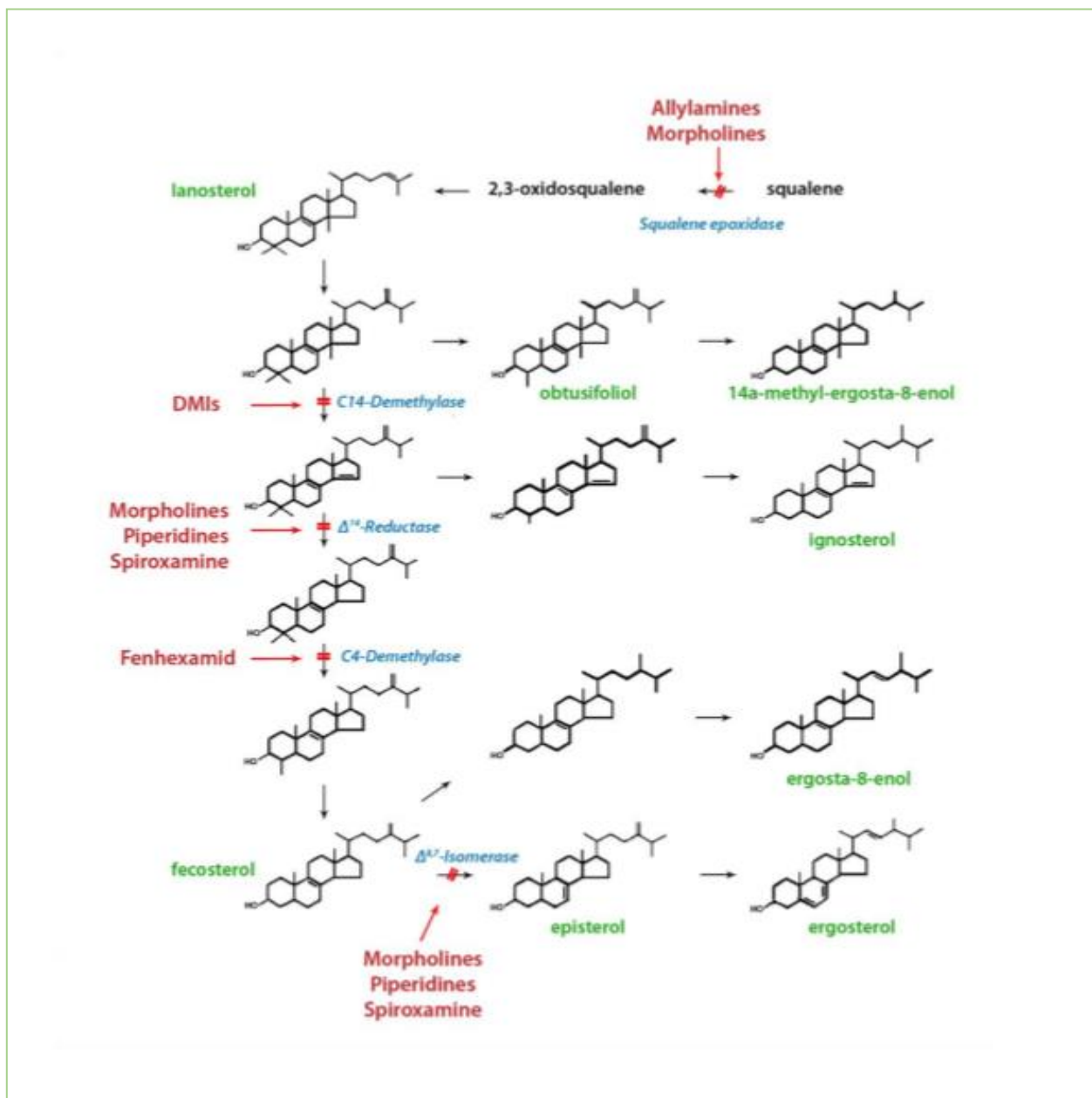
Όσον αφορά τη χημική τους δομή, χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός αζωτο-ετεροκυκλικού δακτυλίου στο μόριό τους, που μπορεί να είναι κορεσμένος ή ακόρεστος. Στην πρώτη κατηγορία, με τον κορεσμένο άζωτο – ετεροκυκλικό δακτύλιο ανήκουν οι υποομάδες των πυριδινικών, πυριμιδινικών, ιμιδαζολικών και τριαζολικών μυκητοκτόνων και είναι η σημαντικότερη στη φυτοπροστασία. Στη δεύτερη, ανήκουν οι υποομάδες των πιπεραζινικών, μορφολινικών και πιπεριδινικών μυκητοκτόνων. Ακόμη, στη βιοσύνθεση της εροστερόλης δρουν τα μυκητοκτόνα spiroxamine και fenhexamid των ομάδων των σπироκεταλαμινών και υδροξυανιλιδίων, αντίστοιχα, τα οποία όμως δεν έχουν αζωτοετεροκυκλικό δακτύλιο (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Οι EBIs διακρίνονται στις κάτωθι κατηγορίες με βάση σε ποιο σημείο του βιοχημικού μονοπατιού σύνθεσης της εργοστερόλης δρουν (Εικόνα 8):

- Κλάση I: Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι ενώσεις με μηχανισμό δράσης την παρεμπόδιση της απομεθυλίωσης του C – 14. Ονομάζονται DMIs (Demethylation inhibitors) και στις ενώσεις αυτές ανήκουν τα τριαζολικά, τα ιμιδαζολικά, τα πιπεραζινικά, τα πυριδινικά και τα πυριμιδινικά μυκητοκτόνα τα οποία δρουν ως παρεμποδιστές της απομεθυλίωσης του C-14 (Scheinpflug & Kuck, 1987; Koller, 1992; Buchenauer, 1995).
- Κλάση II: Παρεμποδιστές της Δ^{14} αναγωγής που καταλύεται από το ένζυμο Δ^{14} αναγωγάση ή τον $\Delta^{8\rightarrow7}$ ισομερισμό, που καταλύεται από το ένζυμο $\Delta^{8\rightarrow7}$ ισομεράση. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα πιπεριδινικά και οι σπироκεταλαμίνες.
- Κλάση III: Εδώ ανήκουν τα υδροξυανιλιδία που παρεμποδίζουν την απομεθυλίωση του C – 4, η οποία καταλύεται από το ένζυμο 3 – κετο – αναγωγάση.

- Κλάση IV: Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι αλλυλαμίνες, οι οποίες παρεμποδίζουν την εποξειδωση του σκουαλενίου, η οποία καταλύεται από το ένζυμο εποξειδάση του σκουαλενίου.

Βέβαια, πολλοί από τους EBIs δρουν και σε άλλα σημεία του βιοχημικού κύκλου όπως αυτά της κυκλοποίησης του σκουαλενίου προς 2,3-οξειδο-σκουαλένιο, της μεθυλίωσης του C-24 και της αναγωγής του Δ24(28) διπλού δεσμού, που είναι θέσεις δράσης των αζαστερολών και της εισαγωγής του Δ22 διπλού δεσμού που είναι και θέση δράσης του πιπεραζινικού triforine και του πυριμιδινικού triarimol.

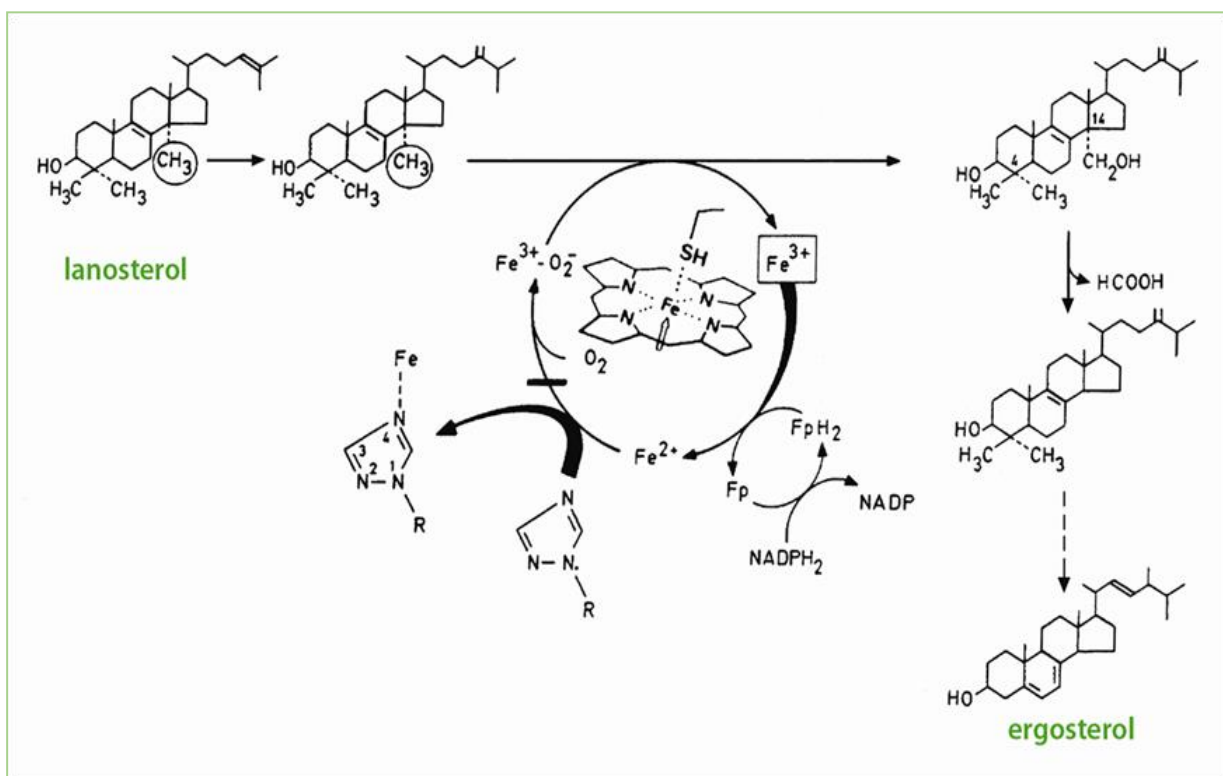


Εικόνα 8: Θέσεις δράσης των EBIs κατά τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010)

1.2.3 Μηχανισμός δράσης των DMIs παρεμποδιστών

Οι DMIs αποτελούν την πιο πολυπληθή ομάδα στους EBIs με πρώτη δραστική που ανακαλύφθηκε το πιπεραζινικό triforine το 1969. Δρουν παρεμποδίζοντας την απομεθυλίωση του C - 14. Αυτό, έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση πρόδρομων 14α-μεθυλιωμένων στερολών στις κυτταρικές μεμβράνες, οι οποίες όμως, δεν είναι ικανές να αντικαταστήσουν την εργοστερόλη στη δόμηση των μεμβρανών των μυκηλιακών μυκήτων (Koller, 1992; Buchenauer, 1995). Η απομεθυλίωση του C-14 του μορίου της λανοστερόλης γίνεται με μια σειρά οξειδώσεων, που καταλύονται από μια οξυγενάση, που έχει σαν προσθετική ομάδα το κυτόχρωμα P450.

Οι DMIs προσκολλώνται στον αιμικό (πορφυρινικό) σίδηρο του κυτοχρώματος με ένα άτομο αζώτου, που έχει ένα ελεύθερο ζευγάρι ηλεκτρονίων και εμποδίζουν την προσκόλληση του οξυγόνου και τον σχηματισμό του πρώτου οξυγονωμένου συμπλόκου (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010). Έτσι, παρεμποδίζεται η μεταφορά οξυγόνου στη μεθυλομάδα του C-14 της λανοστερόλης, το οποίο είναι το σπουδαιότερο στάδιο στη διαδικασία της απομεθυλίωσης



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας απομεθυλίωσης του C-14 στο μόριο της λανοστερόλης και της δράσης των DMIs στην απομεθυλίωση (πηγή Ζιώγας, Μαρκόγλου, 2010)

(Εικόνα 9). Στη σταθεροποίηση του συμπλόκου κυτόχρωμα-παρεμποδιστής φαίνεται να συμβάλλει και το υπόλοιπο λιπόφιλο τμήμα του μορίου των DMIs, το οποίο αλληλεπιδρά με την γύρω από τη θέση δράσης περιοχή του ενζύμου (Gadher *et al.*, 1983; Vanden Bossche *et al.*, 1984; Vanden Bossche *et al.*, 1987; Yoshida and Aoyama, 1987; Koller, 1992; Buchenauer, 1995; Μαρκόγλου, 1997; Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Αναφέραμε πιο πάνω ότι στους DMIs ανήκουν τα τριαζολικά, ιμιδαζολικά, πιπεραζινικά, πυριδινικά και πυριμιδινικά. Από αυτές τις κατηγορίες, αυτή τη στιγμή, εγκεκριμένες δραστικές έχουμε στα ιμιδαζολικά και τριαζολικά σε ένα πλήθος καλλιεργειών (μηλοειδή, πυρηνόκαρπα, εσπεριδοειδή, λαχανικά και φυτά μεγάλης καλλιέργειας).

Στα ιμιδαζολικά εγκεκριμένες δραστικές είναι οι:

- Imazalil
- Prochloraz

Όσον αφορά τα τριαζολικά, που είναι η πολυπληθέστερη ομάδα των EBIs, εγκεκριμένες δραστικές είναι οι:

- Cyproconazole
- Difenoconazole
- Eproconazole (σε μίγματα)
- Fenbuconazole
- Fluquinconazole
- Flutriafol
- Myclobutanil
- Penconazole
- Propiconazole
- Prothioconazole
- Tebuconazole
- Tetraconazole
- Triadimenol
- Triticonazole (πηγή minagric.gr)

Πρόβλημα στη χημική καταπολέμηση γενικά, και στην ομάδα των DMIs, αποτελεί η εμφάνιση ανθεκτικότητας.

1.3 Το πρόβλημα της Ανθεκτικότητας

1.3.1 Χημική Καταπολέμηση και Εμφάνιση Ανθεκτικότητας

Τα φυτά, η βάση της τροφικής αλυσίδας, δέχονται προσβολές από διάφορες κατηγορίες φυτοπαράσιτων. Τα μέτρα καταπολέμησης των εχθρών και των ασθενειών των φυτών διακρίνονται σε διοικητικά, καλλιεργητικά, βιολογικά, χημικά και συμπεριλαμβάνονται στα μέτρα η χρήση ανθεκτικών και ανεκτικών ποικιλιών. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Από τους προαναφερθέντες τρόπους, η χρήση χημικών ενώσεων αποτελεί αναντίρρητα την αποτελεσματικότερη και οικονομικότερη μέθοδο αντιμετώπισης των κυριότερων μυκητολογικών ασθενειών (που συνιστούν διάφορες πολύ σοβαρές ασθένειες των φυτών), τουλάχιστον στις περιοχές με ανεπτυγμένη γεωργία. (Schwinn, 1982; Γεωργόπουλος και Ζιώγας 1992). Αλλά για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί στην γεωργική πράξη μια χημική ένωση θα πρέπει να είναι εκλεκτικά τοξική, δηλ. να εμφανίζει εκλεκτική τοξική δράση, (selective toxicity), ιδιότητα που θα εξασφαλίζει να θανατώνει ή να παρεμποδίζει την ανάπτυξη ή την αναπαραγωγή του παθογόνου και την εκδήλωση συμπτωμάτων με συγκέντρωση του φαρμάκου που να μην έχει δυσμενείς επιπτώσεις στον ξενιστή ή στους άλλους οργανισμούς που εκτίθενται σε αυτό. Θα πρέπει δηλαδή το φάρμακο να έχει πολύ μικρό φάσμα δράσης (Μαρκόγλου, 1997).

Τα πρώτα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν εναντίον μυκητολογικών ασθενειών ήταν προστατευτικές ουσίες με ευρύ φάσμα δράσης, οι οποίες είχαν και τοξικές συνέπειες σε οργανισμούς – μη στόχους. Ανήκαν στην πρώτη περίπτωση των αιτιών για την εκλεκτική τοξική δράση και αποτέλεσαν τα μυκητοκτόνα 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς. Στις 1^{ης} γενεάς ανήκουν οι ενώσεις του θείου (θειασβέστιο) και του χαλκού (βορδιγάλειος πολτός) ενώ στις 2^{ης} γενεάς μυκητοκτόνα περιλαμβάνονται τα διθειοκαρβαμιδικά (maneb, mancozeb, ziram), κινόνες, φθαλιμίδια (captan) κ.α. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Λόγω της ανάγκης για αυξημένη αποτελεσματικότητα αλλά και θεραπευτική δράση, στη δεκαετία του 1970 – 1980 εμφανίστηκε ένας σχετικά μεγάλος αριθμός νέων διασυστηματικών μυκητοκτόνων, αυτών της 3^{ης} γενιάς. Πρόκειται για μυκητοκτόνα που η εκλεκτική τοξικότητα οφείλεται σε διαφορές χημισμού που εκφράζεται στο υποκυτταρικό επίπεδο των παθογόνων.

Πιο συγκεκριμένα, τα μυκητοκτόνα αυτά χαρακτηρίζονται από εξειδικευμένη παρεμπόδιση βιοχημικών διεργασιών του κυττάρου με συνέπεια μεγάλη αποτελεσματικότητα αλλά μικρό φάσμα δράσης. Εδώ περιλαμβάνονται τα βενζιμιδαζολικά (benomyl, carbendazim), καρβοξαμιδικά (carboxin) και φαινυλαμίδια (metalaxyl). (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Πλέον μιλάμε και για μυκητοκτόνα 4^{ης} γενεάς τα οποία: είτε μειώνουν την παθογόνο ικανότητα των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών παρεμποδίζοντας βιοχημικές διαδικασίες, οι οποίες αν και δεν είναι άμεσα θνησιγενείς στους μικροοργανισμούς, είναι πολύ σημαντικές για την φυτοπαθογόνο ικανότητά τους είτε επάγουν τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας του ξενιστή.

Τα πλεονεκτήματα των διασυστηματικών μυκητοκτόνων είναι πολλά καθώς δύνανται να αντιμετωπίζουν τα παθογόνα στο εσωτερικό των φυτών, αντιμετωπίζουν τα παθογόνα μετά την μόλυνσή τους στα φυτά (έχουν θεραπευτική δράση), δεν χρειάζεται πλήρης κάλυψη του φυτού καθώς το φάρμακο εισέρχεται και κυκλοφορεί εντός αυτού και μπορούν να εξασφαλίσουν προστασία του υπέργειου τμημάτων των νεαρών φυταρίων με κάλυψη του σπόρου.

Παρόλα, τα πλεονεκτήματα των διασυστηματικών μυκητοκτόνων, υπάρχει και το πολύ σημαντικό μειονέκτημα της εύκολης ανάπτυξης ανθεκτικότητας των παθογόνων σε αυτά (Dekker & Georgopoulos, 1982; Dekker, 1985, 1987; Sisler, 1988). Μέχρι το 1960 το πρόβλημα αυτό δεν υπήρχε. Αλλά, με τη διαδεδομένη χρήση των εξειδικευμένων παρεμποδιστών, δεδομένου του εξειδικευμένου μηχανισμού δράσης σε υποκυτταρικό επίπεδο οδήγησε στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας των παθογόνων και στην απώλεια της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων (Dekker & Georgopoulos, 1982; Delp, 1988; Brent & Hollomon, 1988).

Ως ανθεκτικότητα ορίζεται **«η σταθερή και κληρονομούμενη στους απογόνους προσαρμογή ενός μικροοργανισμού, στην παρουσία μιας αντιμικροβιακής ένωσης, που έχει ως αποτέλεσμα, την σημαντική μείωση της ευαισθησίας του πληθυσμού του παθογόνου, στον συγκεκριμένο παρεμποδιστή.»** (Delp & Dekker, 1985; Ζιώγας, 2000). Καθίσταται κατανοητό ότι πρόκειται για ένα πρόβλημα που προκύπτει από την επαναλαμβανόμενη επιλογή των ανθεκτικών στελεχών που οδηγεί στην απώλεια της αποτελεσματικότητας των μυκητοκτόνων.

Τα πρώτα προβλήματα ανθεκτικότητας εμφανίστηκαν στα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα στην καταπολέμηση της κερκοσπορίωσης των τεύτλων (Georgopoulos & Donas, 1973), ένα χρόνο μετά την έναρξη εφαρμογής τους, ενώ μέχρι σήμερα σε όλα, σχεδόν, τα μυκητοκτόνα

με εξειδικευμένο μηχανισμό δράσης έχει αναφερθεί σε κάποιο βαθμό εμφάνιση ανθεκτικότητας (Πίνακας 2).

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

Υπάρχει θετική και αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα. Στην πρώτη περίπτωση, η ανθεκτικότητα σε ένα μυκητοκτόνο οδηγεί σε αύξηση της ανθεκτικότητας και σε ένα άλλο μυκητοκτόνο για το παθογόνο, φαινόμενο που αφορά μυκητοκτόνα που είτε ανήκουν στην ίδια ομάδα είτε έχουν κοινό φάσμα δράσης. Αντίθετα, στη δεύτερη περίπτωση, η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας σε ένα μυκητοκτόνο οδηγεί σε αύξηση της ευαισθησίας του παθογόνου σε άλλο μυκητοκτόνο.

Τέλος, η πολλαπλή ανθεκτικότητα είναι το φαινόμενο κατά το οποίο το παθογόνο στέλεχος εμφανίζει ανθεκτικότητα σε διαφορετικών ομάδων μυκητοκτόνα γεγονός που οφείλεται σε ανεξάρτητες μεταλλάξεις στα διαφορετικά σημεία δράσης των μυκητοκτόνων.

Πίνακας 2 Εμφάνιση ανθεκτικότητας στα διάφορα μυκητοκτόνα με χρονολογική σειρά (πηγή FRAC)

Occurrence of Practical Fungicide Resistance in Crops			
Date first observed (approx.)	Fungicide or fungicide class	Years of commercial use before resistance observed (approx.)	Main crop diseases and pathogens affected
1960	Aromatic hydrocarbons	20	Citrus storage rots, <i>Penicillium</i> spp.
1964	Organo-mercurials	40	Cereal leaf spot and stripe, <i>Pyrenophora</i> spp.
1969	Dodine	10	Apple scab, <i>Venturia inaequalis</i>
1970	Benzimidazoles	2	Many target pathogens,
1971	2-Amino-pyrimidines	2	Cucumber and barley, powdery mildews <i>Sphaerotheca fuliginea</i> & <i>Blumeria graminis</i>
1971	Kasugamycin	6	Rice blast, <i>Magnaporthe grisea</i>
1976	Phosphorothiolates	9	Rice blast, <i>Magnaporthe grisea</i>
1977	Triphenyltins	13	Sugar beet leaf spot, <i>Cercospora betae</i>
1980	Phenylamides	2	Potato blight and grape downy mildew, <i>Phytophthora infestans</i> & <i>Plasmopara viticola</i>
1982	Dicarboximides	5	Grape grey mould, <i>Botrytis cinerea</i>
1982	Sterol Demethylation inhibitors (DMIs)	7	Cucurbit and barley powdery mildews, <i>S. fuliginea</i> & <i>Blumeria graminis</i>
1985	Carboxanilides	15	Barley loose smut, <i>Ustilago nuda</i>
1998	Quinone outside Inhibitors (QoIs; Strobilurins)	2	Many target diseases and pathogens
2002	Melanin Biosynthesis Inhibitors (Dehydratase) (MBI-D)	2	Rice blast, <i>Magnaporthe grisea</i>

1.3.2 Γενετικός έλεγχος Ανθεκτικότητας

Η γενετική βάση της ανθεκτικότητας είναι η ύπαρξη μιας μεταλλαγής στο γενετικό υλικό (DNA) με μικρή συχνότητα στα στελέχη ενός πληθυσμού, ο οποίος αφού υποστεί πίεση επιλογής με επαναλαμβανόμενη χρήση ίδιου μυκητοκτόνου μετατοπίζεται σε τιμές μειωμένης ευαισθησίας. Αυτό συμβαίνει, γιατί αυξάνεται η συχνότητα των στελεχών με το γονότυπο που δεν επηρεάζονται από την έκθεση στο φάρμακο με αποτέλεσμα να αλλάζει η κατανομή του πληθυσμού, δηλαδή μειώνεται η μέση ευαισθησία του πληθυσμού και συνεπώς η αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010). Αν η ανάπτυξη ανθεκτικότητας δεν είναι αποτέλεσμα μιας τέτοιας αλλαγής αλλά είναι αποτέλεσμα «φαινοτυπικής προσαρμογής», έχουμε το φαινόμενο της φαινοτυπικής ανθεκτικότητας. Αυτό παρατηρείται μετά από μεγάλο διαστήματος έκθεση του παθογόνου στο μυκητοκτόνο και υπό ευνοϊκές συνθήκες για το παθογόνο, η οποία, όμως, χάνεται μόλις ο μύκητας βρεθεί σε περιβάλλον χωρίς το μυκητοκτόνο και άρα δεν παρουσιάζει ενδιαφέρον (Georgopoulos, 1982^b, 1995; Γεωργόπουλος και Ζιώγας 1992).

Ανάλογα με τον τρόπο που κληρονομείται η μεταλλαγή στο DNA του μύκητα έχουμε διάφορους τύπους ανθεκτικότητας:

- Εξωχρωμοσωματική (extrachromosomal resistance) και
- Χρωμοσωματική (chromosomal resistance).

Η πρώτη περίπτωση, αφορά σε μεταλλαγές σε εξωχρωμοσωματικά γονίδια που κληρονομούνται κατά μη Μενδελικό τρόπο. Αφορά στους μύκητες, σε μιτοχονδριακού DNA μεταλλαγές. Στη δεύτερη περίπτωση, η ανθεκτικότητα είναι αποτέλεσμα μεταλλαγής σε χρωμοσωματικά γονίδια, κληρονομείται κατά τον Μενδελικό τρόπο και είναι η πιο ευρέως μελετημένη (Georgopoulos, 1995; Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Ανάλογα, με τον αριθμό των μεταλλαγμένων γονιδίων που εκφράζονται στο φαινότυπο, όσον αφορά, δηλαδή το γενετικό έλεγχο, διακρίνουμε δύο τύπους ανθεκτικότητας:

1. Ολιγογονική ανθεκτικότητα («μείζονων γονιδίων»)

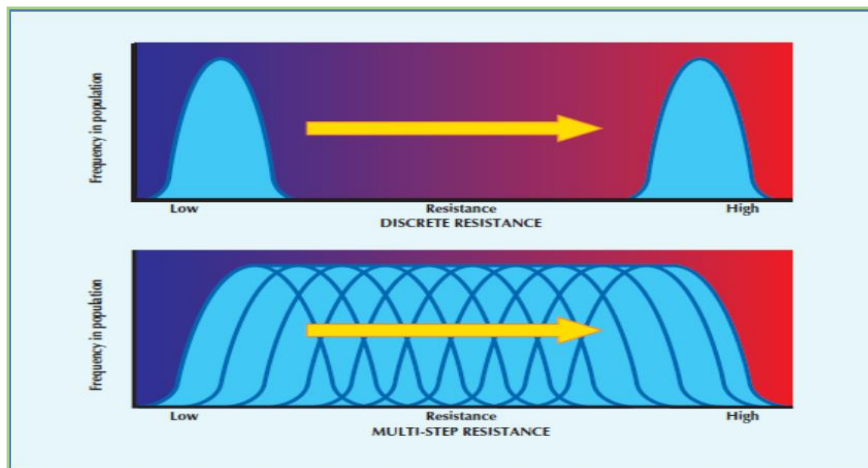
2. Πολυγονική ανθεκτικότητα

Το ποια περίπτωση θα έχουμε εξαρτάται από το μυκητοκτόνο μόνο.

Στην ολιγογονικού τύπου ανθεκτικότητα, έχουμε υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας καθώς μία και μόνο μεταλλαγή αρκεί για να δημιουργήσει πρόβλημα (Εικόνα 10). Μειώνεται δραματικά η συγγένεια με το φάρμακο. Χαρακτηριστικό της ολιγογονικής ανθεκτικότητας

είναι η σταθερότητα του επιπέδου ανθεκτικότητας ακόμα και μετά από μακρόχρονη διακοπή της πίεσης επιλογής από το φάρμακο. Ολιγογονική ανθεκτικότητα, με μεταλλαγή ενός ή λίγων μείζονων γονιδίων συναντάμε στα εξειδικευμένης δράσης μυκητοκτόνα: βενζιμιδαζολικά (Ziogas & Girgis, 1993; Shabi *et al.*, 1983), φαινυλαμίδια, καρβοξιμιδικά (Georgopoulos & Ziogas, 1977) και σε αρωματικούς υδρογονάνθρακες και στα δικαρβοξιμιδικά.

Στην πολυγονικού τύπου ανθεκτικότητα, κάθε γονίδιο προσδίδει μια μικρού επιπέδου ανθεκτικότητα (Εικόνα 10). Η επίδραση του κάθε γονιδίου είναι πολύ μικρή, γεγονός που την καθιστά δύσκολο να αναγνωριστεί σε συνθήκες αγρού. Για να επιτευχθεί, επομένως, υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα θα πρέπει να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφορετικών γονιδίων, για την ακρίβεια προσθετική δράση. Σε αυτού του τύπου ανθεκτικότητα η απώλεια της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου είναι σταδιακή και λιγότερο σταθερή γιατί μπορούμε να εφαρμόσουμε μεγαλύτερη δόση ή να σταματήσει η εφαρμογή του μυκητοκτόνου έτσι ώστε ο πληθυσμός να επανέλθει σε τιμές μειωμένης ευαισθησίας. Παραδείγματα πολυγονικής ανθεκτικότητας αποτελούν οι περιπτώσεις των οργανοφωσφορικών και των οργανοκασσιτερούχων (Georgopoulos 1987, 1995), του dodine (Crute & Harrison, 1988) και των EBIs (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).



Εικόνα 10: Κατανομή πληθυσμού στην περίπτωση ολιγογονικής (επάνω) και πολυγονικής (κάτω) ανθεκτικότητας (πηγή : FRAC)

1.3.3 Βιοχημικοί μηχανισμοί Ανθεκτικότητας

Υπάρχουν διάφοροι βιοχημικοί μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται η ανθεκτικότητα:

1. **Αλλαγή στη θέση δράσης.** Πρόκειται για μία αλλαγή στην ευαίσθητη θέση, δηλαδή στο κυτταρικό συστατικό (ένζυμο ή άλλο) που αντιδρά με τον τοξικό παράγοντα. Πιο συγκεκριμένα, είναι γενετικές αλλαγές (μεταλλάξεις γονιδίων), οι οποίες διαφοροποιώντας τη στερεοχημική δομή του ενζύμου ή γενικότερα του στόχου του παρεμποδιστή, μειώνουν τη συγγένεια (affinity) για το μυκητοκτόνο. Επομένως, προκαλούν γρήγορη μείωση της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου χωρίς κατά τα άλλα να επιδρούν στη λειτουργικότητα και στο συνολικό μεταβολισμό του κύτταρου (Dekker, 1985, 1987, 1995; Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992; De Waard, 1994). Αφορά μυκητοκτόνα με λίγες ή συγκεκριμένες θέσεις δράσης όπως τα βενζιμιδαζολικά (Davidse 1982), τα καρβοξαμιδικά (Georgopoulos & Ziogas, 1977; 1979; Georgopoulos 1982), τα φαινυλαμίδια (Davidse 1982), αρκετά αντιβιοτικά (στρεπτομυκίνη, κασουγκαμυκίνη, κυκλοεξιμίδιο) (Vomvoyanni, 1974; Misato & Ko, 1975; Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992) και τους EBIs (Walsh & Sisler, 1982; Aoyama *et al.*, 1983; Leroux & Greddt, 1984; King *et al.*, 1985; Hitchcock *et al.*, 1987; Vanden Bossche, 1987, 1990; Orth *et al.*, 1990; Demopoulos & Ziogas, 1994).
2. **Μειωμένη συσσώρευση του τοξικού μορίου.** Εδώ έχουμε τρεις κατηγορίες:
 - 2.1. **Δέσμευση του φαρμάκου στο κυτταρικό τοίχωμα,** όπου είναι ένας απλός μηχανισμός που μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της εισόδου του φαρμάκου στο κύτταρο του παθογόνου και παράδειγμα αποτελούν τα μορφολινικά μυκητοκτόνα (Μαρκόγλου, 1997) και το triadimefon.
 - 2.2. **Μειωμένη περατότητα μεμβρανών,** όπου μια κατάλληλη μεταλλαγή σε γόνο που ελέγχει το σύστημα μεταφοράς στη κυττοπλασματική μεμβράνη του μύκητα, μειώνει την περατότητα της μεμβράνης στο φάρμακο, άρα μειώνει την αποτελεσματικότητά του και οδηγεί σε ανθεκτικότητα (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Συναντάμε το μηχανισμό αυτό και σε προστατευτικά και σε διασυστηματικά μυκητοκτόνα όπως στο βενζιμιδαζολικό carbendazim (Nachmias & Barash, 1976) και τους EBIs (Gasztonyi & Josepovits, 1984; Ryley *et al.*, 1984; Wellman & Shauz, 1993).

- 2.3. **Αυξημένη απέκκριση**, δηλαδή λειτουργία συστήματος απόρριψης. Για να έχουμε μη συσσώρευση του τοξικού μορίου μέσα στο κύτταρο μπορούμε να έχουμε όπως στην προηγούμενη περίπτωση μειωμένη είσοδό του αλλά μπορούμε να έχουμε και αυξημένη λειτουργία απεκκριτικών μηχανισμών ενεργούς ή μη μεταφοράς. Απαιτείται ενέργεια για αυτό το μηχανισμό υπό τη μορφή ATP γιατί επιτυγχάνεται η απέκκριση μέσω υπερέκφρασης μη εξειδικευμένων μεταφορέων των μεμβρανών ABC και MFS (De Waard *et al.*, 1997). Συναντάμε το μηχανισμό αυτό και σε προστατευτικά και διασυστηματικά μυκητοκτόνα όπως στους DMIs (De Waard & Van Nistelrooy, 1979, 1984; Kalamaris *et.al.*, 1991; Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992), και σε φαινόμενα πολλαπλής – μη εξειδικευμένης ανθεκτικότητας.
3. **Αποτοξικοποίηση**, όπου εννοούμε μηχανισμούς ενζυμικής αποικοδόμησης του τοξικού μορίου σε προϊόντα που είναι λιγότερο ή καθόλου τοξικά για το κύτταρο. Αυτό μπορεί να γίνει είτε μέσα είτε έξω από το κύτταρο, με ενζυμική αποικοδόμηση ή με δέσμευση του τοξικού μορίου από κυτταρικά συστατικά που δεν είναι σημαντικά για το μεταβολισμό του κυττάρου (Georgopoulos, 1976; Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992). Παράδειγμα αυτού του μηχανισμού αποτελούν τα οργανικά υδραργυρούχα, το dodine (Bartz & Mitchell, 1970), το οργανοφωσφορικό iprobenfos (Nakanishi & Oku, 1970) κ.ά.
4. **Μειωμένη μετατροπή του μη τοξικού μορίου σε τοξικό**. Υπάρχει η διαδικασία «θανατηφόρος σύνθεση» (lethal synthesis) κατά την οποία οι μύκητες μετατρέπουν μια μη τοξική ουσία σε τοξική (Georgopoulos, 1976; Dekker, 1977). Κάποια μυκητοκτόνα εκμεταλλεύονται αυτήν τη διαδικασία και αν και δεν έχουν ουσίες που να είναι τοξικές στους μύκητες μετατρέπονται σε τοξικές από ενζυμικά συστήματα των μυκήτων. Όταν λοιπόν γενετικές μεταλλαγές στα ενζυμικά αυτά συστήματα προκαλούν μειωμένη μετατροπή του μη τοξικού μορίου σε τοξικό τότε έχουμε πρόβλημα ανθεκτικότητας. Παράδειγμα αποτελεί το triadimefon το οποίο πρέπει να μετατραπεί σε triadimenol για να είναι τοξικό και έχουν καταγραφεί περιπτώσεις που είτε αυτό δε συμβαίνει (Fuchs & De Vries, 1984) είτε μετατρέπεται στο λιγότερο τοξικό διαστερεοϊσομερές B του triadimenol (Δημόπουλος, 1992; Demopoulos & Ziogas, 1994).

5. **Λειτουργία εναλλακτικών συστημάτων**, δηλαδή μεταβολικών συστημάτων που πραγματοποιούν τις λειτουργίες που παρεμποδίζονται από το μυκητοκτόνο. Σνηθισμένος μηχανισμός ανθεκτικότητας στα φάρμακα εξειδικευμένης δράσης στρομπιλουρίνες (Ziogas *et al.*, 1997).
6. **Αυξημένη παραγωγή του ενζύμου - στόχου του παρεμποδιστή**, όπου υπάρχει αυξημένη παραγωγή του ενζύμου - στόχου του παρεμποδιστή. Τα αυξημένα επίπεδα του ενζύμου - στόχου είναι τις περισσότερες φορές αποτέλεσμα υπερέκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή. Εμφανίζεται σε εξειδικευμένα μυκητοκτόνα και χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι DMIs – παρεμποδιστές σε αρκετά παθογόνα (Hamamoto *et al.*, 2000; Schnabel & Jones, 2001).

1.3.4 Διερεύνηση του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας στον αγρό

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση και περαιτέρω ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στον αγρό και έχουν να κάνουν με το παθογόνο, με το μυκητοκτόνο και τον τρόπο που ασκείται η γεωργική πρακτική.

Παράγοντες σχετιζόμενοι με το παθογόνο:

- Αρχική κατανομή του πληθυσμού και γενετική προσαρμοστικότητα

Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική συχνότητα των ανθεκτικών στελεχών τόσο πιο σύντομα θα έχουμε ανάπτυξη και επικράτηση των στελεχών αυτών και απώλεια της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου (Εικόνα 11).

- Βιολογία και επιδημιολογία του παθογόνου

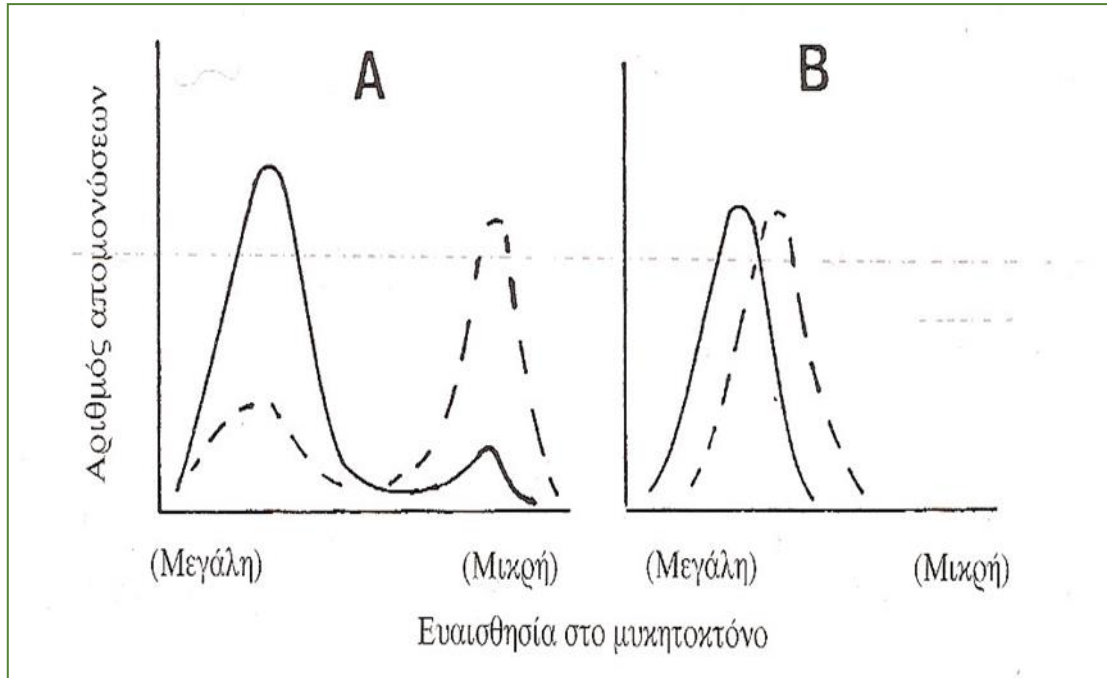
. Όσο μεγαλύτερος ο αριθμός γενεών και απογόνων τόσο μεγαλύτερος ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Επίσης, η ύπαρξη εγγενούς αναπαραγωγής αυξάνει το κίνδυνο ανθεκτικότητας καθώς αυξάνεται η πιθανότητα μεταλλαγών ανθεκτικότητας μέσω γενετικών ανασυνδυασμών.

- Τύπος ασθένειας

Εξετάζεται αν το παθογόνο προσβάλλει εναέρια ή υπόγεια τμήματα όσον αφορά την ευκολία μετάδοσης μολύσματος. Μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος όταν η ασθένεια προσβάλλει εναέρια τμήματα του φυτού αφού η ευκολία μετάδοσης του μολύσματος ευνοεί τη διάδοση της ασθένειας

- Συνθήκες περιβάλλοντος

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες που ευνοούν την εκδήλωση της ασθένειας ευνοούν και την εμφάνιση του προβλήματος.



Εικόνα 11: Σχέση μεταξύ κατανομής του πληθυσμού και του επιπέδου ανθεκτικότητας (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992; Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010).

Παράγοντες σχετιζόμενοι με το μυκητοκτόνο:

Κάποιοι συγκεκριμένοι μηχανισμοί ενέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο. Αν είναι εξειδικευμένης δράσης υπάρχει μεγαλύτερος κίνδυνος και ανθεκτικότητα ολιγογονικού τύπου είναι πιο επικίνδυνο από του πολυγονικού.

Παράγοντες σχετιζόμενοι με τη γεωργική πρακτική:

Υπερβολική δόση οδηγεί σε αυξημένη πίεση επιλογής και οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της ανθεκτικότητας. Μη κατάλληλος χρόνος, συχνότητα και τρόπος εφαρμογής φαρμάκου (πολλαπλή ή αποκλειστική χρήση) επιδεινώνουν το πρόβλημα. Επίσης, τα διαστήματα μεταξύ των εφαρμογών πρέπει να τηρούνται. Ρόλο παίζει και η γεωργική έκταση. Όσο μεγαλύτερη τόσο χειρότερα γιατί περιορίζεται ο αριθμός των άγριων στελεχών που θα ανταγωνιστούν τα ανθεκτικά όταν πάψει η πίεση επιλογής από το μυκητοκτόνο. Για το ίδιο λόγο επηρεάζει η εφαρμογή σε αγρό ή θερμοκήπιο. Δεδομένου ότι το θερμοκήπιο είναι

κλειστό σύστημα, είναι δύσκολο να έχουμε ανάμειξη του άγριου με τον ανθεκτικό πληθυσμό. Τέλος, απαραίτητη είναι η εφαρμογή και άλλων μέτρων πλην της χημικής καταπολέμησης που αποσκοπούν στη μείωση πίεσης επιλογής.

Διακρίνουμε τρεις κατηγορίες σε σχέση με το πόσο επικίνδυνο είναι να χάσει ένα μυκητοκτόνο την αποτελεσματικότητά του και να επικρατήσουν τα ανθεκτικά στελέχη του παθογόνου:

- Υψηλού κινδύνου

Πρόκειται για μυκητοκτόνα με εξειδικευμένο μηχανισμό δράσης στα οποία εμφανίζονται στελέχη υψηλής ανθεκτικότητας με μεταλλαγή μείζονων γόνων χωρίς να επηρεάζεται η φυτοπαθόγνος προσαρμοστικότητα των μεταλλαγμένων στελεχών.

- Μέσου κινδύνου

Πρόκειται για ενώσεις στις οποίες έχουμε είτε μεταλλαγές μείζονων γονιδίων, με σοβαρή, όμως, επίδραση στη φυτοπαθόγνος προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών στελεχών είτε έχουμε πολυγονικό έλεγχο της ανθεκτικότητας.

- Χαμηλού κινδύνου

Πρόκειται για μη εξειδικευμένης δράσης μυκητοκτόνα. Σε αυτήν τη περίπτωση φαίνεται ότι τα παθογόνα δεν έχουν τους κατάλληλους γόνους ανθεκτικότητας ή ότι οι απαιτούμενες μεταλλαγές οδηγούν σε μη βιωσιμότητα του κυττάρου του παθογόνου (Ζιώγας, 2000).

Η ίδια κατάταξη ισχύει και για τα παθογόνα. Άρα έχουμε υψηλού, μέσου και χαμηλού κινδύνου παθογόνα. Ο συνδυασμός και των δύο αποτελεί τον ενδογενή κίνδυνο (Εικόνα 12). Υψηλού κινδύνου παθογόνο με υψηλό κίνδυνο μυκητοκτόνο δίνουν υψηλό ενδογενή κίνδυνο ενώ υψηλού κινδύνου παθογόνο με χαμηλού κινδύνου μυκητοκτόνο (και αντίστροφα) δίνουν μέτριο ενδογενή κίνδυνο

Combined risk: 0.5 – 1.5 = low, 2-6 = medium, 9 = high

High Benzimidazoles QoIs Phenylamides Dicarboximides	3	3	6	9
Medium Carboxanilides DMIs Phenylpyrrols Phosphorothiolates Anilinopyrimidines MBI-Os	2	2	4	6
Low Coppers, sulphur Chlorothalonil Dithiocarbamates Phthalimides MSI-Rs Probenazole	0.5*	0.5	1	1.5
Fungicide Risk		1	2	3
Pathogen Risk		Low <i>Rhizoctonia</i> Rusts Soil borne pathogens Smuts & Bunts	Medium Eyespot <i>Mycosphaerella graminicola</i> <i>Rhynchosporium</i>	High <i>Botrytis</i> <i>Blumeria</i> <i>Magnaporthe</i> <i>Venturia</i> <i>Plasmopara</i> <i>Penicillium</i> <i>M.fijiensis</i> <i>Phytophthora infestans**</i>

* This low score reflects the long standing record of 'no resistance' in this low risk group.
** *P. infestans* is considered by some to be a medium risk as the high risk classification is based largely on the reaction to phenylamides

Εικόνα 12: Ενδογενής κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας όπως διαμορφώνεται σε σχέση με το παθογόνο και το μυκητοκτόνο (πηγή FRAC)

1.3.5 Διαχείριση του προβλήματος της Ανθεκτικότητας

Η διαχείριση της ανθεκτικότητας χωρίζεται σε τρεις πυλώνες:

- Παρακολούθηση του πληθυσμού
- Εκτίμηση του κινδύνου
- Αντιμετώπιση του προβλήματος

Αρχικά, σχετικά με την παρακολούθηση του πληθυσμού, πρέπει να προσδιοριστεί ευαισθησία αναφοράς σε πληθυσμό του παθογόνου που δεν έχει δεχτεί επέμβαση με το μυκητοκτόνο. Οι δειγματοληψίες αγρού (Screening) είναι απαραίτητες για να προσδιοριστεί η αρχική κατανομή ευαισθησίας του πληθυσμού, να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου αλλά και για την μελλοντική αξιολόγηση της στρατηγικής αντιμετώπισης της ανθεκτικότητας που θα εφαρμοστεί. Ο έλεγχος της ευαισθησίας γίνεται, αφού προηγηθεί

κατάλληλη δειγματοληψία, είτε με κλασσικές βιοδοκιμές *in vitro* είτε με μοριακές δοκιμές (ειδικά για την περίπτωση της αλλαγής στη θέση δράσης). Επόμενο βήμα είναι να γίνει εκτίμηση του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας.

Για να εκτιμηθεί ο κίνδυνος, αρχικά απαιτείται διερεύνηση του βιοχημικού μηχανισμού καθώς και του γενετικού τύπου της ανθεκτικότητας που εμφανίζεται. Στη συνέχεια, θα πρέπει να εξεταστεί η ύπαρξη σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας και να συνυπολογιστεί σε αυτά το γενετικό δυναμικό για ανθεκτικότητα. Επιπλέον αυτών, σημαντικό ρόλο παίζει και ο λεγόμενος ενδογενής κίνδυνος (*inherent resistant risk*), δηλαδή οι παράγοντες που έχουν να κάνουν με το μυκητοκτόνο και το παθογόνο και τέλος πρέπει να ληφθούν υπόψιν οι συνθήκες χρήσης και το περιβάλλον.

Αφού εξεταστούν τα παραπάνω καταλήγουμε στην αντιμετώπιση του προβλήματος με λήψη μέτρων όπως: αποφυγή αποκλειστικής χρήσης, χρήση των μυκητοκτόνων σε μίγματα (εναλλαγή με προστατευτικά ή διαφορετικού τρόπου δράσης), περιορισμός εφαρμογών ανά καλλιεργητική περίοδο, κατάλληλος χρόνος εφαρμογής, απαιτείται σχεδίαση του όλου προγράμματος φυτοπροστασίας με παρακολούθηση των μετεωρολογικών συνθηκών και μελέτη της βιολογίας των παθογόνων έτσι ώστε να προλαμβάνονται οι ασθένειες, χρησιμοποίηση της ενδεικνυόμενης δόσης και γενικά χρήση φαρμάκου βάσει ετικέτας και IPM. Η νεότερη τάση στη γεωργία είναι η εφαρμογή ολοκληρωμένης μεθόδου όσον αφορά τη φυτοπροστασία, χρησιμοποιώντας και καλλιεργητικά μέτρα και βιολογικά κ.ά. με σκοπό τη μειωμένη χρήση μυκητοκτόνων (πηγή FRAC).

1.3.6 Προβλήματα και μηχανισμοί ανθεκτικότητας των DMIs παρεμποδιστών

Δεδομένου ότι πρόκειται για φάρμακα εξειδικευμένης δράσης είναι αναμενόμενο να εμφανιστούν προβλήματα ανθεκτικότητας. Η αξιολόγηση του κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικότητας ξεκίνησε σχεδόν συγχρόνως με την εισαγωγή τους στη γεωργική πράξη (Sisler, 1988). Οι DMIs θεωρούνται μέσου κινδύνου μυκητοκτόνα και διατηρούν την αποτελεσματικότητά τους εδώ και 4 δεκαετίες.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η ανθεκτικότητα είναι, συνήθως, πολυγονικού τύπου (Kalamarakis *et al.*, 1991; Wellman & Schauz, 1992). Αυτό, εξηγεί και την σημαντική επίπτωση που έχει η ανθεκτικότητα στη φυτοπαθογόνο προσαρμοστικότητα. Έχει σημειωθεί, ότι στα ανθεκτικά στελέχη η φυτοπαθογόνος ικανότητα είναι μειωμένη λόγω μειωμένου

ρυθμού μυκηλιακής ανάπτυξης, μειωμένης παραγωγής και βλάστησης κονιδίων του παθογόνου και μειωμένης επιμήκυνσης του βλαστικού σωλήνα (Georgopoulos, 1977; De Waard & Van Nistelrooy, 1990; Kalamarakis *et al.*, 1991). Παρ' αυτά, έχει αναφερθεί και ανθεκτικότητα ολιγογονικού τύπου (Leroux *et al.*, 2007; Mullins *et al.*, 2011; Cools & Fraaije, 2012; Cools *et al.*, 2013).

Στους Πίνακες 3 και 4 που ακολουθούν, βλέπουμε διάφορα παθογόνα που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στους DMIs και το μηχανισμό ανθεκτικότητας.

Πίνακας 3: Παραδείγματα ανθεκτικών στελεχών αγρού από διάφορα παθογόνα (Cools *et al.*, 2013)

Organism	Crop	Azole sensitivity phenotype	Mechanism(s)	Comments ^a	Selected reference(s)
<i>Podosphaera fusca</i>	Cucumber	myclobutanil and propiconazole	insert, transposable element). ABC transporter <i>PMR1</i> over-expression		<i>et al.</i> (2007); Sun <i>et al.</i> (2013)
		Lower sensitivities to triadimenol and fenarimol. Cross-resistance between triadimenol and myclobutanil. No cross-resistance between fenarimol and triadimenol or myclobutanil	No <i>CYP51</i> over-expression. <i>CYP51</i> alteration suggested	Azole fungicides, in mixture with alternative modes of action, still recommended for <i>P. fusca</i> control	López-Ruiz <i>et al.</i> (2010, 2011)
<i>Puccinia triticina</i>	Wheat	Varying sensitivity of European isolates to epoxiconazole	<i>CYP51</i> alteration (Y134F) and <i>CYP51</i> over-expression identified in sensitive and less sensitive isolates	Decreased sensitivity phenotypes are still rare. Azoles remain very effective	Stammler <i>et al.</i> (2009)
<i>Rhynchosporium commune</i>	Barley	Positive cross-resistance between propiconazole, tebuconazole, epoxiconazole. Incomplete cross-resistance to prothioconazole	Presence of a second <i>CYP51</i> paralogue (<i>RcCYP51A</i>). Mechanism responsible for more recent shifts unknown	Prothioconazole remains very effective	Hawkins <i>et al.</i> (2011)
<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>	Turf grass	Reduced sensitivities to propiconazole. Sensitivities between azoles as well as to plant growth regulators highly correlated	Induced <i>CYP51</i> over-expression. Constitutive and induced efflux pump (<i>ShatrD</i>) over-expression	Azoles still relied on for <i>S. homoeocarpa</i> control, resistance to unrelated fungicides a possibility	Ok <i>et al.</i> (2011); Hulvey <i>et al.</i> (2012)
<i>Venturia inaequalis</i>	Apple	Resistance to myclobutanil and reduced sensitivity to fenbuconazole and difenoconazole reported. Cross-resistance between azoles. Some local variation	Constitutive <i>CYP51</i> (<i>CYP51A1</i>) over-expression caused by a promoter insert	Azoles still used although other modes of action are available	Schnabel & Jones (2001); Pfeufer & Ngugi (2012)

Πίνακας 4: Παραδείγματα ανθεκτικών στελεχών αγρού από διάφορα παθογόνα (Cools *et al.*, 2013)

Organism	Crop	Azole sensitivity phenotype	Mechanism(s)	Comments ^a	Selected reference(s)
<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	Barley	Varying levels of resistance to triadimenol and propiconazole. Positive cross-resistance to other azoles	CYP51 alterations (Y136F, K147Q)	CYP51 alterations accumulate to confer highest levels of resistance. In Europe <i>B. graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> is currently controlled by mildewicides and host resistance	Délye <i>et al.</i> (1998); Wyand & Brown (2005)
<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	Wheat	Varying levels of resistance to triadimenol and propiconazole. Positive cross-resistance to other azoles	CYP51 alteration (Y136F)	In Europe <i>B. graminis</i> f.sp. <i>tritici</i> is currently controlled by mildewicides and host resistance	Kuck & Mehl (2004); Wyand & Brown (2005)
<i>Botrytis cinerea</i>	Various fruit and vegetables	Reduced azole sensitivity and cross-resistance to unrelated fungicides (multiple drug resistance (MDR))	Increased efflux (<i>MfsM2</i> and <i>Mrr1</i> alteration)	Resistance levels low. Azoles not currently relied on	Kretschmer <i>et al.</i> (2009)
<i>Cercospora beticola</i>	Sugar beet	Cross-resistant to epoxiconazole and flutriafol. Reduced tetraconazole, prothioconazole and difenoconazole sensitivity	Constitutive <i>CYP51</i> over-expression (<i>CbCYP51</i>)	Azoles used to control <i>C. beticola</i>	Nikou <i>et al.</i> (2009); Bolton <i>et al.</i> (2012)
<i>Erysiphe necator</i>	Grapevine	Varying levels of resistance to triadimenol. Restricted cross-resistance to myclobutanil and fenarimol	CYP51 alteration (Y136F)	Isolates carrying Y136F are least sensitive to triadimenol. Most azoles still effective although highly resistant isolates in the USA do not have a <i>CYP51</i> mutation	Délye <i>et al.</i> (1997); Gadoury <i>et al.</i> (2012)
<i>Monilinia fructicola</i>	Stone fruit	Resistant to propiconazole. Reduced sensitivity to tebuconazole and fenbuconazole	Constitutive <i>CYP51</i> over-expression (<i>MICYP51</i> promoter insert 'Mona')	Isolates resistant to propiconazole can be controlled by higher doses or azoles with greater intrinsic activity	Holb & Schnabel (2007); Chen <i>et al.</i> (2012)
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Banana	Varying levels of resistance to propiconazole. Cross-resistance between propiconazole and cyproconazole, but not imazalil	CYP51 alterations (Y136F, A313G, A381G, Y461D, G462A, Y463D, Y463H and Y463N). Inserts in the predicted <i>MICYP51</i> promoter also found	Most resistant isolates found in areas with highest numbers of sprays. Newer azoles (e.g. epoxiconazole) remain very effective	Cañas-Gutiérrez <i>et al.</i> (2009); Chong <i>et al.</i> (2011)
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Wheat	Varying levels of resistance to all azoles registered for <i>M. graminicola</i> control	CYP51 alterations (>30 reported, e.g. D134G, V136A, Y137F, A379G, I381V, Y459D, Y461H, ΔY459/G460, S524T). Constitutive <i>MgCYP51</i> over-expression. Increased efflux suggested	Although some recent isolates are less sensitive to epoxiconazole and prothioconazole, these compounds remain an important component of disease control	Leroux & Walker (2011); Cools & Fraaije (2013)
<i>Oculimacula acuformis</i>	Wheat	Intrinsically resistant to some triazoles. Acquired resistance to the imidazole prochloraz. Sensitive to prothioconazole	Mechanism on intrinsic or acquired resistance unknown, although <i>CYP51</i> sequence variation suggested	Prothioconazole remains effective	Leroux <i>et al.</i> (2013)
<i>Oculimacula yallundae</i>	Wheat	Acquired resistance to some azoles. Sensitive to prothioconazole	Mechanism of acquired resistance unknown, although efflux pump activity suggested	Prothioconazole remains effective	Leroux <i>et al.</i> (2013)
<i>Penicillium digitatum</i>	Citrus	Resistant to imazalil. Cross-resistant to prochloraz,	Constitutive <i>CYP51</i> over-expression (<i>PdCYP51A</i> or <i>PdCYP51B</i> promoter)	Imazalil widely used. High doses control resistant isolates	Nakaune <i>et al.</i> (1998); Ghosop

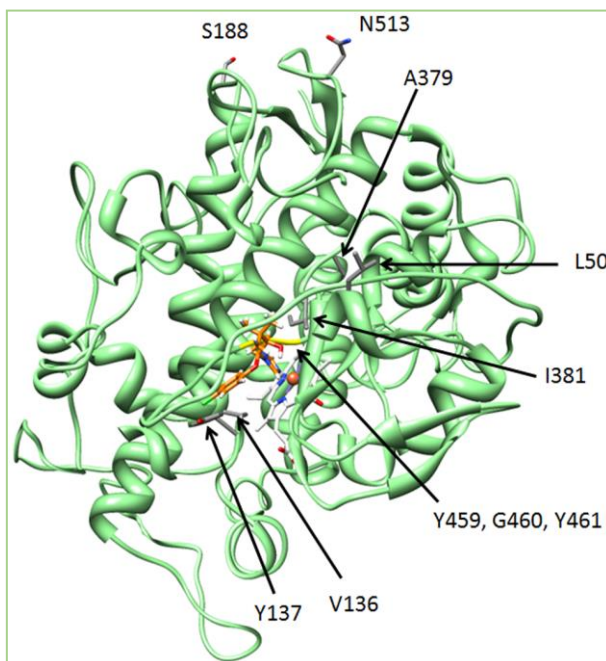
Επίσης, είναι συνηθισμένο και το φαινόμενο της διασταυρωτής ανθεκτικότητας, δηλαδή στελέχη ανθεκτικά σε έναν DMI να είναι ανθεκτικά και σε άλλον (Μαρκόγλου και Ζιώγας, 1994). Αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα έχει αναφερθεί μεταξύ των DMIs και άλλων EBIs (μορφολινικών, αλλυλαμίνων), που δρουν σε διαφορετικά σημεία βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (De Waard M., 1994).

Οι κύριοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που έχουν αναφερθεί στους DMIs είναι:

- Αλλαγή στη θέση δράσης που οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο CYP51 που κωδικοποιεί την 14α – απομεθυλάση στόχο των DMIs, που οδηγεί σε μειωμένη συγγένεια της πρωτεΐνης με τον παρεμποδιστή
- Υπερέκφραση του γονιδίου – στόχου (CYP51)
- Αυξημένη απέκκριση, που προκαλείται από υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους μεταφορείς που δρουν στις μεμβράνες

Αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να συνδυαστούν, δίνοντας διάφορα επίπεδα και σχέσεις

διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των μελών της ομάδας των DMIs (Cools & Fraaije, 2013) (Πίνακας 3, 4).



Εικόνα 13: Το CYP51 σε άγριου τύπου στέλεχος του μύκητα *M. graminicola*

Η πρωτεΐνη συνδέεται με το triadimenol (πορτοκαλί) και φαίνονται και οι περιοχές που υπόκεινται σε μεταλλαγή. Προβλέπεται το triadimenol να σχηματίζει έναν αδύναμο δεσμό υδρογόνου στη μεταλλαγμένη περιοχή Y137 (Mullins *et al.*, 2011)

1.3.6.1 Μεταλλάξεις στο CYP51

Οι DMIs παρεμποδίζουν την 14α – απομεθυλάση. Αυτό το ένζυμο ανήκει στους P450s και συμμετέχει στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης, απαραίτητου συστατικού των κυτταρικών μεμβρανών. Πολλές μεταλλάξεις στο CYP51, σχετιζόμενες με αλλαγή στην ευαισθησία στους παρεμποδιστές της ομάδας των DMIs, έχουν αναφερθεί σε διάφορους μύκητες (Becher & Wirsal, 2012). Οι μεταλλάξεις στο CYP51, συχνά,

επιηρεάζουν μεμονωμένα ή μια υποομάδα των DMIs δίνοντας θετική ή έλλειψη σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας. Η πιο συνηθισμένη μεταλλαγή είναι στη θέση δράσης 136, η αλλαγή δηλαδή από φαινυλαλανίνη σε τυροσίνη στο κωδικόνιο 136, και έχει αναφερθεί και σε φυτοπαθογόνους αλλά και σε μύκητες που προσβάλλουν ανθρώπους (Becher & Wirsal, 2012). Στα φυτοπαθογόνα, αναφέρθηκε πρώτη φορά στο *Blumeria graminis* f.sp. hordei (Wyand & Brown, 2005). Αντίστοιχες μεταλλαγές έχουν βρεθεί στο *Mycosphaerella graminicola* – Y137F (Leroux *et al.*, 2007; Cools *et al.*, 2011) και στο *Puccinia triticina* – Y134F (Stammler *et al.*, 2009) όπου μάλιστα οι μεταλλαγές αυτές δίνουν ανθεκτικότητα στο triadimenol αλλά δεν επιηρεάζουν την ευαισθησία στο epoxiconazole. Αυτό, ενδεχομένως, σχετίζεται με διαφορές στη συγγένεια του triadimenol με τη C14 απομεθυλάση που φέρει τη μεταλλαγή ανθεκτικότητας (Mullins *et al.*, 2011). Άλλη περίπτωση μεταλλαγών, με παράδειγμα το παθογόνο *Mycosphaerella graminicola*, είναι η V136A και η I381V (Εικόνα 13). Η πρώτη συνδέεται με μειωμένη ευαισθησία στο ιμιδαζολικό prochloraz αλλά όχι στο tebuconazole ενώ η δεύτερη δίνει λιγότερη ευαισθησία στις περισσότερες τριαζόλες (ειδικά στο tebuconazole) και δεν επιηρεάζει την ευαισθησία του prochloraz (Fraaije *et al.*, 2007; Leroux *et al.*, 2007). Ενώ υπήρχαν στελέχη που έφεραν μόνο μία από τις δύο μεταλλαγές (Cools & Fraaije, 2008), πλέον, μιλάμε για όλο και περισσότερα στελέχη που φέρουν και τις δύο μεταλλαγές και έχουν επιπλέον μεταλλαγές τις D134G και/ή S524T. Η συχνότητα των στελεχών με τις επιπλέον μεταλλαγές αυξάνεται (Leroux & Walker, 2011; Cools & Fraaije, 2013).

Αν οι προηγούμενες μεταλλαγές, V136A ή/και I138V, συνδυαστούν με αλλαγές στην περιοχή Y459-Y461 (Stammler *et al.*, 2008), προκύπτουν στελέχη του μύκητα *Mycosphaerella graminicola* μειωμένης ευαισθησίας σε όλους τους DMIs (Cools *et al.*, 2011; Cools & Fraaije, 2013).

Συμπερασματικά, η μεταλλαγή στη θέση δράσης σαν μηχανισμός ανθεκτικότητας στους DMIs μπορεί να προκαλέσει θετική ή αρνητική διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ των DMIs ή μπορεί μέχρι και να μειώσει την ευαισθησία σε αυτούς.

1.3.6.2 Υπερέκφραση του CYP51

Αυτός η μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας έχει αναφερθεί σε ένα μεγάλο πλήθος παθογόνων:

- *Venturia inaequalis* (Schnabel & Jones, 2001)
- *Penicillium digitatum* (Sun *et al.*, 2013)
- *Cercospora beticola* (Bolton *et al.*, 2012)
- *Monilinia fructicola* (Luo & Schnabel, 2008)
- *Blumeriella jaapii* (Ma *et al.*, 2006)
- *Puccinia triticina* (Stammler *et al.*, 2009)
- *Mycosphaerella graminicola* (Cools *et al.*, 2012)

Η αύξηση στην έκφραση προέρχεται από μεταλλαγές στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου. Συγκεκριμένα στους μύκητες *V. inaequalis*, *M. fructicola*, *M. graminicola* και *P. digitatum* έχει αναφερθεί η εισαγωγή βάσεων στην περιοχή έναρξης του γονιδίου. Αυτές οι εισαγωγές διαφέρουν στη ποσότητα των βάσεων και περιέχουν ισχυρές αλληλουχίες έναρξης (Sun *et al.*, 2013). Για κάποιους μύκητες όπως οι *C. beticola*, *P. triticina* ο μηχανισμός υπερέκφρασης παραμένει άγνωστος.

Ο μηχανισμός αυτός έχει πλεονεκτήματα καθώς δίνει τη δυνατότητα αντιμετώπισης του προβλήματος της ανθεκτικότητας με τη χρήση υψηλότερων δόσεων φαρμάκου δεδομένου ότι το επίπεδο ανθεκτικότητας είναι συνήθως μικρότερο σε σχέση με την περίπτωση της μεταλλαγής στη θέση δράσης. Όμως, επειδή σαν μηχανισμός είναι καθολικός σε όλους τους DMIs, με έντονη πίεση επιλογής ελλοχεύει ο κίνδυνος συνδυασμού των μηχανισμών υπερέκφρασης και μεταλλαγής στη θέση δράσης δημιουργώντας ανθεκτικά στελέχη σε όλους τους DMIs καθιστώντας το μέλλον των παρεμποδιστών αβέβαιο (Cools *et al.*, 2012, 2013).

1.3.6.3 Αυξημένη απέκκριση

Αυτός ο μηχανισμός οδηγεί σε ανθεκτικότητα σε παρεμποδιστές διαφόρων κατηγοριών (MDR = MultiDrug – Resistant), και αντιμετωπίζεται ως η απόλυτη απειλή για τους μύκητες που προσβάλλουν τους ανθρώπους (Gulshan & Moye Rowley, 2007). Δύο είναι τα συστήματα, που υπάρχουν αναφορές για την επίδρασή τους στους *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *C. albicans* οι μεταφορείς που χρησιμοποιούν την ATP κασέτα - ABC και η άλλη υπεροικογένεια – MFS (major facilitator superfamily) (Thakur *et al.*, 2008; Morschhauser, 2010). Όμως, στους φυτοπαθογόνους μύκητες δεν έχει αναγνωριστεί πλήρως ο μηχανισμός. Έχουν βρεθεί ενδείξεις ότι οι ABC μεταφορείς ανταποκρίνονται σε εφαρμογή DMIs (Becher

et al., 2011), όμως, στην πράξη μόνο στην περίπτωση του *Botrytis cinerea* έχει βρεθεί ο γενετικός μηχανισμός που συνδέεται με την αυξημένη απέκκριση και, συνεπώς, την ανθεκτικότητα σε διάφορα φάρμακα στον αγρό (Kretschmer *et al.*, 2009).

Οι παράγοντες που θεωρούνται υπεύθυνοι για τη μειωμένη εμφάνιση αυτού του είδους ανθεκτικότητας στον αγρό είναι: ο μεγάλος πληθυσμός του κάθε μύκητα, ο περιορισμένος αριθμός ψεκασμών φαρμάκου, η ύπαρξη θέσεων – καταφύγιων για τα ευαίσθητα στελέχη σε συνδυασμό με κόστος στην προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών κατά τις περιόδους που δεν εφαρμόζονται φάρμακα (de Waard *et al.*, 2006). Παρ' αυτά, μελέτες έχουν δείξει ότι αυτό το έλλειμα στην προσαρμοστικότητα ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *C. albicans* (Cowen *et al.*, 2001) δύναται να αντισταθμιστεί.

1.3.6.4 Επιπλέον μηχανισμοί

Πρώτον, όσον αφορά επιπλέον μηχανισμούς ανθεκτικότητας στους DMIs, έχουμε την επιβίωση με κατώτερες στερόλες. Δεδομένου ότι δεν λειτουργεί η 14α – απομεθυλάση έχουμε συσσώρευση άλλων στερολών οι οποίες, όμως, δεν είναι ικανές να αντικαταστήσουν την εργοστερόλη με αποτέλεσμα τα ανθεκτικά στελέχη να μην έχουν καλά φυτοπαθολογικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα άγρια (Leroux & Gredt, 1984; Aoyama *et al.*, 1987;).

Δεύτερον, έχουμε την ύπαρξη πολλαπλών CYP51. Σε είδη των γενών *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhynchosporium* (Becher *et al.*, 2011; Hawkins *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011) έχουν βρεθεί επιπλέον, αλλά όχι αναγκαστικά ίδιων μεταξύ τους, CYP51 (paralogues). Σε συνθήκες πίεσης επιλογής των DMIs οποιοδήποτε αλλαγή προκύψει στη δομή της πρωτεΐνης (CYP51) ή στην υπερέκφρασή της με κόστος στη φυτοπαθογόνο προσαρμοστικότητα καταστρατηγούνται οι παραλλαγές (paralogues) του γονιδίου. Έτσι, τα πολλαπλά CYP51 δίνουν σημαντικό πλεονέκτημα στα παθογόνα σχετικά με τη φυτοπαθογόνο προσαρμοστικότητά τους.

1.3.7 Προβλήματα ανθεκτικότητας της κερκοσπορίωσης των τεύτλων

1.3.7.1 *C. beticola* & το πρόβλημα της Ανθεκτικότητας

Η *C. beticola*, κερκοσπορίωση, μπορεί να προκαλέσει απώλειες στην παραγωγή, χωρίς την εφαρμογή φαρμάκων, της τάξης του 10-50% (Shane & Teng, 1992; Wolf & Verreet, 2002).

Τα βενζιμιδαζολικά ήταν τα πρώτα διασυστηματικά μυκητοκτόνα που διατέθηκαν για την αντιμετώπισή της. Στην Ελλάδα, η χρήση του benomyl ξεκίνησε το 1971 και 2 χρόνια αργότερα εμφανίστηκε το πρόβλημα της ανθεκτικότητας (Georgopoulos & Dovas, 1973). Φυσικά, το ίδιο συνέβη και σε άλλες χώρες (Ruppel & Scott, 1974; D'Ambra *et al.*, 1974; Pal & Mukhopadhyay, 1985; Weiland & Halloin, 2001). Βέβαια, το 1995 σημειώθηκε μείωση της ανθεκτικότητας στο benomyl στην Ελλάδα, και ξανά άρχισε να χρησιμοποιείται στην αρχή της καλλιέργειας σε κάποιες περιοχές (Karadimos *et al.*, 2000).

Στη συνέχεια, είχαμε τα οργανοκασσιτερούχα μυκητοκτόνα τα οποία ήταν αποτελεσματικά και χρησιμοποιούνταν παγκόσμια για τον έλεγχο της ασθένειας (Byford, 1996). Και σε αυτά, όμως εμφανίστηκαν προβλήματα ανθεκτικότητας και η χρήση τους περιορίστηκε σε 2-3 εφαρμογές σε μίγματα με το maneb (Karaoglanidis *et al.*, 2003). Σήμερα, δε χρησιμοποιούνται καθόλου.

Οι DMIs χρησιμοποιούνται στην Ελλάδα, για τον έλεγχο της ασθένειας από το 1979. Πρώτη φορά ανθεκτικά στελέχη στους DMIs αναφέρονται το 1986 και μετά το 1990, μέσω προγραμμάτων monitoring, έχει σημειωθεί μετακίνηση του πληθυσμού προς μειωμένη ευαισθησία στα μυκητοκτόνα αυτά (Georgopoulos, 1987; Karaoglanidis *et al.*, 2000) (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Ευαισθησία στελεχών του μύκητα *C. beticola* σε τρεις DMIs (Bolton *et al.*, 2012)

Year, EC ₅₀ range ^b	Tetraconazole		Difenoconazole		Prothioconazole	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
1997–98 (baseline)						
<0.01	47	47.0	1	2.9	11	31.4
0.011 to 0.10	33	33.0	22	52.4	12	34.3
0.11 to 1.0	20	20.0	19	45.2	12	34.3
>1.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
>0.0	100	100.0	42	100	35	100
2007						
<0.01	249	22.6	67	6.1	5	0.5
0.011 to 0.10	432	39.2	896	81.2	33	3.0
0.11 to 1.0	318	28.8	81	7.3	628	56.9
>1.0	104	9.4	59	5.4	437	39.6
>0.0	1,103	100.0	1,103	100.0	1,103	100.0
2008						
<0.01	194	23.1	46	5.5	2	0.2
0.011 to 0.10	445	53.0	618	73.6	290	34.5
0.11 to 1.0	97	11.5	95	11.3	419	49.9
>1.0	104	12.4	81	9.6	129	15.4
>0.0	840	100.0	840	100.0	840	100.0
2009						
<0.01	8	2.0	10	2.5	19	4.8
0.011 to 0.10	207	52.5	136	34.6	339	86.3
0.11 to 1.0	150	38.1	211	53.7	33	8.4
>1.0	29	7.4	36	9.2	2	0.5
>0.0	394	100.0	393	100.0	393	100.0
2010						
<0.01	0	0.0	1	0.5
0.011 to 0.10	81	38.2	149	70.0
0.11 to 1.0	90	42.5	45	21.1
>1.0	41	19.3	18	8.4
>0.0	212	100.0	213	100.0

^a Symbols: *n* = number of isolates in EC₅₀ range for specified year, % = percentage of isolates in EC₅₀ range for specified year, and ... indicates not assessed.
^b The 50% effective concentration (EC₅₀) values (μg ml⁻¹) were calculated for tetraconazole, prothioconazole, and difenoconazole as described (38) and placed in ranges for each year.

Από την αρχή της χρήσης του οι DMIs ψεκάζονταν σε μίγματα με προστατευτικά μυκητοκτόνα (maneb, chlorothanil) και περισσότερο εφαρμόζονταν το flutriafol και μετά το 1990 και το difenoconazole (Πίνακας 6). Σε αρχικές μελέτες φάνηκε ότι η ανθεκτικότητα στελεχών του μύκητα στους DMIs συνδεόταν με μειωμένη φυτοπαθόγνο προσαρμοστικότητα κι παραγωγή κονιδίων (Karaoglanidis *et al.*, 2001). Στη συνέχεια, μελετήθηκε αν πρόκειται για φαινοτυπική ανθεκτικότητα, αλλά αποδείχθηκε ότι επρόκειτο για σταθερή ιδιότητα (Karaoglanidis *et al.*, 2002). Από τότε όλες οι μελέτες δείχνουν τη σταδιακή αλλά σταθερή μετατόπιση των πληθυσμών *C. beticola* προς μειωμένη ευαισθησία στους DMIs (Karaoglanidis *et al.*, 2003; Bolton *et al.*, 2012). Η πολυκυκλική φύση της ασθένειας, οι ευνοϊκές κλιματολογικές συνθήκες που οδηγούν σε επιδημιολογικές εξάρσεις της ασθένειας, σε συνδυασμό με την εφαρμογή παρόμοιων ψεκαστικών προγραμμάτων εντείνουν την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Karaoglanidis *et al.*, 2002).

Πίνακας 6: Πρόγραμμα ψεκασμών και δόσεις που εφαρμόστηκαν σε αγρούς δειγματοληψίας ζαχαρότευτλων της Β. Ελλάδας (περίοδος 1996-1999) (Karaoglanidis *et al.*, 2002)

Spray application	Sampling site											
	Amyndeon				Imathia				Serres			
	1996	1997	1998	1999	1996	1997	1998	1999	1996	1997	1998	1999
1st	FA/MN ^{ab}	FA/MN	FA/MN	FA/MN	FA/MN	FA/MN	FA/MN	FA/MN	FA/MN	FA/MN	FA/MN	FA/MN
2nd	FA/MN	FA/MN	FA/MN	DF/FP/CH	FA/MN	FA/MN	FA/MN	FA/MN	DF/CH	DF/CH	DF/MN	FL/MN
3rd	FL/CH	FA/MN	DF/FP/CH		FA/MN	FA/MN	FA/MN	FA/MN	DF/CH	DF/MN	DF/MN	DF/MN
4th		DF/CH			DF/FP/CH	DF/FP/CH	DF/FP/CH	DF/FP/CH	FL/MN	DF/CH	FL/MN	DF/MN
5th					FL/CH	DF/CH	FL/MN	FL/MN	DF/CH	DF/MN	FL/MN	FL/MN
6th					FL/CH	DF/CH	FL/MN	FL/FA	FL/MN	DF/MN	FL/MN	FL/MN
7th						DF/CH	FL/MN	DF/CH			FL/MN	FL/MN
8th							FL/MN	FL/MN				

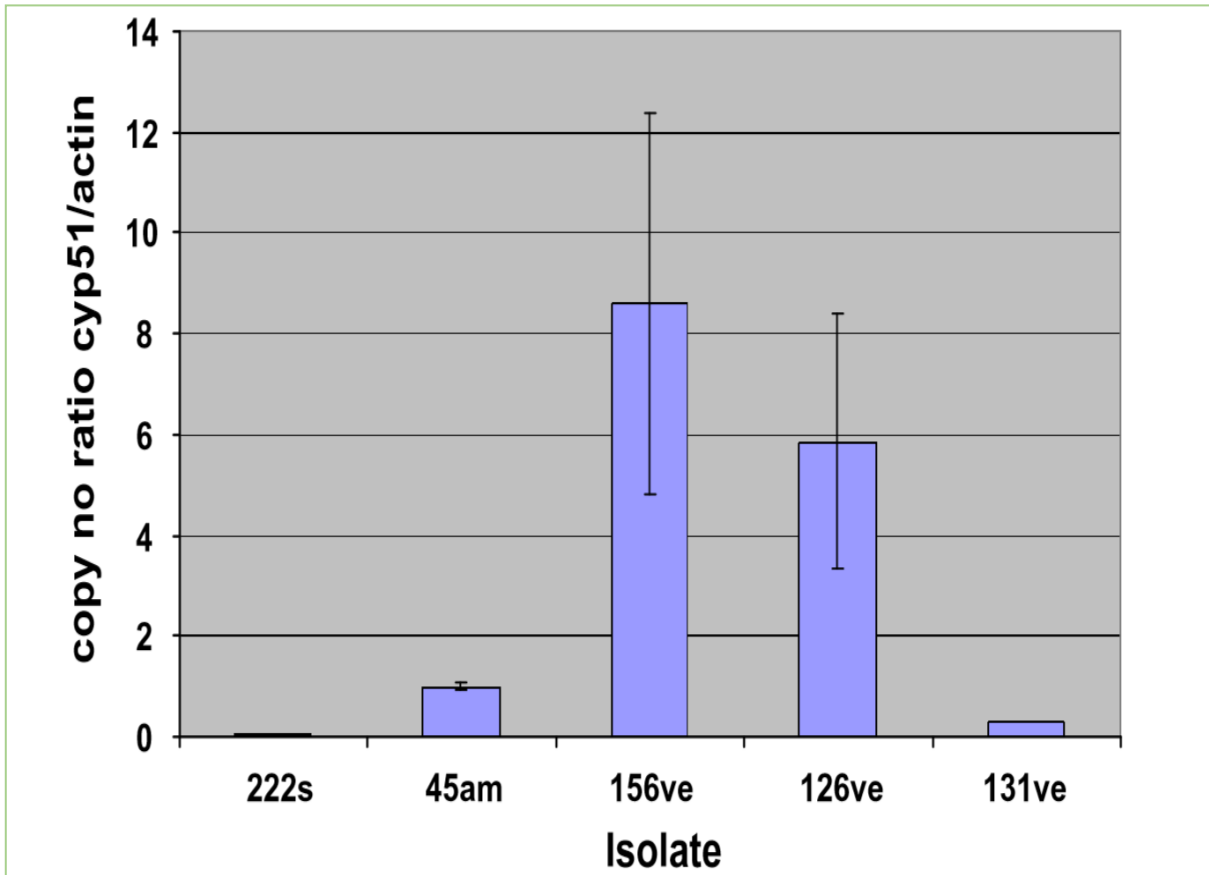
^aNon-sterol-demethylation-inhibiting fungicides: FA, fentin acetate, Brestan 60 WP, Agrevo Hellas SA, 0-30 kg ha⁻¹ a.i.; MN, maneb, Dithane 80 WP, Rohm and Haas Hellas SA, 1-92 kg ha⁻¹ a.i.; CH, chlorothalonil, Daconil, 75 WP, Zeneca Hellas SA, 0-75 kg ha⁻¹ a.i.; FP, fenpropimorph, Corbel 75EC, Novartis Hellas SA, 0-375 kg ha⁻¹ a.i.
^bSterol-demethylation-inhibiting fungicides: FL, flutriafol, Impact 12-5 SC, Zeneca Hellas SA, 0-062 kg ha⁻¹ a.i.; DF, difenoconazole, Score 25 EC, Novartis Hellas, 0-05 kg ha⁻¹ a.i.

Με την εισαγωγή των στρομπιλουρίνων στο οπλοστάσιο αντιμετώπισης της κερκοσπορίωσης, δίνεται η δυνατότητα για καλύτερη διαχείριση του προβλήματος της ανθεκτικότητας στους DMIs (Karaoglanidis *et al.*, 2006). Μάλιστα, δεν έχει βρεθεί, ακόμα, η μεταλλαγή ανθεκτικότητας στις στρομπιλουρίνες G143A με συνέπεια να παραμένουν αποτελεσματικές εναντίον του παθογόνου (Malandrakis *et al.*, 2011).

1.3.7.2 *C. beticola* & μηχανισμός ανθεκτικότητας στους DMIs

Μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη θετικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των DMIs στην περίπτωση της *C. beticola* (με διαφορετικά επίπεδα μεταξύ τους). Ακόμη, υποδεικνύουν μη συσχέτιση μεταξύ των μορφολινικών και των DMIs και καμία συσχέτιση μεταξύ των EBIs και άλλων φαρμάκων (Karaoglanidis & Thanassoulouropoulos, 2003). Αυτό υποδεικνύει εξειδικευμένο μηχανισμό ανθεκτικότητας αποκλειστικά στους DMIs.

Πράγματι, το 2009 οι Νίκου *et al.* ενισχύοντας περιοχή του CYP51 με τη χρήση real Time PCR απέδειξαν ότι ο μηχανισμός είναι η υπερέκφραση του γονιδίου (Γράφημα 1). Ακόμη βρήκαν κάποιες μεταλλαγές οι οποίες όμως ήταν ουδέτερες και δεν επηρέαζαν το σημείο πρόσδεσης των παρεμποδιστών. Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξαν και οι Bolton *et al.*, (2012) και επιπλέον είδαν ότι δεν υπήρχαν προβλήματα προσαρμοστικότητας των ανθεκτικών στελεχών σε σχέση με τα ευαίσθητα και επισήμαναν την ανάγκη παρακολούθησης των πληθυσμών στο μέλλον για καλύτερη διαχείριση της ασθένειας.



Γράφημα 1: : Μεγαλύτερη έκφραση στα στελέχη με την αυξημένη ανθεκτικότητα (Nikou *et al.*, 2009)

1.4 Σκοπός της εργασίας

Η κερκοσπορίωση των τεύτλων προκαλείται από το παθογόνο *Cercospora beticola*. Είναι η πιο σημαντική ασθένεια φυλλώματος των τεύτλων, ή οποία υπό ευνοϊκές συνθήκες μπορεί να προκαλέσει έως και πλήρη απόπτωση του φυλλώματος. Οικονομικότερος και αποτελεσματικότερος τρόπος αντιμετώπισης είναι η χημική καταπολέμηση. Οι περισσότερες δραστικές ουσίες που είναι εγκεκριμένες για την αντιμετώπιση της ανήκουν στην ομάδα των EBIs και συγκεκριμένα στην ομάδα των DMIs.

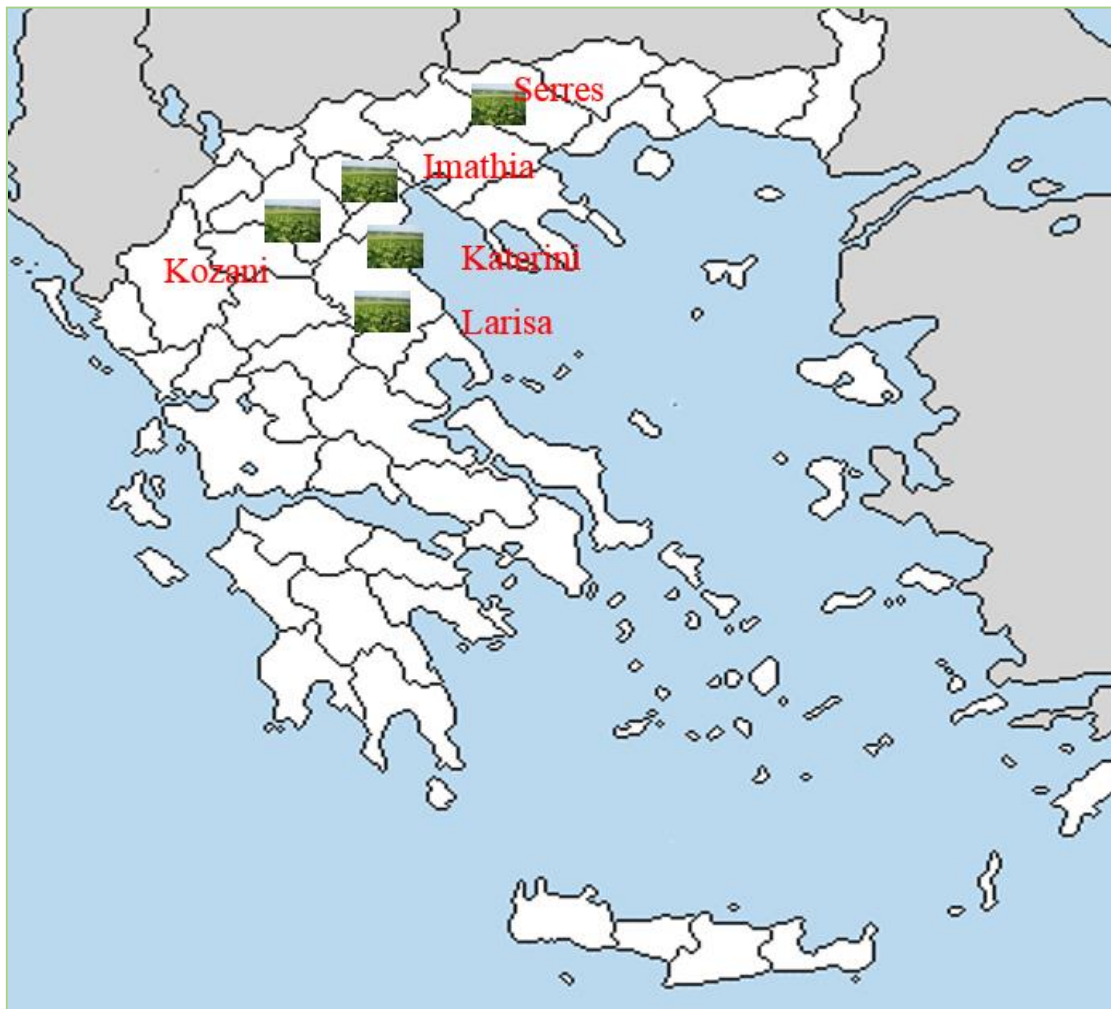
Οι DMIs έχουν χρησιμοποιηθεί ικανοποιητικά για πολλές δεκαετίες αλλά πλέον μιλάμε για προβλήματα εμφάνισης ανθεκτικότητας σε διάφορα παθογόνα. Η ανθεκτικότητα είναι ένα πρόβλημα που απαιτεί διαχείριση. Η διερεύνηση των μηχανισμών που διέπουν την ανθεκτικότητα είναι ουσιαστικό βήμα στο πλαίσιο διαχείρισής της.

Συγκεκριμένα, για το παθογόνο *Cercospora beticola* έχει παρατηρηθεί μετακίνηση της κατανομής του πληθυσμού του προς μειωμένη ευαισθησία στους DMIs και συνεπώς μιλάμε για εμφάνιση προβλήματος ανθεκτικότητας. Από προηγούμενες μελέτες, παρατηρήθηκε η ύπαρξη διαφορετικών φαινότυπων ανθεκτικότητας στους DMIs. Έτσι, τέθηκε στόχος της παρούσας μελέτης η διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας.

Προς την κατεύθυνση αυτή, πραγματοποιήθηκαν μία σειρά βιοδοκιμών διερεύνησης της ευαισθησίας σε διάφορους παρεμποδιστές που ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των EBIs και άλλων που δρουν σε διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια. Ακολούθησε έλεγχος ύπαρξης διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των παρεμποδιστών αυτών έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν πρόκειται για εξειδικευμένο μηχανισμό ανθεκτικότητας ή όχι. Στη συνέχεια, έγινε έλεγχος για την ύπαρξη μηχανισμού αποτοξικοποίησης με χρήση συνεργιστών (PBO) και πραγματοποιήθηκε μοριακή διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας μέσω απομόνωσης του γονιδίου και ανίχνευσης της ύπαρξης σημειακών μεταλλαγών ανθεκτικότητας. Όλα τα πειράματα διεξάχθηκαν στο εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Βιολογικό υλικό



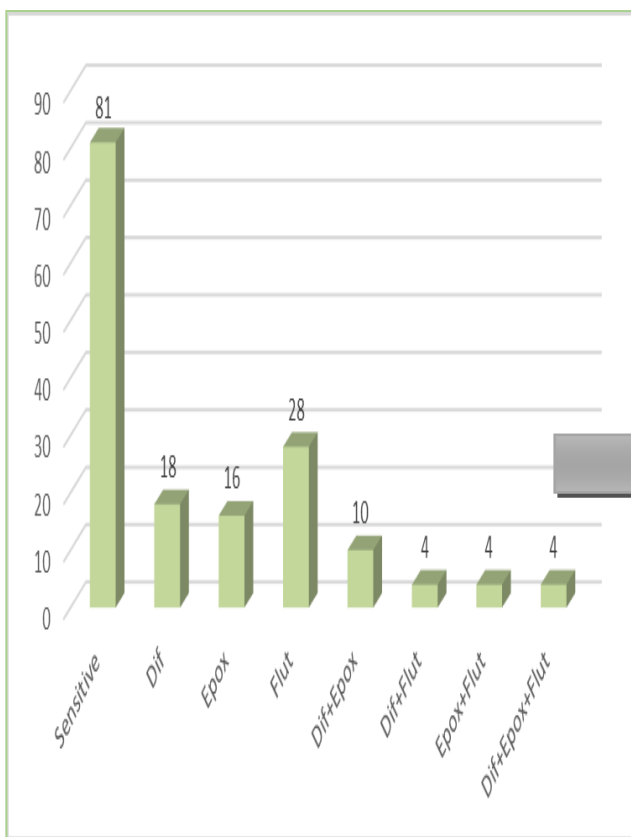
Εικόνα 14: Περιοχές δειγματοληψίας στελεχών του μύκητα *Cercospora beticola*

Το βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της εργασίας προέρχεται από δειγματοληψίες σε αγρούς σε περιοχές της Βορείου και Κεντρικής Ελλάδας (Εικόνα 14). Προηγήθηκαν πειράματα διερεύνησης της κατανομής ευαισθησίας στους DMIs σε σύνολο 300 στελεχών του μύκητα *Cercospora beticola*, στα πλαίσια του προγράμματος ΕΣΠΑ:

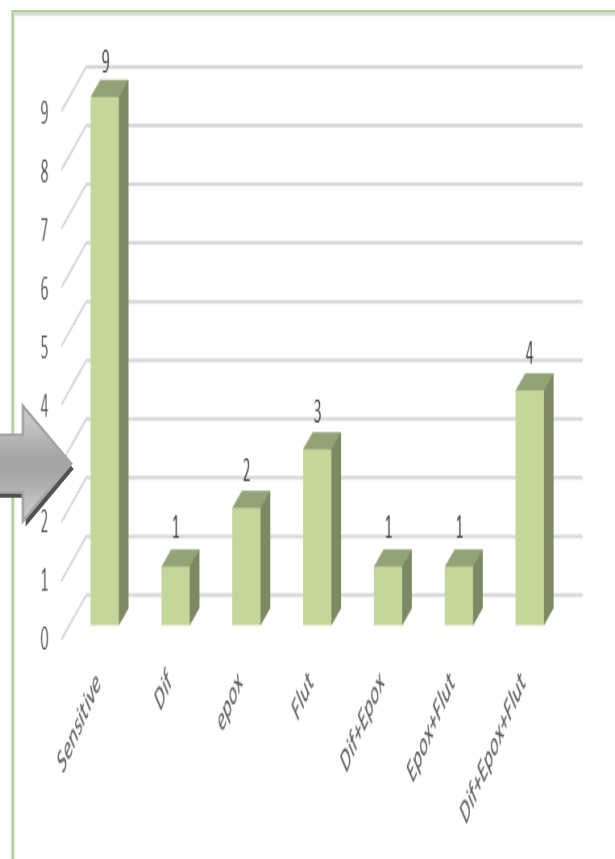
«ΘΑΛΗΣ». Τα 150, από το σύνολο των στελεχών, εξετάστηκαν στο εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας στο ΓΠΑ.

Οι DMIs στους οποίους εξετάστηκε η κατανομή της ευαισθησίας ήταν οι: difenoconazole, epxoconazole και flutriafol. Στα αποτελέσματα των πειραμάτων φάνηκε ότι τα στελέχη ανήκουν σε διαφορετικούς φαινότυπους ανθεκτικότητας όσον αφορά τους DMIs που δοκιμάστηκαν.

Παρατηρήθηκαν φαινότυποι με ανθεκτικότητα στον ένα, στους δύο ή και στους τρεις DMIs που μελετήθηκαν (Γράφημα 2α). Από τα παραπάνω στελέχη επιλέχθηκαν 21 έτσι ώστε να υπάρχει τουλάχιστον ένα στέλεχος – αντιπρόσωπος από κάθε φαινότυπο ανθεκτικότητας και με αυτά πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα διερεύνησης του μηχανισμού ανθεκτικότητας (Γράφημα 2β).



Γράφημα 2α: Διαφορετικοί φαινότυποι ανθεκτικότητας των στελεχών του μύκητα *Cercospora beticola* στους DMIs (Difenoconazole/Epoxiconazole/Flutriafol)



Γράφημα 2β: Φαινότυποι ανθεκτικότητας επιλεγθέντων στελεχών

Αναλυτικά, τα 21 στελέχη που επιλέχθηκαν φαίνονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: Πίνακας επιλεγθέντων στελεχών με χαρακτηρισμό της ανθεκτικότητας τους στον εκάστοτε DMI (+ = ανθεκτικό και - = ευαίσθητο)

# Cb	resistant to		
	difen	epox	flutr
2	-	-	-
9	-	+	-
15	-	-	-
16	-	-	-
27	-	-	-
41	-	-	-
81	-	+	+
84	+	+	+
87	+	+	+
90	+	+	+
92	-	-	+
102	-	-	-
109	+	-	+
110	-	-	-
112	-	-	-
121	-	-	-
122	-	+	-
128	-	-	+
130	-	-	+
134	+	-	-
137	+	+	+

2.2 Υλικά καλλιέργειας

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το PDA, PDBroth και Water Agar.

PDA

Το PDA που χρησιμοποιήθηκε ήταν έτοιμο από την εταιρία Sigma-Aldrich, απλά προστέθηκαν επιπλέον 5 g Agar/L έτσι ώστε να έχουμε συνολική ποσότητα άγαρ στο λίτρο 20 g.

Συγκεκριμένα για 1L υλικού χρησιμοποιήθηκαν

- 1000 ml απιονισμένο νερό
- 39 g PDA
- 5 g Agar

Ακολουθούσε θέρμανση με ανάδευση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 300°C και μετά αποστείρωση σε κλίβανο υγρής θερμότητας (autoclave) στους 121°C για 20 λεπτά.

PDBroth

Το PDBroth που χρησιμοποιήθηκε ήταν έτοιμο από την εταιρία Sigma-Aldrich.

Για 1L υλικού χρησιμοποιήθηκαν

- 1000 ml απιονισμένο νερό
- 24 g PDBroth

Ακολουθούσε θέρμανση με ανάδευση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 300°C και μετά αποστείρωση σε κλίβανο υγρής θερμότητας (autoclave) στους 121°C για 20 λεπτά.

Water Agar

Φτωχό υλικό καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα με τους SDHIs: boscalid, fluopyram.

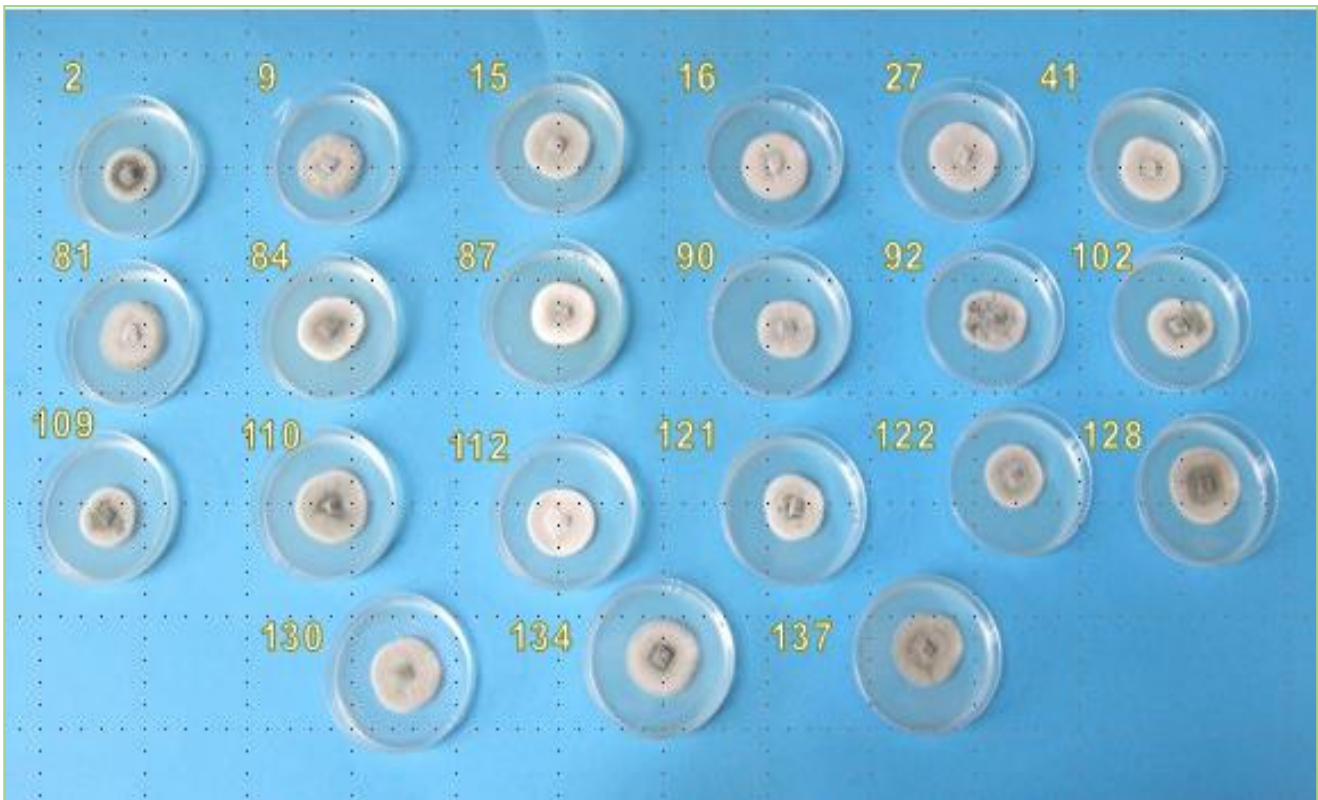
Για 1L υλικού χρησιμοποιήθηκαν

- 1000 ml απιονισμένου νερού
- 20 g Agar

Ακολουθούσε θέρμανση με ανάδευση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 300°C και μετά αποστείρωση σε κλίβανο υγρής θερμότητας (autoclave) στους 121°C για 20 λεπτά.

2.3 Καλλιέργεια, διατήρηση και ανανέωση στελεχών του μύκητα *C. beticola*

Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία petri (92x16mm ή 60 x16mm με περίπου 15 ml ή 7,5 ml θρεπτικό υλικό αντίστοιχα) που επώζονταν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 25°C, σταθερής υγρασίας 70% και με συνθήκες σκότους (Εικόνα 17). Για διατήρηση για μεγάλο χρονικό διάστημα, αποθηκεύτηκαν κυκλικά μυκηλιακά τμήματα διαμέτρου 4mm από κάθε στέλεχος σε σωλήνες erpendorf με διάλυμα γλυκερόλης 20% στους -80°C.



Εικόνα 15: Τα 21 στελέχη στα οποία έγιναν τα πειράματα Cross-resistance
Καλλιέργεια 7 ημερών

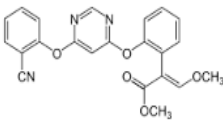
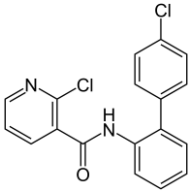
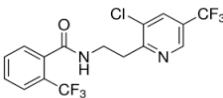
2.4 Πειράματα διερεύνησης μηχανισμού ανθεκτικότητας στελεχών του μύκητα C. beticola

2.4.1 Έλεγχος ευαισθησίας στελεχών και διερεύνηση ύπαρξης σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας

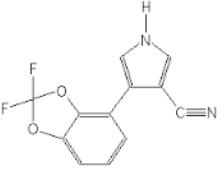
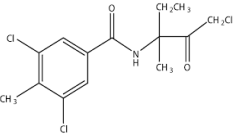
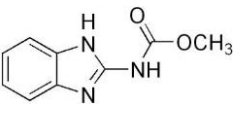
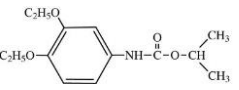
Στα πειράματα μέτρησης της ευαισθησίας των στελεχών του μύκητα *C. beticola*, που ανήκουν σε διαφορετικούς φαινότυπους ανθεκτικότητας στους DMIs (Difenoconazole, Eproxiconazole, Flutriafol), χρησιμοποιήθηκαν μυκητοκτόνα των οποίων η ονομασία της δραστικής, ο χημικός τύπος, η χημική ομάδα, η καθαρότητα και η εταιρεία προέλευσης φαίνονται στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακας 6, 7, 8).

Η εκπόνηση των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση διαλυμάτων stock των δραστικών ουσιών που συντηρούνταν στους -20 °C. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αιθανόλη, μεθανόλη, αλκοόλη ανάλογα με την δραστική ουσία. Προσέχτηκε, κατά τα πειράματα, η ποσότητα του οργανικού διαλύτη να μην προκαλεί τοξικότητα στο εξεταζόμενο στέλεχος, το οποίο σημαίνει ότι η ποσότητα του διαλύτη δεν υπερέβαινε το 1%(v/v) του όγκου του θρεπτικού υλικού.

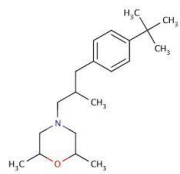
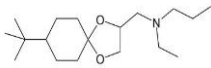
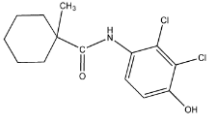
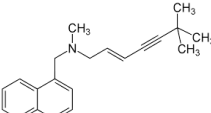
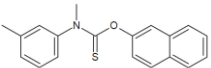
Πίνακας 8: Παρεμποδιστές της αναπνοής

Δραστική ουσία	Χημική ομάδα	Μηχανισμός δράσης	Καθαρότητα	Εταιρεία
<p>Azoxystrobin</p> 	Στρομπιλουρίνες	Παρεμπόδιση συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας	Analytical	Syngenta Crop Protection
<p>SHAM (Το SHAM χρησιμοποιήθη κε σε βιοδοκιμή μαζί με το Azoxystrobin)</p>	Υδροξαμικά οξέα	Εξειδικευμένος παρεμποδιστής της εναλλακτικής αναπνοής, ανταγωνιστής της ανηγμένης συμπικινόνης, χωρίς απαραίτητα να υπάρχει αλληλεπίδραση με το καταλυτικό κέντρο της οξειδάσης που ανάγει το οξυγόνο	Analytical	Sigma - Aldrich
<p>Boscalid</p> 	SDHIs	Παρεμπόδιση του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας	Technical	Basf Crop Protection Ελλάς
<p>Fluopyram</p> 	SDHIs	Παρεμπόδιση του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας	Analytical	Προσφορά εργαστήριου Φυτοπαθολογίας (ΑΠΘ)

Πίνακας 9: Παρεμποδιστής που δρα στην οσμορρύθμιση και παρεμποδιστές της μιτωτικής διαίρεσης

Δραστική ουσία	Χημική ομάδα	Μηχανισμός δράσης	Καθαρότητα	Εταιρεία
<p>Fludioxonil</p> 	Φαινυλοπυρρολικά	Οσμορρύθμιση	Analytical	Syngenta Crop Protection
<p>Zoxamide</p> 	Βενζαμίδια	Παρεμπόδιση του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου(spindle) αποκλείοντας τον κανονικό αποχωρισμό των αδελφών χρωματίδων κατά την μιτωτική διαίρεση	Analytical	DowAgro Sciences
<p>Carbendazim</p> 	Βενζιμιδαζολικά	Παρεμπόδιση του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου(spindle) αποκλείοντας τον κανονικό αποχωρισμό των αδελφών χρωματίδων κατά την μιτωτική διαίρεση	Analytical	Bayer Hellas
<p>Diethiophencarb</p> 	Φαινυλοκαρβαμικά	Παρεμπόδιση του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου(spindle) αποκλείοντας τον κανονικό αποχωρισμό των αδελφών χρωματίδων κατά την μιτωτική διαίρεση	Analytical	Sumitomo

Πίνακας 10: λοιποί EBIs

Δραστική ουσία	Χημική ομάδα	Μηχανισμός δράσης	Καθαρότητα	Εταιρεία
Fenpropimorph 	Μορφολίνες	Παρεμπόδιση του ενζύμου Δ14 αναγωγής, του Δ8→7 ισομεράση και παρεμπόδιση της εποξειδάσης του σκουαλενίου στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης	Analytical	BASF
Spiroxamine 	Υδροξυανιλίδια	Παρεμπόδιση της Δ14 αναγωγής που καταλύεται από το ένζυμο Δ14 αναγωγής ή του Δ8→7 ισομερισμού, που καταλύεται από το ένζυμο Δ8→7 ισομεράση.	Analytical	Sigma - Aldrich
Fenhexamid 	Σπιροκαταλαμίνες	Παρεμπόδιση της απομεθυλίωσης του C - 4, η οποία καταλύεται από το ένζυμο 3 - κετο - αναγωγής	Analytical	Sigma - Aldrich
Terbinafine 	Αλλυλαμίνες	Παρεμπόδιση της εποξειδάσης του σκουαλενίου στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης	Analytical	Sigma - Aldrich
Tolnaftate 	Λοιποί EBIs	Παρεμπόδιση της εποξειδάσης του σκουαλενίου στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης	Analytical	Sigma - Aldrich

Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας των στελεχών του μύκητα *C. beticola*, έγινε *in vitro*, με την παρακολούθηση της επίδρασης κάθε μυκητοκτόνου στη γραμμική ανάπτυξη του μυκηλίου σε θρεπτικό υλικό που περιείχε PDA (εκτός από την περίπτωση των boscalid και

fluoragram που περιείχε water agar), σε petri τρυβλία διαμέτρου 9cm. Για κάθε επέμβαση, ενσωματωνόταν στο PDA η αντίστοιχη ποσότητα φαρμάκου και καθόλου φάρμακο στην περίπτωση του μάρτυρα.

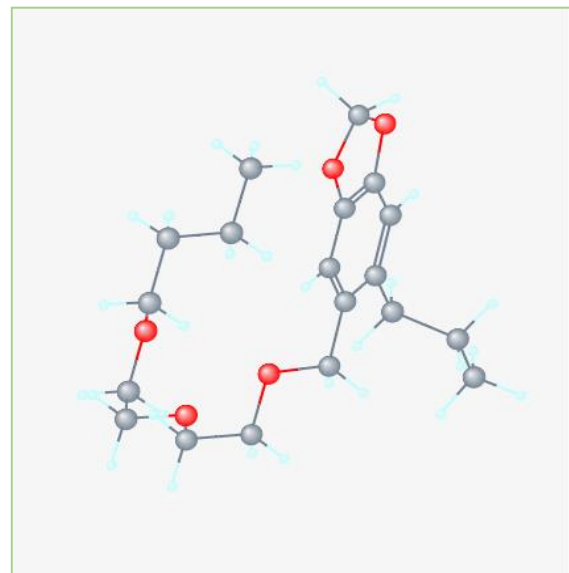
Μυκηλιακά κυκλικά τμήματα διαμέτρου 4 mm από την περιφέρεια αναπτυσσόμενης αποικίας 7 ημερών, εμβολιάζονταν ασηπτικά, σε θρεπτικό υλικό που περιείχε το εκάστοτε μυκητοκτόνο στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνταν τμήματα από τρία διαφορετικά στελέχη. Στη συνέχεια, επωαζόταν στους 25 °C για 7 ημέρες και ακολουθούσε μέτρηση της διαμέτρου των αποικιών που αναπτύχθηκαν. Σε όλα τα πειράματα υπήρχαν τρεις επαναλήψεις για κάθε επέμβαση. Για την μέτρηση, υπολογιζόταν ο μέσος όρος των δυο μεγαλύτερων διαμέτρων. Με αυτές τις μετρήσεις έγιναν οι αναγκαίες συγκρίσεις.

Από τις καμπύλες που προέκυψαν υπολογίστηκε η EC50 κάθε στελέχους, δηλαδή η συγκέντρωση που προκαλεί το 50% της ανάπτυξης σε σχέση με αυτήν σε απουσία φαρμάκου.

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι σχέσεις διασταυρωτής ανθεκτικότητας των DMIs παρεμποδιστών με τα μυκητοκτόνα ώστε να ανιχνευθεί η ύπαρξη εξειδικευμένης ή μη ανθεκτικότητας των στελεχών. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της συσχέτισης των δεδομένων κατά Pearson με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS.

2.4.2 Διερεύνηση του μηχανισμού αποτοξικοποίησης με τη χρήση συνεργιστών (PBO)

Στα πειράματα διερεύνησης της ύπαρξης αποτοξικοποίησης ως μηχανισμός ανθεκτικότητας χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια στελέχη με τα πειράματα διερεύνησης ύπαρξης σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας. Συγκεκριμένα εξετάστηκε αν ο μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι η αποτοξικοποίηση με P450s με τη βοήθεια του συνεργιστή Piperonyl butoxide το οποίο αποτελεί εξειδικευμένο



Εικόνα 16: Τριτοταγής δομή Piperonyl Butoxide

(http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/piperonyl_butoxide#section=3D-Conformer)

IUPAC: 5-[2-(2-butoxyethoxy)ethoxymethyl]-6-propyl-1,3-benzodioxole

παρεμποδιστή των P450s (Εικόνα 16). Προμηθεύτηκε από την εταιρία Sigma – Aldrich.

Για την εργασία με το PBO δημιουργήθηκε διάλυμα stock φαρμάκου συγκέντρωσης 500 mg/ml με διαλύτη αιθανόλη. Το stock αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Αρχικά έγινε ένα πείραμα για να βρεθεί η συγκέντρωση του PBO που είναι κοντά στα όρια μυκητοτοξικότητας. Επιλέχθηκε η συγκέντρωση 5000 µg/ml για να πραγματοποιηθεί το πείραμα. Όσον αφορά τους DMIs, χρησιμοποιήθηκε μία διαγνωστική δόση, αυτή των 10 µg/ml.

Έτσι, πραγματοποιήθηκαν 4 επεμβάσεις για κάθε DMI (Difenoconazole, Eproxiconazole, Flutriafol):

- Control - 0 µg/ml
- PBO - 5000 µg/ml
- DMI - 10 µg/ml
- PBO - 5000 µg/ml + DMI 10 µg/ml

Για κάθε επέμβαση ενσωματωνόταν η αντίστοιχη ποσότητα φαρμάκου σε PDA. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε petri τρυβλία διαμέτρου 9 cm. Σε κάθε τρυβλίο εμβολιάζονταν, ασηπτικά, μυκηλιακά τμήματα (από τρία διαφορετικά στελέχη) διαμέτρου 4 mm. Στη συνέχεια, επωάζονταν στους 25 °C για 7 ημέρες και ακολουθούσε μέτρηση της διαμέτρου των αποικιών που αναπτύχθηκαν. Για κάθε επέμβαση υπήρχαν τρεις επαναλήψεις.

2.4.3 Διερεύνηση του μηχανισμού αλλαγή στη θέση δράσης

2.4.3.1 Απομόνωση ολικού DNA και ολικού RNA

Σε αυτά τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη (9, 16, 27, 35, 51, 84, 90, 101, 102, 110, 128, 137) (Πίνακας 9).

Για την απομόνωση DNA δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι.

Πίνακας 11: Φαινότυποι ανθεκτικότητας στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στη μοριακή διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας

S=Ευαίσθητο

R=Ανθεκτικό

#Cb	difen	epox	flutr
16	S	S	S
27	S	S	S
102	S	S	S
110	S	S	S
9	R	R	S
35	R	R	S
51	R	R	S
128	S	S	R
101	S	S	R
84	R	R	R
90	R	R	R
137	R	R	R

Η προετοιμασία περιλάμβανε ανάπτυξη των στελεχών σε κωνικές φιάλες των 100 ml, που περιείχαν 50ml PDBroth. Γινόταν εμβολιασμός του μέσου ανάπτυξης υπό ασηπτικές συνθήκες και μετά τοποθετείτο σε θάλαμο σταθερών συνθηκών στους 27°C, υπό συνεχή περιστροφή. Μετά από περίπου 2,5 εβδομάδες ανάπτυξης το μυκήλιο που είχε σχηματιστεί μεταφερόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 50 ml με φιλτράρισμα και από κει και πέρα εξετάστηκαν τρεις τρόποι για να ξεκινήσει η διαδικασία της απομόνωσης DNA:

1. Λειοφυλλίωση για 24 h και κονιορτοποίηση με χρήση υγρού αζώτου
2. Κονιορτοποίηση απευθείας με υγρό άζωτο χωρίς να έχει προηγηθεί λειοφυλλίωση
3. Λειοφυλλίωση για 72 h και κονιορτοποίηση χωρίς χρήση υγρού αζώτου

Καλύτερη μέθοδος αποδείχθηκε η τρίτη, αφού έδινε μεγαλύτερη ποσότητα DNA.

Η περαιτέρω διαδικασία για την απομόνωση του DNA και του RNA έγινε με τα kit της Malva: Analytikjena innuPREP Plant DNA Kit και innuPREP Plant Rna Kit αντίστοιχα. Στο innuPREP Plant DNA Kit χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία με το CBV Lysis Solution για μεγαλύτερη απόδοση σε ολικό DNA. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν σύμφωνη με τις οδηγίες της παραγωγού εταιρείας.

2.4.3.2 Σύνθεση μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Το ολικό RNA που αποκτήθηκε με την παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιήθηκε στη σύνθεση μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης Superscript II RNase H-(GIBCO) και εκκινητή προσαρμογέα oligodT [5'-GACTCGAGTCGACATCGA (-dT)₁₇-3'] ο οποίος υβριδίζει με την 3' πολυ-αδέσυνο ουρά (Poly-A tail) του mRNA (Εικόνα 17).

Συγκεκριμένα, ετοιμάστηκε αντίδραση 20 μl ως ακολούθως:

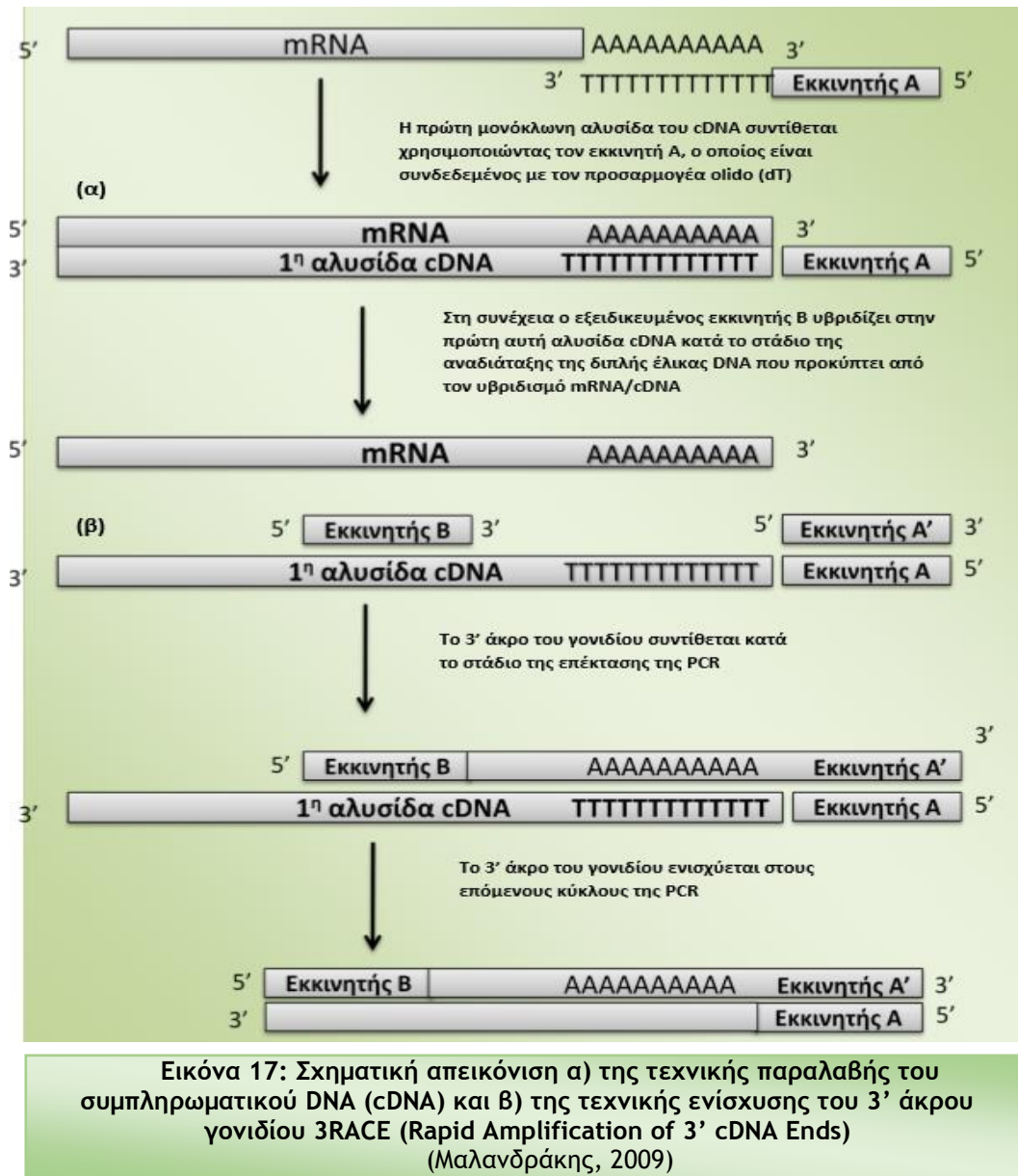
1. 5 μg ολικού RNA
2. 1 μl oligo-dT-17 (500 μg/ml)
3. DEPC-ddH₂O μέχρι τα 20 μl

Τα δείγματα επώστηκαν σε θερμοκρασία 70 °C για χρόνο 10 λεπτά ώστε να διαταραχτεί η δευτεροταγής δομή του RNA κι να καταστεί σχετικά γραμμικό ώστε να υβριδίσει ο εκκινητής.

Στη συνέχεια, έγινε η μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο και ακολούθησε η προσθήκη των ακόλουθων αντιδραστηρίων

- 4 μl 5X Ρυθμιστικό διάλυμα First-Strand Buffer (GIBCO-BRL)
- 2 μl 0.1M DTT (Dithiothreitol-παράγοντας αποδιάταξης)
- 1 μl 10mM dNTP Mix (10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία 42 °C για 2 λεπτά και αμέσως μετά προσθήκη 1 μl Superscript II RNase H – του ενζύμου που καταλύει την αντίστροφη μεταγραφή του συμπληρωματικού DNA – και επώαση σε θερμοκρασία 50 °C για 1 ώρα. Το ένζυμο εν συνεχεία απενεργοποιήθηκε με επώαση στους 70 °C για 15 λεπτά.



2.4.3.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου CYP51 που κωδικοποιεί την 14α - απομεθυλάση και αλληλούχιση

Για την απόκτηση τμήματος του γονιδίου CYP51 που κωδικοποιεί την 14-απομεθυλάση στα στελέχη του μύκητα *C. beticola* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Δεδομένου ότι η αλληλουχία του γονιδίου είναι γνωστή, χρησιμοποιήθηκαν οι εξειδικευμένοι εκκινητές CYP51Fs/CYP51Rs και CYP51F₃/CYP51R₃ (Πίνακας 10) για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου από δείγματα cDNA και ολικού DNA αντίστοιχα των ευαίσθητων και ανθεκτικών στους DMIs στελεχών του μύκητα. Οι εκκινητές

CYP51F₃/CYP51R₃ σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα PRIMER3 έτσι ώστε να συνδέονται σε τμήμα πριν από αυτό των CYP51Fs/CYP51Rs και να κωδικοποιούν μεγαλύτερο τμήμα του γονιδίου. Η αντίδραση που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 0,5 μM από τους παραπάνω εκκινητές, 15 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTPs και 2,5 μονάδες (units) HotStar Taq DNA πολυμεράση (Qiagen) στο ρυθμιστικό διάλυμα του παρασκευαστή.

Στην περίπτωση του cDNA οι συνθήκες της PCR ήταν 95 °C για 5 min και 40 κύκλοι με 94 °C για 1 min, 54 °C για 1,5 min, 72 °C για 2 min και μία τελική φάση επέκτασης στους 72°C για 10 min. Στην περίπτωση του ολικού DNA οι συνθήκες της PCR ήταν 95 °C για 5 min και 40 κύκλοι με 94 °C για 1 min, 50 °C για 40 sec, 72 °C για 2 min και μία τελική φάση επέκτασης στους 72 °C για 10 min.

Πίνακας 12: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR κατά τη μοριακή διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')
CYP51Fs (Nikou <i>et al.</i> , 2009)	GTGTTTCGGCAAGGACGTCG
CYP51Rs (Nikou <i>et al.</i> , 2009)	CTCTCCCACCTTCACAACAGC
CYP51F ₃	GCGGCGACTTCTAATCATTT
CYP51R ₃	TCAACGACCTTCTTGCTTCC

Τα προϊόντα της ενίσχυσης της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) η οποία περιείχε 0,5 g αγαρόζης και 2 μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε 50 ml ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X. Τα δείγματα των οποίων οι ζώνες που εμφανίστηκαν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία είχαν το επιθυμητό μέγεθος καθαρίστηκαν με το GeneJet PCR Purification Kit της ThermoScientific βάσει των οδηγιών της εταιρείας.

Στη συνέχεια, τα δείγματα στάλθηκαν στα εργαστήρια της εταιρείας VbCbioTECH της Βιέννης όπου αλληλουχήθηκαν με χρήση της τεχνικής ABI Prism 3100 και ABI Prism 3730 XL capillary sequencer. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που προέκυψαν, εισήχθησαν στη βάση δεδομένων NCBI nucleotide. Στη βάση αυτή, 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. Επιβεβαιώθηκε, έτσι, η ταυτότητα των προϊόντων αλληλούχισης με βάση το ποσοστό ομολογίας τους με το Cyp51 γονίδιο στελεχών του *C. beticola* της βάσης και ελέγχθηκε ταυτόχρονα η ύπαρξη μεταλλαγών στα ανθεκτικά στελέχη με τη βοήθεια του προγράμματος Clustal – w.

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

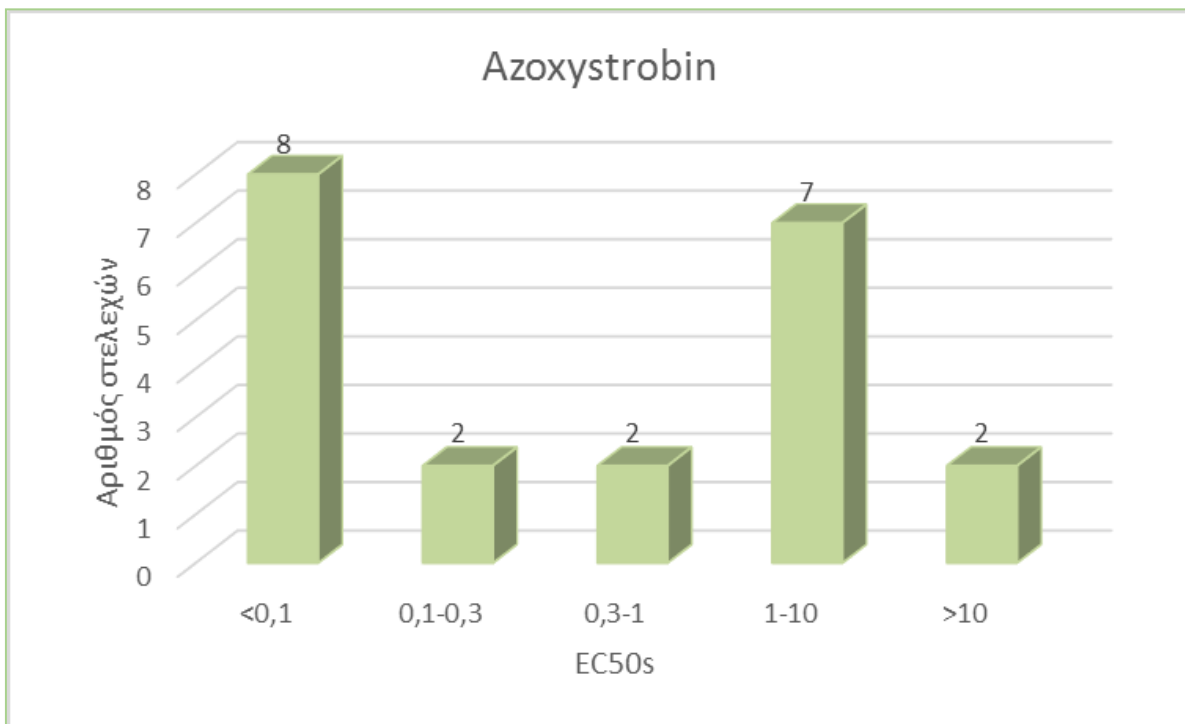
3.1 Μελέτη της ύπαρξης διασταυρωτής ανθεκτικότητας σε παρεμποδιστές της ομάδας των EBIs και άλλους παρεμποδιστές στελεχών του μύκητα *C. beticola*

Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποτελεσματικότητας διαφόρων παρεμποδιστών σε στελέχη του μύκητα *C. beticola* που ανήκουν σε διαφορετικούς φαινότυπους ανθεκτικότητας στους DMIs ώστε να εκτιμηθεί η ευαισθησία αναφοράς στα μυκητοκτόνα αυτά. Προχωρήσαμε σε συγκρίσεις διασταυρωτής ανθεκτικότητας με στόχο τη διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας μεταξύ των DMIs με άλλα μυκητοκτόνα που ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης (EBIs) αλλά και μυκητοκτόνα με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης σε υποκυτταρικό επίπεδο.

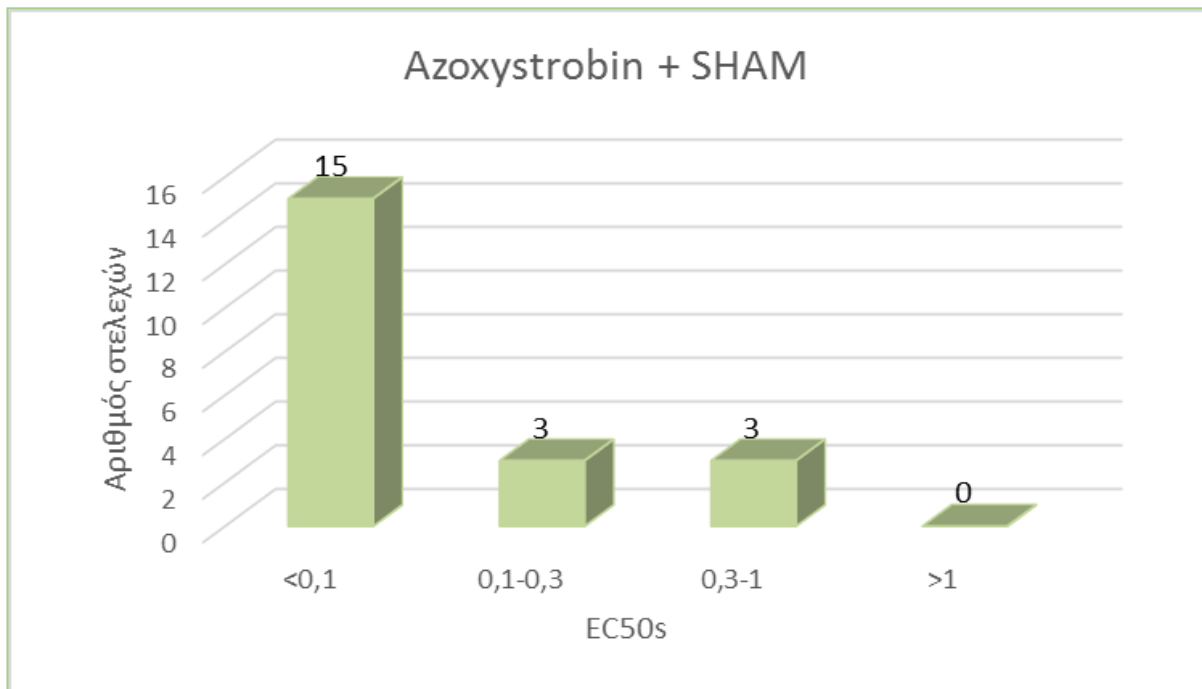
Συγκεκριμένα, από τους παρεμποδιστές που ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των EBIs δοκιμάστηκαν τα terbinafine, tolnaftate που δρουν στην εποξειδάση του σκουαλενίου, το fenhexamid που παρεμποδίζει το ένζυμο 3-κετο-αναγωγή και το spiroxamine που παρεμποδίζει τα ένζυμα Δ14 αναγωγή και Δ8→7 ισομεράση. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε το fenpropimorph που παρεμποδίζει τα ένζυμα Δ14 αναγωγή, Δ8→7 ισομεράση και έχει βρεθεί ότι δρα και στην εποξειδάση του σκουαλενίου. Από τους παρεμποδιστές της αναπνοής, χρησιμοποιήθηκαν οι SDHIs boscalid και fluopyram και η στρομπιλουρίνη azoxystrobin (μόνη της και σε συνδυασμό με τον εξειδικευμένο παρεμποδιστή SHAM). Επίσης, από τους παρεμποδιστές της μιτωτικής διαίρεσης δοκιμάστηκαν το βενζιμιδαζολικό carbendazim, το φααινυλοκαρβαμικό diethophencarb και το βενζαμίδιο zoxamide. Τέλος, εξετάστηκε και το φαυλοπυρρολικό fludioxonil που δρα στην ωσμωρρύθμιση των κυττάρων επηρεάζοντας την ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών.

3.1.1 Αποτελεσματικότητα διάφορων παρεμποδιστών

Τα μυκητοκτόνα τα οποία ήταν πολύ αποτελεσματικά ήταν τα azoxystrobin, fludioxonil και terbinafine με EC_{50} s < 1 $\mu\text{g/ml}$ (Γράφημα 4, 5, 6). Η αποτελεσματικότητα του azoxystrobin αυξήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με τον εξειδικευμένο παρεμποδιστή της εναλλακτικής αναπνοής SHAM (Γράφημα 3, 4), γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη μηχανισμού εναλλακτικής αναπνοής στο μύκητα *C. beticola*. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του azoxystrobin μαζί με το SHAM η πλειονότητα των στελεχών του μύκητα *C. beticola* είχαν τιμές EC_{50} μικρότερες από 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Κανένα στέλεχος δεν είχε τιμή EC_{50} μεγαλύτερη του 1 $\mu\text{g/ml}$, αντίθετα με την περίπτωση του azoxystrobin που 9 στελέχη είχαν τιμές EC_{50} μεγαλύτερες του 1 $\mu\text{g/ml}$ και μάλιστα 2 εξ' αυτών εμφάνισαν τιμές μεγαλύτερες των 10 $\mu\text{g/ml}$.

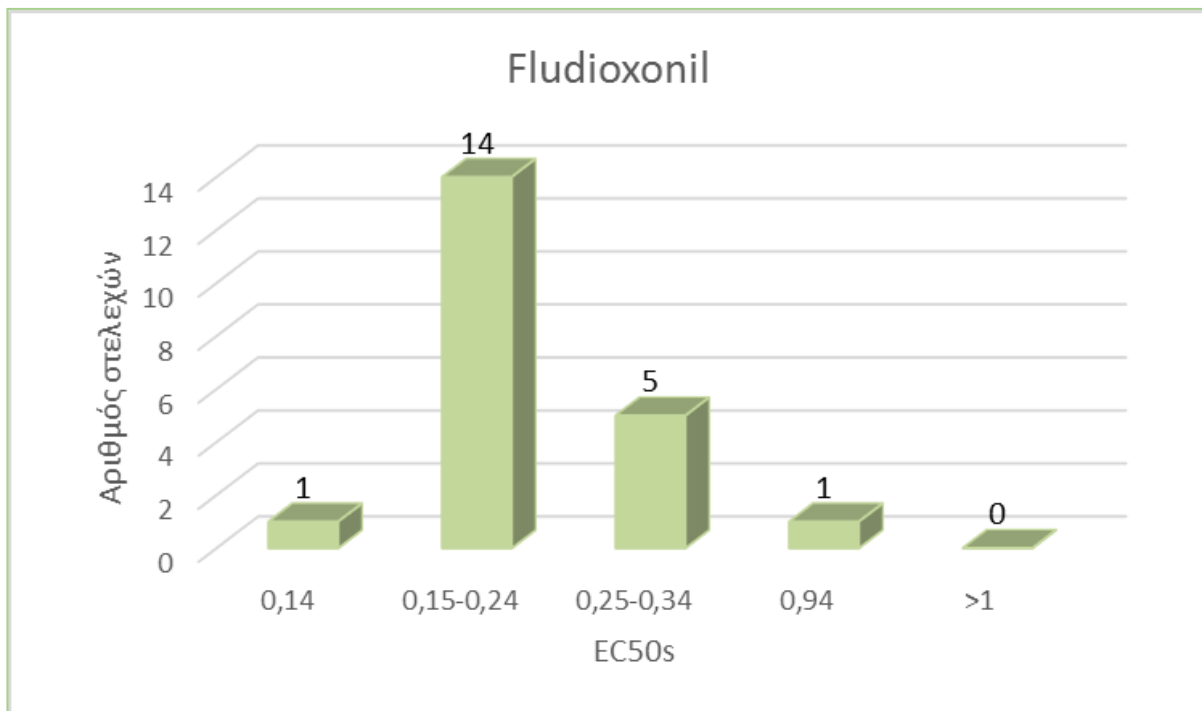


Γράφημα 3: Κατανομή ευαισθησίας στελεχών του μύκητα *C. beticola* στο azoxystrobin (EC_{50} s σε $\mu\text{g/ml}$)

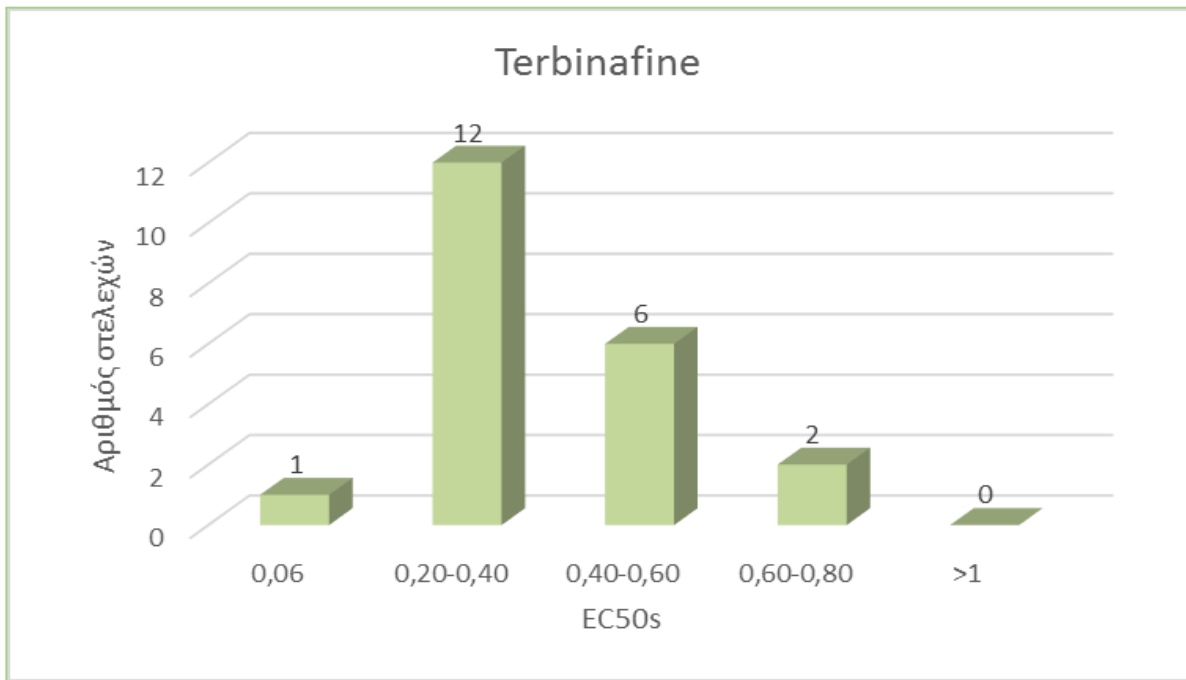


Γράφημα 4: Κατανομή ευαισθησίας στελεχών του μύκητα *C. beticola* στο azoxystrobin σε συνδυασμό με τον εξειδικευμένο παρεμποδιστή SHAM (EC50s σε μg/ml)

Στην περίπτωση των fludioxonil, terbinafine η πλειονότητα των στελεχών είχαν τιμές EC50 μικρότερες από 0,4 μg/ml με 20 στελέχη για το fludioxonil και 13 στελέχη για το terbinafine (Γράφημα 5, 6).

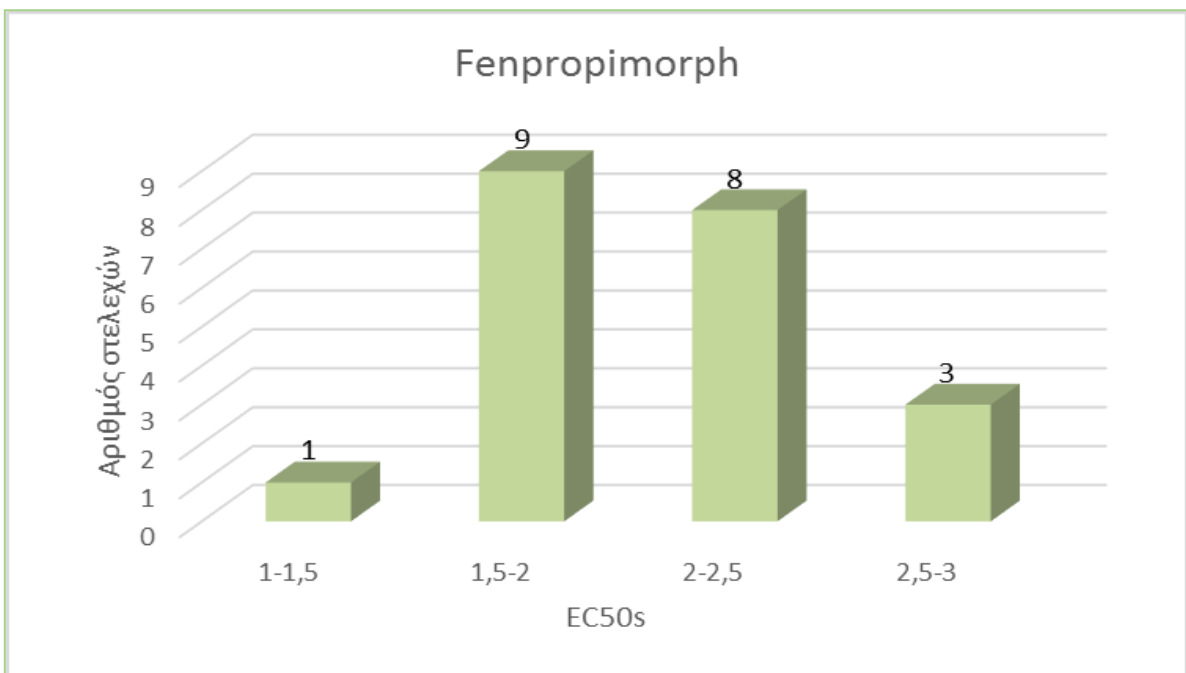


Γράφημα 5: Κατανομή ευαισθησίας στελεχών του *C. beticola* στο fludioxonil (EC50s - μg/ml)



Γράφημα 6: Κατανομή ευαισθησίας στελεχών του *C. beticola* στο terbinafine (EC50s - μg/ml)

Αξίζει να σημειωθεί ότι αποτελεσματικό ήταν και το carbendazim στην πλειονότητα των στελεχών (σε 20 στελέχη) με τιμές EC50 μικρότερες του 0,1 μg/ml εκτός από το στέλεχος 92 (ανθεκτικό μόνο στο flutriafol) με τιμή EC50 μεγαλύτερη των 10 μg/ml. Λιγότερο αποτελεσματικό ήταν το εγκεκριμένο fenpropimorph με τιμές EC50 να κυμαίνονται μεταξύ των 1 – 3 μg/ml (Γράφημα 7).



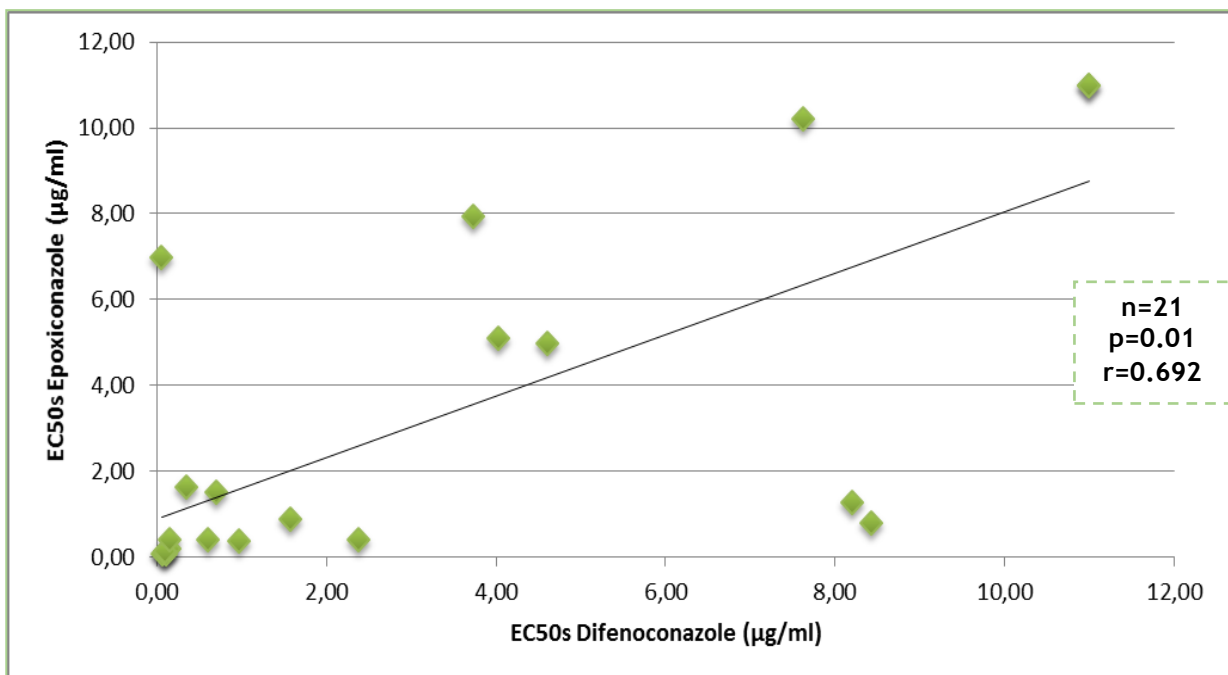
Γράφημα 7: Κατανομή ευαισθησίας στελεχών του μύκητα *C. beticola* στο fenpropimorph (EC50s σε μg/ml)

Οι υπόλοιποι παρεμποδιστές που δοκιμάστηκαν δεν ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικοί στο σύνολο των στελεχών με μέση ευαισθησία που έφτανε μέχρι και 40 µg/ml.

3.1.2 Διερεύνηση της ύπαρξης σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των DMIs και διάφορων παρεμποδιστών

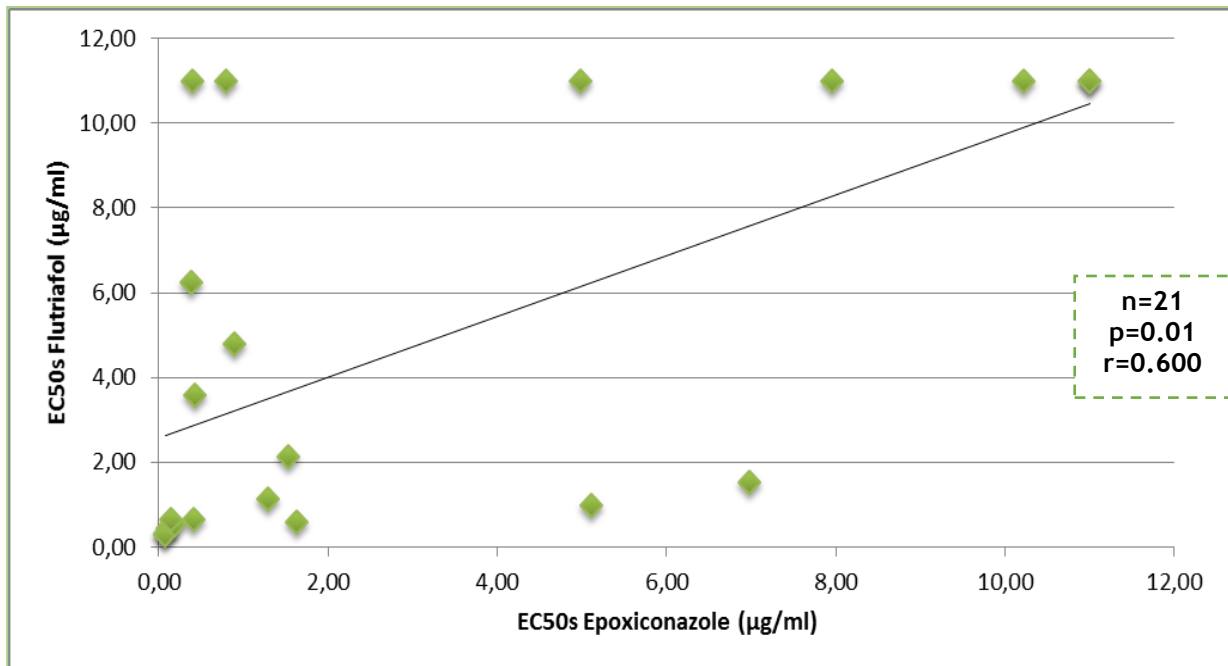
Η ύπαρξη σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας ελέγχθηκε στατιστικά με τη μέθοδο συσχέτισης κατά Pearson. Συγκεκριμένα, έγιναν συγκρίσεις κατά Pearson μεταξύ των EC50s (µg/ml) των παρεμποδιστών (για το azoxystrobin χρησιμοποιήθηκαν οι EC50s που προέκυψαν από την βιοδοκιμή με το SHAM). Στις περιπτώσεις που δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός των τιμών EC50, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος συσχέτισης κατά Pearson στα ποσοστά ανάπτυξης που αντιστοιχούσαν στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε ο εκάστοτε παρεμποδιστής (carbendazim, boscalid, fenhexamid, diethophencarb).

Παρατηρήθηκε θετική διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ των DMIs παρεμποδιστών που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, ο συντελεστής συσχέτισης στην περίπτωση των difenoconazole, eroxiconazole και flutriafol είναι θετικός σε επίπεδο σημαντικότητας 0,01%. Η γραμμική συσχέτιση των DMIs που μελετήθηκαν φαίνεται στα γραφήματα που ακολουθούν (Γράφημα 8, 9, 10).



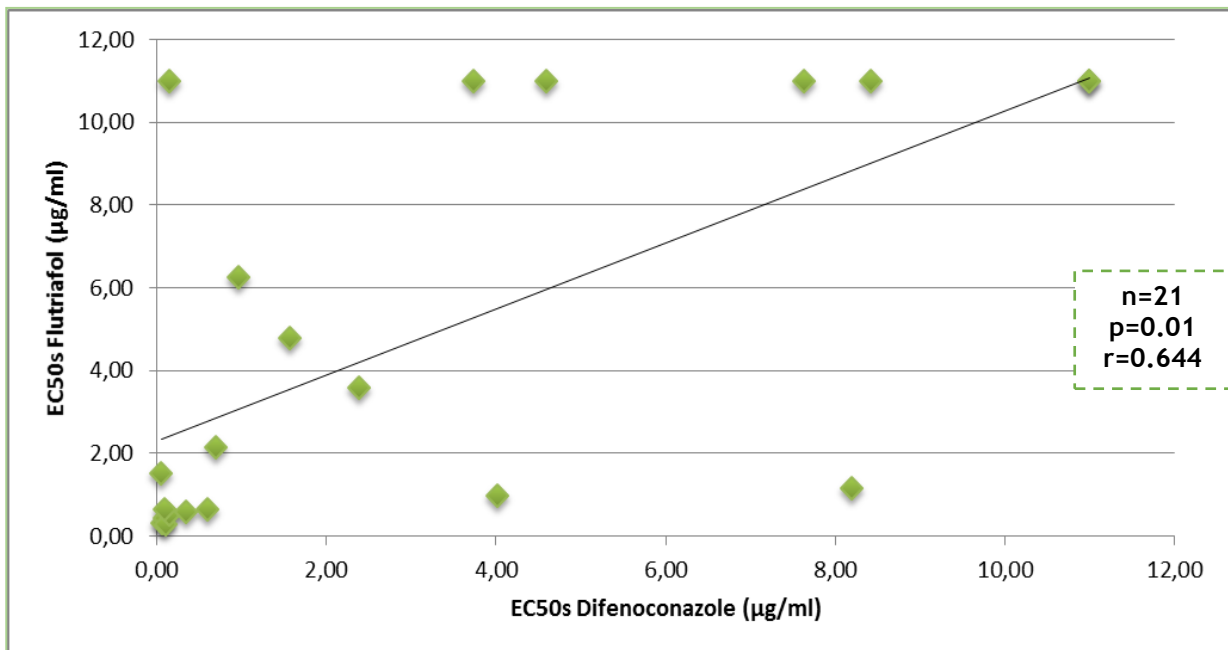
Γράφημα 8: Γραμμική συσχέτιση των τιμών EC50 (µg/ml) στελεχών του μύκητα *C. beticola* μεταξύ των DMI παρεμποδιστών difenoconazole - eroxiconazole

Στην περίπτωση των difenoconazole – epxoiconazole έχουμε το μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης κατά Pearson 0.692 όσον αφορά τη σύγκριση μεταξύ των DMIs (Γράφημα 8).



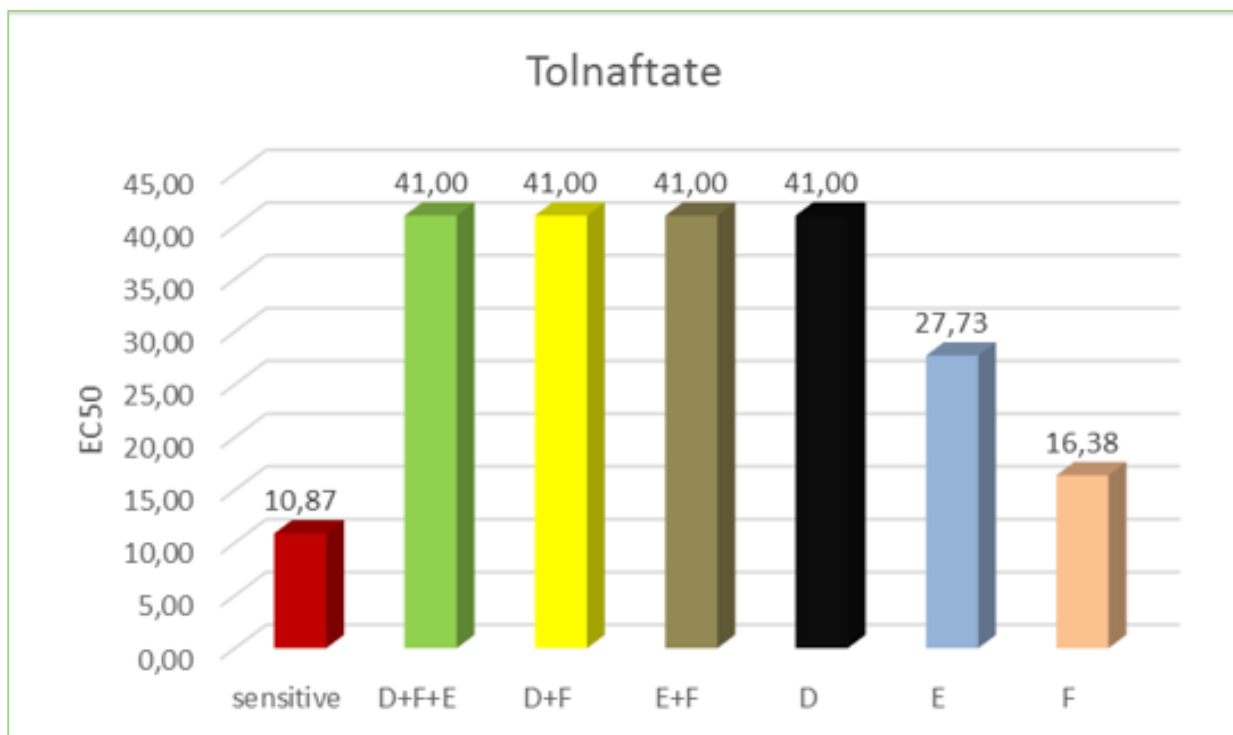
Γράφημα 9: Γραμμική συσχέτιση των τιμών EC50 (µg/ml) στελεχών του μύκητα *C. beticola* μεταξύ των DMI παρεμποδιστών epxoiconazole - flutriafol

Στην περίπτωση των difenoconazole – flutriafol έχουμε το θετικό συντελεστή συσχέτισης κατά Pearson 0.644 και στην περίπτωση των epxoiconazole – flutriafol έχουμε το μικρότερο συντελεστή 0,600 όσον αφορά τη σύγκριση μεταξύ των DMIs (Γράφημα 9, 10).



Γράφημα 10: Γραμμική συσχέτιση των τιμών EC50 (µg/ml) στελεχών του μύκητα *C. beticola* μεταξύ των DMI παρεμποδιστών difenoconazole - flutriafol

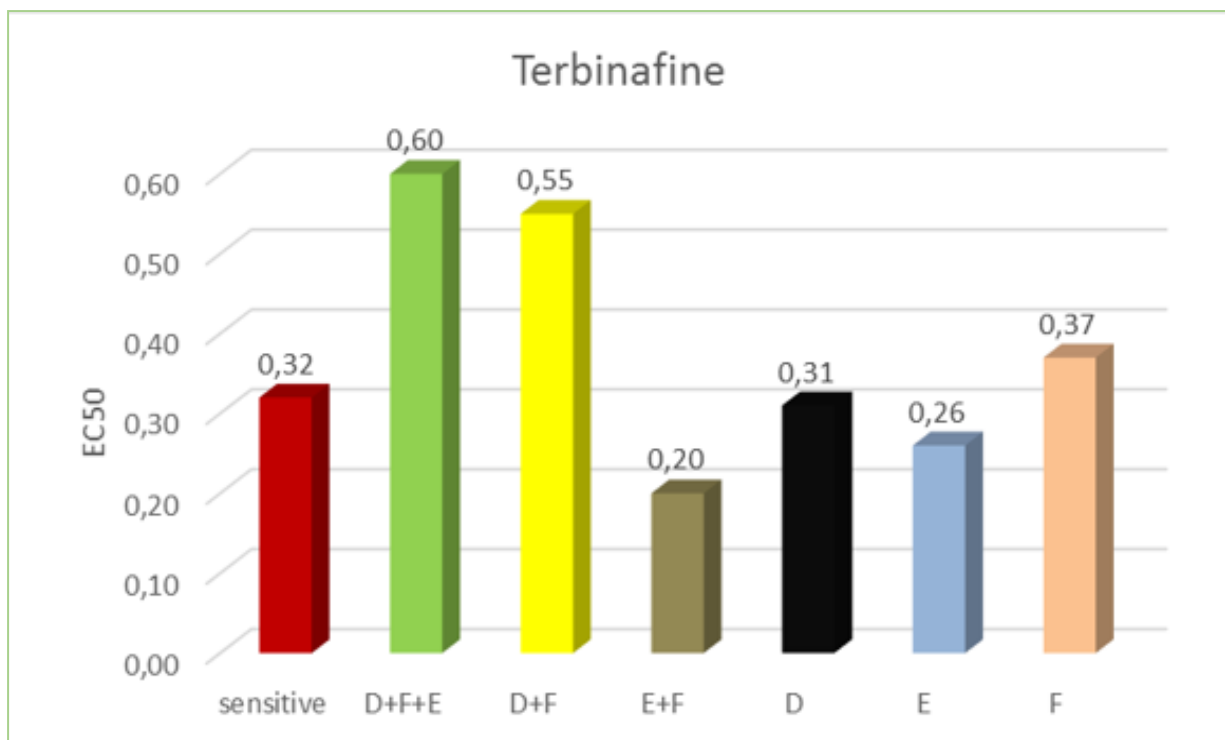
Σε σχέση με τους υπόλοιπους παρεμποδιστές που δρουν στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης, το tolnaftate εμφάνισε διασταυρωτή ανθεκτικότητα με όλους τους DMIs που μελετήθηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας 0,01 (Πίνακας 14). Όλοι οι φαινότυποι με διπλή ή τριπλή ανθεκτικότητα στους τρεις DMIs παρουσίασαν σημαντικά μειωμένη ευαισθησία στο tolnaftate όπως και τα στελέχη με μεμονωμένη ανθεκτικότητα στο difenoconazole ($R_f \approx 4$) ενώ μικρότερα επίπεδα ανθεκτικότητας ($R_f \approx 2,7 - 1,6$) παρατηρήθηκαν στα στελέχη με μεμονωμένη ανθεκτικότητα στα eroxicconazole και flutriafol αντίστοιχα (Γράφημα 12).



Γράφημα 11: Μέσες τιμές EC50s (μg/ml) των φαινοτυπικών κατηγοριών του μύκητα *C. beticola* που μελετήθηκαν κατά την εφαρμογή του παρεμποδιστή tolnaftate.

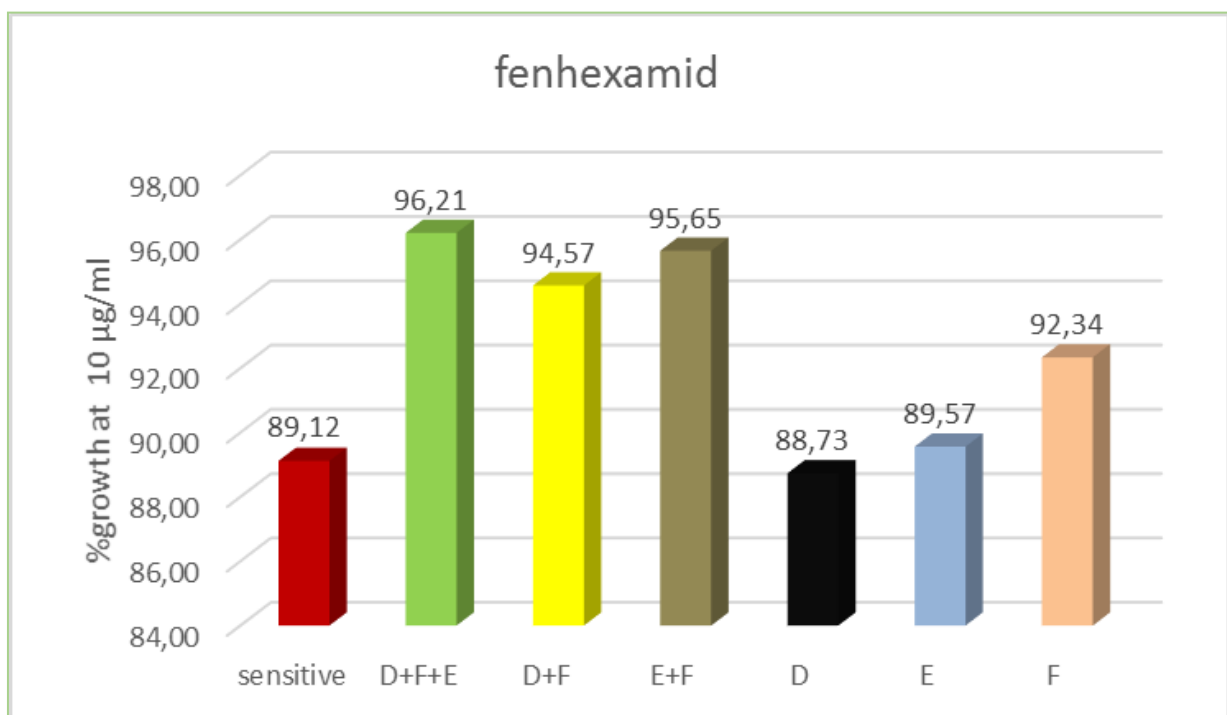
D: ανθεκτικά στο difenoconazole, E: ανθεκτικά στο eroxicconazole, F: ανθεκτικά στο flutriafol

Παρόμοια αποτελέσματα είχαμε και στο terbinafine το οποίο παρουσίασε θετική διασταυρωτή ανθεκτικότητα με δύο από τους DMIs (difenoconazole, flutriafol). Με το difenoconazole εμφάνισε θετική διασταυρωτή ανθεκτικότητα σε επίπεδο σημαντικότητας 0,01 και με το flutriafol σε επίπεδο 0,05 (Πίνακας 14). Στο Γράφημα 13 φαίνεται πως φαινότυποι με τριπλή ανθεκτικότητα στους τρεις DMIs παρουσίασαν μειωμένη ευαισθησία στο terbinafine ($R_f \approx 1.9$) όπως και τα στελέχη με διπλή ανθεκτικότητα στους difenoconazole-flutriafol ($R_f \approx 1.7$). Διαφορετική εικόνα έχουμε στα στελέχη με μεμονωμένη ανθεκτικότητα στα difenoconazole, epoxiconazole και flutriafol που παρουσιάζουν εικόνα αντίστοιχη με τα ευαίσθητα στελέχη ($R_f \approx 1$) κατά την εφαρμογή του fenhexamid.



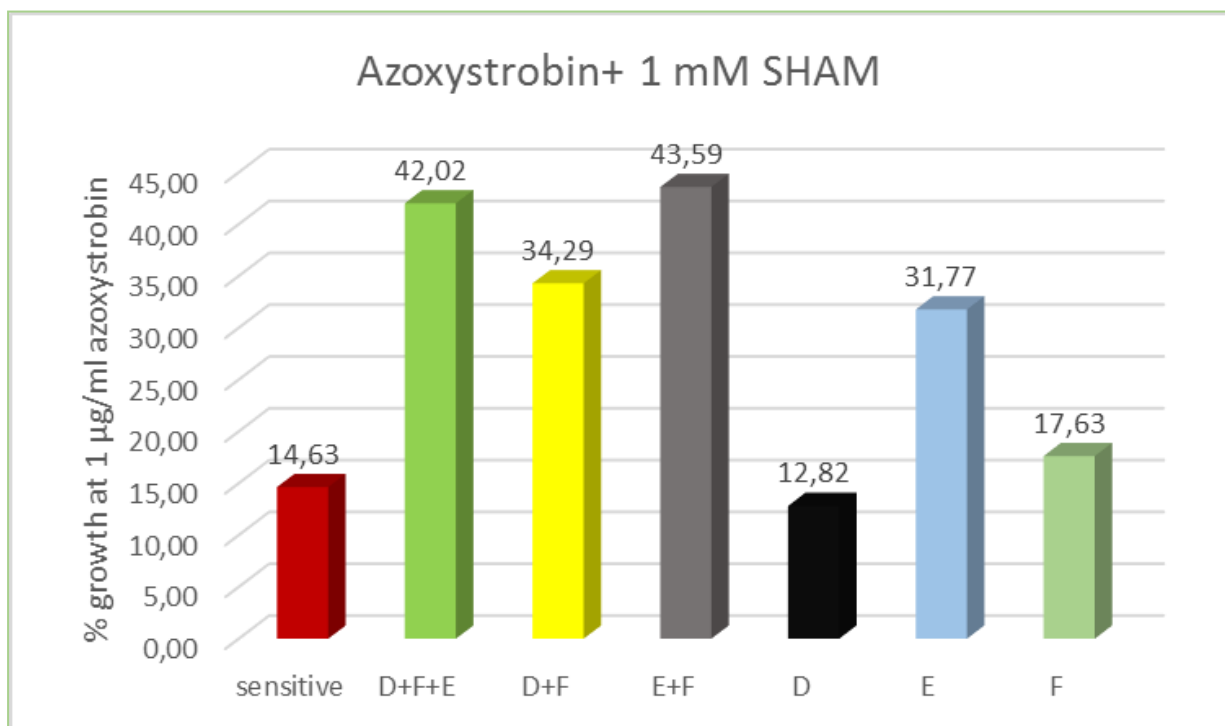
Γράφημα 12: Μέσες τιμές EC50s (µg/ml) των φαινοτυπικών κατηγοριών του μύκητα *C. beticola* που μελετήθηκαν κατά την εφαρμογή του παρεμποδιστή terbinafine
 D: ανθεκτικά στο difenoconazole, E: ανθεκτικά στο epoxiconazole, F: ανθεκτικά στο flutriafol

Επίσης, σε δύο DMIs διασταυρωτή ανθεκτικότητα εμφάνισε και το fenhexamid. Συγκεκριμένα, εμφάνισε θετική διασταυρωτή ανθεκτικότητα σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το eroxiconazole και το flutriafol (Πίνακας 14). Παρακάτω (Γράφημα 14), παρατηρείται μικρή μείωση της ευαισθησίας στο fenhexamid στα στελέχη με τριπλή και διπλή ανθεκτικότητα στους τρεις DMIs ($R_f \approx 1.7$) και ακόμα μικρότερη μείωση παρατηρήθηκε στα στελέχη με μεμονωμένη ευαισθησία στο flutriafol ($R_f \approx 1.04$). Η μικρή διαφορά με τα ευαίσθητα στελέχη φαίνεται και από το επίπεδο σημαντικότητας. Τα υπόλοιπα στελέχη με μεμονωμένη ευαισθησία στα difenoconazole, flutriafol εμφάνισαν αντίστοιχη εικόνα με τα ευαίσθητα στελέχη.



Γράφημα 13: ποσοστό ανάπτυξης σε συγκέντρωση 10 µg/ml fenhexamid στελεχών του μύκητα *C. beticola* που ανήκουν σε διαφορετικούς φαινότυπους ανθεκτικότητας στους DMIs που μελετήθηκαν. D: ανθεκτικά στο difenoconazole, E: ανθεκτικά στο eroxiconazole, F: ανθεκτικά στο flutriafol

Δεν βρέθηκε διασταυρωτή ανθεκτικότητα με παρεμποδιστές που δρουν σε διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια από τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης πλην της περίπτωσης του azoxystrobin (όταν δρούσε εν συνεργία με τον εξειδικευμένο παρεμποδιστή SHAM). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε θετική διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ των difenoconazole - epxiconazole και azoxystrobin σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και 0,01 αντίστοιχα. Στο Γράφημα 14 παρατηρείται ότι όλοι οι ανθεκτικοί φαινότυποι με εξαίρεση τα στελέχη που ήταν ανθεκτικά μόνο στο difenoconazole, ήταν λιγότερο ευαίσθητοι στον QoI παρεμποδιστή azoxystrobin παρουσία του εξειδικευμένου παρεμποδιστή της αναπνοής SHAM.



Γράφημα 14: ποσοστό ανάπτυξης σε συγκέντρωση 1 µg/ml azoxystrobin + 1mM SHAM στελεχών του μύκητα *C. beticola* που ανήκουν σε διαφορετικούς φαινότυπους ανθεκτικότητας στους DMIs που μελετήθηκαν
D: ανθεκτικά στο difenoconazole, **E:** ανθεκτικά στο epxiconazole, **F:** ανθεκτικά στο flutriafol

Η ύπαρξη αυτής της διασταυρωτής ανθεκτικότητας είναι, πιθανώς, αποτέλεσμα επιλογής τέτοιων φαινότυπων λόγω εφαρμογής μιγμάτων DMIs - QoIs (SPHERA 535 SC – cyproconazole/trifloxystrobin).

Συνοπτικά, από τις συγκρίσεις, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τριών DMIs που μελετήθηκαν (Πίνακας 13). Οι μεταλλαγές ανθεκτικότητας στους DMIs δεν φάνηκε να επηρεάζουν την ευαισθησία στα μυκητοκτόνα των άλλων ομάδων εκτός από την περίπτωση του azoxystrobin (Πίνακας 14). Αντίθετα, στη σύγκριση με μυκητοκτόνα που ανήκουν στην ομάδα των EBIs στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των τριών DMIs και του tolnaftate. Ακόμη, σημαντική συσχέτιση υπάρχει και μεταξύ των difenoconazole/flutriafol – terbinafine, epoxiconazole/flutriafol – fenhexamid και difenoconazole - spiroxamine (Πίνακας 13). Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις παρατηρήθηκαν σχέσεις θετικής διασταυρωτής ανθεκτικότητας.

Πίνακας 13: Συντελεστές συσχέτισης κατά Pearson (DMIs - λοιποί EBIs)

	difenoconazole	epoxiconazole	flutriafol	fenpropimorph	fenhexamid	spiroxamine	terbinafine	tolnaftate
difenoconazole	1	,692**	,644**	,177	,379	,449*	,590**	,774**
epoxiconazole	,692**	1	,600**	-,037	,452*	,381	,411	,596**
flutriafol	,644**	,600**	1	,187	,528*	,366	,524*	,623**

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).
* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Πίνακας 14: Συντελεστές συσχέτισης κατά Pearson (DMIs - υπόλοιποι παρεμποδιστές)

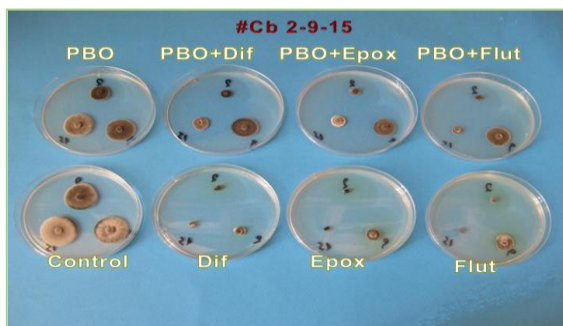
	azoxystrobin	boscalid	fluopyram	fludioxonil	zoxamide	carbendazim	diethophencarb
difenoconazole	,460*	,341	,254	-,036	,333	,038	,115
epoxiconazole	,600**	,318	,197	-,036	,348	-,028	,107
flutriafol	,387	,164	,207	-,060	,253	,215	-,054

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).
* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Η θετική συσχέτιση μεταξύ των τριών DMI είναι, ως ένα βαθμό, αναμενόμενη στα μυκητοκτόνα με τον ίδιο μηχανισμό δράσης και σε συνδυασμό με την έλλειψη σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας με μυκητοκτόνα άλλων ομάδων δίνει μια πρώτη ένδειξη για μηχανισμό ανθεκτικότητας σχετιζόμενο με τη θέση δράσης.

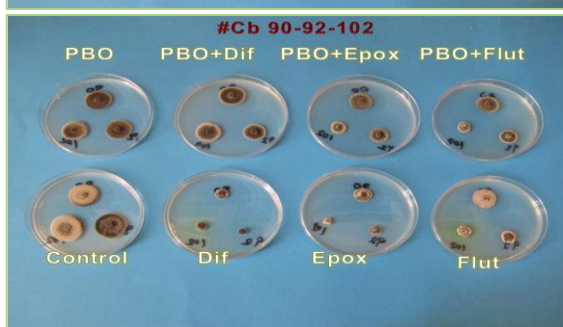
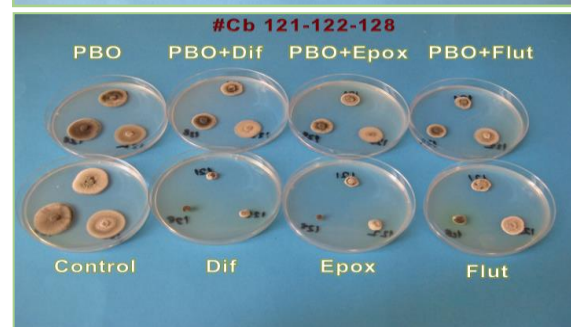
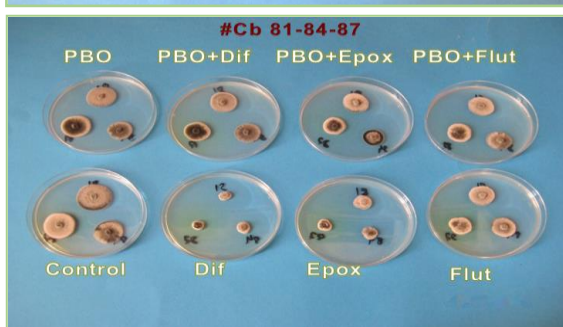
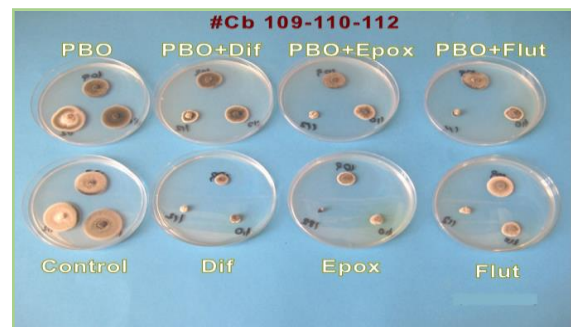
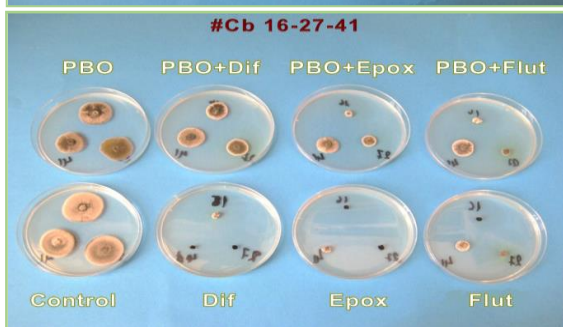
3.2 Διερεύνηση του μηχανισμού αποτοξικοποίησης μέσω μονοοξυγονασών (P450s) στελεχών του μύκητα *C. beticola*

Για τη μελέτη πιθανής εμπλοκής του βιοχημικού μηχανισμού αποτοξικοποίησης χρησιμοποιήθηκε ο συνεργιστής PBO σε πειράματα *in vitro*. Συγκεκριμένα επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 5000 $\mu\text{g/ml}$ του εν λόγω παρεμποδιστή των P450s ενζύμων και χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η επίδρασή του παρουσία καθενός από τους τρεις DMIs που μελετήθηκαν. Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 21) καθώς και τους πίνακες (Πίνακες 12, 13, 14) φαίνονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων συνεργισμού.



Εικόνα 19: Ευαισθησία των στελεχών του μύκητα *C. beticola*:

στα PBO (5000 $\mu\text{g/ml}$),
difenoconazole (10 $\mu\text{g/ml}$),
epoxiconazole (10 $\mu\text{g/ml}$),
flutriafol (10 $\mu\text{g/ml}$)
και σε μίγμα αυτών



Πίνακας 15: Επίδραση των difenoconazole, PBO και μίγματος αυτών στην % ανάπτυξη στελεχών του μύκητα *C. beticola*

#cb	5000 µg/ml PBO	10 µg/ml difen	difen + PBO
2	62,50	0,00	68,18
9	90,79	14,06	84,21
15	80,72	0,00	49,09
16	87,50	7,89	61,54
27	80,68	0,00	62,71
41	82,35	0,00	81,03
81	85,23	17,11	80,95
84	82,86	24,14	104,35
87	89,87	20,90	81,36
90	97,18	28,81	85,96
92	80,77	4,55	84,31
102	82,05	22,73	92,31
109	90,28	26,67	84,91
110	85,39	11,69	64,06
112	91,76	5,48	36,36
121	83,78	11,29	74,00
122	86,42	10,14	84,48
128	93,90	1,43	67,69
130	88,10	9,72	77,42
134	84,88	28,38	88,52
137	93,67	13,43	77,42

Στον παραπάνω πίνακα φαίνεται πως η προσθήκη 5000 µg/ml PBO στο θρεπτικό υπόστρωμα μείωσε σημαντικά (έως και 80% στα στελέχη 84 και 92) την παρεμποδιστική δράση του difenoconazole τόσο στα ανθεκτικά όσο και στα ευαίσθητα στελέχη. Η μικρότερη επίδραση του PBO ανιχνεύτηκε στο στέλεχος 112 όπου η μείωση της αποτελεσματικότητας του difenoconazole ήταν της τάξης του 30%.

Πίνακας 16: Επίδραση των epoxiconazole, PBO και μίγματος αυτών στην % ανάπτυξη στελεχών του μύκητα *C. beticola*

#cb	5000 µg/ml PBO	10 µg/ml epox	epox + PBO
2	62,50	0,0	42,42
9	90,79	28,1	70,18
15	80,72	0,0	41,82
16	87,50	0,0	15,38
27	80,68	0,0	42,37
41	82,35	12,3	67,24
81	85,23	38,2	82,54
84	82,86	44,8	94,57
87	89,87	32,8	71,19
90	97,18	50,8	71,93
92	80,77	16,7	66,67
102	82,05	7,6	54,81
109	90,28	45,0	77,36
110	85,39	15,6	53,13
112	91,76	0,0	13,64
121	83,78	25,8	64,00
122	86,42	26,1	74,14
128	93,90	4,3	53,85
130	88,10	20,8	58,06
134	84,88	13,5	49,18
137	93,67	29,9	69,35

Και στον πίνακα αυτό φαίνεται πως η προσθήκη 5000 µg/ml PBO στο θρεπτικό υπόστρωμα μείωσε σημαντικά (έως και 50% στα στελέχη 84, 92, 102, 122 και 128) την παρεμποδιστική δράση του epoxiconazole τόσο στα ανθεκτικά όσο και στα ευαίσθητα

στελέχη. Η μικρότερη επίδραση του PBO ανιχνεύτηκε στα στελέχη 16 και 112 όπου η μείωση της αποτελεσματικότητας του eroxiconazole ήταν της τάξης του 15%.

Πίνακας 17: Επίδραση των flutriafol, PBO και μίγματος αυτών στην % ανάπτυξη στελεχών του μύκητα *C. beticola*

#cb	0/5000 PBO	10 µg/ml flut	flut + PBO
2	62,50	0,00	21,21
9	90,79	43,75	75,44
15	80,72	0,00	20,00
16	87,50	0,00	7,69
27	80,68	0,00	16,95
41	82,35	24,66	65,52
81	85,23	63,16	79,37
84	82,86	79,31	97,83
87	89,87	61,19	79,66
90	97,18	81,36	80,70
92	80,77	40,91	60,78
102	82,05	30,30	44,23
109	90,28	75,00	75,47
110	85,39	38,96	46,88
112	91,76	9,59	10,61
121	83,78	38,71	58,00
122	86,42	50,72	79,31
128	93,90	21,43	49,23
130	88,10	41,67	48,39
134	84,88	33,78	36,07
137	93,67	67,16	77,42

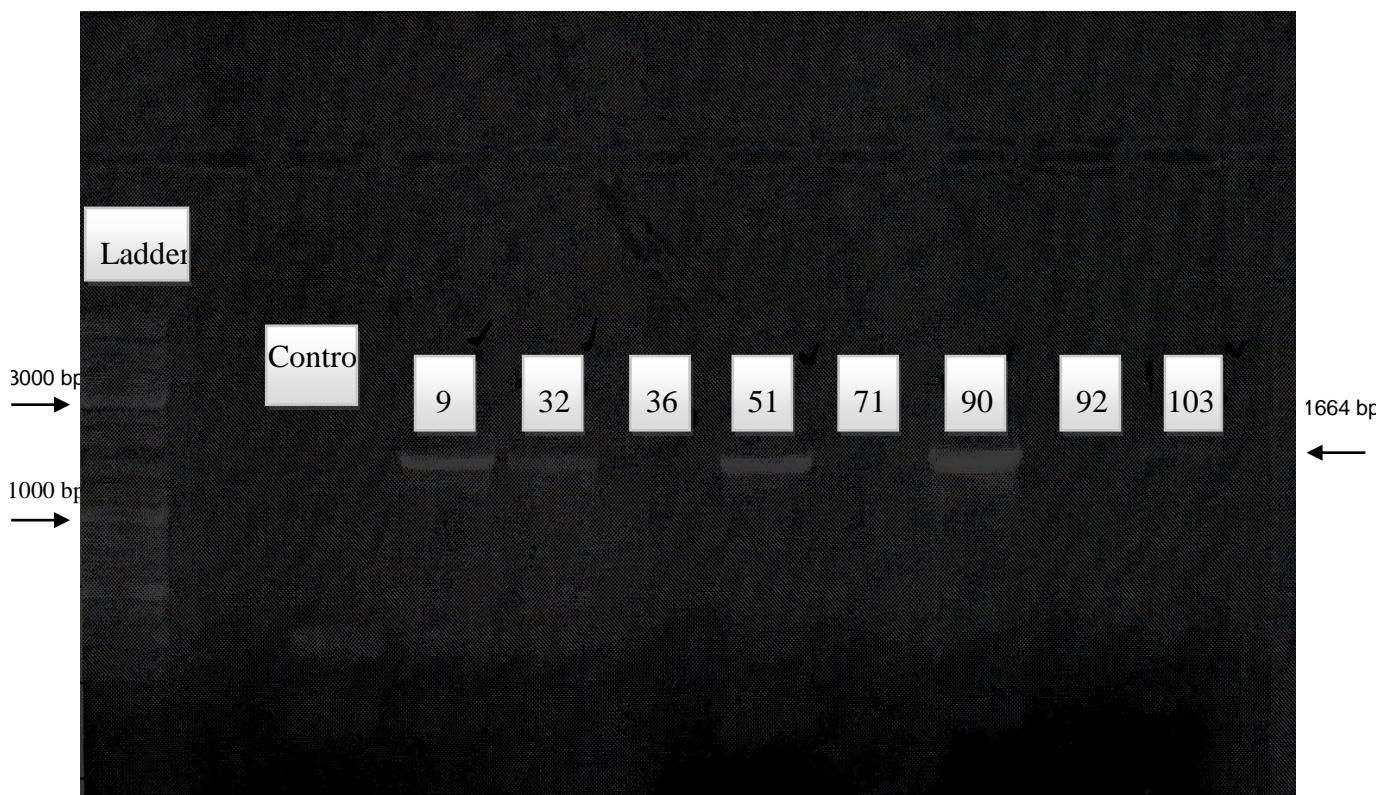
Όπως φαίνεται στον πίνακα 17, η παρεμποδιστική δράση του flutriafol με την προσθήκη 5000 µg/ml PBO στο θρεπτικό υπόστρωμα κυμάνθηκε τόσο στα ανθεκτικά όσο και στα

ευαίσθητα στελέχη σε ποσοστά της τάξης του 0,5% - 40%. Γενικά, παρατηρήθηκε η μικρότερη μείωση της παρεμποδιστικής δράσης σε σχέσης με τους υπόλοιπους DMIs. Μάλιστα, στο στέλεχος 90 κατά την προσθήκη του PBO είχαμε επιπλέον μείωση της ευαισθησίας αλλά σε πολύ μικρό ποσοστό (0,7%). Η μικρότερη επίδραση του PBO ανιχνεύτηκε στο στέλεχη 109, 112 (0,5%) και η μεγαλύτερη επίδρασή του μετρήθηκε στο στέλεχος 41 (40%).

Στη μεγάλη πλειοψηφία των περιπτώσεων παρατηρήθηκε ανταγωνισμός μεταξύ των DMI παρεμποδιστών και του PBO ακόμα και στις περιπτώσεις των ευαίσθητων στους DMIs στελεχών. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι ο μηχανισμός της αποτοξικοποίησης με τη βοήθεια μονοοξυγονασών δεν αποτελεί το μηχανισμό ανθεκτικότητας των DMI-ανθεκτικών στελεχών, δεδομένου ότι δεν άρει τους ανθεκτικούς φαινότυπους ενώ, αντίθετα, καθιστά λιγότερο ευαίσθητους και τους ευαίσθητους στους DMI φαινότυπους.

3.3 Απομόνωση και αλληλούχιση τμήματος του γονιδίου CYP51 και χαρακτηρισμός μεταλλαγών ανθεκτικότητας στελεχών του μύκητα *C. beticola*

Προκειμένου να διερευνήσουμε την ύπαρξη μεταλλαγών στα στελέχη που ανήκουν στους ανθεκτικούς φαινότυπους στους DMIs, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και ταυτοποίηση τμήματος του γονιδίου CYP51, που κωδικοποιεί την 14α – απομεθυλάση ένζυμο στόχο των DMIs. Για το σκοπό αυτό προχωρήσαμε στην εξαγωγή ολικού DNA και RNA από τα διάφορα στελέχη του μύκητα (16, 27, 102, 110, 9, 35, 51, 128, 101, 84, 90). Το ολικό RNA χρησιμοποιήθηκε για την απόκτηση του ολικού συμπληρωματικού cDNA του μύκητα. Δεδομένου ότι η αλληλουχία του CYP51 ήταν γνωστή (Nikou *et al.*, 2009; Bolton *et al.*, 2012) χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές (specific primers) και για το DNA και για το cDNA. Το μέγεθος της ζώνης που πάρθηκε στην περίπτωση του γενωματικού DNA ήταν 1664 bp. Στη συνέχεια, τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση.



Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση αгарόζης 1% προϊόντων PCR όπου ενισχύθηκε τμήμα του γονιδίου CYP51 δειγμάτων ολικού DNA από τα στελέχη που φαίνονται στην εικόνα του μύκητα *C. beticola* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές CYP51F₃/CYP51R₃ (1kb Ladder)

Συγκεκριμένα, στελέχη ευαίσθητα στους DMIs ή με μονή ανθεκτικότητα σε ένα εξ' αυτών διέφεραν από την παραλλαγή 3 σε σημεία που βρίσκονται είτε σε περιοχές της πρωτεΐνης που δεν είναι συντηρημένες είτε σε σημεία συντηρημένα αλλά οι μεταλλαγές αυτές εντοπίζονται τόσο στα ευαίσθητα όσο και σε ανθεκτικά στους DMIs στελέχη. Αντίθετα, οι φαινότυποι με ανθεκτικότητα και στους τρεις DMIs παρουσίασαν μία κοινή μεταλλαγή, η οποία δεν υπάρχει ούτε στην παραλλαγή 3 αλλά ούτε και στους υπόλοιπους φαινότυπους με μονή ή πλήρη ευαισθησία στους τρεις DMIs που μελετήθηκαν (Εικόνα 21). Πρόκειται για την αντικατάσταση του E (γλουταμινικό οξύ) από K (λυσίνη) στη θέση 149 (Πίνακας 18). Επίσης, στο ανθεκτικό και στους τρεις DMIs στέλεχος 90, βρέθηκε επιπλέον η αντικατάσταση του G (γλυσίνη) από E (γλουταμινικό οξύ) στη θέση 458. Πιθανολογούμε ότι η E149K αντικατάσταση αποτελεί μεταλλαγή ανθεκτικότητας ενώ δεν μπορούμε να ισχυριστούμε κάτι τέτοιο για την G458E μεταλλαγή αφού δεν είναι κοινή για τα 3 στελέχη με ταυτόχρονη ανθεκτικότητα στους τρεις DMIs.

#Cb	difen	epox	flutr	Cyp 51
16	-	-	-	(201-217)
27	-	-	-	(273-280)
102	-	-	-	(507-511)
110	-	-	-	καμία μεταλλαγή
9	+	+	-	καμία μεταλλαγή
35	+	+	-	καμία μεταλλαγή
51	+	+	-	καμία μεταλλαγή
128	-	-	+	(146-154, 511-516)
101	-	-	+	καμία μεταλλαγή
84	+	+	+	E149K
90	+	+	+	E149K, G458E
137	+	+	+	E149K

Κεφάλαιο 4: Συζήτηση – Συμπεράσματα

Η κερκοσπορίωση των τεύτλων είναι η σημαντικότερη ασθένεια φυλλώματος των τεύτλων και προκαλείται από το μύκητα *Cercospora beticola*. Ο αποτελεσματικότερος και οικονομικότερος τρόπος αντιμετώπισης της ασθένειας είναι η χημική καταπολέμηση, ενώ στους DMIs ανήκουν οι περισσότερες δραστικές που είναι εγκεκριμένες ενάντια της κερκοσπορίωσης. Η χρήση των DMIs στην Ελλάδα ξεκίνησε το 1979, με πρώτη αναφορά για ανθεκτικά στελέχη το 1996 (Karaoglanidis *et al.*, 1996). Από τότε, μέσω προγραμμάτων δειγματοληψιών παρατηρήθηκε μετακίνηση του πληθυσμού του παθογόνου προς μειωμένη ευαισθησία στους DMIs (Georgopoulos, 1987; Karaoglanidis *et al.*, 2000). Έχουν αναφερθεί διάφοροι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στους DMIs συμπεριλαμβανομένων των: αλλαγή στη θέση δράσης, υπερέκφραση του γονιδίου στόχου (CYP51) και αυξημένη απέκκριση που οφείλεται σε υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους μεταφορείς που δρουν στις μεμβράνες (Cools *et al.*, 2013).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 21 στελέχη αγρού από διάφορους αγρούς της Κεντρικής και Βορείου Ελλάδας που ανήκουν σε διαφορετικούς φαινότυπους ανθεκτικότητας στους DMIs και μελετήθηκαν με σκοπό τη διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ευαισθησίας σε διάφορα μυκητοκτόνα και στη συνέχεια, ελέγχθηκε η ύπαρξη σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ διάφορων παρεμποδιστών για να διαπιστωθεί αν πρόκειται για εξειδικευμένο μηχανισμό ανθεκτικότητας ή όχι. Σε αυτά πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ευαισθησίας σε διάφορες συγκεντρώσεις σε μυκητοκτόνα της ευρύτερης ομάδας των EBIs αλλά και σε μυκητοκτόνα που δρουν σε διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια.

Πολύ αποτελεσματικά ήταν τα azoxystrobin, fludioxonil και terbinafine με μέση ευαισθησία μικρότερη του 1 μg/ml. Από αυτά εγκεκριμένο για την αντιμετώπιση της κερκοσπορίωσης είναι μόνο το azoxystrobin. Λιγότερο αποτελεσματικό ήταν το επίσης εγκεκριμένο fenpropimorph με τιμές μέσης ευαισθησίας που κυμαίνονταν 1-3 μg/ml. Οι υπόλοιποι παρεμποδιστές δεν ήταν αποτελεσματικοί σε συγκεντρώσεις έως 40μg/ml.

Πιο συγκεκριμένα, αποτελεσματικό ήταν το azoxystrobin στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε μαζί με τον εξειδικευμένο παρεμποδιστή SHAM. Αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη εναλλακτικής αναπνοής στο *C. beticola*. Ο μηχανισμός αυτός έχει καταγραφεί σε πλήθος φυτοπαθογόνων μυκήτων (Ziogas *et al.*, 1997; Yukioka *et al.*, 1997; Joseph-Horne *et*

al., 1999; Tamura *et al.*, 1999; Olaya & Koller, 1999a) όπως και στην περίπτωση του *C. beticola*, όπου εξηγεί εν μέρει την ανθεκτικότητα του παθογόνου στο pyraclostrobin (Μαλανδράκης, 2009). Το επίσης αποτελεσματικό fludioxonil είναι εγκεκριμένο σε ένα πλήθος καλλιεργειών (καλλωπιστικά, λαχανικά υπαίθρου και θερμοκηπίου, μηλοειδή, σιτηρά) και στα αρωματικά και βιομηχανικά φυτά που ανήκουν και τα ζαχαρότευτλα το fludioxonil έχει έγκριση για τον ηλίανθο (CELEST 025 FS) και τον καπνό (SWITCH 25/37.5WG). Προβλήματα ανθεκτικότητας δεν έχουν αναφερθεί πέρα από την περίπτωση του *Botrytis cinerea* που φαίνεται να σχετίζεται με το μηχανισμό αυξημένης απέκκρισης. Ακόμη προβλήματα διασταυρωτής ανθεκτικότητας έχουν καταγραφεί μόνο με δικαρβοξιμιδικά και ανιλινοπυριμιδίνες.

Επιπλέον, αποτελεσματικό ήταν το terbinafine που ανήκει στην ευρύτερη ομάδα των SBIs και συγκεκριμένα στις αλλυλαμίνες. Χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση τοπικών δερματομυκητιάσεων του ανθρώπου που προκαλούνται από μύκητες των γενών *Blastomyces*, *Candida*, *Epidermophyton* και *Trichophyton* (Ζιώγας & Μαρκόγλου, 2010). Δεν ήταν τόσο αποτελεσματικό, όμως, όσο το fludioxonil και όπως θα δούμε και παρακάτω εμφάνισε και διασταυρωτή ανθεκτικότητα με τους DMIs. Λιγότερο αποτελεσματικό από τα προηγούμενα ήταν το εγκεκριμένο ενάντια στην κερκοσπορίωση fenpropimorph.

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι σχέσεις διασταυρωτής ανθεκτικότητας μεταξύ των μυκητοκτόνων ώστε να ανιχνευθεί η ύπαρξη εξειδικευμένης ή μη ανθεκτικότητας των μεταλλαγμένων στελεχών. Στατιστικός έλεγχος της συσχέτισης κατά Pearson έδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ των difenoconazole, epxiconazole κι flutriafol, γεγονός που αποτελέσε μια πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη ανθεκτικότητας σχετικού με τη θέση δράσης των μυκητοκτόνων αυτών. Θετική συσχέτιση μεταξύ των DMIs έχει καταγραφεί σε πλήθος ερευνητικών εργασιών σε πολλά παθογόνα (Kretschmer *et al.*, 2009; Snelders *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012; Gadoury *et al.*, 2012; Cools & Fraaije, 2013). Στην περίπτωση του παθογόνου *C. beticola* από το 2000 οι Karaoglanidis *et al.* έχουν αναφερθεί στη θετική διασταυρωτή ανθεκτικότητα μεταξύ των DMIs bitertanol και flutriafol. Επόμενες μελέτες έδειξαν τη θετική συσχέτιση μεταξύ των difenoconazole, bitertanol, propiconazole, fluzilazole, myclobutanil, triadimefon, pyrifenoX, fenanimol, imazalil, triforine και flutriafol (Karaoglanidis *et al.*, 2003) και μεταξύ των epxiconazole, flutriafol (Nikou *et al.*, 2009).

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι υπάρχουν διαφορετικοί φαινότυποι μεταξύ των DMIs κάτι που έχει, επίσης, παρατηρηθεί από τους Bolton *et al.* (2012). Παρ' αυτά δεν μπόρεσε να εξηγηθεί από την παραλλακτικότητα του γονιδίου CYP51. Ήδη οι Nikou *et al.* βρήκαν το 2009 μια μεταλλαγή σε συντηρημένο τμήμα του γονιδίου που δε σχετιζόταν με την μειωμένη

ευαισθησία στους DMIs. Το γεγονός αυτό, ίσως, εξηγείται από το ότι υπάρχει διαφορά στην στερεοχημική συγγένεια των δραστικών με το σύστημα στόχο των φαρμάκων, διαφορά ενδεχομένως ικανή να εξισορροπήσει τις διαφορές στο επίπεδο εκδήλωσης της ανθεκτικότητας στους παρεμποδιστές.

Επίσης παρουσιάστηκε, στην παρούσα μελέτη, θετική συσχέτιση μεταξύ των τριών DMIs και κάποιων παρεμποδιστών από την ευρύτερη ομάδα των EBIS. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τριών DMIs και του tolnaftate και μεταξύ των difenoconazole/flutriafol – terbinafine, epoxiconazole/flutriafol – fenhexamid και difenoconazole – spiroxamine. Σε άλλα παθογόνα όπως το *Candida albicans* (Akins, 2005; Barker & Rogers, 2006), *Botrytis cinerea* (Leroux, 2007; Kretschmer *et al.*, 2009), *Penicillium digitatum* και *Septoria tritici* (De Waard *et al.*, 2006) η ύπαρξη διασταυρωτής ανθεκτικότητας σε διάφορους SBIs σχετίζεται με το μηχανισμό της υπερέκφρασης ή της αυξημένης απέκκρισης που προσδίδει μη εξειδικευμένη ανθεκτικότητα. Παρόλα αυτά, δεν βρέθηκε διασταυρωτή ανθεκτικότητα με το fenpropimorph, γεγονός που υποδεικνύει ότι διαφορετικά γονίδια ελέγχουν την ανθεκτικότητα σε κάθε ομάδα μυκητοκτόνων. Αξίζει να σημειωθεί ότι αποτελέσματα μη συσχέτισης του μορφολινικού fenpropimorph και των DMIs έχουν καταγραφεί σε πλήθος παθογόνων *Erysiphe graminis* (de Waard *et al.*, 1986; Girling *et al.*, 1988), *Venturia inaequalis* (Thind *et al.*, 1986), *Rhynchosporium secalis* (Girling *et al.*, 1988), *Monilinia fructicola* (Nuninger-Ney *et al.*, 1989), *Pyrenophora teres* (Peever & Milgroom, 1993) και *Ustilago maydis* (de Waard & van Nistelrooy, 1990; Markoglou & Ziogas, 1999). Πρέπει να αναφερθεί και η περίπτωση αρνητικής συσχέτισης μεταξύ των tebuconazole-fenhexamid που κατέγραψαν οι Chuan-qing Zhang *et al.* (2007) σε στελέχη του *Botrytis cinerea*.

Επιπλέον, η διερεύνηση σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας με παρεμποδιστές που δρουν σε διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια δεν έδειξε κάποια συσχέτιση πλην της περίπτωσης του azoxystrobin με τα difenoconazole/epoxiconazole. Αυτή η συσχέτιση δεδομένου ότι δεν υπάρχει στους υπόλοιπους παρεμποδιστές δε μας δίνει κάποια πληροφορία για το μηχανισμό ανθεκτικότητας. Αναφορές για συσχέτιση των στρομπιλουρίνων και των DMIs έχουμε, αρχικά, αυτή της (weak) αρνητικής συσχέτισης μεταξύ fluquinconazole – azoxystrobin (Mavroeidi & Shaw, 2005) στο *Mycosphaerella graminicola*. Η ένδειξη αυτή μπορεί να συνδέεται με την επιλογή φαινότυπων ανθεκτικών και στις δύο ομάδες μυκητοκτόνων. Αυτή η επιλογή στο *C. beticola*, πιθανώς, να προέκυψε από την χρήση του σκευάσματος SPHERA 535 SC που αποτελεί μίγμα της στρομπιλουρίνης trifloxystrobin και

του DMI cyproconazole και είναι εγκεκριμένο ενάντια της κερκοσπορίωσης των τεύτλων. Η παράλληλη μείωση της ευαισθησίας στους DMIs και στις στρομπιλουρίνες έχει εντοπιστεί και στην περίπτωση των *Venturia inaequalis* (Dux *et al.*, 2004), *Zymoseptoria tritici* (Stewart *et al.*, 2014). Μάλιστα, οι Stewart *et al.* (2014) επισημαίνουν τον κίνδυνο ύπαρξης τέτοιων φαινότυπων σε συνδυασμό με ευνοϊκές συνθήκες για το παθογόνο για την πρόκληση επιδημιών. Συνεπώς, η χρήση μιγμάτων DMIs και στρομπιλουρίνων φαίνεται επίφοβη.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι πρόκειται για εξειδικευμένο μηχανισμό ανθεκτικότητας. Λαμβάνοντας υπόψη τη θετική συσχέτιση των DMIs – azoxystrobin και την αποτελεσματικότητα των υπόλοιπων παρεμποδιστών για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί το fludioxonil ως εναλλακτικό μυκητοκτόνο. Ήταν ο μόνος παρεμποδιστής που ήταν αποτελεσματικός και χωρίς να υπάρχει κάποια συσχέτιση με τους DMIs.

Το συμπέρασμα για τον εξειδικευμένο μηχανισμό ανθεκτικότητας ενίσχυσαν και τα πειράματα συνεργισμού με τον γενικευμένο παρεμποδιστή των P450s, PBO. Για την ακρίβεια, έδειξαν μη αποτοξικοποίηση μέσω μονοοξυγονασών και ανταγωνισμό για τη θέση δράσης. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι και το PBO και οι DMIs δρουν στην οικογένεια των P450s με το PBO να έχει ένα σχετικά ευρύ φάσμα δράσης (Feyereisen, 2014). Ακόμη, έχει αναφερθεί ανταγωνισμός μεταξύ των DMIs και των phosphorothiolate που δρουν επίσης σε P450s στο *Pyricularia oryzae* Cavara (Sugiura *et al.*, 2006). Σε σχέση με τους EBIs, συνεργιστική δράση του PBO έχει καταγραφεί μόνο για το fenpropimorph και όχι για τους DMIs (Leroux *et al.*, 2000).

Η μη σημαντική μείωση στην ευαισθησία των στελεχών σε μυκητοκτόνα άλλων ομάδων και ο μη συνεργισμός των DMIs με το PBO αποτέλεσαν σαφείς ενδείξεις ότι δεν υπάρχει ο μηχανισμός της αποτοξικοποίησης και ότι πρόκειται για εξειδικευμένο μηχανισμό ανθεκτικότητας. Προχωρήσαμε στην απομόνωση του γονιδίου στόχου CYP51 των DMIs έτσι ώστε να εξετάσουμε αν πρόκειται για μεταλλαγή στη θέση δράσης. Το 2009 οι Nikou *et al.*, ενισχύοντας περιοχή του CYP51 βρήκαν κάποιες μεταλλαγές οι οποίες όμως ήταν ουδέτερες και δεν επηρέαζαν το σημείο πρόσδεσης των παρεμποδιστών. Συγκεκριμένα, εντόπισαν την αντικατάσταση A169G μόνο στα πολύ ανθεκτικά στελέχη, αλλά η μεταλλαγή αυτή δεν προσέδιδε ανθεκτικότητα στους DMIs. Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξαν και οι Bolton *et al.* (2012), οι οποίοι παρουσίασαν τρεις παραλλαγές της πρωτεΐνης CYP51 χωρίς να τις συσχετίσουν με την ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στους DMIs.

Στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε η αντικατάσταση του E (γλουταμινικό οξύ) από K (λυσίνη) στη θέση 149 ως κοινή μεταλλαγή στα στελέχη που ήταν ανθεκτικά και στους τρεις

DMIs που μελετήθηκαν, ενώ δε βρέθηκε κάποια άλλη αντικατάσταση που να μπορεί να θεωρηθεί μεταλλαγή ανθεκτικότητας. Ο μηχανισμός αλλαγή στη θέση δράσης έχει αναφερθεί σε διάφορους μύκητες (Becher & Wirsel, 2012). Οι μεταλλαγές στο CYP51, συχνά, επηρεάζουν μεμονωμένα ή μια υποομάδα των DMIs δίνοντας θετική ή έλλειψη σχέσεων διασταυρωτής ανθεκτικότητας (Cools & Fraaije, 2013). Κοντά στο κωδικόνιο 149 που βρέθηκε η μεταλλαγή στην παρούσα μελέτη έχει αναφερθεί η μεταλλαγή M145L στο *Mycosphaerella graminicola* (Cools & Fraaije, 2013), η I145F στο *Phakopsora pachyrhizi* (Schmitz *et al.*, 2013) και η K147Q στο *Blumeria graminis f.sp. hordei* (Wyand & Brown, 2005) ως μεταλλαγές που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στους DMIs. Αυτά τα στοιχεία σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η μεταλλαγή αυτή υπάρχει μόνο στα στελέχη με ανθεκτικότητα και στους τρεις DMIs και όχι σε κάποιον άλλο φαινότυπο ανθεκτικότητας συγκλίνουν στο ότι η μεταλλαγή E149K αποτελεί μεταλλαγή ανθεκτικότητας. Προς το παρόν, στο μύκητα *C. beticola* ως μηχανισμός ανθεκτικότητας στους DMIs έχει βρεθεί η υπερέκφραση (Nίκου *et al.*, 2009; Bolton *et al.*, 2012).

Συνοπτικά, μπορούμε να πούμε πως στην προσπάθεια εύρεσης του μηχανισμού ανθεκτικότητας στους DMIs καταλήξαμε στο ότι πρόκειται για εξειδικευμένο μηχανισμό. Στο φαινότυπο ανθεκτικότητας και για τους τρεις DMIs φαίνεται ο μηχανισμός να είναι η αλλαγή στη θέση δράσης και συγκεκριμένα η μεταλλαγή E149K. Παρόλα αυτά, η αλλαγή στη θέση δράσης δεν εξηγεί τους υπόλοιπους φαινότυπους ανθεκτικότητας. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για να διαπιστωθεί αν υπάρχει και ο μηχανισμός της υπερέκφρασης, κάτι που αναμένεται σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Στην γεωργική πράξη απαιτείται προσοχή όσον αφορά τη χρήση μιγμάτων με DMIs και στρομπιλουρίνες και γενικά πρέπει να γίνεται προσεχτικός σχεδιασμός στα προγράμματα εφαρμογής μυκητοκτόνων ώστε να αποφεύγεται η πίεση επιλογής των DMIs. Επίσης, πρέπει να γίνει επιπλέον έρευνα μήπως τα εντομοκτόνα με συνεργιστή το PBO μειώνουν την παρεμποδιστική δράση των DMIs. Τέλος, ένας παρεμποδιστής που μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναντία της κερκοσπορίωσης και να αντιμετωπίσει και τα ανθεκτικά στους DMIs στελέχη είναι το fludioxonil, το οποίο σε πειράματα *in vitro* ήταν πολύ αποτελεσματικό.

Βιβλιογραφία

- Akins, Robert A. 2005. "An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*." *Medical Mycology* 43: 285-318.
- Anastasios A. Malandrakis, Anastasios N. Markoglou, Dimitra C. Nikou, John G. Vontas, Basil N. Ziogas. 2011. "Molecular diagnostic for detecting the cytochrome b G143S – QoI resistance mutation in *Cercospora beticola*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100 (1): 87-92.
- Anonymous. 1969. "DMI-Distribution maps of plat diseases." *Edition 4, Map No. 96*.
- . 2003. *Sugar and Sweetener Situation and Outlook Yearbook*. SSS-2003. Economic Research Service, U.S. Department of Agriculture: June 2003.
- Aoyama Y., Yoshida Y., Hata S., Nishino T. and Katsuki H. . 1983. "Buthiobate: A potent inhibitor of yeast cytochrome P-450 catalyzing 14-a demethylation of lanosterol." *Biochemical and Biophysical Research Communications* (115): 642.
- Barker Katherine S. and Rogers David. 2006. "Recent insights into the mechanisms of antifungal resistance." *Current Infectious Disease Reports* 8 (6): 449-456.
- Bartz J.A. and Mitchell J.E. . 1970. "Evidence for the metabolic detoxification of n-dodecylgouadinine acetate by ungerminated macroconidia of *Fusarium solani* f.sp. phaseoli ." *Phytopathology* (60): 350.
- becher R. and Wirsal SRG. 2012. "Fungal cytochrome P450 sterol 14a-demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens." *Applied Microbiology and Biotechnology* 95: 825-40.
- Becher R., Weihmann F., Deising HB. and Wirsal SGR. 2011. "Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses." *BMC Genomics* 12: 52.
- Bleiholder H and Weltzien HC . 1972. "Beitrage zur Epidimiologie von *Cercospora beticola* Sacc." *Phytopathologische Zeitschrift* 73, 46-68 and 93-114.
- Bolton Melvin D., Gary A. Secor, Viviana Rivera, John J. Weiland, Kurt Rudolph, Keshav Birla, Judith Rengifo, Larry G. Campbell. 2012. "Evaluation of the potential for sexual reproduction in field population of *Cercospora beticola* from USA." *Fungal Biology* (116): 511-516.

- Bolton Melvin D., Rivera-Varas Viviana, Rudolph Kurt D., Secor Gary A. 2012. "Characterization of CbCyp51 from field isolates of *Cercospora beticola*." *Phytopathology* (102): 298-305.
- Brent K.J and Hollomon D.W. 1998. "Fungicide Resistance: The assessment of risk." *FRAC Monograph No2. Global Crop Protection Federation (Brussels)* 1-48.
- Buchenauer, H. 1995. "DMI - fungicides - side effects on the plant and problems of resistance." In *Modern Selective Fungicides*. New York, 2nd edition, 259.
- Burden R.S., Cooke D.T., and Carter G.A. 1989. "Inhibitors of sterol biosynthesis and growth in plants and fungi." *Phytochemistry* 28: 1791.
- Byford, W.J. February 1996. "A survey of foliar diseases of sugar beet and their control in Europe." *Proceedings of the 59th IIRB Congress* 1-10.
- Canova, A. 1959. "Ricerca su la biologia e l'epidemiologia de la *Cercospora beticola* Sacc., Parte III." *Annali Della Sperimentazione Agraria, N.S., 13*, 477-479.
- Carlson, L.W. 1967. "Relation of weather factors to dispersal of conidia of *Cercospora beticola* (Sacc.)." *Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists* 14, 319-323.
- Chen FP., Fan JR., Zhou T., Liu JL. and Schnabel G. 2012. "Baseline sensitivity of *Monilinia fructicola* from China to the DMI fungicide SYP-Z048 and analysis of DMI-resistant mutants." *Plant Disease* 96: 416-22.
- Chuan-qing Zhang, Jin-wen Zhu, Fang-lin Wei, Shao-ying Liu, Guo-nian Zhu. 2007. "Sensitivity of *Botrytis cinerea* from greenhouse vegetables to DMIs and fenhexamid." *Phytoparasitica* 35 (3): 300-313.
- Cioni Franco, Marina Collina, Gianfranco Maines, Mohamed F. R. Khan, Gary A. Secor, Viviana V. Rivera. 2014. "A New Integrated Pest Management (IPM) Model for *Cercospora* Leaf Spot of Sugar Beets in the Po Valley, Italy." *SugarTech* 16 (1): 92-99.
- Cools H.J. and Fraaije B.A. 2013. "Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control." *Pest Management Science* 69: 150-5.
- Cools HJ. and Fraaije B.A. 2008. "Are azole fungicides losing ground against *Septoria tritici* wheat disease? Resistance mechanisms in *Mycosphaerella graminicola*." *Pest Management Science* 64: 681-4.

- Cools HJ., Hawkins NJ., and Fraaije B.A. 2013. "Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi." *Plant Pathology* 62 (Suppl. 1): 36-42.
- Cools HJ., Mullins LGL., Fraaije BA., et al. 2011. "Impact of recently emerged sterol 14a-demethylase (CYP51) variants of *Mycosphaerella graminicola* on azole fungicide sensitivity." *Applied and Environmental Microbiology* 77: 3830-7.
- Cowen LE., Kohn LM and Anderson JB. 2001. "Divergence in fitness and evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*." *Journal of Bacteriology* 183: 2971-8.
- Crous PW and Braun U. 2003. "*Mycosphaerella* and its anamorphs: I. Names published in *Cercospora* and *Passalora*." *CBS Biodiversity Series 1. Centraalbureauvoor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands*.
- Crute I, and Harrison. J. n.d. "Studies in the inheritance of resistance to metalaxyl in *Bremia lactucae* and on the stability and fitness of field isolates." *Plant Pathology* 231-250.
- D'Ambra, V., Mutto, S., Carula, G. 1974. "Sensibilita e tolleranza di isolati di *Cercospora beticola* sensibili e tolleranti al benomyl." *L'Ind. Saccarifera Ital.* 1 11-13.
- Daub M.E., and Ehrenshaft M. 2000. "The photoactivated cercospora toxin cercosporin: contributions to plantdisease and fundamental biology." *Annu. Rev. Phytopathol.* (38): 461-490.
- Davidse, L.C. 1982. "Benzimidazole compounds: selectivity and resistance." In *Fungicide Resistance in Crop Protection*, edited by J. Dekker and S.G Georgopoulos, 60.
- Davidse, L.C. 1982. "Benzimidazole compounds: selectivity and resistance." In *Fungicide Resistance in Crop Protection*, 60. J. Dekker and S. G. Georgopoulos.
- De Waard M. A. and Van Nistelrooy G. M. 1979. "Mechanism of resistance to fenarimol in *Aspergillus nididans*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 10: 219.
- De Waard M.A. and Van Nistelrooy J. G.M. 1984. "Differential accumulation of fenarimol by a wild-type isolate and fenarimol-resistant isolates of *Penicillium italicum*." *Netherlands Journal of Plant Pathology* 90: 143.
- De Waard M.A. and Van Nistelrooy J.G.M. 1990. "Stepwise development of laboratory resistance to DMI fungicides in *Penicillium italicum*." *Neth. J. Plant Pathol.* 96: 321.
- De Waard MA, Kipp EMC, Horn NM and van Nistelrooy JGM. 1986. "Variation in sensitivity to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in wheat powdery mildew." *Netherlands Journal of Plant Pathology* 92: 21-32.

- De Waard Maarten A., Alan C Andrade, Keisuke Hayashi, Henk-jan Schoonbeek, Ioannis Stergiopoulos and Lute-Harm Zwiars. 2006. "Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence." *Pest Management Science* 62 (3): 195–207.
- De Waard, M.A. 1997. "Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance." *Pesticide Science* 271-275.
- De Waard, M.A. 1994. "Resistance to Fungicides Which Inhibit Sterol 14a-Demethylation, an Historical Perspective, BCPC Monograph No 60." *Fungicide Resistance*, 3.
- Dekker J and Georgopoulos S.G. 1982. *Fungicide Resistance in Crop Protection Pudoc*. Wageningen.
- Dekker, J. 1995. "Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance." In *Modern Selective Fungicide (H Lyr, Ed)*. New York, 2nd edition, 23: Gustav Fischer Verlag.
- Dekker, J. n.d. "Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance." In *Modern Selective Fungicide*. New York, 1st edition, 233: Gustav Fisher Verlag.
- Dekker, J. 1977. "Resistance." *Systematic Fungicides* 19-52.
- Dekker, J. 1985. "The fungicide resistance problem : Will it grow worse?" *EPPO Bull.* (15): 337.
- Delp C.J and Dekker J. . 1985. "Fungicide resistance: Definitions and use of terms." *EPPO Bull* (15): 333-335.
- Delp, C.J. 1988. *Fungicide resistance in North America*. Minnesota: APS Press, ST. Paul.
- 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.
- Dux, H.; Sierotzki, H.; Meier-Runge, F.; Gisi, U. n.d. "Sensitivity of *Venturia inaequalis* populations to anilinopyrimidine, DMI and QoI fungicides." In *Modern fungicides and antifungal compounds IV: 14th International Reinhardsbrunn Symposium, Friedrichroda, Thuringia, Germany, April 25-29, 2004 2005* , 45-44.
- El-Kazzaz, MK. 1977. "Cercospora leaf spot disease of chard in Egypt." *Egyptian Journal of Phytopathology* 9, 81-82.

- Eveline Snelders, Simone M. T. Camps , Anna Karawajczyk, Gijs Schaftenaar, Gert H. J. Kema, Henrich A. van der Lee, Corné H. Klaassen, Willem J. G. Melchers, Paul E. Verweij. 2012. "Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus fumigatus*." *PLoS ONE* .
- Feyereisen, René. 2014. "Insect P450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities." *Pest Management Science* 3895.
- Fraaije BA., Cools HJ., Kim S-H., Motteram J., Clark WS. and Lucas JA. 2007. "A novel substitution I138V in the sterol 14a-demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides." *Molecular Plant Pathology* 8: 245-54.
- Frandsen, NO. 1955. "Über den Wirkkreis und die systematische Verwandtschaft von *Cercospora beticola*." *Archiv für Microbiologie* 22, 145-174.
- Fuchs A. and De Fries F.W. 1984. "Diastereomer-selective resistance in *Cladosporium cucumerinum* to triazole-type fungicides." *Pesticide Science* 15: 90.
- Gadher P., Mercer E., Baldwin B., and Wiggins T. 1983. "A comparison of the potency of some fungicides as inhibitors of sterol 14-demethylation ." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 19,1.
- Gadoury DM., Cadle-Davidson L., Wilcox WF., Dry IB., Seem RC. and Milgroom MG. 2012. "Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph." *Molecular Plant Pathology* 13: 1-16.
- Gasztonyi M. and Josepovits G. 1984. "Metabolism of some sterol inhibitors in fungi and higher plants, with special reference to the selectivity of fungicidal action." *Pesticide Science* 15: 48.
- Georgopoulos S. G. and Ziogas B. N. 1977. "A new class of carboxin-resistant mutant of *Ustilago maydis*." *Netherlands Journal of Plant Pathology* (83 (Suppl. 1)): 235.
- Georgopoulos S.G and Ziogas B.N. 1977. "A new class of carboxin-resistant mutant of *Ustilago maydis*." *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 83 (Suppl. 1) 235.
- Georgopoulos S.G. and Dovas C. 1973. "A serious outbreak of strains of *Cercospora beticola* resistant to benzimidazole fungicides in North Greece." *Plant Disease Rep.* (57): 321-324.
- Georgopoulos, S. 1976. "The genetics and biochemistry of resistance to chemicals in plant pathogens." *Proceedings of the American Phytopathological Society* 327-345.

- Georgopoulos, S.G. and Dovas, C. 1973. "Occurrence of *Cercospora beticola* strains resistant to benzimidazole fungicides in northern Greece." *Plant Dis. Rep.* 57 321-324.
- Georgopoulos, S.G. 1977. "Development of fungal resistance to fungicides." In *Antifungal Compounds*, edited by VOL 2 M. R. Siegel and H. D. Sisler, 439.
- Georgopoulos, S.G. 1982. "Genetical and Biochemical background of fungicide resistance." Edited by J. Dekker and S.G. Georgopoulos. *Fungicide Resistance in Crop Protection*.
- Georgopoulos, S.G. 1987. "The development of fungicide resistance. In: Wolfe, M.S., Caten, C.E. (Eds.), *Populations of Plant Pathogens: Their Dynamics and Genetics* ." *Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK* 239–251.
- Georgopoulos, S.G. 1995. "The genetics of fungicide resistance." In *Modern Selective Fungicides*, (H. Lyr, Ed), 39. New York, 2nd edition: Gustav Fischer Verlag.
- Giannopolitis, CN. 1978. "Lesions on sugarbeet roots caused by *Cercospora beticola*." *Plant Disease Reporter* 62, 424-427.
- Girling IJ, Hollomon DW, Kendall SJ, Loeffler RST and Senior IJ. 1988. "Effects of fenpropidin on DMI-resistant strains of *Erysiphe graminis* f.sp. hordei and *Rhynchosporium secalis*." *Proceedings of British Crop Protection Conference—Pests and Diseases* 385-390.
- Goodwin S.B., Dunkle L.D. and Zismann V.L. 2001. "Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA." *Phytopathology* (91): 648-658.
- Goudet C., Milat M.L., Sentenac H., and Tribaud J.B. 2000. "Beticolins, nonpeptidic, polycyclic molecules produced by the phytopathogenic fungus *Cercospora beticola*, as a new family of ion channel-forming toxins." *Mol. Plant-Microbe Interact.* 203-209 (13).
- Gulshan K. and Moye-Rowley WS. 2007. "Multidrug resistance in fungi." *Eukaryotic Cell* 6: 1933-42.
- Hamamoto H., Hasegawa K., Nakaune R., Lee Y. J., Makizumi Y., Akutsu K. and Hibi T. . 2000. "Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14_-demethylase gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*." *Appl. Environ. Microbiol.* (66): 3421-3426.

- Hawkins N., Cools HJ., Shaw Mw., Sierotzki H and Fraaije BA. 2011. "Molecular mechanisms of altered fungicide sensitivity in *Rhynchosporium secalis*." In *Modern Fungicides and Antifungal Compounds VI: Proceedings of the 16th International Reinhardsbrunn Symposium on Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, edited by Deising HB, Gisi U, Kuck KH, Russel PE, Lyr H Dehne HW, 12-34. Braunschweig, Germany, Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft.
- Hitchcock C.A, Barrett K.J and Russel N.J. 1987. "The lipid composition of azole-sensitive and azole-resistant strains of *Candida albicans*." *J. Gen. Microbiol.* (132): 2421.
- Holtschulte, B. 2000. "*Cercospora beticola*-worldwide distribution and incidence." In *Advances in sugar beet research Vol. 2*, 5-16.
- Jessica, Vereijssen. 2004. "Cercospora leaf spot in sugar beet. Epidemiology, life cycle components and disease management."
- Joseph-Horne T., Wood PM., Heppner C. and Hollomon D.W. 1999. "Involvement of the alternative oxidase in cellular energy production in the wheat Take-AII+ fungus, *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*." *Pesticide Science* 55: 367-370.
- Kalamaris A. E., De Waard M.A., Ziogas B.N. and Georgopoulos S.G. n.d. "Resistance to Fenarimol in *Nectria haematococca* var. *curcubita*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 40: 212.
- Karadimos, D.A., Ioannidis, P.I., Thanassouloupoulos, C.C. 2000. "The response of *Cercospora beticola* to benomyl." *Phytopathol. Mediterr.* 39: 329.
- Karaoglanidis G.S, Karadimos D.A., Ioannidis P.M., Ioannidis P.I. 2003. "Sensitivity of *Cercospora beticola* populations to fentin-acetate, benomyl and flutriafol in Greece." *Crop Protection* 22 735-740.
- Karaoglanidis G.S. and Karadimos D.A. 2006. "Cross-Resistance Patterns Among Sterol Biosynthesis Inhibiting Fungicides (SBIs) in *Cercospora beticola*." *Crop Protection* 25 (9): 977-983.
- Karaoglanidis G.S. and Thanassopoulos C.C., 2003. "Cross-Resistance Patterns Among Sterol Biosynthesis Inhibiting Fungicides (SBIs) in *Cercospora beticola*." *European Journal of Plant Pathology* 109 (9): 929-934.
- Karaoglanidis, G.S., Ioannidis, P.M., Thanassouloupoulos, C.C. 2001. "Influence of fungicide spray schedules on the sensitivity of *Cercospora beticola* to the sterol demethylation-inhibiting fungicide flutriafol." *Crop Prot.* 20: 941-947.

- Karaoglanidis, G.S., Ioannidis, P.M., Thanassouloupoulos, C.C. 2002. "Changes in sensitivity to sterol-demethylation-inhibiting fungicides of *Cercospora beticola* populations during a 4-year period in N. Greece." *Plant Pathol.* 51: 55-62.
- Karaoglanidis, G.S., Ioannidis, P.M., Thanassouloupoulos, C.C. 2000. "Reduced sensitivity of *Cercospora beticola* to sterol-demethylationinhibiting fungicides." *Plant Pathol.* 49: 567-572.
- Khan Mohamed F.R. and Smith Larry J. 2005. "Evaluating fungicides for controlling *Cercospora* leaf spot on sugar beet." *Crop Protection* (24): 79-86.
- King D.J., Wiseman A., Kelly D. and Kelly S.L. 1985. "Differences in the cytochrome P-450 enzymes of sterol C-14 demethylase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *Current Genetics* (10): 261.
- Koller, W. 1992. "Antifungal agents with target sites in sterol functions and biosynthesis." *Target of Fungicide Action* London 119.
- Kretschmer M., Leroch M., Mosbaxh A. et al. 2009. "Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*." *PLoS Pathogens* 5: e1000696.
- Leroux P and Gredt M. 1984. "Negative cross-resistance of benzimidazole resistant strains of *Botrytis cinerea*, *Fusarin nival* and *Pseudocercospora herpotrichoides* to various pesticides." *Neth. J. Pl. Pathol.* (95): 201.
- Leroux P and Walker AS. 2011. "Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14a-demethylase inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*." *Pest Management Science* 67: 44-59.
- Leroux P., Albertini C., Gautier A., Gredt M., and Walker A.S. 2007. "Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14a-demethylase inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*." *Pest Management Science* 63: 688-98.
- Leroux Pierre, Florence Chapeland, Annick Arlold and Michel Gredt. 2000. "New Cases of Negative Cross-resistance between Fungicides, Including Sterol Biosynthesis Inhibitors." *J. Gen. Plant Pathol.* 66: 75-81.
- Leroux, Pierre. 2007. "Chemical Control of *Botrytis* and its Resistance to Chemical Fungicides." *Botrytis: Biology, Pathology and Control* 195-222.

- Liu X., Yu F., Schnabel G., Wu J., Wang Z and Ma Z. 2011. "Paralogous cyp51 genes in *Fusarium graminearum* mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors." *Fungal Genetics and Biology* 48: 113-23.
- Losel, D.M. 1990. "Lipids in the Structure and Function of Fungal Membranes ." *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi* Springer Verlag, Berlin, 119.
- Luo CX. and Schnabel G. 2008. "The cytochrome p450 lanosterol 14a-demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia." *Applied and Environmental Microbiology* 74: 359-66.
- Ma Z.H., Proffer TJ, and Sundin G.W. 2006. "Overexpression of the 14a-demethylase target gene (CYP51) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*." *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2581-5.
- Markoglou AN and Ziogas BN. 1999. "Genetic control of resistance to fenpropimorph in *Ustilago maydis*." *Plant Pathology* 48: 521–530.
- Mavroeiidi V.I. and Shaw M.W. 2005. "Sensitivity distributions and cross-resistance patterns of *Mycosphaerella graminicola* to fluquinconazole, prochloraz and azoxystrobin over a period of 9 years." *Crop Protection* 24 (3): 259-266.
- McKay MB and Pool VW. 1918. "Field studies of *Cercospora beticola*." *Phytopathology* 8: 119-136.
- Mercer, E.I. 1984. "The biosynthesis of ergosterol." *Pesticide Science* 15 (133).
- Meredith, DS. 1967. "Conidium release and dispersal in *Cercospora beticola*." *Phytopathology* 57, 889-893.
- Misato T. and Ko K. 1975. "The development of resistance to agricultural antibiotics." *Environmental Quality and Safety* 437.
- Mischke, W. 1960. "Untersuchungen über den Einfluss des Bestandsklimas auf die Entwicklung der Ruben-Blattfleckenkrankheit (*Cercospora beticola* Sacc.) im Hinblick auf die Einrichtung eines Warndienstes." *Bayerisches Landwirtschaftliches Jahrbuch* 37, 197-227.
- Morschhauser, J. 2010. "Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi." *Fungal Genetics and Biology* 47: 94-106.
- Mulins JGL., Parker JE., Cools HJ et al. 2011. "Molecular modelling of the emergence of zole resistance in *Mycosphaerella graminicola*." *PLoS ONE* 6 e20973.

- Nachmias A. and Barash I. 1976. "Decreased permeability as a mechanism of resistance to methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in *Sporobolomyces roseus*." *Journal of General Microbiology* (94): 1665.
- Nakanishi T. and Oku H. 1970. "Mechanism of selective toxicity of fungicides: absorption metabolism and accumulation of pentachloronitrobenzene by phytopathogenic fungi." *Annn. Phytop. Soc. Japan* 36: 67.
- Nikou D., Malandrakis A., Konstantaki M., Vontas J., Markoglou A., Ziogas B. 2009. "Molecular characterization and detection of overexpressed C-14 alpha-demethylas-based DMI resistance in *Cercospora beticola* field isolates." *Pesticide Biochemistry and Physiology* (95): 18-27.
- Nuninger-Ney C, Schwinn FJ and Staub T. 1989. "In vitro selection of sterol-biosynthesis inhibitor (SBI)-resistant mutants in *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey." *Netherlands Journal of Plant Pathology* 95: 137–150.
- Olaya G and Koller W. 1999a. "Diversity of kresoxim-methyl sensitivities in baseline populations of *Venturia inaequalis*." *Pesticide Science* 55: 1083-1088.
- Orth A. B., Henry M. J. and Sisler H. D. 1990. "Mechanism of resistance to terbinafine in two isolates of *Ustilago maydis*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 37: 182.
- Pal, V. and Mukhopadhyay, A.N.,. 1985. "Occurrence of strains of *Cercospora beticola* resistant to carbendazim (MBC) in India." *Indian J. Mycol. Plant Pathol.* 13 333–334.
- Peever TB and Milgroom MG. 1993. "Genetic correlations in resistance to sterol biosynthesis inhibiting fungicides in *Pyrenophora teres*." *Phytopathology* 83: 1076–1082.
- Pool VW and McKay MB. 1916. "Climatic conditions as related to *Cercospora beticola*." *Journal Agricultural Research* 6, 21-60.
- Racca P. and Jorg E. 2007. "CERBET 3 - a forecaster for epidemic development of *Cercospora beticola*." *EPPO Bulletin* 37 (2): 344-349.
- Ruppel, E.G. and Scott, P.R. 1974. "Strains of *Cercospora beticola* resistant to benomyl in the USA." *Plant Dis. Rep* 58: 434-436.
- Ryley J. F., Wilson R. G. and Barrett-bee K. J. 1984. "Azole resistance in *Candida albicans*, *Sabouraundia*." *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 22: 53.
- Saccardo, P.A. 1876. "Fungi Veneti novi vel critici." *Series V. Nuovo Giornale Bot. Italiano* (8): 116-211.

- Scheinflug H. and Kuck K.H. n.d. "Sterol biosynthesis inhibiting piperazine, pyridine, pyrimidine andazole fungicides." In *Modern Selective Fungicides*. New York, 1st edition, 173.
- Schnabel G. and Jones AL. 2001. "The 14a-demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil." *Phytopathology* 91: 102-10.
- Schnabel. G., Jones A.L. . 2001. "The 14a-demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistance to myclobutanil." *Phytopathology* (91): 102-110.
- Schurnbrad, E. 1952. "Ein Beitrag zur Frage der Bedeutung der Sameninfektion durch *Cercospora beticola*." *Zucker* 13, 295-299.
- Schwinn, F.J. 1982. "Chemical control of fungal diseases: importance and problems." In *Fungicide Resistance in Crop Protection*, 7. J. Dekker and S.G. Georgopoulos.
- Shabi E., Katan T. and Marton K. 1983. "Inheritance of resistance to benomyl in isolates of *Venturia inaequalis*." *Israel Plant Pathology* 207-211.
- Shane, W.W. and Teng, P.S. 1992. "Impact of *Cercospora* leaf spot on root weight, sugar yield and purity of *Beta vulgaris*." *Plant Dis.* 76: 812-820.
- Sisler, H. D. 1988. "Fungicidal action and fungal resistance mechanisms." In *Fungicide Resistance in North America* (C. J. Delp, Ed), 6. , 6. C. J. Delp.
- Soylu S, Soylyu EM and Kurt S. 2003. "First report of *Cercospora* leaf spot on Swiss chard caused by *Cercospora beticola* Sacc. in Turkey." *Plant Pathology* 52 (804).
- Stammler G., Carstensen M., Koch A., Semar M., Strobel D. and Schlehuber S. 2008. "Frequency of different CYP51-haplotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and -field efficacy." *Crop Protection* 27: 1448-56.
- Stammler G., Cordero J., Koch A. and Schlehuber S. 2009. "Role of the Y134F mutation in *cyp51* and overexpression of *cyp51* in the sensitivity response of *Puccinia triticina* to epoxiconazole." *Crop Protection* 28: 891-7.
- Sugiura Hisao, Keisuke Hayashi, Toshinobu Tanaka, Mitsuaki Takenaka & Yasuhiko Uesugi. 1993. "Mutual Antagonism between Sterol Demethylation Inhibitors and Phosphorothiolate Fungicides on *Pyricularia oryzae* and the Implications for their Mode of Action*." *Pestic. Sci.* 39: 193-98.

- Sun X., Xu Q., Zhang T., Zhu C. and Li H. 2013. "PdMLE1, a specific and active transposon acts as a promoter and confers *Penicillium digitatum* with DMI resistance." *Environmental Microbiology Reports* 5: 135-42.
- T.M. Stewart, A.J. Perry and M.J. Evans. 2014. "Resistance of *Zymoseptoria tritici* to azoxystrobin and epoxiconazole in the lower North Island of New Zealand." *Agrichemicals* 308.
- Tamura H., Mizutani A., Yukioka H., Miki N., Ohba K. and Masuko M. 1999. "Effect of the methoxy iminoacetamide fungicide, SSF129, a respiratory activity of *Botrytis cinerea*." *Pesticide Science* 55: 681-686.
- Thakur JK., Arthanari H., Yang FJ et al. 2008. "A nuclear reporter-like pathway regulating multidrug resistance in fungi." *Nature* 452: 604-9.
- Thind TS, Clerjeau M and Olivier JM . 1986. " First observations on resistance in *Venturia inaequalis* and *Guignardia bidwellii* to ergosterol–biosynthesis inhibitors in France." *Proceedings of British Crop Protection Conference-Pests and Disease* 491-498.
- Trueman C.L., Hanson L.E., Rosenzweig N., Jiang Q.W.,and Kirk W.W. 2013. "First Report of QoI Insensitive *Cercospora beticola* on Sugar Beet in Ontario, Canada." *The American Phytopathological Society Journals* 97: 1255.
- Vanden Bossche H., Willemsens G and Marichal P. 1984. "Cytochrome P - 450 inhibitors at the origin of the deteriorated fungal membranes." *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, 307.
- Vanden Bossche, H. Vanden. 1990. "Importance and Role of Sterols in Fungal Membranes,." In *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi*, edited by Trinci A. P. J., Jung M. J., Goosey M. W. and Copping L. G. Kuhn P. J., 135.
- Vanden Bossche H., Marichal P., Gorrens J., Bellens D., Verhoeven H., Coene M.C., Lauwers W. and Janssen P.A.J. n.d. "Interaction of azole derivatives with cytochrome P-450 isozymes in yeast, fungi, plants and mammals cells." *Pesticide Science* 21, 289.
- Vanden, Bossche. 1990. "Importance and Role of Sterols in Fungal Membranes." In *Biochemistry of Cells Walls and Membranes in Fungi*, edited by Trinci A.P.J., Jung M.J., Goosey M.W., and Copping L.G., Eds. Kuhn P.J., 135.
- Vereijssen J., Schneider J.H.M., and Termorshuizen A.A.J. 2003. "Possible root infection of *Cercospora beticola* in sugarbeet." *Eur. J. Plant Path* (110): 103-106.

- Vereijssen, Jessica. 2004. *Cercospora leaf spot in sugar beet. Epidemiology, life cycle and disease management.*
- Vestal, EF. 1933. "Pathogenicity, host response and control of *Cercospora* leaf-spot of sugar beet." *Iowa Agricultural Research Station Bulletin* 168, 43-72.
- Vomovoyanni, E. 1974. "Multigenic control of ribosomal properties associated with cycloeximide sensitivity in *Neurospora crassa*." *Nature* 248-258.
- Walsh R.C and Sisler H.D. 1982. "A mutant of *Ustilago maydis* deficient in sterol C-14 demethylation. Characteristics and sensitivity to inhibitors of ergosterol biosynthesis." *Pesticide Biochemistry and Physiology* (18): 122.
- Weiland John and Koch Georg. 2004. "Pathogen profile: Sugarbeet leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.)." *Molecular Plant Pathology* 5 (3): 157-166.
- Weiland, J.J. and Halloin, J.M. 2001. "Benzimidazole resistance in *Cercospora beticola* sampled from sugarbeet fields in Michigan, USA." *Can. J. Plant Pathol.* 23 78-82.
- Wellmann H. and Schauz K. 1993. "DMI-resistance in *Ustilago maydis*. II. Effect of triadimefon on regenerating protoplasts and analysis of fungicide uptake." *Pesticide Science* 46: 55.
- Wolf, P.F.J. and Verreet, J.A. 2002. "The IPM sugar beet model: an integrated pest management system in Germany for the control of fungal leaf diseases in sugar beet. *Plant Dis.* 86, 336–344." *Plant Dis.* 86: 336–344.
- Wyand RA. and Brown JMK. 2005. "Sequence variation in the CYP51 gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides." *Fungal Genetics and Biology* 42: 726-35.
- Yoshida Y., and Aoyama Y. 1987. "Interaction of azole antifungal agents with cytochrome P-450 purified from *Saccharomyces cerevisiae* microsomes." *Biochemical Pharmacology* 36, 229.
- Yukioka H., Tanaka R., Inagaki S., Katoh K., Miki N., Mizutani A., Masuko M. and Kunoh H. 1997. "Mutants of the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea* deficient in alternative, cyanide-resistant respiration." *Fungal Genetics and Biology* 22: 221-228.
- Ziogas B.N and Girgis S. M. 1993. "Cross-resistance relationships between benzimidazole fungicides and diethofencarb in *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*." *Pesticide Science* (39): 109.

- Ziogas BN, Baldwin BC and Young JE . 1997. "Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*." *Pesticide Science* (50): 28-34.
- Αυγουλάς, Χ. 2013. "Η καλλιέργεια των ζαχαρότευτλων στην Ελλάδα: Ξαναγυρίσαμε στο 1960" *Ελληνική Γεωργία*.
- Αυγουλάς, Χ. 2014. "Τίτλοι τέλους για την καλλιέργεια των ζαχαρότευτλων στην Ελλάδα...." *Ελληνική Γεωργία*.
- Γεωργόπουλος Σ.Γ. και Ζιώγας Β.Ν. 1992. *Αρχές και Μέθοδοι Καταπολέμησης των Ασθενειών των Φυτών*. Αθήνα.
- Δημόπουλος, Β. 1992. *Διερεύνηση της ανθεκτικότητας στα τριαζολικά μυκητοκτόνα*. Αθήνα.
- Ζιώγας Β.Ν. και Μαρκόγλου Α.Ν. 2010. *Γεωργική Φαρμακολογία*. Αθήνα.
- Ζιώγας, Β. 2000. "Ανθεκτικότητα των φυτοπαθογόνων στα μυκητοκτόνα." *Γεωπονικά* 386: 9-19.
- Μαλανδράκης, Αναστάσιος Α. 2009. *Διερεύνηση της ανθεκτικότητας φυτοπαθογόνων μυκήτων στους παρεμποδιστές του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας*. Αθήνα: Διδακτορική διατριβή.
- Μαρκόγλου, Α. 1997. *Διερεύνηση της ανθεκτικότητας του μύκητα *Ustilago maydis* στα μορφολινικά μυκητοκτόνα*. Αθήνα.